

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Física Gleb Wataghin

**Microscopias de Óptica Não Linear: Fluorescência Excitada por  
Absorção de Dois Fótons, Geração de Segundo Harmônico e  
Geração de Terceiro Harmônico**

Dissertação de Mestrado

Vitor Bianchin Pelegati

Orientador: Carlos Lenz Cesar

Banca Examindora

Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz – DT/FMC/UNICAMP

Prof. Dr. José Antonio Roversi – DEQ/IFGW/UNICAMP

Este exemplar corresponde a redação final da dissertação de mestrado defendida pelo aluno Vitor Bianchin Pelegati e aprovada pela comissão julgadora.



Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

Campinas, Dezembro de 2010

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

P362m	<p>Pelegati, Vitor Bianchin</p> <p>Microscopias de óptica não linear : fluorescência excitada por absorção de dois fótons, geração de segundo harmônico e geração de terceiro harmônico / Vitor Bianchin Pelegati. -- Campinas, SP : [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Carlos Lenz Cesar. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".</p> <p>1. Microscopia. 2. Ótica não-linear. 3. Fluorescência excitada por dois fótons. 4. Geração de segundo harmônico. 5. Geração de terceiro harmônico. I. Cesar, Carlos Lenz. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(vsv/ifgw)</p>
-------	--

- **Título em inglês:** Non linear optical microscopies : Two photon excited fluorescence, Second harmonic generation and Third harmonic generation
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
  1. Microscopy
  2. Nonlinear optics
  3. Two photon excited fluorescence
  4. Second harmonic generation
  5. Third harmonic generation
- **Área de Concentração:** Física
- **Titulação:** Mestre em Física
- **Banca Examinadora:**

Prof. Carlos Lenz Cesar  
Profª Fátima Aparecida Böttcher Luiz  
Prof. José Antonio Roversi
- **Data da Defesa:** 21-12-2010
- **Programa de Pós-Graduação em:** Física

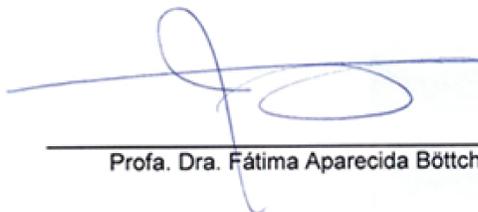
MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE VITOR BIANCHIN PELEGATI 010059 APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN", DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 21 / 12 / 2010.

**COMISSÃO JULGADORA:**



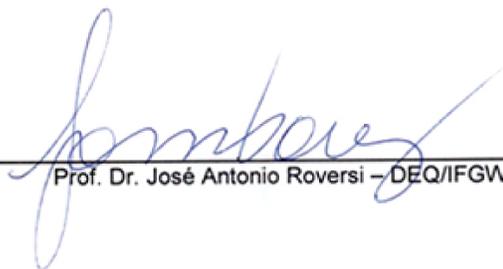
---

Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar- Orientador do Candidato  
DEQ/IFGW/UNICAMP



---

Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz – DT/FCM/UNICAMP



---

Prof. Dr. José Antonio Roversi – DEQ/IFGW/UNICAMP

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

Ao meu orientador, Carlos Lenz Cesar, pelos ensinamentos.

Aos meus pais, ao meu irmão e à minha família.

À Dayana pelo tempo de união e pelo carinho.

Aos meus colegas de trabalho, Wagner, Javier, André, Diogo, Gislaine, Daniela, Gustavo, Sílvio e Júlio.

Ao professor Hernandes Faustino de Carvalho, do instituto de biologia, e aos seus alunos Taize, Rafaela e Danilo.

À Unicamp pela oportunidade.

À agência CAPES pelo suporte financeiro.

## Resumo

Biologia celular é um novo mundo promissor com enorme impacto social, econômico e na saúde. Organismos vivos são capazes de, produzir a própria energia a partir da luz do sol, se reproduzir, de se auto-reparar, sinalizar e navegar por sinais bioquímicos, biomecânicos, luminosos, térmicos, e outros, e produzir materiais à temperatura ambiente.

As possibilidades abertas por essa área incluem, desde bactérias e protozoários usados para destruir células de câncer, regeneração de órgãos inteiros, produção de etanol a partir de algas, e outros. Entretanto, para o entendimento da biologia em seu nível mais profundo, ferramentas de observação não destrutivas fazem-se necessária para seguir os processos celulares durante seu tempo de vida. A óptica tem a única onda não destrutiva capaz de fornecer informações em tempo real com suficiente resolução espacial de eventos acontecendo internamente à célula. Ademais, porque feixes de luz não colidem, a óptica permite a integração de diferentes técnicas capazes de reunir informações simultâneas de processos celulares.

Óptica não linear é especialmente adequada para tal, pois não requer marcação ou processamentos especiais de amostras que poderiam destruir, ou modificar, os processos celulares. Além disso, técnicas elásticas, como a geração de segundo e terceiro harmônicos não liberam energia no material que é, portanto, preservado após a observação. O objetivo dessa tese é desenvolver uma plataforma multimodal para observação de processos biológicos pelo uso de microscopias de fluorescência excitada por absorção de dois fótons, geração de segundo harmônico e geração de terceiro harmônico no mesmo instrumento.

Nosso grupo foi pioneiro em demonstrar a aquisição de imagens de geração de segundo harmônico no Brasil e, essa tese é a primeira a realizar a aquisição de imagens por geração de terceiro harmônico. Estas três técnicas juntas fornecem informações complementares a respeito da organização de células e tecidos. Enquanto a fluorescência pode ser específica para algumas proteínas alvo, o segundo harmônico pode observar a rede

de colágeno da matriz extra celular e, o terceiro harmônico pode observar os núcleos e gotículas de lipídios internas às células.

Esta tese descreve o sistema experimental para realizar essas aquisições multimodais de imagens, a física por trás dos sinais não lineares, importantes para entender seu significado biológico, e mostra aplicações das técnicas para diferentes amostras biológicas e inorgânicas.

# Abstract

Cell biology is promising a brave new world with enormous social economic and health impacts. Living organisms are capable of producing their own energy from sun light, reproduce, self-repair, signalize and travel in response to biochemical, biomechanical, light and thermal signals among others, and to produce materials at room temperature.

The possibilities opened by this area range from bacteria and protozoa used to destroy cancer cells, whole organs regeneration, ethanol produced from algae, and others. However, to actually understand biology at its deepest level non destructive observation tools are necessary to follow cell processes during their time course. Optics is about the only wave capable to provide non destructive real time information with enough spatial resolution of the events happening inside the cells. Moreover, because light beams do not collide, optics allows the integration of different techniques capable to gather simultaneous information during a cell process.

Non linear optics is specially suited for that in the sense that it does not require staining or special sample processing that would destroy, or change, the process. Besides, elastic techniques such as second and third harmonic generation do not release energy at the material which is therefore preserved after the observation. The objective of this thesis is to develop a multimodality platform for biology process observation by using Two Photon Excited Fluorescence, Second Harmonic Generation and Third Harmonic Generation Microscopy with the same instrument.

Our group was the first one to demonstrate the acquisition of Second Harmonic Generation images in Brazil and this thesis is the first one to perform the acquisition of third harmonic generation images. These three techniques together provide complementary information respect to cell and tissue organization. While fluorescence can be specific target to some proteins, second harmonic can observe the collagen network of extra cellular matrix and the third harmonic can observe the nucleus and lipid droplets inside the cells.

This thesis describe the experimental setup to perform these multimodal image acquisition, the physics behind the non linear signals, important to understand their biological mean, and shows applications of these techniques for different biological and inorganic samples.

# Índice

Capítulo 1: Introdução	1
Capítulo 2: Teoria	7
2.1 Geração de Segundo e Terceiro Harmônicos:	
Modelo do Oscilador Clássico	7
2.1.1 Oscilador Harmônico	7
2.1.2 Oscilador não Harmônico	9
2.2 Fluorescência Excitada por Absorção de Dois Fótons	11
2.3 Geração de Segundo Harmônico	12
2.4 Representação do Espectro Angular	13
2.5 O Feixe Paraxial	15
2.6 Equação de Onda para Óptica Não Linear e Aproximação Paraxial	16
2.6.1 THG por um feixe Gaussiano Focalizado	20
2.7 Formulação de Green	23
Capítulo 3: Sistema Experimental	35
3.1 Laser de Ti:Safira	36
3.2 Alinhamento do Laser de Ti:Safira	48
3.3 O Sistema de Varredura e o Microscópio Confocal	52
3.4 Os Filtros para SHG e THG	55
3.5 Fotomultiplicadora	57

3.6 Montagem Experimental	59
3.7 Sistema para Caracterização do sinal de THG	64
Capítulo 4: Resultados	67
4.1 THG para uma interface Vidro-Ar	67
4.2 Resultados para Microscopia THG	71
4.3 Integração entre as Técnicas THG, SHG e TPEF	75
4.4 Microscopia NLO para Amostras Fixadas	79
Capítulo 5: Conclusões e Perspectivas	87
Apêndice A – Função de Green da equação de onda	89
Bibliografia	93

## Lista de abreviaturas e siglas

AOM	Acousto-Optic Modulator
CCD	Charge-Coupled Device
CW	Continuous Wave
DPSSL	Diode Pumped Solid State Laser
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
GVD	Group-Velocity Dispersion
HE	Hematoxylin and Eosin
HR	High Reflector
NLO	Non Linear Optics
OC	Output Coupler
REA	Representação do Espectro Angular
SHG	Second Harmonic Generation
THG	Third Harmonic Generation
TPEF	Two Photon Excited Fluorescence
PBS	Polarizing Beamsplitter
PMT	Photomultiplier Tube



# Capítulo 1

## Introdução

Uma das dificuldades para o estudo dos processos celulares é a falta de ferramentas que permitam a observação dos processos não destrutivamente, em tempo real, com resolução espacial sub-celular, tanto nos aspectos bioquímicos como biomecânicos. A observação de objetos transparentes, pode ser contornada com a inclusão de marcadores exógenos, mas para tal, o objeto em estudo deve ser transformado em algo que se adapte às técnicas de visualização. Microscopias ópticas que não requerem marcadores exógenos são especialmente adequadas ao estudo de processos celulares, pois não interferem nos mesmos.

Nos últimos anos várias ferramentas de microscopias de óptica não linear foram desenvolvidas, entre elas, a microscopia confocal multifóton, as microscopias SHG e THG [Second Harmonic Generation e Third Harmonic Generation]. Óptica não linear [NLO] é o estudo de fenômenos que ocorrem como consequência da modificação das propriedades ópticas do material. Fenômenos de óptica não linear são assim chamados no sentido de que eles ocorrem quando a resposta do material ao campo óptico aplicado depende de maneira não linear com a intensidade do feixe incidente.

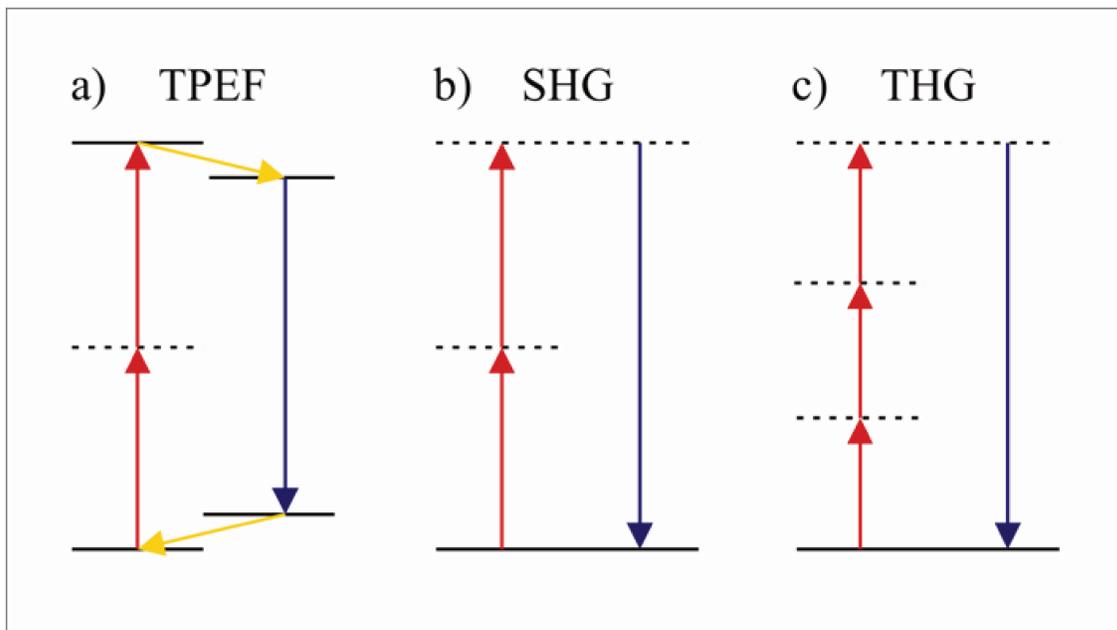
As microscopias SHG e THG não utilizam marcadores exógenos e, envolvendo mais de um fóton, são intrinsecamente confocais permitindo a reconstrução de imagens em 3 dimensões com resolução espacial sub-celular [~200-300 nm lateral e ~500-600 nm axial]. Em amostras animais a microscopia SHG visualiza a rede de colágeno, enquanto a microscopia THG visualiza heterogeneidades com contraste advindo do parâmetro  $\chi^{(3)}$ , que varia por ordens de grandeza em diferentes materiais.

No caso da microscopia multifóton, a fluorescência é excitada através de um processo de dois [Two-Photon Excitation Fluorescence – TPEF], ou mais, fótons, com o dobro do comprimento de onda dos processos de 1 fóton. Os processos multifótons também são intrinsecamente confocais, gerando luz apenas no foco do laser. Uma das principais

vantagens da microscopia confocal é a profundidade de observação na amostra. O espalhamento Rayleigh de luz depende do comprimento de onda, sendo 16 vezes menor para a excitação por dois fótons, comparada à de 1-fóton, portanto, enquanto microscopia confocal de 1 fóton, pode observar no limite, amostras com profundidades de até 150-200  $\mu\text{m}$ , a de dois fótons pode chegar a 700  $\mu\text{m}$ .

O grupo de Biofotônica, do Instituto de Física Gleb Wataghin, tem trabalhado no desenvolvimento de sistemas integrados com todas as técnicas modernas de óptica não linear. A microscopia confocal multifóton e SHG já foram desenvolvidas e geraram trabalhos aceitos para publicações. Porém a microscopia THG só agora pode ser implementada, após a chegada de um novo sistema laser de femtosegundos.

Uma forma de representar os processos de óptica não linear é através de diagramas de níveis de energia. A figura abaixo mostra os fenômenos de óptica não linear realizados no nosso trabalho.



*Figura 1.1: As setas possuem comprimento proporcional à energia  $\hbar\omega$  dos fótons (inversamente proporcional ao comprimento de onda) as linhas contínuas representam níveis de energia reais e as linhas tracejadas representam níveis de energia virtuais. A) Fluorescência excitada por absorção de dois fótons TPEF. B) Geração de segundo harmônico SHG. C) Geração de terceiro harmônico THG.*

As microscopias SHG e THG já foram utilizadas para:

- SHG + TPEF para estudar vesículas de lipídios<sup>1</sup>, neurônios<sup>2</sup>, células de neuroblastomas<sup>3</sup>, estruturas musculares e de tubulina<sup>4</sup> todas marcadas.
- THG + TPEF foi aplicado simultaneamente para fazer imagens de células gliais humanas<sup>5</sup>.
- SHG + THG utilizado para monitorar desenvolvimento de embrião e mitoses em peixe-zebra in vivo e estudar anisotropia não-linear de células musculares com profundidades de até 1,5 mm e resolução lateral de 0,4  $\mu\text{m}$ <sup>6</sup>.
- Cardiomiócitos<sup>7</sup>.
- Interfaces ou aplicações campos elétricos [como nos impulsos nervosos] quebram a simetria de inversão e permitem observação de SHG<sup>8</sup>.
- SHG gerados por colágenos<sup>9, 10</sup>, complexos de actina-miosina<sup>10</sup>.
- THG gerados em rizóides de algas verdes<sup>11</sup>, cloroplastos<sup>12</sup>, eritrócitos<sup>13</sup>, células epiteliais fixas, neurônios e musculares<sup>14</sup> e espículas larvais de ouriços-do-mar<sup>15</sup>.
- dinâmica intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>16</sup>.

---

<sup>1</sup> L. Moreaux, O. Sandre, and J. Mertz, "Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy," *J Opt Soc Am B* 17(10), 1685-1694 (2000).

<sup>2</sup> L. Moreaux, O. Sandre, S. Charpak, M. Blanchard-Desce, and J. Mertz, "Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy," *Biophys J* 80(3), 1568-1574 (2001).

<sup>3</sup> P. J. Campagnola, M. D. Wei, A. Lewis, and L. M. Loew, "High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation," *Biophys J* 77(6), 3341-3349 (1999).

<sup>4</sup> P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler, "Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues," *Biophys. J.* 82(1), 493-508 (2002).

<sup>5</sup> R. Barille, L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, P. Vacher, and T. Ducret, "Visualization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics with simultaneous two-photon-excited fluorescence and third-harmonic generation microscopes," *Appl Phys Lett* 79(24), 4045-4047 (2001).

<sup>6</sup> C.-K. Sun, S.-W. Chu, S.-Y. Chen, T.-H. Tsai, T.-M. Liu, C.-Y. Lin, and H.-J. Tsai, "Higher harmonic generation microscopy for developmental biology," *J. Struct. Biol.* 147, 19-30 (2004). S. W. Chu, S. Y. Chen, T. H. Tsai, T. M. Liu, C. Y. Lin, H. J. Tsai, and C. K. Sun, "In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy," *Opt Express* 11(23), 3093-3099 (2003). <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=OPEX-11-23-3093>

<sup>7</sup> V. Barzda, C. Greenhalgh, J. A. der Au, S. Elmore, J. van Beek and J. Squier, "Visualization of mitochondria in cardiomyocytes by simultaneous harmonic generation and fluorescence microscopy", *Optics Express*, Vol. 13, Issue 20, pp. 8263-8276 (2005)

<sup>8</sup> L. Sacconi, L. D. A. Dombeck and W. W. Webb, "Overcoming photodamage in second-harmonic generation microscopy: Real-time optical recording of neuronal action potentials", *PNAS* 103 (9) 3124-3129 (2006).

<sup>9</sup> I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher, "Connective-Tissue Polarity - Optical 2nd-Harmonic Microscopy, Crossed-Beam Summation, and Small-Angle Scattering in Rat-Tail Tendon," *Biophys J* 50(4), 693-712 (1986)

<sup>10</sup> Y. C. Guo, P. P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin, and R. R. Alfano, "Second harmonic tomography of tissues," *Opt. Lett.* 22(17), 1323-1325 (1997).

<sup>11</sup> J. A. Squier, M. Muller, G. J. Brakenhoff, and K. R. Wilson, "Third harmonic generation microscopy," *Opt Express* 3(9), 315-324 (1998). <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=OPEX-3-9-315>

<sup>12</sup> M. Muller, J. Squier, K. R. Wilson, and G. J. Brakenhoff, "3D microscopy of transparent objects using third-harmonic generation," *J Microsc-Oxford* 191, 266-274 (1998).

<sup>13</sup> A. C. Millard, P. W. Wiseman, D. N. Fittinghoff, K. R. Wilson, J. A. Squier, and M. Muller, "Third-harmonic generation microscopy by use of a compact, femtosecond fiber laser source," *Appl Optics* 38(36), 7393-7397 (1999).

<sup>14</sup> D. Yelin, D. Oron, E. Korkotian, M. Segal, and Y. Silberberg, "Third-harmonic microscopy with a titanium sapphire laser," *Appl Phys B-Lasers O* 74, S97-S101 (2002).

<sup>15</sup> D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, "Depth-resolved multiphoton polarization microscopy by third-harmonic generation," *Opt Lett* 28(23), 2315-2317 (2003).

Para que os processos de óptica não linear ocorram, é necessário que os múltiplos fótons coincidam no tempo e no espaço. Quando o elétron é excitado para o nível virtual, seu tempo de vida é extremamente curto, e de acordo com o princípio da incerteza, a população pode ficar em um estado virtual por um período de tempo da ordem de  $\hbar/\delta E$ , onde  $\delta E$  é a diferença de energia entre o nível virtual e o nível real mais próximo.

Os efeitos de óptica não linear podem ocorrer com lasers contínuos (continuous wave – cw), mas as potências devem ser tão altas que inviabilizam sua utilização, devido aos danos térmicos que causariam nas amostras. Para que os fótons coincidam no tempo, é necessário o uso de laser de pulsos ultracurtos.

Lasers de Titânio:Safira (Ti:Safira) produzem pulsos de aproximadamente 70fs com potência média de 3W e taxa de repetição de 80MHz (tempo de repetição de 12ns). A potência de pico ( $P_p$ ) para esse laser é de 530kW.

Com o uso de laser de pulsos ultracurtos os fótons passam a coincidir no tempo, por outro lado, a superposição espacial desses fótons será maior no foco do laser, conforme mostrado na figura 1.2. Isso nos dá a possibilidade de ajustar a potência do laser, para garantir que os efeitos de óptica não linear ocorram apenas na região em torno do foco do laser. Enquanto o processo de excitação por um fóton, processo linear, ocorre em todo o cone de luz incidente, os processos não lineares ocorrem apenas no foco.

---

<sup>16</sup> L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, R. Barille, P. Vacher, and P. Voisin, “Imaging of Ca<sup>2+</sup> intracellular dynamics with a third-harmonic generation microscope,” *Opt. Lett.* 26, 515-517 (2001).

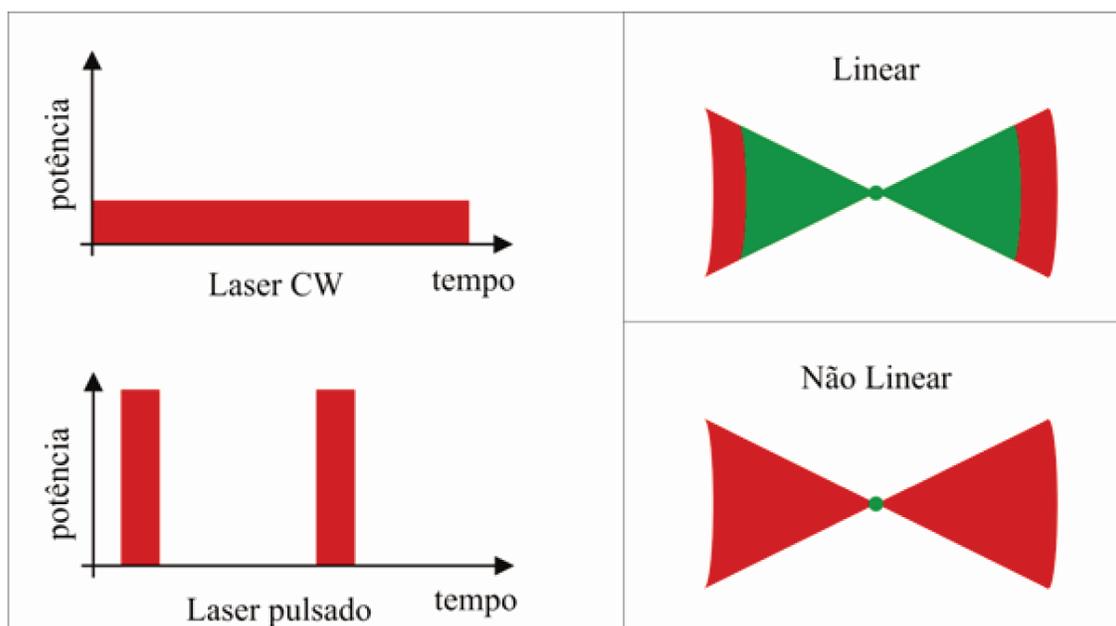


Figura 1.2: Diferença entre excitação por um e dois fótons

Para um processo linear, o número de eventos será proporcional à intensidade e à área, sendo,  $N \propto \frac{\text{potência}}{\text{área}} \times \text{área}$ . No caso dos processos não lineares, a intensidade é proporcional à  $I^n$ , e a quantidade de eventos será  $N \propto I^n \times \text{área} = \frac{\text{potência}^n}{\text{área}^{n-1}}$ . Isso significa que essa quantidade de eventos será inversamente proporcional à área, com maior ocorrência no foco, onde a área é menor.

Com essa característica é possível a construção de imagens em três dimensões sem a necessidade de nenhum outro dispositivo (na microscopia confocal é necessário o uso do pinhole), e a fluorescência pode ser detectada em qualquer posição.

No capítulo dois apresentamos descrições teóricas para a geração de terceiro harmônico com tratamento rigoroso, realizando cálculos analíticos para um caso especial de uma interface perpendicular ao eixo do laser usando a aproximação de feixe gaussiano. Também apresentamos explicações intuitivas para a geração de segundo harmônico e para a fluorescência de excitação por dois fótons.

No capítulo três discutimos o sistema experimental, apresentando cada componente da montagem. No decorrer do capítulo descrevemos os detalhes do alinhamento e das adaptações necessárias para a obtenção de imagens com máxima qualidade.

Os resultados do trabalho são apresentados no capítulo quatro, onde mostramos inúmeras imagens com as mais variadas aplicações, em que foram utilizadas como amostras materiais biológicos e não biológicos.

O capítulo cinco é reservado para as conclusões e perspectivas.

# Capítulo 2

## Teoria

O objetivo desse capítulo é apresentar o desenvolvimento matemático dos fenômenos de óptica não linear, estudados nessa tese. Explicações intuitivas são utilizadas para o SHG e TPEF, um tratamento mais rigoroso para esses dois fenômenos pode ser encontrado na dissertação de mestrado de André A. de Thomaz<sup>17</sup>.

Para o THG tivemos um tratamento mais rigoroso, trabalhando com a aproximação gaussiana para um feixe de laser e encontramos soluções analíticas para o caso particular de uma interface perpendicular ao eixo do laser.

## 2.1 Geração de Segundo e Terceiro Harmônicos: Modelo do Oscilador Clássico

### 2.1.1 Oscilador Harmônico

A geração de harmônicos pode ser explicada classicamente através de um modelo de um oscilador não harmônico. Em um oscilador harmônico a força restauradora é linear com o deslocamento  $F = -kx$ . Supondo uma força dissipativa proporcional à velocidade, a equação diferencial do oscilador harmônico amortecido não forçado é dada por:

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = -kx - b \frac{dx}{dt} \quad (2.1)$$

ou

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \omega_o^2 x = 0 \quad (2.2)$$

---

<sup>17</sup> Thomaz, A. A. “Ferramenta Biofotônica Integrada para Manipulações e Microscopias Confocais”. Dissertação de mestrado orientada por Carlos lenz César, defendida em dezembro de 2007

Onde  $\frac{b}{m} = \gamma$  e  $\frac{k}{m} = \omega_o^2$ . O deslocamento  $x$ , sem solução transiente, quando o oscilador é forçado com uma força  $F_o e^{i\omega t}$ , é dada por  $x(t) = x_o e^{i\omega t}$  com

$$x_o = \frac{1}{[\omega_o^2 - \omega^2 + i\gamma\omega]} \left( \frac{F_o}{m} \right) = \frac{1}{D(\omega)} \left( \frac{F_o}{m} \right) \quad (2.3)$$

Onde  $D(\omega) = [\omega_o^2 - \omega^2 + i\gamma\omega]$ . Para frequências muito altas  $\omega \gg \omega_o$ ,  $D(\omega) = -\omega^2$  e a amplitude de oscilação é atenuada com o quadrado do inverso da frequência  $x_o = -\frac{1}{\omega^2} \left( \frac{F_o}{m} \right)$ . Por outro lado para frequências baixas  $\omega \ll \omega_o$ ,  $D(\omega) = \omega_o^2$  e

o oscilador responde como no caso estático  $x_o = \frac{1}{\omega_o^2} \left( \frac{F_o}{m} \right) = \left( \frac{F_o}{k} \right)$ . Se  $\omega = \omega_o$  atingimos a

ressonância com uma amplitude amplificada dada por  $x_o = \frac{1}{i\gamma\omega} \left( \frac{F_o}{m} \right)$ . Em síntese, o

oscilador harmônico não responde para frequências muito acima da ressonância mas responde para frequências abaixo da ressonância, na forma  $F = -kx$ .

Quando uma onda eletromagnética incide sobre uma molécula ela força núcleos e elétrons. Devido à massa grande dos núcleos, a ressonância dos mesmos ocorre na região do infravermelho. Já os elétrons apresentam ressonância na região do ultravioleta podendo alcançar, dependendo da molécula, do visível ao infravermelho próximo. Nas frequências ópticas tipicamente utilizadas em experimentos de SHG/THG apenas os elétrons respondem aos campos eletromagnéticos. Nesse caso, cada elétron está sujeito a força  $F = -e E_o e^{i\omega t}$ . A resposta linear, supondo um oscilador harmônico amortecido é dada, então, por

$$x_o = \frac{1}{D(\omega)} \left( \frac{e E_o}{m} \right) \quad (2.4)$$

### 2.1.2 Oscilador Não Harmônico

Entretanto, a lei de Hooke  $F = -kx$  é apenas uma aproximação da realidade, válida para oscilações muito pequenas. Uma expansão em série de Taylor mostra que uma força mais geral seria dada por:

$$F = -kx - \beta x^2 - \eta x^3 - \dots \quad (2.5)$$

com termos cada vez menores à medida que a ordem da série cresce. Podemos utilizar o fato de que a influência dos termos de potências maiores são bem menores dos termos anteriores para desenvolver um método de aproximações sucessivas para resolver essa equação diferencial não linear.

Passo (1) desprezamos os termos  $x^{n>1}$  e encontramos  $x^{(0)}$  do oscilador harmônico

$$x^{(0)} = \frac{1}{D(\omega)} \left( \frac{e E_o}{m} \right) e^{i\omega t} \quad (2.6)$$

Passo (2): passamos esse  $[x^{(0)}]^n$  para o lado direito da equação do oscilador harmônico forçado como uma nova força:

No caso do SHG

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \omega_o^2 x = -\frac{\beta}{D(\omega)^2} \left( \frac{e E_o}{m} \right)^2 e^{i2\omega t} \quad (2.7)$$

No caso do THG

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \omega_o^2 x = -\frac{\eta}{D(\omega)^3} \left( \frac{e E_o}{m} \right)^3 e^{i3\omega t} \quad (2.8)$$

Substituindo soluções do tipo

$$\begin{aligned} x^{(2)} &= x_2 e^{i2\omega t} \\ x^{(3)} &= x_3 e^{i3\omega t} \end{aligned} \quad (2.9)$$

obtemos:

$$\mathbf{x}_2 = -\frac{\beta}{D(2\omega)D(\omega)^2} \left( \frac{\mathbf{e} E_o}{m} \right)^2 \quad (2.10)$$

e

$$\mathbf{x}_3 = -\frac{\eta}{D(3\omega)D(\omega)^3} \left( \frac{\mathbf{e} E_o}{m} \right)^3 \quad (2.11)$$

Esse é o modelo mais simples e desconsidera que os campos devem ser reais, ou que se deve combinar termos com  $e^{\pm i n \omega t}$ . Se tomarmos uma excitação da forma  $\cos(\omega t)$  o termo com  $\mathbf{x}^2$  levaria a  $\cos^2(\omega t) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(2\omega t)$ , com um termo DC, chamado de retificação óptica, e um termo com o dobro da frequência. Já o termo com  $\mathbf{x}^3$  levaria a  $\cos^3(\omega t) = \frac{3}{4} \cos(\omega t) + \frac{1}{4} \cos(3\omega t)$  gerando um sinal na mesma frequência e outra no terceiro harmônico.

É interessante também rever esse modelo simples em termos do vocabulário típico da óptica não linear. Sabemos que um dipolo oscilante é capaz de irradiar ondas eletromagnéticas e que esses dipolos podem ser criados pelo campo eletromagnético incidente. A densidade de dipolos de um meio  $P(\vec{E})$  pode ser expandida em série de Taylor  $P(\vec{E}) = P_o + \epsilon_o \chi^{(1)} : \vec{E} + \frac{1}{2} \epsilon_o \chi^{(2)} : \vec{E}\vec{E} + \frac{1}{6} \epsilon_o \chi^{(3)} : \vec{E}\vec{E}\vec{E}$  onde as suscetibilidades de primeira,  $\chi^{(1)}$ , segunda,  $\chi^{(2)}$  e terceira ordem,  $\chi^{(3)}$ , são tensores que dependem da frequência final do sinal gerado e dos campos incidentes. O sinal de SHG é gerado pelo termo  $\chi^{(2)}[2\omega : \omega, \omega] : \vec{E}_o \vec{E}_o e^{\pm i 2 \omega t}$  enquanto o sinal do THG é gerado pelo termo  $\chi^{(3)}[3\omega : \omega, \omega, \omega] : \vec{E}_o \vec{E}_o \vec{E}_o e^{\pm i 3 \omega t}$ .

A potência, ou intensidade em um oscilador é proporcional ao quadrado da amplitude,  $\mathbf{x}^2$ , enquanto a intensidade de um sinal eletromagnético é proporcional ao

quadrado da amplitude do campo elétrico  $I \propto E^2$ . Em consequência o sinal do SHG é proporcional a  $E_o^4 \propto I^2$ , enquanto o sinal do THG é proporcional a  $E_o^6 \propto I^3$ .

## 2.2 Fluorescência Excitada por Absorção de Dois Fótons

Na fluorescência por absorção de um fóton, um elétron é excitado de um estado fundamental para um estado excitado, de onde 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 proibidas e o processo de decaimento é lento. Esse processo é chamado fosforescência. Já os processos permitidos por spin são rápidos e chamados de fluorescência.

Na fluorescência por absorção de dois fótons, o processo é o mesmo, mas ao invés de um, dois fótons são necessários para a excitação do elétron. A diferença entre os dois processos é apenas o modo de excitação, a fluorescência emitida é a mesma<sup>18</sup>.

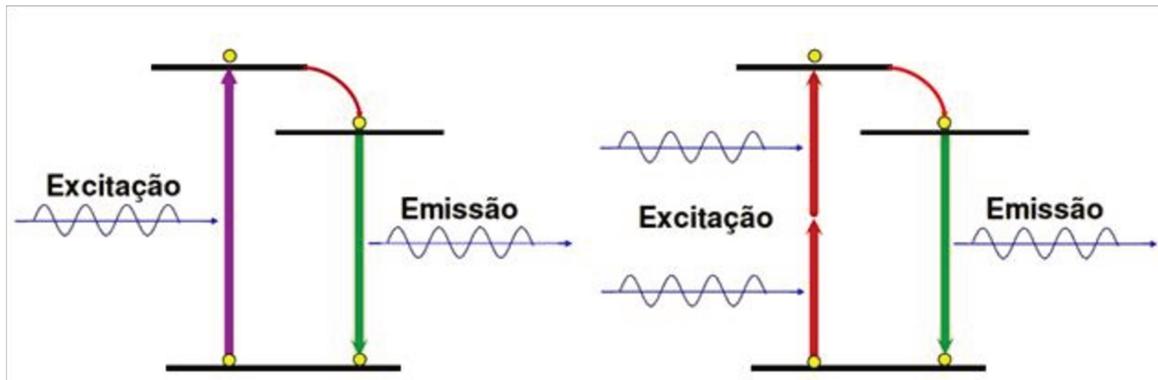


Figura 2.1: Excitação da molécula por um e dois fótons.

Como o processo por excitação de dois fótons precisa de dois fótons para excitação para cada fóton emitido, a intensidade do sinal gerado será proporcional ao quadrado da intensidade da excitação, e não será proporcional ao feixe de excitação com na absorção de

<sup>18</sup> 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.<sup>18</sup>

um fóton. Analogamente em um processo que necessita da absorção de três fótons, no caso da geração de terceiro harmônico, a intensidade do sinal depende da intensidade do feixe de excitação ao cubo.

A possibilidade de utilizar um comprimento de onda no infravermelho para excitação de moléculas que emitem no visível, ou ultravioleta (UV) é favorável para a penetração do laser na amostra. 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 com o dobro do comprimento de onda é 16 vezes menos espalhado, penetrando 16 vezes mais em amostras não absorvedoras. Considerando que amostras biológicas, de um modo geral, absorvem mais no visível do que no infravermelho, a penetração do feixe de excitação se torna ainda maior. Essa característica é relevante para todos os processos de óptica não linear descritos nesse trabalho.

## 2.3 Geração de Segundo Harmônico

Para o segundo harmônico faremos uma explicação intuitiva, que nos levará à principal característica desse fenômeno, mostrada no final dessa seção.

Partindo da equação 2.5 faremos uma operação de inversão, trocando  $x$  por  $-x$ .

$$F(-x) = -K(-x) - \beta(-x)^2 - \eta(-x)^3 + \dots \quad (2.12)$$

Para uma molécula com simetria de inversão, a força em uma posição  $-x$  deve ter o sinal trocado com relação a força em  $x$ . Assim  $F(-x) = -F(x)$ .

$$K(x) + \beta(x)^2 + \eta(x)^3 + \dots = -K(-x) - \beta(-x)^2 - \eta(-x)^3 - \dots \quad (2.13)$$

Para o termo dependente de  $x^2$  temos uma igualdade do tipo

$$+\beta(x)^2 = -\beta(-x)^2 \rightarrow 2\beta x^2 = 0 \quad (2.14)$$

A única solução é  $\beta = 0$ , a susceptibilidade de segunda ordem  $\chi^{(2)}$  também será zero. A conclusão é que para moléculas com simetria de inversão não teremos SHG.

Um bom gerador de SHG na biologia é o colágeno, que possui moléculas quiriais, a organização das moléculas também favorece o sinal de SHG, o colágeno se arranja em hélices triplas crescendo em fibras.

## 2.4 Representação do Espectro Angular

A representação do espectro angular (REA) é uma técnica matemática utilizada para descrever campos ópticos em meios homogêneos. O campo óptico é descrito com uma superposição de ondas planas e ondas evanescentes que são soluções intuitivas das equações de Maxwell. A REA é um método muito poderoso para descrever a propagação de feixes de laser e para focalização de luz. No limite paraxial, a REA torna-se idêntico ao método de óptica de Fourier.

A REA também é conhecida como expansão de Weyl, devido ao seu idealizador (Weyl, 1919)<sup>19</sup>. Mandel (1995)<sup>20</sup>, Richards e Wolf (1959)<sup>21,22</sup> e Novotny (2006)<sup>23</sup> fazem uso dessa técnica para descrever campos focalizados.

Supondo que um campo elétrico  $\vec{E}(\vec{r})$  em um ponto qualquer do espaço, no qual incluímos um eixo arbitrário,  $z$ , e consideramos o campo elétrico no plano  $z$  constante. Neste plano podemos avaliar a transformada de Fourier do campo elétrico como

$$\vec{e}(k_x, k_y; z) = \frac{1}{4\pi^2} \iint_{-\infty}^{\infty} \vec{E}(x, y, z) e^{-i[k_x x + k_y y]} dx dy \quad (2.15)$$

Similarmente, a transformada inversa é dado por

$$\vec{E}(x, y, z) = \frac{1}{4\pi^2} \iint_{-\infty}^{\infty} \vec{e}(k_x, k_y; z) e^{-i[k_x x + k_y y]} dk_x dk_y \quad (2.16)$$

<sup>19</sup> H. Weyl; "Ausbreitung elektromagnetischer Wellen über einem ebenen Leiter" Ann. Phys. (Leipzig), 60:481-500, 1919.

<sup>20</sup> L. Mandel; E. Wolf, "Optical Coherence and Quantum Optics", Cambridge University Press, New York, 1995.

<sup>21</sup> 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

<sup>22</sup> 21B. Richards, E. Wolf; "Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. 2. Structure of the Image Field in an Aplanatic System." Proc R Soc Lond Ser-A, 253(1274):258-279, 1959.

<sup>23</sup> L. Novotny, B. Hecht; "Principles of Nano-Optics", Cambridge University Press, New York, 2006.

Assumindo que o meio é homogêneo, isotrópico, linear e sem fontes (pelo menos no plano  $z = \text{constante}$ ). Desta maneira um campo óptico com frequência harmônica  $\omega$  satisfaz a equação vetorial de Helmholtz.

$$(\nabla^2 + k^2)\vec{E}(\vec{r}) = 0 \quad (2.17)$$

com  $k = n\omega/c$  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 (2.16) na equação de Helmholtz obtemos

$$\vec{e}(k_x, k_y; z) = \vec{e}(k_x, k_y; 0)e^{\pm ik_z z} \quad (2.18)$$

Esta equação descreve como um espectro de Fourier do campo elétrico no plano imagem ( $z$  constante) pode ser calculado multiplicando-se o espectro no plano objeto em  $z = 0$  por um fator  $e^{\pm ik_z z}$  (propagador). O sinal indica em qual dos semi-espacos a onda está se propagando. A definição de  $k_z$  com a parte imaginária positiva nos dá uma solução finita para todo o espaco  $z$ . Inserindo esse resultado na equação (2.16) temos

$$\vec{E}(x, y, z) = \iint_{-\infty}^{\infty} \vec{e}(k_x, k_y; 0) e^{-i[k_x x + k_y y \pm k_z z]} dk_x dk_y \quad (2.19)$$

Esta equação é conhecida como REA. Para o campo magnético  $\vec{H}$  a equação é similar. Para que a equação (1.5) obedeça as equações de Maxwell ainda é preciso impor a restrição  $\nabla \cdot \vec{E} = 0$ . Essa restrição implica em  $\vec{k} \cdot \vec{E} = 0$ , 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  $k_x, k_y$  e  $k_z$  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, o que dá origem a campos evanescentes. Essas duas soluções características são dadas por

$$\begin{aligned} e^{i[k_x x + k_y y]} e^{\pm i|k_z|z} & \quad k_x^2 + k_y^2 \leq k^2 \\ e^{i[k_x x + k_y y]} e^{-|k_z|z} & \quad k_x^2 + k_y^2 > k^2 \end{aligned} \quad (2.20)$$

A primeira equação em (2.20) 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 uma região  $k_x^2 + k_y^2 \leq k^2$ .

## 2.5 O feixe paraxial

Quando os campos se propagam ao longo de uma direção  $z$  ( $k$  quase paralelo ao eixo  $z$ ) e divergem muito lentamente na direção transversal ( $k_x$  e  $k_y$  muito pequenos quando comparados a  $k$ ), como na propagação de um feixe de laser, podemos fazer uma aproximação paraxial. Expandimos em série até primeira ordem,

$$k_z = \sqrt{1 - (k_x^2 + k_y^2) / k^2} \approx k - \frac{(k_x^2 + k_y^2)}{2k} \quad (2.21)$$

Esta aproximação é chamada aproximação paraxial e simplifica consideravelmente a integração das integrais de Fourier.

Vamos tratar agora do feixe Gaussiano, considerando-o linearmente polarizado, com uma distribuição Gaussiana na cintura do feixe (denotado por  $\omega_0$ ).

$$\vec{E}(x', y', 0) = \vec{E}_0 e^{-\frac{x'^2 + y'^2}{\omega_0}} \quad (2.22)$$

Onde as linhas denotam as coordenadas transversal no plano objeto ( $z = 0$ ) e sem linha no plano imagem ( $z$  constante). O espectro de Fourier em  $z = 0$  é então,

$$\vec{e}(k_x, k_y; z) = \frac{1}{4\pi^2} \iint_{-\infty}^{\infty} \vec{E}_0 e^{-\frac{x'^2 + y'^2}{\omega_0}} e^{-i[k_x x' + k_y y']} dx' dy' = \vec{E}_0 \frac{\omega_0^2}{4\pi} e^{-(k_x^2 + k_y^2) \frac{\omega_0^2}{4}} \quad (2.23)$$

Que também é uma função gaussiana. Inserindo a equação anterior na equação do REA (1.5), e usando a aproximação paraxial (2.21), obtemos

$$\vec{E}(x', y', 0) = \vec{E}_0 \frac{\omega_0^2}{4\pi} e^{ikz} \iint_{-\infty}^{\infty} e^{-(k_x^2 + k_y^2) \left( \frac{\omega_0^2}{4} + i \frac{z}{2k} \right)} e^{-i[k_x x' + k_y y']} dk_x dk_y \quad (2.24)$$

Integrando obtemos o resultado da representação paraxial de um feixe Gaussiano

$$\vec{E}(x', y', 0) = \frac{\vec{E}_0 e^{ikz}}{(1 + 2iz / k\omega_0^2)} e^{-\frac{(x^2 + y^2)}{\omega_0^2} \frac{1}{(1 + 2iz / k\omega_0^2)}} \quad (2.25)$$

Podemos reescrever esta equação usando os parâmetros  $z_0 = k\omega_0^2/2$  (comprimento de Rayleigh) e  $\rho^2 = x^2 + y^2$

$$\vec{E}(x', y', 0) = \vec{E}_0 \frac{\omega_0}{\omega(z)} e^{-\frac{\rho^2}{\omega^2(z)}} e^{i[kz - \eta(z) + k\rho^2/2R(z)]} \quad (2.26)$$

Onde

$$\begin{aligned} \omega(z) &= \omega_0 \sqrt{1 + z^2 / z_0^2} && \text{Cintura do feixe} \\ R(z) &= z \left(1 + z_0^2 / z^2\right) && \text{Raio de curvatura} \\ \eta(z) &= \arctan(z / z_0) && \text{Correção de fase} \end{aligned} \quad (2.27)$$

É importante notar que uma vez que a aproximação paraxial é introduzida, o campo elétrico não satisfaz mais as equações de Maxwell. O erro torna-se tanto maior quanto menor for a cintura do feixe. Quando  $\omega_0$  tornar-se comparável ao comprimento de onda no meio, mais termos da expansão em série (2.21) devem ser incluídos. Deve-se estar atento para o caso de feixes altamente focalizados, pois nessa situação, estas séries convergem muito mal e uma descrição mais acurada torna-se necessária.

Vamos usar o feixe Gaussiano para os cálculos analíticos do sinal de THG gerado em interfaces.

## 2.6 Equação de Onda para Óptica Não Linear e Aproximação Paraxial.

Começamos com as equações de Maxwell.

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho \quad (2.28)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (2.29)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (2.30)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{J} \quad (2.31)$$

Estamos interessados na solução para regiões que não possuem cargas livres, então  $\rho = 0$ , e que não possuem correntes,  $\vec{J} = 0$ . Assumimos que o material não é magnético  $\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$ . Entretanto o material é não linear no sentido que o campo  $\vec{D}$  e  $\vec{E}$  são relacionados por

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad (2.32)$$

Tomando o rotacional da equação (2.30) temos

$$\nabla \times \nabla \times \vec{E} + \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{D}}{\partial t^2} = 0 \quad (2.33)$$

Usando a equação (2.32) em (2.33) cada componente da frequência do feixe obedece a seguinte equação de onda

$$\nabla \times \nabla \times \vec{E} + \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = -\mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} \quad (2.34)$$

Onde

$$\nabla \times \nabla \times \vec{E} = \nabla(\nabla \cdot \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E} \quad (2.35)$$

O termo  $\nabla \cdot \vec{E}$  pode ser desconsiderado.

$$\vec{P} = \vec{P}^{(1)} + \vec{P}_{nl} \quad (2.36)$$

$$\vec{D} = \vec{D}^{(1)} + \vec{P}_{nl} \quad (2.37)$$

$$-\nabla^2 \vec{E} + \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{D}^{(1)}}{\partial t^2} = -\mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}_{nl}}{\partial t^2} \quad (2.38)$$

Queremos encontrar o campo no meio não linear e isotrópico

$$\vec{D} = \varepsilon_o \vec{E} + \vec{P} \quad (2.39)$$

$$\vec{P} = \varepsilon_o \chi^{(1)} \vec{E} + \vec{P}_{nl} \quad (2.40)$$

$$\vec{D} = \varepsilon_o \vec{E} + \varepsilon_o \chi^{(1)} \vec{E} + \vec{P}_{nl} = \varepsilon_o [1 + \chi^{(1)}] \vec{E} + \vec{P}_{nl} = \varepsilon_o \varepsilon^{(1)} \vec{E} + \vec{P}_{nl} = \varepsilon \vec{E} + \vec{P}_{nl} \quad (2.41)$$

Aplicando na equação 2.38

$$-\nabla^2 \vec{E} + \frac{1}{c^2} \varepsilon^{(1)} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = -\mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}_{nl}}{\partial t^2} \quad (2.42)$$

Essa equação é da forma de uma equação de onda forçada (não homogênea). O termo não linear age como uma fonte. Para um meio dispersivo devemos considerar cada frequência separadamente.

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \sum_{n>0} \vec{E}_n(\vec{r}, t) \quad (2.43)$$

$$\vec{D}^{(1)}(\vec{r}, t) = \sum_{n>0} \vec{D}_n^{(1)}(\vec{r}, t) \quad (2.44)$$

$$\vec{P}_{nl}(\vec{r}, t) = \sum_{n>0} \vec{P}_{nl}(\vec{r}, t) \quad (2.45)$$

Onde

$$\vec{E}_n(\vec{r}, t) = \vec{E}_n(\vec{r}) e^{-i\omega_n t} + c.c. \quad (2.46)$$

$$\vec{D}_n(\vec{r}, t) = \vec{D}_n(\vec{r}) e^{-i\omega_n t} + c.c. \quad (2.47)$$

$$\vec{P}_{nl,n}(\vec{r}, t) = \vec{P}_{nl,n}(\vec{r}) e^{-i\omega_n t} + c.c. \quad (2.48)$$

Introduzindo as equações (2.43) à (2.48) na equação (2.38) temos uma equação análoga à equação (2.42) válida para cada frequência.

$$\nabla^2 \vec{E}_n - \frac{1}{c^2} \varepsilon^{(1)} \frac{\partial^2 \vec{E}_n}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}_{nl,n}}{\partial t^2} \quad (2.49)$$

Com

$$\vec{E}_n(\vec{r}, t) = \vec{A}_n(\vec{r})e^{i(k_n z - \omega_n t)} + c.c. \quad (2.50)$$

$$\vec{P}_{nl,n}(\vec{r}, t) = \vec{p}_n(\vec{r})e^{i(k'_n z - \omega_n t)} + c.c. \quad (2.51)$$

Aqui  $\vec{E}_n(\vec{r}, t)$  e  $\vec{P}_{nl,n}(\vec{r}, t)$  podem representar ondas não planas permitindo que as amplitudes complexas  $\vec{A}_n(\vec{r})$  e  $\vec{p}_n(\vec{r})$  variarem espacialmente. Sendo  $z$  a direção dominante de propagação da onda  $\vec{E}_n(\vec{r}, t)$  é útil expressarmos o laplaciano como

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial z^2} + \nabla_T^2 \quad (2.52)$$

Onde o laplaciano transversal em coordenadas retangulares é dado por

$$\nabla_T^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \quad (2.53)$$

A equação (2.49) fica

$$\left[ \frac{\partial^2 \vec{A}_n}{\partial z^2} + 2ik_n \frac{\partial \vec{A}_n}{\partial z} - k_n^2 \vec{A}_n + \nabla_T^2 \vec{A}_n + \frac{\varepsilon^{(1)} \omega_n^2}{c^2} \vec{A}_n \right] e^{i(k_n z - \omega_n t)} = -\mu_0 \omega_n^2 \vec{p}_n e^{i(k'_n z - \omega_n t)} \quad (2.54)$$

Como  $k_n^2 = \varepsilon^{(1)} \omega_n^2 / c^2$  o terceiro e o quinto termo do lado esquerdo da equação (2.54) se cancelam. Pode-se abandonar o primeiro termo da equação (2.54) que é muito menor do que o segundo. Essa aproximação é conhecida como slow-varying amplitude approximation (SVAA) e é válida quando

$$\left| \frac{\partial^2 \vec{A}_n}{\partial z^2} \right| \ll \left| k_n \frac{\partial \vec{A}_n}{\partial z} \right| \quad (2.55)$$

e

$$\left| \frac{\partial^2 \vec{A}_n}{\partial t^2} \right| \ll \omega_n \left| \frac{\partial \vec{A}_n}{\partial t} \right| \quad (2.56)$$

Para que essa aproximação seja aplicável para pulsos de laser de femtosegundos, a equação (2.56) requer que a duração do pulso do laser seja significativamente maior do que

a oscilação da onda eletromagnética. No nosso caso, com um pulso de aproximadamente 100fs com  $\lambda=300\text{nm}$ , o período de oscilação é aproximadamente 1fs. A duração do pulso é duas ordens de grandeza maior do que a onda. Sendo assim a aproximação pode ser usada.

$$2ik_n \frac{\partial \vec{A}_n}{\partial z} + \nabla_T^2 \vec{A}_n = -\mu_0 \omega_n^2 \vec{P}_n e^{i(k'_n - k_n)z} \quad (2.57)$$

onde  $(k'_n - k_n) = \Delta k$ .

### 2.6.1 THG por um feixe Gaussiano Focalizado

Por generalização, iremos considerar a geração do q-ésimo harmônico. De acordo com a equação (2.57) a amplitude  $A_q$  da componente de frequência  $\omega_q = q\omega$  do campo deve obedecer à equação

$$2ik_q \frac{\partial A_q}{\partial z} + \nabla_T^2 A_q = -\frac{\omega_q^2}{c^2} \chi^{(q)} A_1^q e^{i\Delta k z} \quad (2.58)$$

onde  $\Delta k = (qk_1 - k_q)$  e onde definimos a amplitude complexa  $p_q$  referente à polarização não linear igual à  $p_q = \varepsilon_0 \chi^{(q)} A_1^q$ . Aqui  $\chi^{(q)}$  é a susceptibilidade não linear que descreve a geração do q-ésimo harmônico,  $\chi^{(q)} = \chi^{(q)}(q\omega = \omega + \omega + \dots + \omega)$ , e  $A_1$  é a amplitude complexa da onda fundamental, que pode ser descrita por um feixe gaussiano dado pela equação (2.25) da forma.

$$A_1(r, z) = \frac{B_1}{1 + i\zeta} e^{-r^2/w_0^2(1+i\zeta)} \quad (2.59)$$

onde  $\zeta = 2z/b$  e  $b = kw_0$  é o parâmetro confocal.

Trabalhamos com a aproximação de bombeio constante. Resolvemos a equação (2.58) adotando a solução teste

$$A_q(r, z) = \frac{B_q(z)}{1 + i\zeta} e^{-qr^2/w_0^2(1+i\zeta)} \quad (2.60)$$

onde  $B_q(z)$  é função de  $z$ . A solução possui a mesma dependência radial do termo da fonte (2.58) e o mesmo parâmetro confocal de (2.59). Esse comportamento faz sentido, pois a onda harmônica é coerente. Se a solução (2.60) é substituída em (2.58) verificamos que ela satisfaz essa equação enquanto  $B_q(z)$  obedecer à seguinte equação diferencial.

$$\frac{dB_q(z)}{dz} = \frac{i\omega_q^2 \chi^{(q)}}{2k_q c^2} \frac{B_1^q}{(1+i\zeta)^{q-1}} e^{i\Delta k z} \quad (2.61)$$

Por integração direta obtemos

$$B_q = \frac{i\omega_q^2 \chi^{(q)}}{2k_q c^2} B_1^q J_q(\Delta k, z_0, z) \quad (2.62)$$

onde

$$J_q(\Delta k, z_0, z) = \int_{-z_0}^z \frac{e^{i\Delta k z'} dz'}{(1+2iz'/b)^{q-1}} \quad (2.63)$$

Para o caso de um feixe altamente focalizado no interior de um meio não linear, temos que  $b \ll |z_0|, |z|$  nesse limite a integral em (2.62) pode ser aproximada substituindo os limites de integração por infinito.

$$J_q(\Delta k, z_0, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{i\Delta k z'} dz'}{(1+2iz'/b)^{q-1}} \quad (2.64)$$

Essa integral é resolvida por meio de uma integral de contorno. A solução de  $J_q$  é dada pelo resíduo.

$$J = 2\pi i \text{Res}[f(z)] \quad (2.65)$$

Como  $z_0 = ib/2$ . O resíduo é dado por

$$Res[f(z)] = \frac{1}{(q-2)!} \lim_{z \rightarrow z_0} \left( \frac{d^{q-2}}{dz^{q-2}} \left[ (z-ib/2)^{q-1} \left( \frac{b}{2i} \right)^{q-1} \frac{e^{i\Delta k z}}{(z-ib/2)^{q-1}} \right] \right) \quad (2.66)$$

Derivando temos

$$Res[f(z)] = \frac{1}{(q-2)!} \left( \frac{b}{2i} \right)^{q-1} (i\Delta k)^{q-2} e^{-\Delta k b/2} \quad (2.67)$$

Pelo lema de Jordan para  $\Delta k \leq 0$ ,  $J = 0$ .

$$J_q(\Delta k, z_0, z) = \begin{cases} 0 & \Delta k \leq 0 \\ \frac{\pi b^{q-1} \Delta k^{q-2}}{2^{q-2} (q-2)!} e^{-\Delta k b/2} & \Delta k > 0 \end{cases} \quad (2.68)$$

No nosso caso, para  $q=3$ .

$$J_q(\Delta k, z_0, z) = \begin{cases} 0 & \Delta k \leq 0 \\ \frac{\pi b^2 \Delta k}{2} e^{-\Delta k b/2} & \Delta k > 0 \end{cases} \quad (2.69)$$

O resultado mostra de que a geração de terceiro harmônico no limite de um feixe fortemente focalizado desaparece para a condição de perfeito phase-matching ( $\Delta k = 0$ ) e é maximizado através de  $\Delta k$  positivo. Esse comportamento pode ser entendido em termos da mudança de fase de  $\pi$  radianos que ocorre no foco de qualquer feixe focalizado.

Esta anomalia de fase, que leva o nome de mudança de fase de Gouy (1890), tem consequências importantes para a óptica não linear, porque em geral, a polarização  $p_q = \chi^{(q)} A_1^q$  experimenta uma mudança de fase que é  $q$  vezes maior do que a experimentada pelo feixe incidente. Consequentemente a polarização não linear não acoplará corretamente com o feixe incidente ao menos que haja uma incompatibilidade dos vetores de onda  $\Delta k$ , que compensará a mudança de fase devido à passagem do feixe pelo foco.

Esse resultado tem grande importância para a microscopia THG, e implica que o mesmo não pode ser obtido de uma estrutura com grande volume. Resultado que foi

primeiro demonstrado por Boyd<sup>24</sup> e precedeu a primeira microscopia<sup>25</sup> por geração de terceiro harmônico realizada por Silberberg.

## 2.7 Formulação de Green

Os resultados obtidos na sessão anterior são para um modelo em duas dimensões. Silberberg<sup>25</sup> mostrou que o terceiro harmônico também é gerado em interfaces perpendiculares ao eixo óptico.

Em microscopia THG estamos interessados nos sinais gerados em amostras com tamanhos e formas diferentes, além disso, a aproximação paraxial não é mais válida em condições de forte focalização. Outro modelo para microscopia THG, formulado por Xie e Cheng<sup>26</sup>, resolve os resultados através da função de Green.

Vamos iniciar a partir das equações de Maxwell.

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \rightarrow \vec{B} = \nabla \times \vec{A} \quad (2.67)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (2.68)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\nabla \times \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \rightarrow \nabla \times \left[ \vec{E} + \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} \right] = 0 \rightarrow \vec{E} + \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} = -\nabla \phi \quad (2.69)$$

O campo elétrico em termo do potencial e o potencial vetor é dado por

$$\vec{E} = -\frac{\partial \vec{A}}{\partial t} - \nabla \phi \quad (2.70)$$

O campo no meio não linear é dado pela equação 2.41 e o campo elétrico é

<sup>24</sup> R. Boyd, *Nonlinear Optics* (Academic, New York, 1992)

<sup>25</sup> Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, and Y. Silberberg, "Nonlinear scanning laser microscopy by third-harmonic generation," *Appl. Phys. Lett.* 70, 922–924 (1997).

<sup>26</sup> J.-X. Cheng and X. S. Xie, "Green's function formulation for third harmonic generation microscopy," *J. Opt. Soc. Am. B* 19, 1604–1610 (2002)

$$\nabla \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\varepsilon} - \frac{1}{\varepsilon} \nabla \cdot \vec{P}_{nl} \quad (2.71)$$

Substituindo o campo elétrico dado pela equação (2.70) em (2.70) temos.

$$\nabla \cdot \left[ -\frac{\partial \vec{A}}{\partial t} - \nabla \phi \right] = \frac{\rho}{\varepsilon} - \frac{1}{\varepsilon} \nabla \cdot \vec{P}_{nl} \rightarrow -\frac{\partial}{\partial t} \nabla \cdot \vec{A} - \nabla^2 \phi = \frac{\rho}{\varepsilon} - \frac{1}{\varepsilon} \nabla \cdot \vec{P}_{nl} \quad (2.72)$$

$$\nabla^2 \phi + \frac{\partial}{\partial t} \nabla \cdot \vec{A} = -\frac{\rho}{\varepsilon} + \frac{1}{\varepsilon} \nabla \cdot \vec{P}_{nl} \quad (2.73)$$

A partir da lei de Ampère queremos escrever as equações diferenciais para o potencial vetor e para o potencial elétrico, tendo a polarização como fonte.

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{J} + \frac{\partial}{\partial t} \vec{D} \quad (2.74)$$

$$\nabla \times \mu \vec{H} = \mu \vec{J} + \mu \frac{\partial}{\partial t} \vec{D} \rightarrow \nabla \times \vec{B} = \mu \vec{J} + \mu \frac{\partial}{\partial t} [\varepsilon \vec{E} + \vec{P}_{nl}] \quad (2.75)$$

$$\nabla \times \nabla \times \vec{A} = \mu \vec{J} + \mu \varepsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \mu \frac{\partial \vec{P}_{nl}}{\partial t} \rightarrow \nabla \times \nabla \times \vec{A} - \mu \varepsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} = \mu \vec{J} + \mu \frac{\partial \vec{P}_{nl}}{\partial t} \quad (2.76)$$

$$-\nabla^2 \vec{A} + \nabla \nabla \cdot \vec{A} + \mu \varepsilon \frac{\partial^2 \vec{A}}{\partial t^2} + \nabla \frac{\partial}{\partial t} [\mu \varepsilon \phi] = \mu \vec{J} + \mu \frac{\partial \vec{P}_{nl}}{\partial t} \quad (2.77)$$

$$\nabla^2 \vec{A} - \mu \varepsilon \frac{\partial^2 \vec{A}}{\partial t^2} - \nabla \left[ \nabla \cdot \vec{A} + \mu \varepsilon \frac{\partial \phi}{\partial t} \right] = -\mu \vec{J} - \mu \frac{\partial \vec{P}_{nl}}{\partial t} \quad (2.78)$$

Introduzindo o Gauge de Lorentz nas equações (2.78) e (2.73) :  $\nabla \cdot \vec{A} + \mu \varepsilon \frac{\partial \phi}{\partial t} = 0$

$$\nabla^2 \vec{A} - \mu \varepsilon \frac{\partial^2 \vec{A}}{\partial t^2} = -\mu \vec{J} - \mu \frac{\partial \vec{P}_{nl}}{\partial t} \quad \nabla^2 \vec{A} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{A}}{\partial t^2} = -\mu \vec{J} - \mu \frac{\partial \vec{P}_{nl}}{\partial t} \quad (2.79)$$

$$\nabla^2 \phi - \mu \varepsilon \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} = -\frac{\rho}{\varepsilon} + \frac{1}{\varepsilon} \nabla \cdot \vec{P}_{nl} \quad \nabla^2 \phi - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} = -\frac{\rho}{\varepsilon} + \frac{1}{\varepsilon} \nabla \cdot \vec{P}_{nl} \quad (2.80)$$

Considerando o meio dielétrico:  $\rho = 0$  e  $\vec{J} = 0$

$$\nabla^2 \bar{A} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \bar{A}}{\partial t^2} = -\mu \frac{\partial \bar{P}_{nl}}{\partial t} \quad (2.81)$$

$$\nabla^2 \phi - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} = \frac{1}{\varepsilon} \nabla \cdot \bar{P}_{nl} \quad (2.82)$$

Para resolver as equações (2.68) e (2.82) vamos usar a função de Green

$$\nabla^2 G(\vec{r}, t; \vec{r}', t') - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 G(\vec{r}, t; \vec{r}', t')}{\partial t^2} = -\delta(\vec{r} - \vec{r}') \delta(t - t') \quad (2.83)$$

que tem a seguinte solução, demonstrado no apêndice A<sup>27</sup>

$$G(\vec{r}, t; \vec{r}', t') = \frac{\delta\left[t - t' - \frac{nR}{c}\right]}{4\pi R} \quad (2.84)$$

com  $R = |\vec{r} - \vec{r}'|$

O que nos leva às seguintes equações

$$\bar{A} = -\mu \iint \frac{\delta\left[t - t' - \frac{nR}{c}\right]}{4\pi R} \frac{\partial \bar{P}_{nl}(\vec{r}', t')}{\partial t'} dV' dt' \quad (2.85)$$

$$\phi = \frac{1}{\varepsilon} \iint \frac{\delta\left[t - t' - \frac{nR}{c}\right]}{4\pi R} \nabla' \cdot \bar{P}_{nl}(\vec{r}', t') dV' dt' \quad (2.86)$$

Podemos escrever a polarização separando a parte temporal.

$$\bar{P}_{nl}(\vec{r}', t') = \bar{P}_{nl}(\vec{r}') e^{-i\omega t'} \quad (2.87)$$

$$\frac{\partial}{\partial t'} \bar{P}_{nl}(\vec{r}', t') = -i\omega \bar{P}_{nl}(\vec{r}') e^{-i\omega t'} \quad (2.88)$$

Substituindo em (2.85) e (2.86)

<sup>27</sup> Equação 2.90 do Novotny L., "Principle of Nano-Optics", Cambridge University Press, 2006.

$$\bar{A} = i\mu\omega \iint \bar{P}_{nl}(\vec{r}') \frac{\delta\left[t-t' - \frac{nR}{c}\right]}{4\pi R} e^{-i\omega t'} dV' dt' \quad (2.89)$$

$$\phi = \frac{1}{\varepsilon} \iint \nabla' \cdot \bar{P}_{nl}(\vec{r}') \frac{\delta\left[t-t' - \frac{nR}{c}\right]}{4\pi R} e^{-i\omega t'} dV' dt' \quad (2.90)$$

Resolvendo a integral temporal

$$\bar{A}(\vec{r}, t) = i\mu\omega e^{-i\omega t} \int \frac{e^{\frac{i n\omega R}{c}}}{4\pi R} \bar{P}_{nl}(\vec{r}') dV' \quad (2.91)$$

$$\phi(\vec{r}, t) = \frac{1}{\varepsilon} e^{-i\omega t} \int \frac{e^{\frac{i n\omega R}{c}}}{4\pi R} \nabla' \cdot \bar{P}_{nl}(\vec{r}') dV' \quad (2.92)$$

$$\bar{A}(\vec{r}) = i\mu\omega \int \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \bar{P}_{nl}(\vec{r}') dV' \quad (2.93)$$

$$\phi(\vec{r}) = \frac{1}{\varepsilon} \int \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \nabla' \cdot \bar{P}_{nl}(\vec{r}') dV' \quad (2.94)$$

Substituindo as equações (2.93) e (2.94) em (2.70) temos

$$\vec{E} = i\omega\bar{A} - \nabla\phi = -\mu\omega^2 \int \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \bar{P}_{nl}(\vec{r}') dV' - \nabla \frac{1}{\varepsilon} \int \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \nabla' \cdot \bar{P}_{nl}(\vec{r}') dV' \quad (2.95)$$

Para resolver o divergente da polarização fazemos

$$\nabla' \cdot \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \bar{P}_{nl} \right] = \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \nabla' \cdot [\bar{P}_{nl}] + \bar{P}_{nl} \cdot \nabla' \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] = \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \nabla' \cdot [\bar{P}_{nl}] - \bar{P}_{nl} \cdot \nabla \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] \quad (2.96)$$

$$\frac{e^{ikR}}{4\pi R} \nabla' \cdot [\bar{P}_{nl}] = \nabla' \cdot \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \bar{P}_{nl} \right] + \bar{P}_{nl} \cdot \nabla \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] \quad (2.97)$$

$$\vec{E} = -\mu\omega^2 \int \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \bar{P}_{nl}(\vec{r}') dV' - \nabla \frac{1}{\varepsilon} \int \nabla' \cdot \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \bar{P}_{nl} \right] dV' - \nabla \frac{1}{\varepsilon} \int \bar{P}_{nl} \cdot \nabla \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] dV' \quad (2.98)$$

$$\vec{E} = -\mu\omega^2 \int \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \vec{P}_{nl}(\vec{r}') dV' - \nabla \frac{1}{\varepsilon} \int \vec{P}_{nl} \cdot \nabla \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] dV' \quad (2.99)$$

Vamos usar a notação de Einstein, onde os índices repetidos são considerados com somatória sobre esses índices.

$$\nabla [\vec{a} \cdot \vec{F}] = \bar{\mu}_i \partial_i [a_j F_j] = \bar{\mu}_i a_j \partial_i F_j \quad (2.100)$$

Aplicando em (38) temos

$$-\nabla \frac{1}{\varepsilon} \int \vec{P}_{nl} \cdot \nabla \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] dV' = -\frac{1}{\varepsilon} \int \bar{\mu}_i \partial_i \partial_j \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] P_{nlj} dV' = -\frac{1}{\varepsilon} \int \nabla \nabla \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] \cdot \vec{P}_{nl} dV' \quad (2.101)$$

O que nos dá o seguinte equação para o campo elétrico

$$\vec{E} = -\frac{k^2}{\varepsilon} \int \left[ \vec{I} + \frac{1}{k^2} \nabla \nabla \right] \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \cdot \vec{P}_{nl}(\vec{r}') dV' \quad (2.102)$$

Agora, usando a notação de Einstein, vamos resolver as derivadas em (2.102).

$$\partial_i \partial_j \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] = \left\{ \frac{ike^{ikR}}{4\pi R} \left[ ik - \frac{1}{R} \right] - 2 \frac{e^{ikR}}{4\pi R^2} \left[ ik - \frac{1}{R} \right] + \frac{e^{ikR}}{4\pi R^3} \right\} \frac{(x_j - x'_j)(x_i - x'_i)}{R^2} + \frac{e^{ikR}}{4\pi R^2} \left[ ik - \frac{1}{R} \right] \delta_{ij} \quad (2.103)$$

$$\partial_i \partial_j \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] = \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \left\{ ik \left[ ik - \frac{1}{R} \right] - \frac{2}{R} \left[ ik - \frac{1}{R} \right] + \frac{1}{R^2} \right\} \frac{(x_j - x'_j)(x_i - x'_i)}{R^2} + \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \frac{1}{R} \left[ ik - \frac{1}{R} \right] \delta_{ij} \quad (2.104)$$

Para campos distantes podemos aproximar a equação (2.104) para

$$\frac{1}{k^2} \partial_i \partial_j \left[ \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \right] \cong -\frac{e^{ikR}}{4\pi R^3} (x_j - x'_j)(x_i - x'_i) \quad (2.105)$$

Também para campos distantes, vamos usar a seguinte aproximação

$$R = |\vec{r} - \vec{r}'| = [r^2 - 2\vec{r} \cdot \vec{r}' + r'^2]^{1/2} = r \left[ 1 - 2\frac{\vec{r} \cdot \vec{r}'}{r^2} + \frac{r'^2}{r^2} \right]^{1/2} = r \left[ 1 - 2\frac{\vec{r} \cdot \vec{r}'}{r^2} \right]^{1/2} \cong r \left[ 1 - \frac{1}{2} 2\frac{\vec{r} \cdot \vec{r}'}{r^2} \right] \quad (2.106)$$

$$R \cong r - \frac{\vec{r} \cdot \vec{r}'}{r} \quad (2.107)$$

$$\frac{e^{ikR}}{4\pi R} \cong \frac{e^{ik[r - \frac{\vec{r} \cdot \vec{r}'}{r}]} }{4\pi r} = \frac{e^{ikr}}{4\pi r} e^{-ik\vec{n} \cdot \vec{r}'} \quad (2.108)$$

Aplicando a equação (2.405) e as aproximações para campos distantes na equação (2.102), ainda escrita na notação de Einstein.

$$\vec{E} = -\frac{k^2}{\varepsilon} \vec{\mu}_i \int \left[ \delta_{ij} - \frac{(x_j - x'_j)(x_i - x'_i)}{R^2} \right] \frac{e^{ikR}}{4\pi R} \vec{P}_{nlj}(\vec{r}') dV' \quad (2.109)$$

O que nos dá a seguinte equação para o campo elétrico

$$\vec{E} = -\frac{k^2}{\varepsilon} \frac{e^{ikr}}{4\pi r} \int \left[ \vec{P}_{nl}(\vec{r}') - \frac{[(\vec{r} - \vec{r}') \cdot \vec{P}_{nl}(\vec{r}')] (\vec{r} - \vec{r}')}{r^2} \right] e^{-ik\frac{x_k - x'_k}{r}} dV' \quad (2.110)$$

Mais uma vez, como queremos o campo elétrico para campos distantes, consideramos  $r \gg r'$ .

$$\vec{E} = -\frac{k^2}{\varepsilon} \frac{e^{ikr}}{4\pi r} \int \left[ \vec{P}_{nl}(\vec{r}') - \left( \frac{\vec{r}}{r} \cdot \vec{P}_{nl}(\vec{r}') \right) \frac{\vec{r}}{r} \right] e^{-ik\frac{\vec{r} \cdot \vec{r}'}{r}} dV' \quad (2.111)$$

Sendo  $\vec{r} = r\vec{\mu}_r$  e

$$\vec{r} = (r \sin \theta \cos \varphi, r \sin \theta \sin \varphi, r \cos \theta) \quad (2.112)$$

$$\vec{\mu}_r = (\sin \theta \cos \varphi, \sin \theta \sin \varphi, \cos \theta) \quad (2.113)$$

$$\vec{\mu}_\theta = (-\cos \theta \cos \varphi, -\cos \theta \sin \varphi, \sin \theta) \quad (2.114)$$

$$\vec{\mu}_\varphi = (-\sin \varphi, \cos \varphi, 0) \quad (2.115)$$

Para resolver a equação (2.110) vamos tomar a polarização em coordenadas esféricas

$$\vec{P}_{nl} = (P_x, P_y, P_z) = (\vec{P}_{nl} \cdot \vec{\mu}_r) \vec{\mu}_r + (\vec{P}_{nl} \cdot \vec{\mu}_\theta) \vec{\mu}_\theta + (\vec{P}_{nl} \cdot \vec{\mu}_\varphi) \vec{\mu}_\varphi \quad (2.116)$$

$$\vec{P}_{nl} \cdot \vec{\mu}_r = (\sin \theta \cos \varphi P_x, \sin \theta \sin \varphi P_y, \cos \theta P_z) \quad (2.117)$$

$$\vec{P}_{nl} \cdot \vec{\mu}_\theta = (-\cos \theta \cos \varphi P_x, -\cos \theta \sin \varphi P_y, \sin \theta P_z) \quad (2.118)$$

$$\vec{P}_{nl} \cdot \vec{\mu}_\varphi = (-\sin \varphi P_x, \cos \varphi P_y, 0) \quad (2.119)$$

Vamos simplificar a parte vetorial do integrando

$$\vec{P}_{nl}(\vec{r}') - \left( \frac{\vec{r}}{r} \cdot \vec{P}_{nl}(\vec{r}') \right) \frac{\vec{r}}{r} = (P_r, P_\theta, P_\varphi) - [\vec{\mu}_r \cdot (P_r, P_\theta, P_\varphi)] \vec{\mu}_r = (P_r, P_\theta, P_\varphi) - (P_r, 0, 0) \quad (2.120)$$

$$\vec{P}_{nl}(\vec{r}') - \left( \frac{\vec{r}}{r} \cdot \vec{P}_{nl}(\vec{r}') \right) \frac{\vec{r}}{r} = (0, P_\theta, P_\varphi) \quad (2.121)$$

Chegamos então a seguinte solução

$$\vec{P}_{nl}(\vec{r}') - \left( \frac{\vec{r}}{r} \cdot \vec{P}_{nl}(\vec{r}') \right) \frac{\vec{r}}{r} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ -\cos \theta \cos \varphi & -\cos \theta \sin \varphi & \sin \theta \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \vec{\mu}_r \\ \vec{\mu}_\theta \\ \vec{\mu}_\varphi \end{bmatrix} \quad (2.122)$$

Substituindo em (2.111) temos

$$\vec{E} = -\frac{k^2}{\varepsilon} \frac{e^{ikr}}{4\pi r} \int e^{-ik \frac{\vec{r} \cdot \vec{r}'}{r}} \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ -\cos \theta \cos \varphi & -\cos \theta \sin \varphi & \sin \theta \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \vec{\mu}_r \\ \vec{\mu}_\theta \\ \vec{\mu}_\varphi \end{bmatrix} dV' \quad (2.123)$$

Podemos resolver analiticamente usando a aproximação paraxial, nesse caso, tomaremos um feixe incidente polarizado na direção x. No foco a polarização do feixe muito maior em x do que nas outras direções<sup>2</sup>.

Com

$$|\vec{r}'| \approx z + \frac{x^2 + y^2}{2z} \text{ Para os termos da fase}$$

$$|\vec{r}| \approx z \text{ Para os termos da amplitude}$$

$$\frac{\vec{r} \cdot \vec{r}'}{r} \approx z' + \frac{xx' + yy'}{z}$$

$$\vec{P}^{(3)}(x, y, z) = \frac{\varepsilon_0}{4} \chi^{(3)}(x, y, z) E_\omega^3(x, y, z) \vec{\mu}_x \quad (2.124)$$

E utilizando o feixe gaussiano dado pela equação (2.25)

$$E^3 = \frac{E_0^3 e^{3ik_{v,\omega}z}}{(1 + 2iz/k_{v,\omega}\omega_0^2)^3} e^{-\frac{3(x^2+y^2)}{\omega_0^2} \frac{1}{(1+2iz'/k_{v,\omega}\omega_0^2)}} \quad (2.125)$$

Vamos considerar uma interface no plano xy, e para um meio isotrópico, assim,  $\chi^{(3)}$  será apenas função de z.

$$\vec{E} = -\frac{k^2}{\varepsilon} \frac{e^{ik\left(z + \frac{x^2+y^2}{2z}\right)}}{4\pi z} \int e^{-ik\left(z' + \frac{xx'+yy'}{z}\right)} \frac{\varepsilon_0}{4} \chi^{(3)}(z) \frac{E_0^3 e^{3ik_\omega z'}}{(1 + 2iz'/k_\omega\omega_0^2)^3} e^{-\frac{3(x'^2+y'^2)}{\omega_0^2} \frac{1}{(1+2iz'/k_\omega\omega_0^2)}} dV' \quad (2.126)$$

$$\vec{E} = -\frac{\varepsilon_0 E_0^3 k^2}{4\varepsilon} \frac{e^{ik\left(z + \frac{x^2+y^2}{2z}\right)}}{4\pi z} \int \chi^{(3)}(z) \frac{e^{i(3ik_{v,\omega}-k)z'}}{(1 + 2iz'/k_\omega\omega_0^2)^3} e^{-\frac{ik_{xx'} - 3x'^2}{z} \frac{1}{\omega_0^2 (1+2iz'/k_\omega\omega_0^2)}} e^{-\frac{ik_{yy'} - 3y'^2}{z} \frac{1}{\omega_0^2 (1+2iz'/k_\omega\omega_0^2)}} dV' \quad (2.127)$$

$$I_x = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{ik_{xx'} - 3x'^2}{z} \frac{1}{\omega_0^2 (1+2iz'/k_\omega\omega_0^2)}} dx' \quad (2.128)$$

$$I_y = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{ik_{yy'} - 3y'^2}{z} \frac{1}{\omega_0^2 (1+2iz'/k_\omega\omega_0^2)}} dy' \quad (2.129)$$

$$I(\alpha) = \int_{-\infty}^{\infty} d\alpha \exp[-a\alpha^2 + b\alpha] \quad (2.130)$$

$$I(\alpha) = \sqrt{\frac{\pi}{a}} e^{\frac{b^2}{4a}} \quad (2.131)$$

$$I_x = \sqrt{\frac{\pi(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{3}} e^{\frac{-k^2 x^2(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{12z^2}} \quad (2.132)$$

$$I_y = \sqrt{\frac{\pi(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{3}} e^{\frac{-k^2 y^2(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{12z^2}} \quad (2.133)$$

$$E = -\frac{\varepsilon_0 E_0^3 k^2}{12\varepsilon} \frac{e^{ik\left(z+\frac{x^2+y^2}{2z}\right)}}{4z} \int \chi^{(3)}(z) \frac{(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{1} \frac{e^{i(3ik_\omega-k)z'}}{(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)^3} \times \quad (2.134)$$

$$\times e^{\frac{-k^2 x^2(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{12z^2}} e^{\frac{-k^2 y^2(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{12z^2}} dz'$$

$$E = -\frac{\varepsilon_0 E_0^3 k^2 \omega_0^2}{12\varepsilon} \frac{e^{ik\left(z+\frac{x^2+y^2}{2z}\right)}}{4z} \int \chi^{(3)}(z) \frac{e^{i(3ik_\omega-k)z'}}{(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)^2} e^{\frac{-k^2 x^2(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{12z^2}} e^{\frac{-k^2 y^2(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{12z^2}} dz' \quad (2.135)$$

$$E = -\frac{\varepsilon_0 E_0^3 k^2 \omega_0^2}{12\varepsilon} \frac{e^{ik\left(z+\frac{x^2+y^2}{2z}\right)}}{4z} \int \chi^{(3)}(z) \frac{e^{i(3ik_\omega-k)z'}}{(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)^2} e^{\frac{-k^2(x^2+y^2)(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)\omega_0^2}{12z^2}} dz' \quad (2.136)$$

Para  $z \gg z'$  vamos desprezar o termo com dependência de  $z'$  na fase da equação (2.136).

$$E = -\frac{\varepsilon_0 E_0^3 k^2 \omega_0^2}{12\varepsilon} \frac{e^{ik\left(z+\frac{x^2+y^2}{2z}\right)}}{4z} \int \chi^{(3)}(z) \frac{e^{i(3ik_\omega-k)z'}}{(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)^2} e^{\frac{-k^2(x^2+y^2)\omega_0^2}{12z^2}} dz' \quad (2.137)$$

$$E = -\frac{\varepsilon_0 E_0^3 k^2 \omega_0^2}{38z\varepsilon} e^{ik\left(z+\frac{x^2+y^2}{2z}\right)} e^{\frac{-k^2(x^2+y^2)\omega_0^2}{12z^2}} \int \chi^{(3)}(z) \frac{e^{i(3ik_\omega-k)z'}}{(1+2iz'/k_\omega \omega_0^2)^2} dz' \quad (2.138)$$

Na equação (2.138),  $k_{v, \omega}$  é o vetor de onda do laser, e  $k$  é o vetor de onda do sinal de THG gerado. Vamos calcular para um meio não dispersivo, ou seja  $k_{v, \omega} = k$ , com

$$\chi^{(3)}(z) = \chi_1^{(3)} \Theta(z_i - z') + \chi_2^{(3)} [1 - \Theta(z_i - z')] \quad (2.139)$$

Onde  $\Theta(z)$  é a função de Heavyside em uma dimensão, e  $z_i$  é a distância entre a cintura do feixe e a interface, conforme a figura 2.1

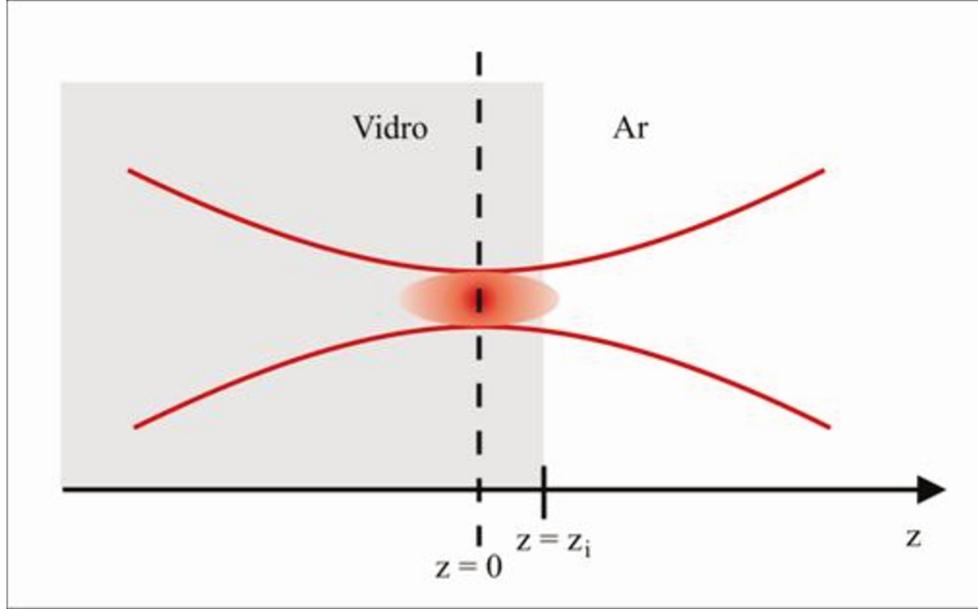


Figura 2.2: Representação para um feixe focalizado em uma interface vidro-ar.

$$E = -\frac{\varepsilon_0 E_0^3 k^2 \omega_0^2}{38z\varepsilon} e^{ik\left(\frac{x^2+y^2}{2z}\right)} e^{-\frac{k^2(x^2+y^2)\omega_0^2}{12z^2}} \int \chi^{(3)}(z) \frac{1}{\left(1+2iz'/k_\omega\omega_0^2\right)^2} dz' \quad (2.140)$$

$$E = -\frac{\varepsilon_0 E_0^3 k^2}{38z\varepsilon} e^{ik\left(\frac{x^2+y^2}{2z}\right)} e^{-\frac{k^2(x^2+y^2)\omega_0^2}{12z^2}} \left( \chi_1^{(3)} \frac{ik_\omega}{2\left(1+\frac{2i\omega_0^2 z_i}{k_\omega}\right)} - \chi_2^{(3)} \frac{ik_\omega}{2\left(1+\frac{2i\omega_0^2 z_i}{k_\omega}\right)} \right) \quad (2.141)$$

$$E = -\frac{\varepsilon_0 E_0^3 k^2}{38z\varepsilon} e^{ik\left(\frac{x^2+y^2}{2z}\right)} e^{-\frac{k^2(x^2+y^2)\omega_0^2}{12z^2}} \left( \chi_1^{(3)} - \chi_2^{(3)} \right) \frac{ik_\omega}{2\left(1+\frac{2i\omega_0^2 z_i}{k_\omega}\right)} \quad (2.142)$$

A intensidade do campo elétrico gerado na amostra é dado por

$$I_{THG} = \frac{n}{2} \varepsilon_0 c |E|^2 \quad (2.143)$$

$$I_{THG} = \frac{nc\varepsilon_0^3 E_0^6 k^4 k_\omega^2}{(11552) z^2 \varepsilon^2} e^{-\frac{k^2(x^2+y^2)\omega_0^2}{6z^2}} (\chi_1^{(3)} - \chi_2^{(3)})^2 \left[ 1 + \left( \frac{2\omega_0^2 z_i}{k_\omega} \right)^2 \right]^{-1} \quad (2.144)$$

$$I_{THG} \propto (\Delta\chi^{(3)})^2 \left[ 1 + \left( \frac{2\omega_0^2 z_i}{k_\omega} \right)^2 \right]^{-1} \quad (2.145)$$

Com esse resultado chegamos a conclusão de que para uma interface entre dois meios não dispersivos, o sinal será proporcional a distância  $z_i$  e a diferença entre os valores de  $\chi(3)$ <sup>27</sup>. Em amostras biológicas, que são em sua maioria compostas por água, uma grande fonte de THG são os lipídios<sup>28</sup>.

---

<sup>28</sup> D. Débarre and E. Beaufreire, “Quantitative Characterization of Biological Liquids for Third-Harmonic Generation Microscopy,” *Biophys J.* 92(2): 603–612 (2007).



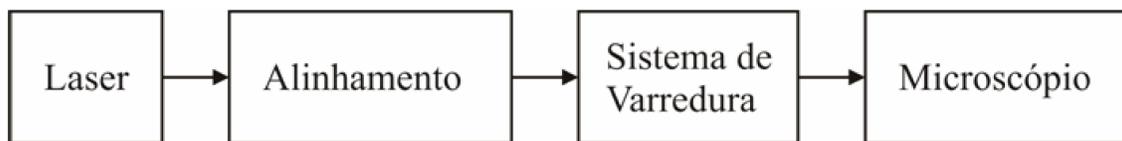
## Capítulo 3

### Sistema Experimental

Neste capítulo vamos descrever os instrumentos e como é feito o alinhamento do laser para a aquisição de imagens. Na primeira seção apresentaremos os principais componentes para a microscopia de óptica não linear, e em seguida discutimos cada componente da montagem e como é realizado o alinhamento do laser. A montagem experimental foi realizada com o objetivo de integrar as diferentes técnicas utilizadas pelo grupo, no caso, principalmente, de microscopia de fluorescência excitada por dois fótons junto com as microscopias de geração de segundo e terceiro harmônicos [SHG e THG]. Além disso, o sistema sempre esteve também integrado com as técnicas de FLIM [Fluorescence Lifetime Imaging] e Pinças Ópticas, embora não utilizadas nessa tese, cujo objetivo principal foi de incorporar a microscopia THG.

No final do capítulo apresentamos uma montagem experimental para caracterização do sinal de THG, demonstrando a dependência da intensidade do sinal com relação à intensidade do sinal do laser

A figura 3.1 mostra um diagrama de blocos dos principais partes do sistema experimental. Nele nós temos o laser, o caminho do laser até o sistema de varredura, o sistema de varredura e o microscópio.



*Figura 3.1 diagrama de blocos do sistema experimental*

No decorrer desse capítulo iremos explicar em detalhes o funcionamento e a importância de cada parte do sistema experimental.

### 3.1 Laser de Ti:Safira

Para nosso sistema utilizamos o laser de Ti:Safira Mai-Tai mostrado na figura 1, que gera pulsos de aproximadamente 70 femtosegundos na taxa de repetição de 80MHz, com potência de até 3 W e que pode ser sintonizado desde 690nm a 1040nm. A potência de

pico é dada por  $P_{pico} = \left( \frac{1}{\nu_{rep} \tau} \right) P_{média}$  que chega, nesse caso

$$P_{pico} = \left( \frac{1}{80 \times 10^6 \times 70 \times 10^{-15}} \right) 3W \cong 530kW .$$



*Figura 3.2: Foto do MaiTai*

O sistema MaiTai é um sistema fechado “One Box” de lasers em cascata integrados como mostra o esquema da figura 3.3. O laser Millennia, um DPSSL [Diode Pumped Solid State Laser], bombeia o laser de Ti:safira em 532 nm contínuo. Os pulsos de femtosegundos são gerados no laser de Ti:safira em toda a banda entre 680 nm até 1040 nm. O último elemento, o DeepSee, é um pré-compensador da Dispersão de Velocidade de Grupo das partes ópticas do microscópio que garante o pulso mais curto após a objetiva.



Figura 3.3: Esquema do laser MaiTai DeepSee da Spectra-Physics

O próprio laser de bombeio Millennium é, por sua vez, também um sistema integrado cujo esquema é mostrado na figura 3. No Millennium o íon trivalente  $\text{Nd}^{3+}$  embebido em uma matriz de Vanadato de Ítrio,  $\text{Nd:YVO}_4$ , é bombeado por duas barras de lasers de diodo de AlGaAs operando em 808 nm [Spectra-Physics ProLite Diode Laser] para gerar um feixe de laser contínuo [cw] em 1064 nm. As barras de lasers de diodo se localizam na fonte de potência do Millennium e o acoplamento desses feixes é feito através de fibras ópticas. O feixe de 1064 nm é dobrado intracavidade para o comprimento de onda de 532 nm através de um cristal de triborato de lítio (LBO) a  $90^\circ$  sintonizado por temperatura na configuração de casamento de fase não crítica.

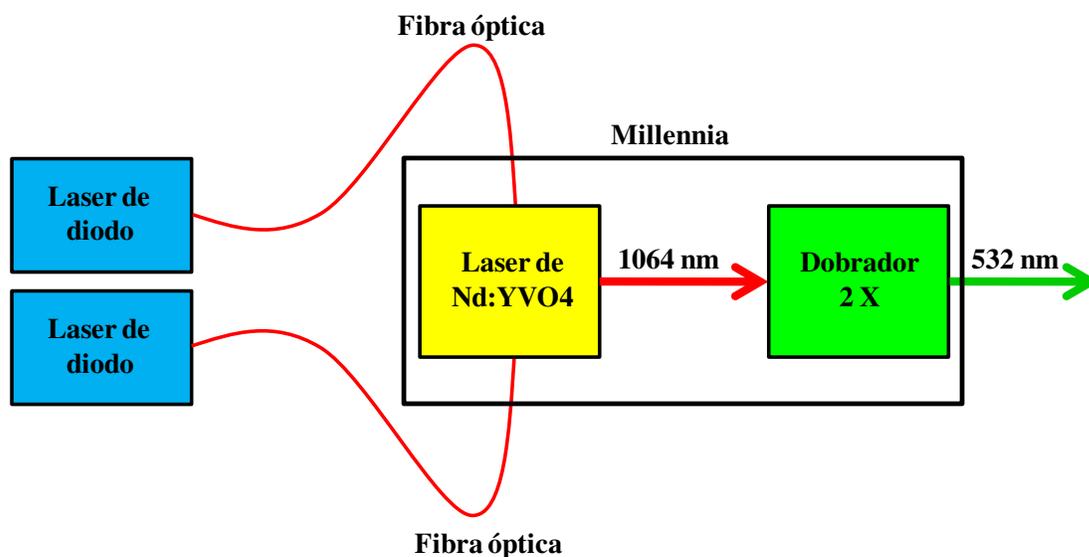


Figura 3.4: Esquema do laser Millennium

O esquema da Figura 3.4, extraído do manual do usuário do laser Millennium<sup>29</sup>, mostra a cavidade interna do Millennium. O cristal de  $\text{Nd:YVO}_4$  é bombeado por ambos os lados pelas duas fibras ópticas transmitindo o feixe de 808 nm. Os níveis de energia do íon

<sup>29</sup> [http://www-physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics\\_173\\_273/245A\\_Rev\\_D\\_Millennia%20V\\_User\\_Manual.pdf](http://www-physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/245A_Rev_D_Millennia%20V_User_Manual.pdf)

de  $\text{Nd}^{3+}$  foram descritos na tese de doutorado de Adriana Fontes<sup>30</sup> [páginas 18 e 19], a qual pode ser acessada nas teses digitais do site da biblioteca do IFGW. Nessa tese apenas estabelecemos que esse laser opera na linha de 1064 nm. Note-se que o 1064 nm é fechado com dois HRs [“high reflectors”] em lugar da configuração tradicional de um HR e um OC [“output coupler”] para aumentar ao máximo a potência intracavidade. O cristal de LBO, colocado dentro da cavidade, gera o 532 nm na configuração com os dois feixes, 1064 nm e 532 nm, colineares.

A condição de casamento de fase [phase matching], ou seja,  $\vec{k}_{532} = 2\vec{k}_{1064}$ , é feita na configuração não crítica para permitir a colinearidade dos dois feixes. Na configuração não crítica todas as polarizações estão ao longo dos eixos cristalinos e o “phase matching” não depende mais do ângulo entre os feixes e o cristal. O ajuste do phase matching é obtido através da variação da temperatura e o Millennia tem um sistema de realimentação que mantém a temperatura do cristal na condição de máximo do sinal em 532 nm. Eventualmente, principalmente após queda de energia, é necessário iniciar o procedimento de otimização da temperatura de “phase matching”, que será feito automaticamente. Esse procedimento nunca foi necessário após um ano de uso do MaiTai em nosso laboratório, embora tenha sido realizado uma vez com um antigo Millennia do laboratório. O 532 nm é transmitido por um espelho dicróico para fora da cavidade do Millennia.

---

<sup>30</sup> Adriana Fontes, “Sistema de Micromanipulação e Microanálise com Pinças Ópticas”, (2004)

Figure 3-9: The *Millennia V* Laser Head

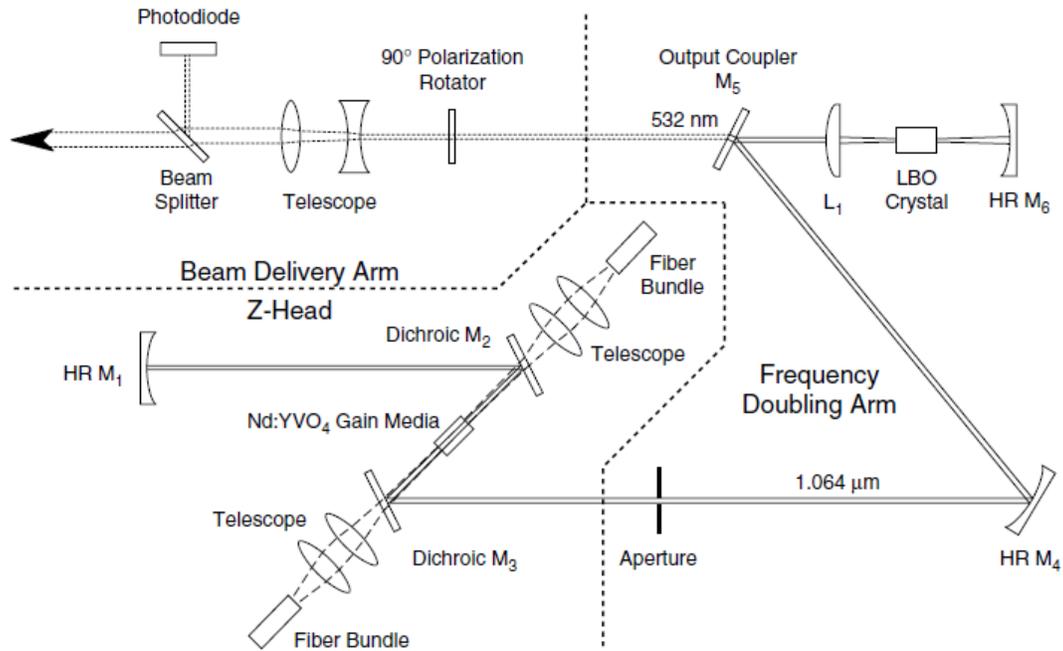


Figura 3.5. Esquema do laser *Millennia* da *Spectra-Physics*.

Nas primeiras tentativas de geração de segundo harmônico intracavidade se percebeu que a potência de saída oscilava caoticamente devido a um processo devido a mistura de frequências entre os modos longitudinais do laser de bombeio. A solução da Spectra-Physics para esse problema foi aumentar o comprimento da cavidade, dobrando-a com espelhos, para aproximar os modos longitudinais permitindo até 100 modos no banda de ganho do laser. A potência total dividida em tantos modos diminuiu a potência de cada um deles para abaixo do limiar da geração de frequência soma e estabilizou a potência de saída do laser. A figura 3.6, também extraída do manual do usuário do *Millennia*<sup>29</sup>, exemplifica essa situação. Os lasers *Millennia* atuais têm chegado a potências acima de 18W em 532 nm.

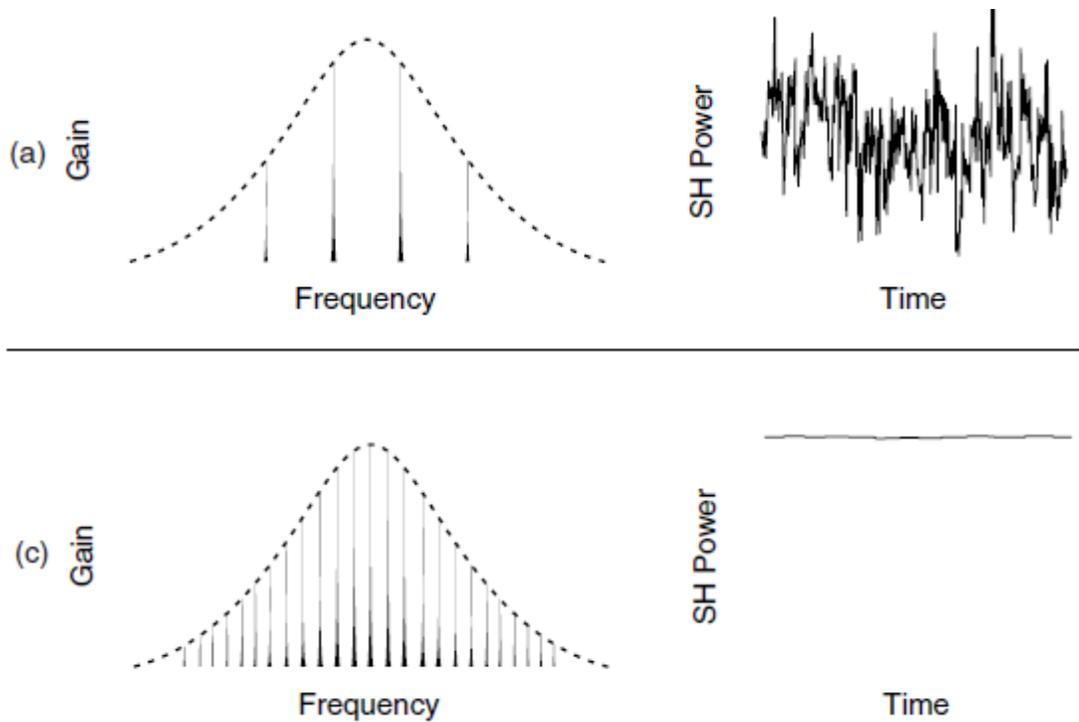
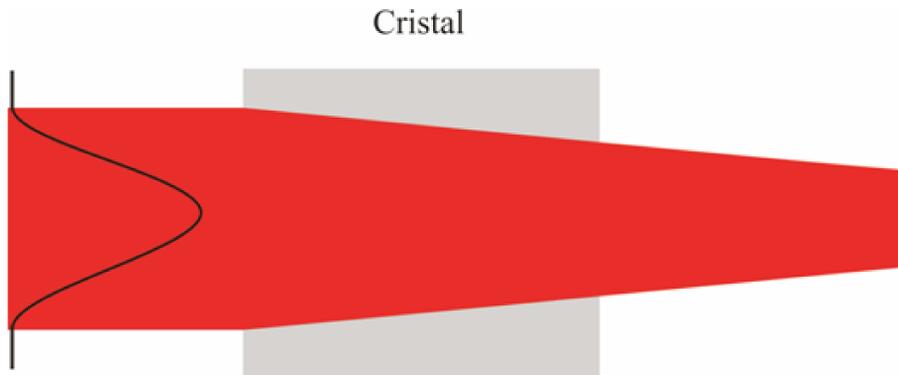


Figura 3.6. Acima: poucos modos longitudinais na banda de ganho levam a oscilação caótica da potência do segundo harmônico devido a processos de soma de frequência. Abaixo: muitos modos longitudinais na banda de ganho divide a potência de cada modo e estabiliza a potência do segundo harmônico.

O Millennia bombeia o laser de Ti:safira que vai gerar os pulsos de femtosegundos. Esse laser também já foi descrito na tese da Adriana Fontes. O íon  $\text{Ti}^{3+}$  substitui o  $\text{Al}^{3+}$  na safira  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Da configuração atômica do átomo de titânio o íon perde dois elétrons do orbital 4S e um do orbital 3D, sobrando, portanto, um elétron no orbital 3D. No esquema de Russel-Saunders o estado fundamental desse elétron será para o maior m de orbital D, levando a um L total igual a 2, e o spin total de  $\frac{1}{2}$ . O J varia de  $\frac{3}{2}$  até  $\frac{5}{2}$ . O estado fundamental do  $\text{Ti}^{3+}$ , na notação espectroscópica da forma  $^{2S+1}L_J$ , será o  $^2D_{3/2}$  e o estado excitado o  $^2D_{5/2}$ . O campo cristalino do cristal hospedeiro levanta a degenerescência desses níveis para um estado excitado  $^2E_0$ , duplamente degenerado e três estados  $^2T_2$  quase degenerados<sup>30</sup>. O cristal deve ser resfriado para evitar a população térmica dos dois níveis próximos do estado fundamental.

O bastão de safira dopado com titânio possui um índice de refração não linear, da forma  $n(I) = n_0 + n_2 I$ , com  $n_2$  positivo, para o feixe incidente que possua uma

distribuição de intensidade gaussiana, o índice de refração do cristal será maior no centro do que nas bordas, fazendo com que o cristal funcione como uma lente. Esse fenômeno é conhecido como auto-focalização, ou lente de Kerr. Esse fenômeno faz com que o laser seja capaz de gerar pulsos de femtosegundos em todo intervalo de ganho e é conhecido como Kerr Lens Mode Locking.



*Figura 3.7: Auto-focalização do laser no cristal de Ti:Safira*

O laser pode operar na forma pulsada, denominada de “mode-locked”, que é quando as perdas na cavidade são menores para o laser operando com a focalização que ocorre no cristal do que sem ela.

O mode-locking pode ser ativo ou passivo. Ativo é quando existe uma ação externa modulando as perdas da cavidade, e passivo é quando a modulação ocorre naturalmente. A operação do laser se dará da forma pulsada se o tempo entre duas janelas de ganho for o mesmo tempo que o pulso leva para percorrer a cavidade. A figura 3.8 ilustra esse comportamento.

O laser de Ti:Safira não inicia sua operação pulsada de forma natural, pois as diferenças de perdas entre as operações pulsada e CW são muito pequenas. Uma forma de iniciar a operação pulsada é colocando um pinhole no foco da lente Kerr não linear, o que gera um aumento na operação CW, favorecendo a operação pulsada. O Mai-Tai funciona com mode-locking ativo/passivo, que é conseguido através de um modulador acusto-óptico (AOM). Entretanto, após iniciada a operação pulsada, detetores do pulsos óticos geram o

sinal eletrônico que alimenta o AOM, ou seja, as perdas moduladas na cavidade estão automaticamente sincronizadas com o “round trip time” do pulso luminoso.

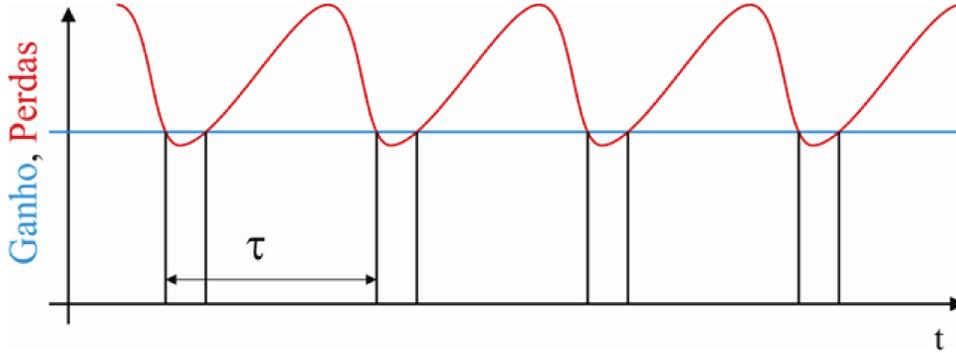


Figura 3.8: Esquema do ganho e as perdas na cavidade do laser. Nas janelas onde o ganho é maior que as perdas o laser pode pulsar

**Dispersão de Velocidade de Grupo.** A dispersão de velocidade de grupo alarga temporalmente os pulsos do laser, tanto dentro da cavidade do laser, quanto fora da cavidade, ao passar por meios materiais, trazendo efeitos deletérios para todas as microscopias de óptica não linear. Por isso esse assunto merece um tratamento mais aprofundado nesse capítulo. O papel da duração temporal na geração de um sinal de óptica não linear pode ser expresso da seguinte forma: a geração de um sinal de  $n$  fótons em um único pulso depende da potência de pico elevada à potência  $n$  multiplicado pela duração do

pulso, ou seja,  $S_{1pulso} = C I_{pico}^n \tau_{pulso} = C \left( \frac{\tau_{rep}}{\tau_{pulso}} \right)^n P_{média}^n \tau_{pulso}$ , onde  $C$  é uma constante. No

tempo  $t$  existirão  $\frac{t}{\tau_{rep}}$  pulsos, e o sinal integrado em  $t$  será dado por

$$S(t) = C \left( \frac{\tau_{rep}}{\tau_{pulso}} \right)^n P_{média}^n \tau_{pulso} \left( \frac{t}{\tau_{rep}} \right) = C \left( \frac{\tau_{rep}}{\tau_{pulso}} \right)^{n-1} P_{média}^n t.$$

Isso significa que, mantida a mesma potência média, o sinal de óptica não linear cai com o inverso da duração do pulso elevado a potência  $n-1$ , ou seja, potência 1 para sinal de SHG e a potência 2 para sinal de

THG. Se o pulso alargar por um fator de 2, por exemplo, o sinal de SHG cai pela metade e o de THG cai para um quarto do valor inicial.

**Velocidade de Grupo e Dispersão de Velocidade de Grupo.** Suponha duas ondas harmônicas de mesma intensidade mas frequências diferentes do tipo  $S = A[\cos(k_1x - \omega_1t) + \cos(k_2x - \omega_2t)]$ . Essa soma pode ser expressa como a multiplicação de duas ondas usando  $2\cos a \cos b = \cos(a-b) + \cos(a+b)$ . Fazendo  $a+b = k_1x - \omega_1t$  e  $a-b = k_2x - \omega_2t$  obtemos  $a = \frac{k_1+k_2}{2}x - \frac{\omega_1+\omega_2}{2}t$  e  $b = \frac{k_1-k_2}{2}x - \frac{\omega_1-\omega_2}{2}t$ . O que nos leva a:

$$S = A[\cos(k_1x - \omega_1t) + \cos(k_2x - \omega_2t)] = A \cos\left(\frac{k_1+k_2}{2}x - \frac{\omega_1+\omega_2}{2}t\right) \cos\left(\frac{k_1-k_2}{2}x - \frac{\omega_1-\omega_2}{2}t\right)$$

O primeiro cosseno oscila muito mais rápido do que o segundo, que atua como uma função envelope que se propaga na velocidade de grupo  $V_g = \frac{\Delta\omega}{\Delta k} = \frac{\partial\omega}{\partial k}$ . Um pulso curto necessariamente possui muitas frequências diferentes, devido ao limite da transformada de Fourier [relação de incerteza] dado por  $\Delta\nu \Delta\tau > \frac{1}{2}$ . Essa relação implica em que será impossível construir um pulso curto sem uma dada largura de banda  $\Delta\nu$ , mas não implica em que dada a largura de banda  $\Delta\nu$  o pulso será o mais curto possível. Suponha que todas as componentes tenham a mesma fase nula. Para  $t = 0$  todos os cossenos valem 1 e todos se somam. Entretanto se as diversas componentes possuírem fases diferentes, mesmo para  $t = 0$ , não haverá essa soma e o pulso não será o mais curto possível.

Suponha agora um pulso inicialmente o mais curto possível para a largura de banda que atravessa um meio de espessura  $L$  que possui velocidades de grupo diferentes para as frequências mais alta e mais baixa. Haverá um atraso na chegada dos dois feixes dado por

$$\delta\tau_{delay} = L\left(\frac{1}{V_{g1}} - \frac{1}{V_{g2}}\right) = L\delta\left(\frac{1}{V_g}\right) = L\delta\left(\frac{\partial k}{\partial\omega}\right).$$

Existem duas definições da dispersão da velocidade de grupo, uma em que se pretende medir o atraso temporal em termos da

frequência angular, ou seja,  $GVD = \frac{1}{L} \frac{\partial \tau}{\partial \omega} = \frac{\partial^2 k}{\partial \omega^2}$ , e a outra em termos do comprimento de

onda, sendo  $\lambda$  o comprimento de onda no vácuo  $\lambda = \frac{2\pi c}{\omega}$ . A relação entre as duas é dada

por  $D = \frac{\partial}{\partial \lambda} \left( \frac{\partial k}{\partial \omega} \right) = \frac{\partial}{\partial \omega} \left( \frac{\partial k}{\partial \omega} \right) \frac{\partial \omega}{\partial \lambda} = -\frac{2\pi c}{\lambda^2} GVD$ . Quando o índice de refração de um meio

material depende do comprimento de onda a dispersão aparece pois  $k = \frac{2\pi n(\lambda)}{\lambda}$ , logo

$\frac{\partial k}{\partial \omega} = \frac{\partial}{\partial \lambda} \left[ \frac{2\pi n(\lambda)}{\lambda} \right] \left( \frac{\partial \lambda}{\partial \omega} \right) = \left[ -\frac{2\pi n(\lambda)}{\lambda^2} + \frac{2\pi}{\lambda} \frac{\partial n}{\partial \lambda} \right] \left( -\frac{\lambda^2}{2\pi c} \right) = \left[ \frac{n(\lambda)}{c} - \frac{\lambda}{c} \frac{\partial n}{\partial \lambda} \right]$ , o que leva a:

$D = \frac{\partial}{\partial \lambda} \left[ \frac{n}{c} - \frac{\lambda}{c} \frac{\partial n}{\partial \lambda} \right] = \frac{1}{c} \frac{\partial n}{\partial \lambda} - \frac{1}{c} \frac{\partial n}{\partial \lambda} - \frac{\lambda}{c} \frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2} = -\frac{\lambda}{c} \frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2}$ . Note que só existe D, e GVD, se

$\frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2} \neq 0$ .

Nesse ponto podemos usar o modelo de Lorenz-Lorentz da constante dielétrica para mostrar que em meios materiais transparentes o D é positivo. Nesse modelo o elétron responde ao campo eletromagnético como um oscilador harmônico forçado amortecido

$m[\ddot{\vec{x}} + \gamma \dot{\vec{x}} + \omega_0 \vec{x}] = -e\vec{E}(\vec{x}, t)$ . O momento de dipolo será dado por

$\vec{p} = -ex = \frac{\left( \frac{e^2}{m} \right)}{[\omega_o^2 - \omega^2 + i\gamma\omega]} \vec{E}$ , e a polarização  $\vec{P} = N\vec{p}$  onde N é o número de dipolos por

volume, onde  $m$  é a massa do elétron,  $\gamma$  é a força fenomenológica de amortecimento e  $\omega_0$  a

frequência de ressonância do sistema. Então  $\vec{P} = \frac{\left( \frac{Ne^2}{m} \right)}{[\omega_o^2 - \omega^2 + i\gamma\omega]} \vec{E}$  e

$\vec{D} = \epsilon_o \vec{E} + \vec{P} = \epsilon_o \left[ 1 + \frac{\omega_p^2}{[\omega_o^2 - \omega^2 + i\gamma\omega]} \right] \vec{E}$ , o que leva a constante dielétrica  $\vec{D} = \epsilon \vec{E}$  a ser

dada por  $\epsilon = \epsilon_o \left[ 1 + \frac{\omega_p^2}{[\omega_o^2 - \omega^2 + i\gamma\omega]} \right]$ . O índice de refração é dado, portanto, por

$$n = \sqrt{\frac{\varepsilon}{\varepsilon_0}} = \sqrt{1 + \frac{\omega_p^2}{\omega_0^2 - \omega^2 + i\gamma\omega}}. \text{ Para } \omega \gg \omega_0, \text{ como é o caso dos materiais transparentes,}$$

$$\text{então } n = \sqrt{1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}} \text{ ou em termos do comprimento de onda, } n = \sqrt{1 - \frac{\omega_p^2}{(2\pi c)^2} \lambda^2}. \text{ Nesse caso}$$

$$\frac{d^2 n}{d\lambda^2} = - \left[ 1 - \frac{\omega_p^2}{(2\pi c)^2} \lambda^2 \right]^{-\frac{1}{2}} \left( \frac{\omega_p^2 \lambda}{(2\pi c)^2} \right) \left[ 1 + \frac{\frac{\omega_p^2}{(2\pi c)^2}}{1 - \frac{\omega_p^2}{(2\pi c)^2} \lambda^2} \right] < 0, \text{ significando que } D = -\frac{\lambda}{c} \frac{\partial^2 n}{\partial \lambda^2} > 0. \text{ Isso}$$

significa que  $\delta\tau = LD\delta\lambda$  será positivo para  $\delta\lambda$  positivo, ou seja, comprimentos de onda maiores demoram mais viajando no meio do que comprimentos de ondas mais curtos.

Uma estimativa para o atraso temporal devido à dispersão após atravessar um pedaço de sílica de 5 cm,  $GVD = 160\text{fs}^2/\text{mm}$ , pode ser feita usando o fato de que  $\delta\tau = L \times GVD \times \delta\omega$  e que a largura de banda em termos da duração do pulso é dada por

$$\delta\omega \cong \frac{\pi}{\delta\tau_{\text{pulso}}} \text{ levando a } \delta\tau_{\text{delay}} = \frac{\pi \times L \times GVD}{\delta\tau_{\text{pulso}}}. \text{ Para um pulso de } 70 \text{ fs}$$

$$\delta\tau_{\text{delay}} = \frac{\pi \times 50\text{mm} \times 160 \frac{\text{fs}^2}{\text{mm}}}{70\text{fs}} = 360\text{fs}. \text{ Ou seja a dispersão de velocidade de grupo pode}$$

alargar substancialmente a duração temporal do pulso.

**Correção da GVD.** Como concluímos, em um meio material transparente os comprimentos de onda maiores se atrasam em relação aos comprimentos de ondas menores. Como corrigir isso?

Fazendo com que o caminho percorrido pelos comprimentos de ondas menores seja maior. Isso pode ser obtido com o sistema de 4 prismas mostrado na figura 3.9. Note que o caminho do azul é mais longo do que o caminho óptico do vermelho correspondendo a um D negativo que depende da distância entre os prismas. A inserção dos prismas no ângulo de Brewster evita perdas por reflexão. A dispersão pode ser anulada inserindo mais ou menos prismas na trajetória do feixe. Ao se inserir mais prisma se introduz mais material no caminho óptico adicionando D positivo sem alterar o D negativo. Com as distâncias corretas o sistema permite correção perfeita da GVD.

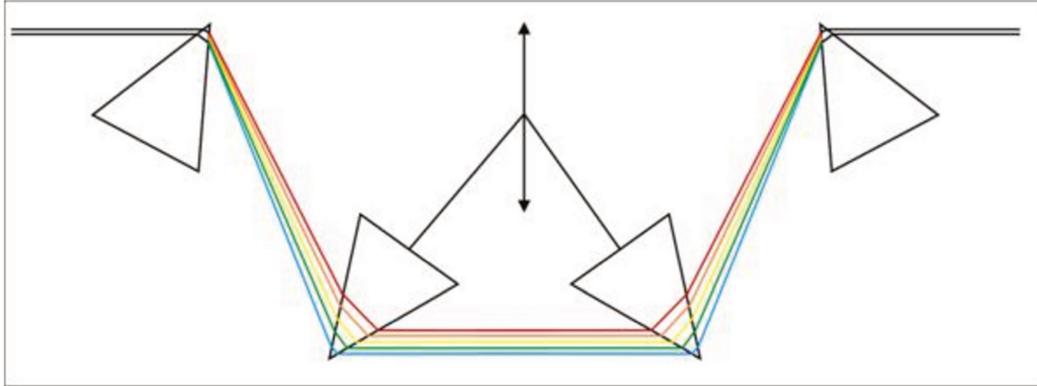


Figura 3.9: Configuração dos prismas para correção da dispersão

Esse sistema é utilizado tanto dentro da cavidade do laser de Ti:safira, para obter o pulso mais curto possível, como mostrado na figura 3.9, quanto fora da cavidade para compensar a dispersão positiva que existirá quando o pulso do laser atravessar todos os componentes ópticos até o foco da objetiva. As objetivas produzem uma grande dispersão e, maior do que a dispersão das objetivas, tem sido a dispersão originada dos atenuadores baseado em moduladores acusto-ópticos não utilizados nessa tese.

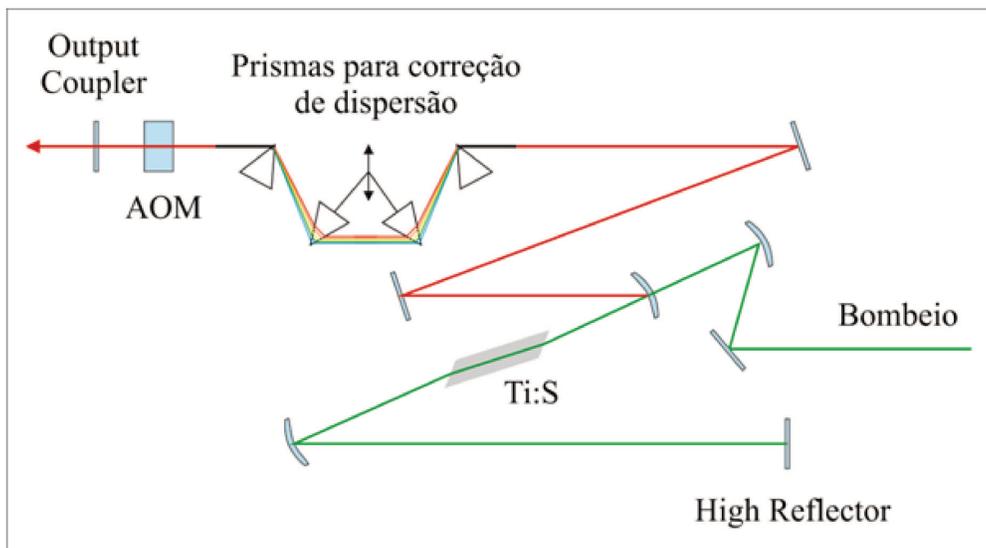
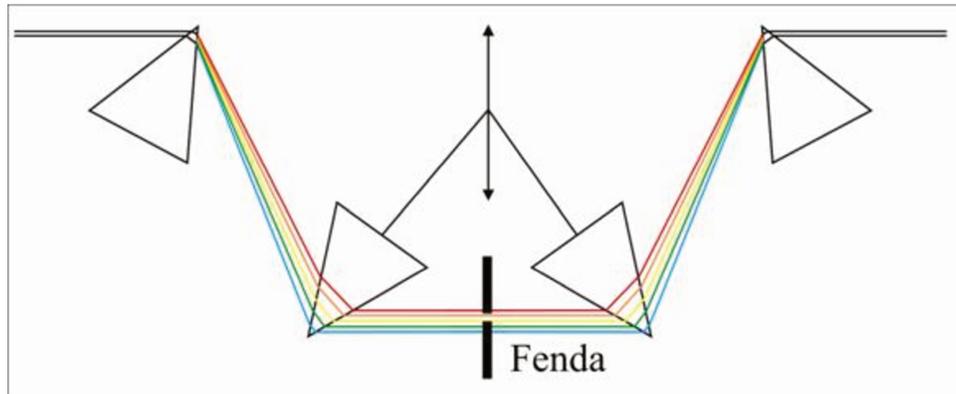


Figura 3.10: Esquema da cavidade de um laser de Ti:Safira.

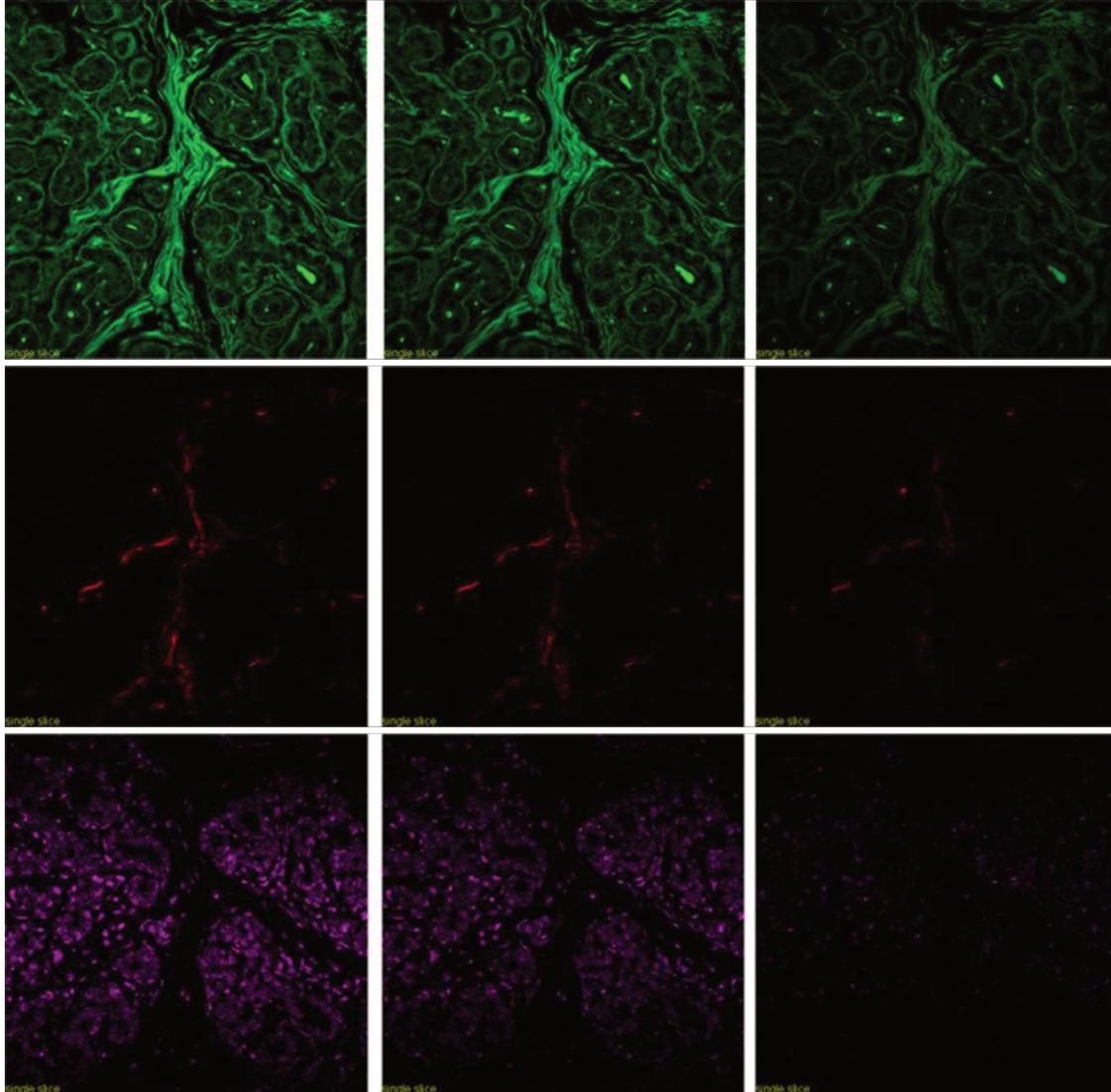
O compensador da dispersão intracavidade também pode ser usado como elemento de sintonia do comprimento de onda do laser, inserindo uma fenda entre os prismas centrais, onde o espectro está espacialmente separado, como mostra a figura 3.11.



*Figura 3.11: Fenda para a seleção de comprimentos de onda.*

O DeepSee do Mai-Tai é um mesmo sistema de prismas para efetuar uma pré-compensação da dispersão de velocidade de grupo (GVD). A largura do pulso gerado na saída do laser, com mencionado acima, é de aproximadamente 70fs. Percorrendo o caminho óptico até a amostra, o que inclui, entre outros, os espelhos, as lentes do telescópio e a objetiva, a largura do pulso aumenta e o aproveitamento da potência do laser para geração de sinal na amostra diminui. O DeepSee tem as seguintes propriedades: em 690nm possui compensação de  $-22500\text{fs}^2$  à  $-41700\text{fs}^2$ ; em 800nm compensação de  $-8900\text{fs}^2$  à  $-24500\text{fs}^2$ ; e em 1040nm compensação de 0 à  $-9600\text{fs}^2$ .

Para ilustrar os benefícios do DeepSee mostramos as imagens de fluorescência excitada por dois fótons, SHG e THG, obtidas com a compensação ótima e fora da compensação ótima.



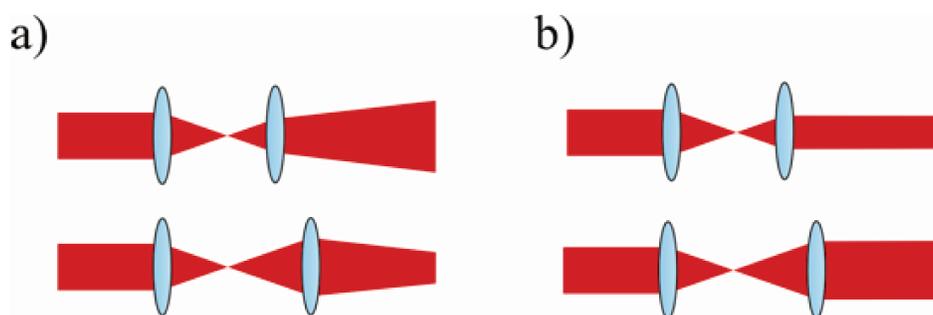
*Figura 3.12: A primeira coluna da esquerda, imagens com a compensação de GVD otimizada, nas colunas do meio e da direita a compensação de GVD é alterada. TPEF (Verde), SHG (Vermelho) e THG (Magenta).*

## 3.2 Alinhamento do Laser de Ti:Safira

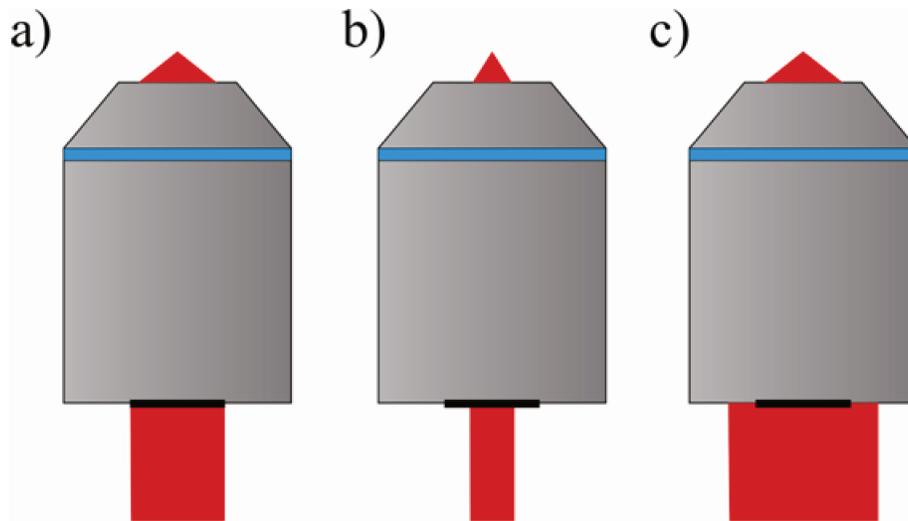
Primeiramente o feixe do laser é alinhado por uma placa de meia onda (half-wavelength plate) e um polarizing beamsplitter (PBS), esses dois objetos ópticos em conjunto servem para que seja possível um ajuste da potência do laser que irá incidir sobre a amostra. A placa de meia onda está montada sobre um estágio giratório, mudando a orientação da placa podemos escolher a polarização do feixe, que está polarizado horizontalmente, o PBS tem como objetivo transmitir a polarização horizontal e refletir a

polarização vertical. Logo na saída do laser colocamos a placa de meia onda, e devemos tomar cuidado com uma pequena reflexão gerada pela placa de meia onda, para que essa não retorne para a cavidade do laser, podendo diminuir sua eficiência. Depois colocamos o PBS que deve estar ajustado para transmitir a polarização horizontal e refletir a polarização vertical, e devemos tomar cuidado para que a reflexão gerada no PBS também não retorne para a cavidade do laser.

Após esse conjunto o laser é alinhado por um telescópio composto por duas lentes, o alinhamento correto do telescópio é crucial para que a geração das imagens tenha boa qualidade. O objetivo do telescópio é de colimar o laser, que é ejetado com divergência relevante, e de mudar o tamanho do feixe, para que tenha o tamanho correto para preencher a abertura da objetiva.



*Figura 3.13: Mudando a posição das lentes pode-se fazer com que um feixe convergente fique paralelo (a). Usando duas lentes com distâncias focais diferentes fazemos o ajuste do tamanho do laser (b).*

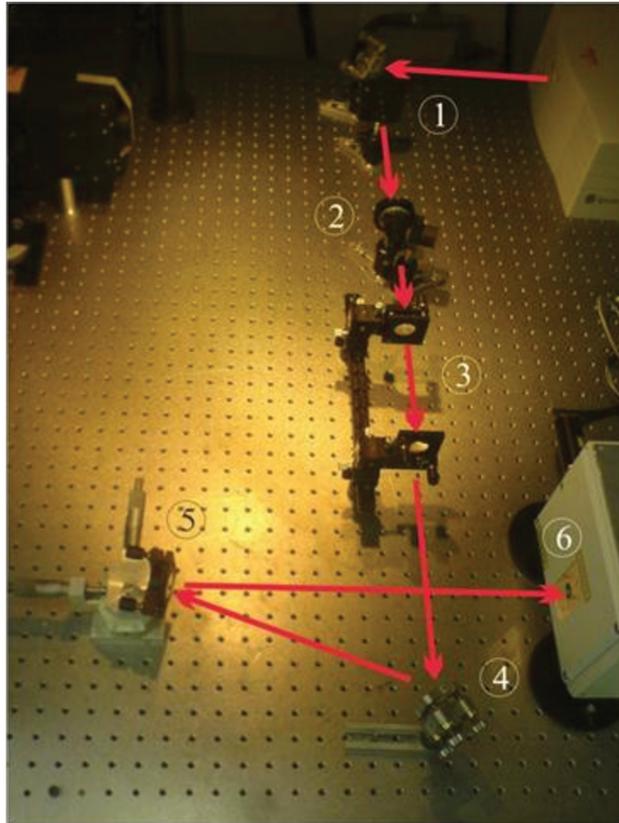


*Figura 3.14: Em a) temos o preenchimento correto da objetiva, se o laser não preencher todo estaremos utilizando uma abertura numérica menor do que a abertura numérica nominal da objetiva b), se o laser estiver com um tamanho maior do que o correto, teremos perda de eficiência c).*

Para alinhar o telescópio primeiro marcamos o caminho do feixe sem o telescópio, depois colocamos a primeira lente, que é montada sobre um sistema de translação XYZ. Essa lente tornará o laser divergente e mudará completamente sua posição, que deve ser reencontrada. Depois colocamos a segunda lente na posição para que seu foco coincida espacialmente com o foco da primeira, a inserção dessa segunda lente também muda a posição do feixe, então recuperamos novamente a posição do feixe e modificamos a posição da lente para que o feixe fique com a menor divergência possível. No nosso caso utilizamos a primeira lente com distância focal de 10cm e a segunda lente com distância focal de 5cm. Essa configuração de lentes diminui a largura do laser pela metade, ficando próximo do tamanho correto para entrada no sistema de varredura.

Antes de entrar no para o sistema de varredura e no FV300 usamos dois espelhos que em conjunto fazem o que chamamos de “walk”, que consiste em movimentar um espelho depois do outro, de forma que o movimento de um compense o movimento do outro e assim fazer com o que o feixe entre no FV300 com a direção correta, o que seria consideravelmente mais difícil de ser feito usando apenas um espelho. Para o alinhamento, fazemos uma imagem com a PMT de transmissão usando uma objetiva de 10x e

movimentamos os dois espelhos para que a imagem fique homogênea. Na figura 3.15 temos uma foto da montagem.



*Figura 3.15: Montagem experimental mostrando com caminho do laser. 1, placa de meia onda; 2, PBS; 3, telescópio; 4 e 5, espelhos para fazer o walk; 6, entrada do FV300.*

Com esse alinhamento já podemos fazer uma imagem, e a partir daí, faremos um alinhamento fino nos espelhos, para que as imagens de transmissão e reflexão fiquem boas e homogêneas.

### 3.3 O Sistema de Varredura e o Microscópio Confocal

A nossa varredura será feita pelo FV300 da Olympus, apesar da microscopia por geração de harmônicos e da microscopia multifóton já serem confocais, o FV300 possui tanto o sistema de varredura, quanto o pinhole, utilizado para a microscopia confocal.

O sistema de varredura, também conhecido como “scan-head” ou “scanner”, faz a varredura do feixe da amostra e também coleta o sinal para a imagem do sinal coletado pela objetiva. O FV300 possui uma entrada para laser de infravermelho além da entrada para o laser de Argônio usado na microscopia confocal, filtros para fluorescência, espelhos dicróicos, espelhos galvanômetros para a varredura do laser, cinco tamanhos de pinhole. A figura 3.16 mostra o FV300.

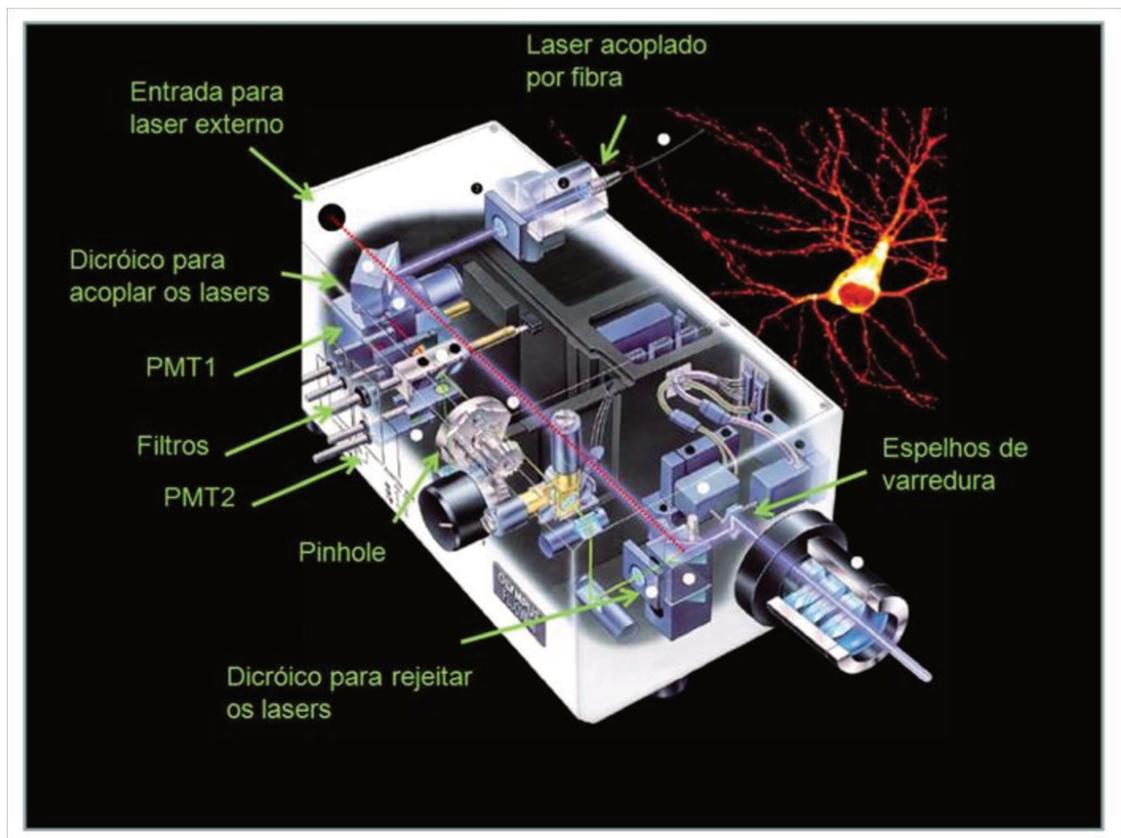
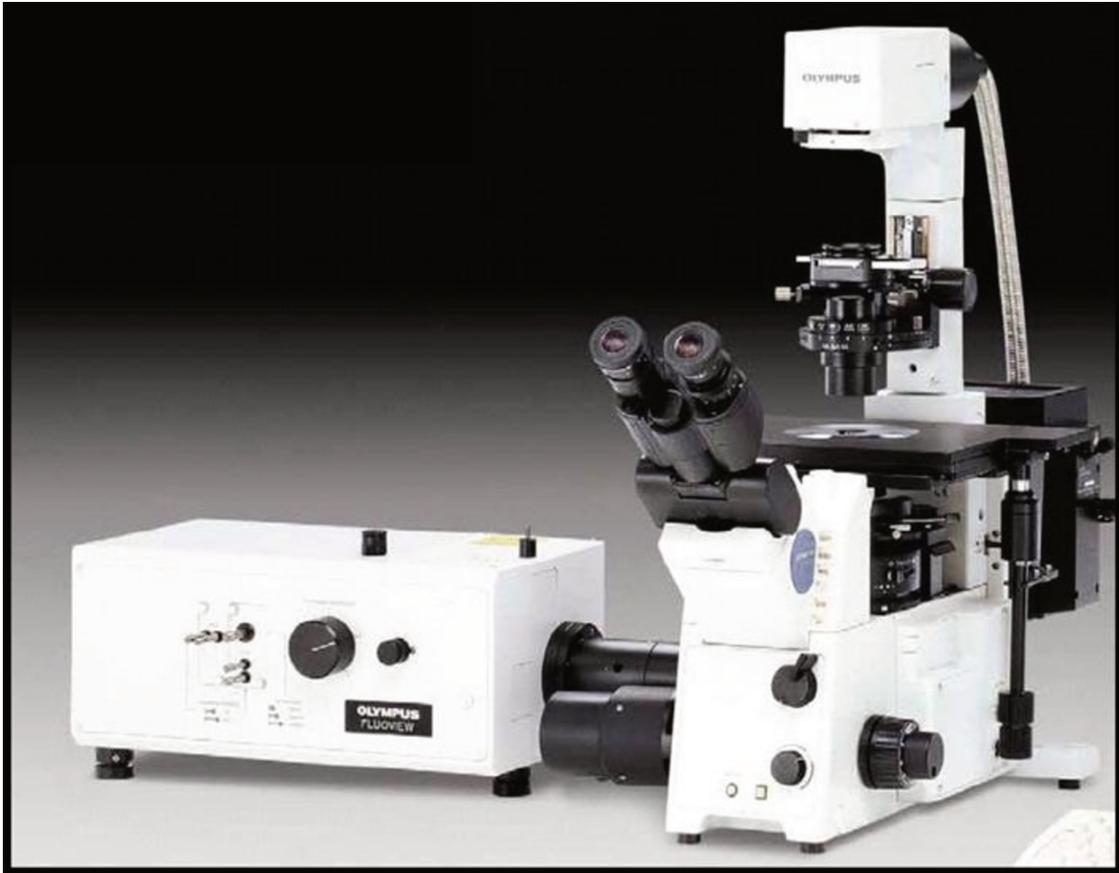


Figura 3.16: O FV300 da Olympus

O “pinhole” é um dos principais componentes do scan head, que atua como um filtro espacial conjugado com o plano focal da objetiva posicionado diretamente em frente às fotomultiplicadoras.

As imagens são adquiridas em 2D fazendo uma varredura no plano focal. As varreduras em X e Y são feitas por dois espelhos independentes. Quando o espelho responsável pela direção X termina de varrer uma linha, ele volta à posição inicial enquanto o espelho responsável pela varredura em Y muda para uma nova posição. A fluorescência que é gerada em cada ponto é coletada pela objetiva retornando pelo mesmo caminho, passando pelos espelhos de varredura no sentido inverso, esse processo é conhecido como “descanning” do sinal. Após os espelhos de varredura a fluorescência passa direto pelo espelho dicróico e é focalizado no pinhole.

Enquanto o laser varre a amostra, o sinal de cada ponto é detectado pela fotomultiplicadora, que está conectada ao computador. Esse sinal é convertido em uma imagem digital onde cada pixel representa um ponto varrido na amostra. A intensidade do pixel será proporcional a intensidade do sinal detectado pela fotomultiplicadora. A reconstrução de imagem 3D é feita sobrepondo as imagens em 2D para diferentes planos focais no eixo Z. A Figura 3.17 mostra o scanhead acoplado ao microscópio.



*Figura 3.17: O FV300 da Olympus acoplado ao microscópio IX-81*

Para que o sistema de varredura funcione corretamente é adotada uma montagem, que fica interna ao microscópio, composto por duas lentes que formam um telescópio, similar ao utilizado na nossa montagem. Esse telescópio tem como objetivo fazer com que o feixe do laser entre inclinado na objetiva sem diminuir a intensidade e seu funcionamento é descrito na figura 3.18.

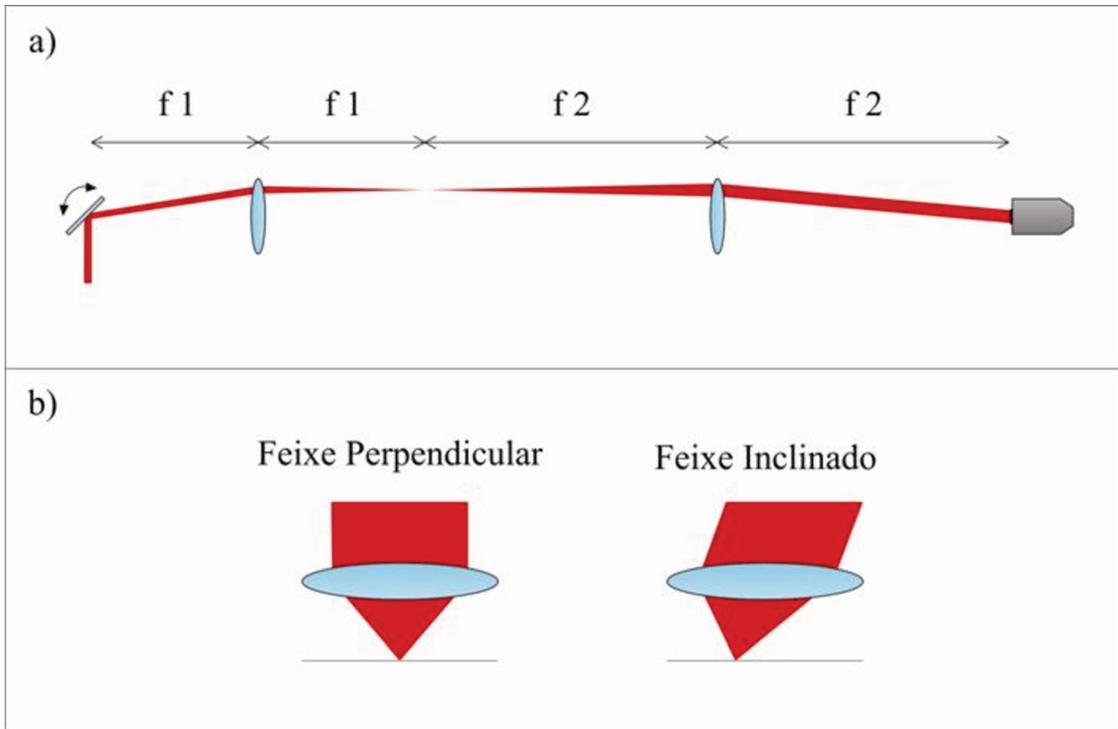


Figura 3.18: Os espelhos galvanômetros são colocados no foco da lente de entrada, essa lente está com o foco no mesmo local do foco de uma segunda lente que direciona o feixe para a entrada da objetiva, assim o sistema de varredura inclina o feixe na objetiva (a), um feixe entrando inclinado na objetiva irá focalizar no mesmo plano de um feixe perpendicular tendo um deslocamento proporcional a inclinação (b).

### 3.4 Os filtros para THG e SHG

Os processos de óptica não linear e a fluorescência por excitação de dois fótons são efeitos que ocorrem simultaneamente na amostra. Devemos filtrar esses sinais, entre si e também o sinal gerado pelo próprio laser, para termos imagens bem definidas do efeito desejado. A escolha de filtros adequados é crítica para o segundo e terceiro harmônicos, uma vez que iremos detectar o sinal gerado para frente, sendo que a intensidade do laser é muito maior, e pode interferir na medida. Para a fluorescência usaremos um filtro 700 short pass que transmite comprimentos de onda abaixo de 700nm.

O laser pode ser ajustável de 690 a 1040nm, isso nos dá um THG entre 230 e 346nm, e um SHG entre 345 e 520nm. A figura 3.19 ilustra os comprimentos de onda possíveis.

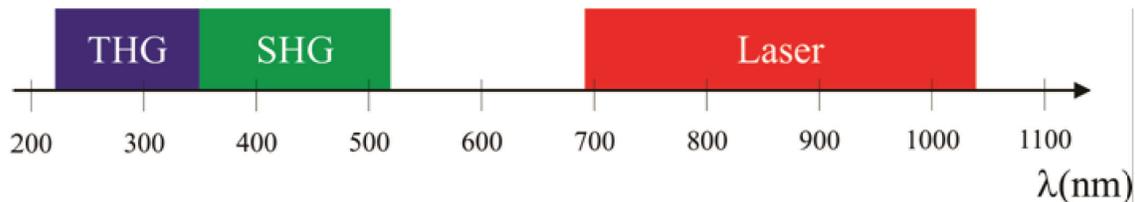


Figura 3.19: Comprimentos de onda para o laser, SHG e THG

Para a escolha do comprimento de onda, consideramos que nas bordas do intervalo de emissão o laser possui potência menor do que no meio, a potência máxima é obtida em aproximadamente 800nm com 3W, e a potência em 1040nm é de 600mW e em 690nm é de 900mW. Outra consideração é com relação ao espalhamento que o sinal experimenta na amostra, mostrado anteriormente proporcional à  $\lambda^{-4}$ . Então não queremos o maior comprimento de onda no qual o laser tenha bastante potência.

Com essas considerações em mente, escolhemos o filtro colorido U340 da Hoya que possuem um espectro de transmissão dado pela figura 3.20

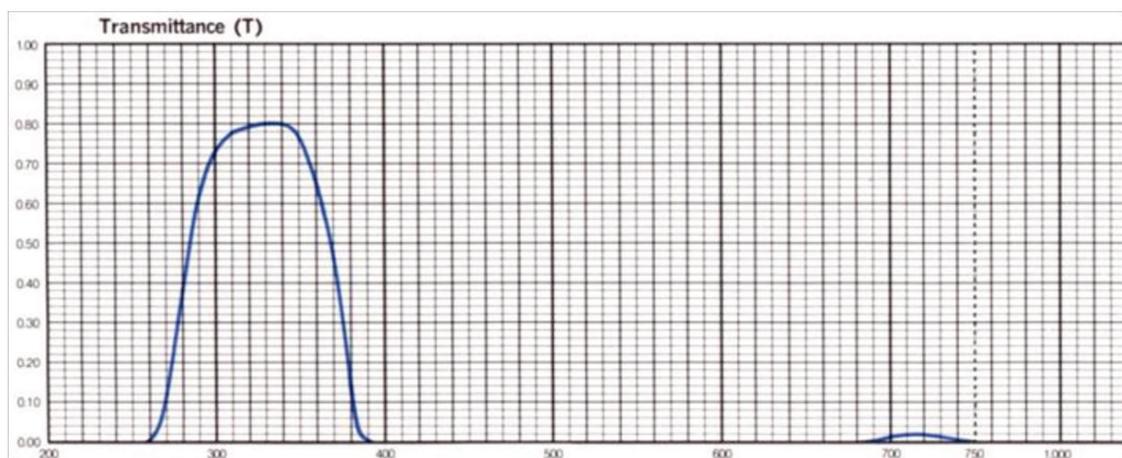
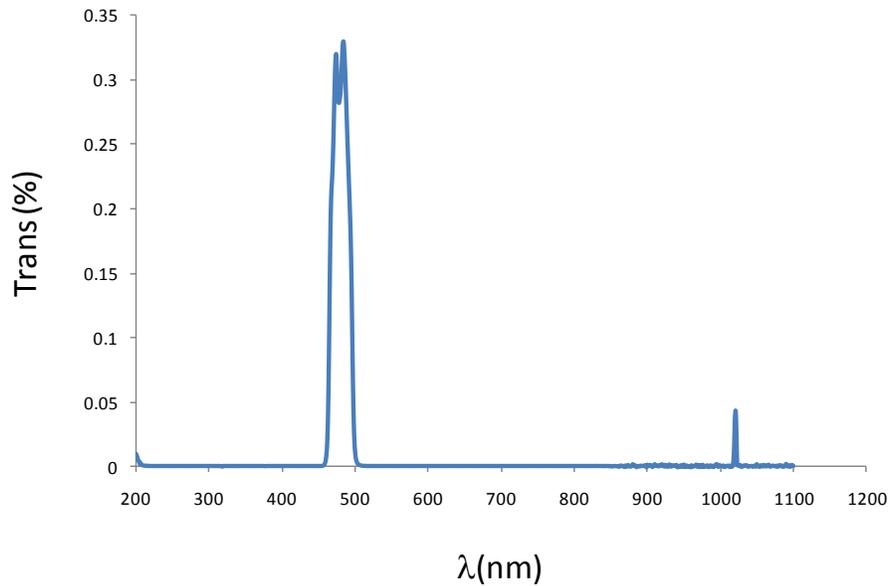


Figura 3.20: Transmissão do filtro usado para THG

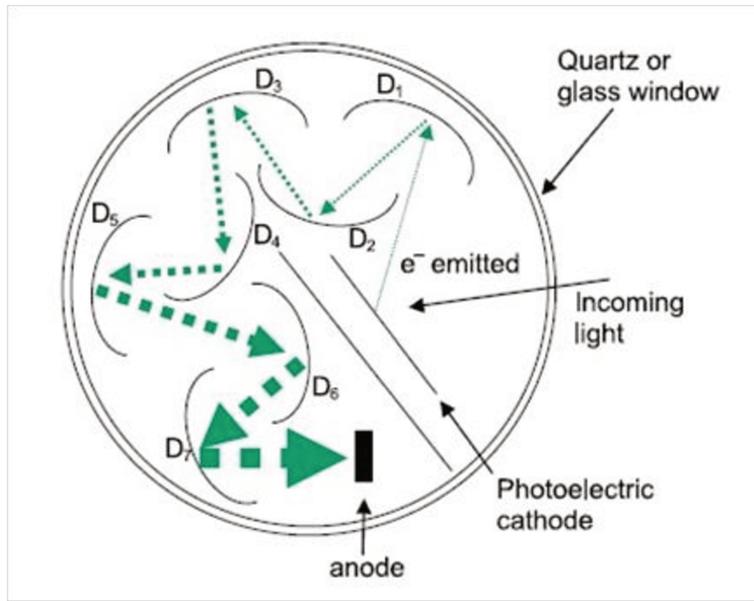
E para o segundo harmônico utilizamos o filtro, que era utilizado pelo grupo para outros experimentos, com espectro de transmissão dado pela figura 3.21



*Figura 3.21: Transmissão do filtro usado para SHG*

## 3.5 Fotomultiplicadora

Na fotomultiplicadora (PMT) o primeiro elétron é emitido através do efeito fotoelétrico e dá origem a uma emissão em cascata e amplificada através da colisão com placas polarizadas contra as quais foi acelerado como mostra a figura 3.22



*Figura 3.22: Configuração de uma fotomultiplicadora.*

Para que um elétron fotoexcitado seja emitido é necessária uma energia mínima para ultrapassar a função trabalho da superfície dos metais e a resposta espectral das fotomultiplicadoras tende a ser nula na região do infravermelho. Tratamentos da interface como GaAs podem ampliar a região de resposta espectral, até pouco tempo limitada em torno de 900-1000 nm.

Como as fotomultiplicadoras são muito sensíveis, é importante evitar o excesso de luz, que geraria um excesso de corrente, podendo danificá-las. Nós realizamos as imagens com uma fotomultiplicadora Hamamatsu R3896, com tempos de resposta da ordem de ns e resposta espectral entre 185-900 nm conforme podemos ver na figura 3.23

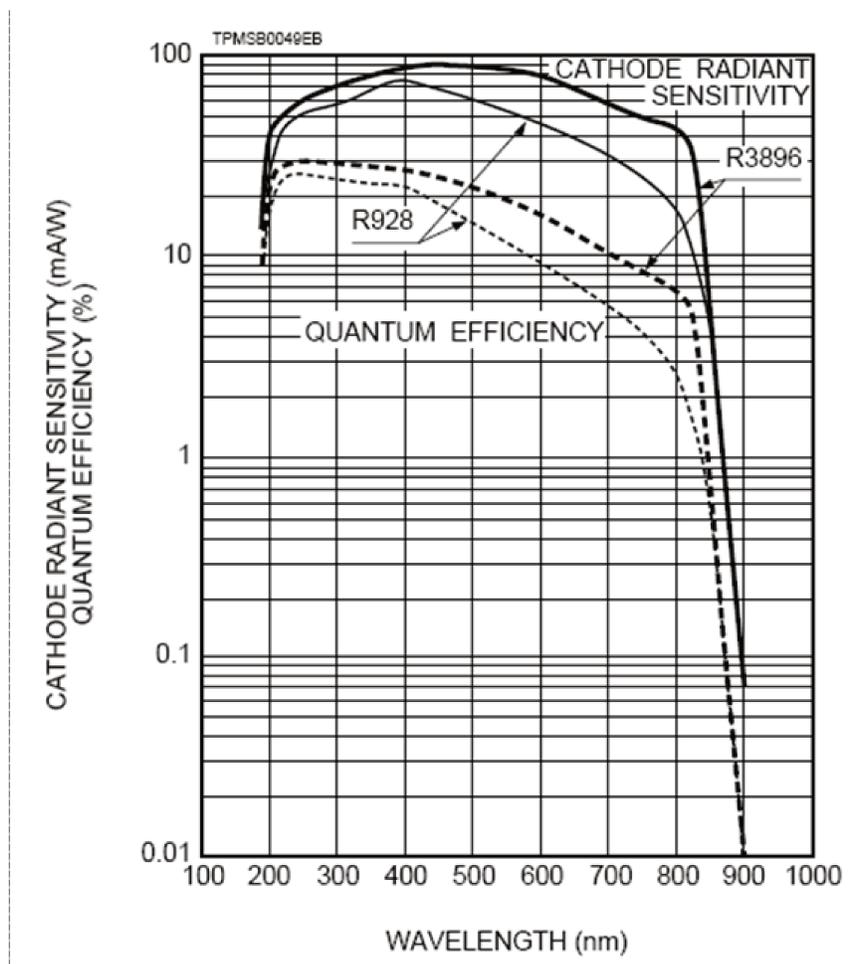


Figura 3.23: Resposta espectral da fotomultiplicadora.

## 3.6 Montagem Experimental

Antes da montagem definitiva, em que foi possível a obtenção de imagens de óptica não linear e multifóton, nós fizemos a mesma montagem que já utilizávamos para o SHG somente com a mudança do filtro para transmissão do SHG para um filtro para transmissão do THG.

Nessa montagem usávamos o condensador, que tem dois objetivos, coletar o sinal da amostra e focalizar na PMT e focalizar a luz de iluminação na amostra. A figura 3.24 mostra a primeira montagem experimental realizada. A PMT externa, que mede o sinal

gerado na direção “para frente” é utilizada para o THG e SHG. E a PMT que fica interna ao FV300 é utilizada para medir o sinal da fluorescência multifóton que é captado pela objetiva na mesma direção de incidência do laser.

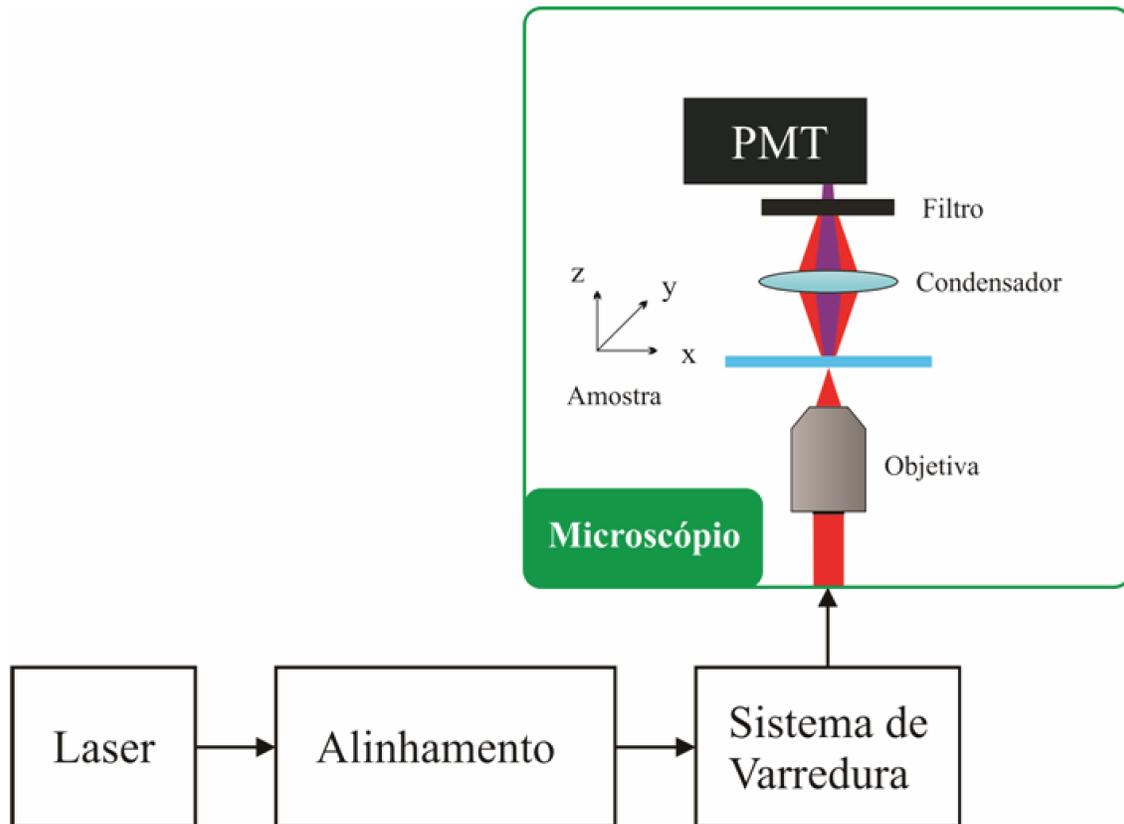


Figura 3.24: Primeira montagem experimental realizada

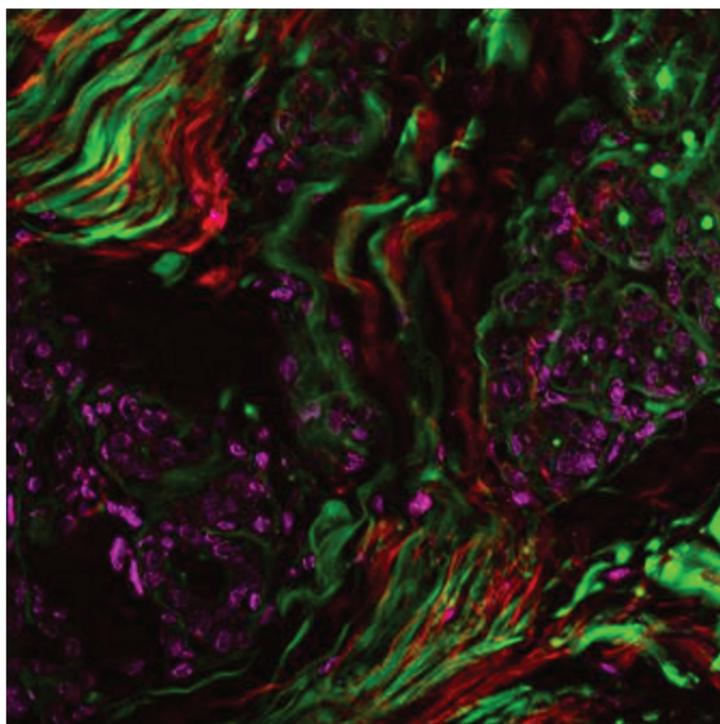
Mas o uso do condensador se mostrou incompatível com o comprimento de onda do THG, que está no ultravioleta. Realizamos algumas tomadas de imagens, mas não obtivemos os resultados esperados, isso porque o vidro presente no condensador estava absorvendo o sinal do THG. Seria necessário nesse caso o uso de um condensador especial<sup>31</sup>. Por isso optamos por não usarmos mais o condensador e para que

<sup>31</sup> D. Yelin, D. Oron, E. Korkotian, M. Segal, Y. Silbelberg, “Third-harmonic microscopy with a titanium–sapphire laser”. Appl. Phys. B 74, S97–S101 (2002).

conseguíssemos coletar a maior quantidade de sinal, colocamos a PMT no lugar do condensador, bem próxima à amostra.

Um segundo problema que surgiu foi com a obtenção das imagens de SHG e THG para uma mesma região. Como usávamos duas montagens diferentes, uma para cada sinal, era necessário trocar a posição da PMT, e durante essa troca, por mais que utilizássemos todo o cuidado possível, sempre ocorriam algumas trepidações no microscópio, o que fazia com que a amostra mudasse a sua posição em alguns  $\mu\text{m}$ .

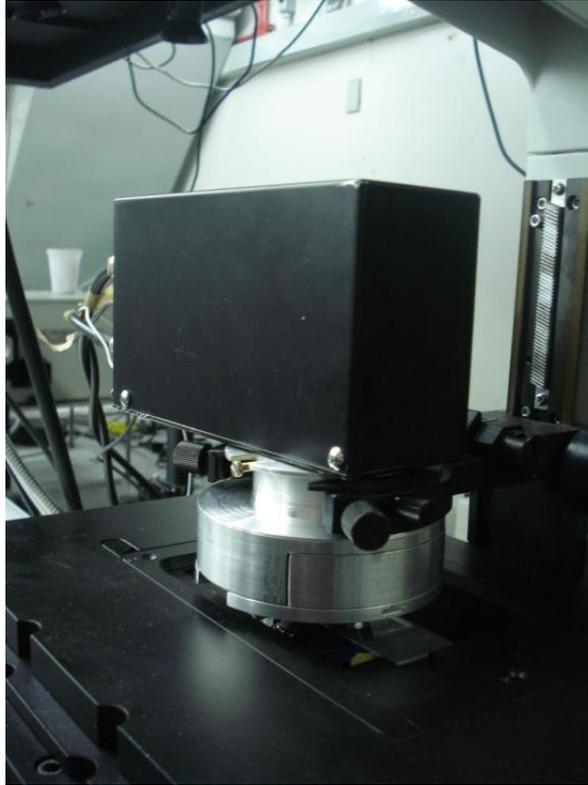
Assim tínhamos uma imagem em que o SHG e o THG apareciam deslocados. A figura 3.25 exemplifica essa situação.



*Figura 3.25: Amostra fixada de mama humana, TPEF Hematoxilina Eosina (verde); SHG (Vermelho) que está deslocado para direita; THG (Magenta).*

Para resolver esse problema projetamos uma peça que acopla a PMT ao suporte do condensador, e que possui uma gaveta para trocarmos os filtros, sem causar nenhuma

trepidação ao microscópio, e por consequência, à amostra. A figura 3.26 mostra como ficou a PMT acoplada ao suporte do condensador através da peça com gaveta.



*Figura 3.26: PMT e peça com gaveta para troca de filtros*

Com a resolução desses dois problemas conseguimos integrar as técnicas e o resultado é a seguinte montagem experimental mostrada na figura 3.27

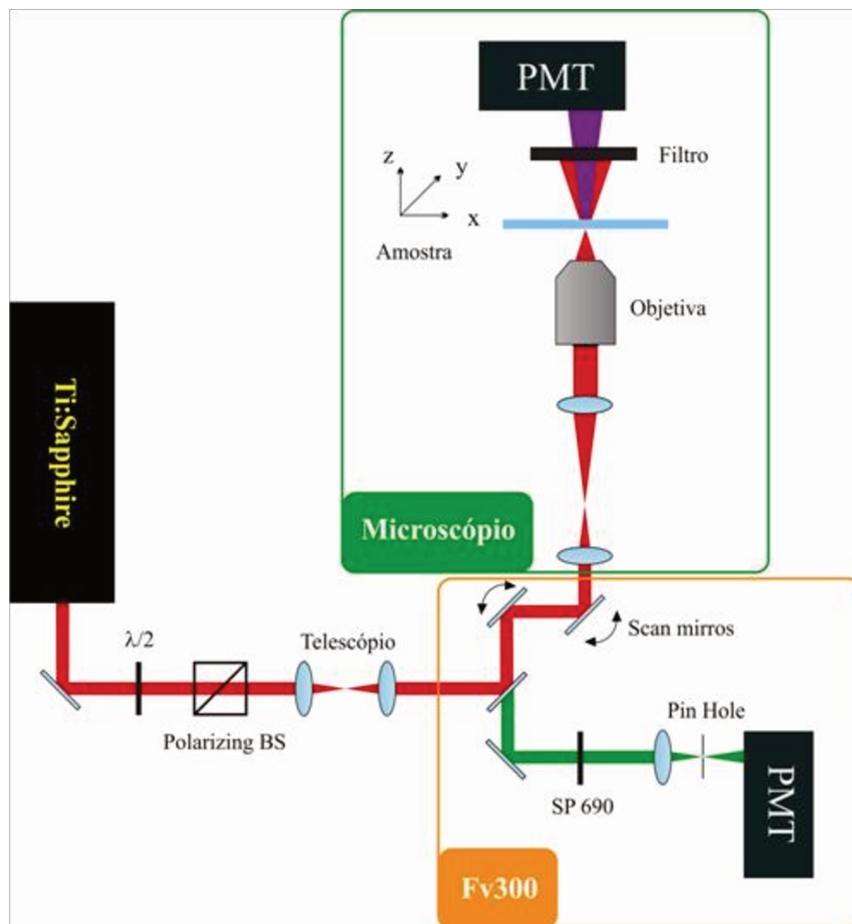


Figura 3.27: Montagem experimental para microscopia THG

A montagem é composta por um microscópio invertido IX-81, o sistema de varredura confocal FV300, ambos da Olympus. Dentro do FV300 há duas fotomultiplicadoras (PMT) Hamamatsu 3896, outra PMT do mesmo modelo será utilizada para captar o sinal gerado para frente. O laser é um Mai-Tai de Ti:Safira da Spectra-physics. Um estágio de translação da Prior Scientific, modelo ProScan foi usado para movimentar as amostras na direção x-y, enquanto o movimento na direção z é realizado pelo próprio IX-81.

Para detectarmos o sinal de THG usamos dois filtros coloridos Hoya U340 que possui um pico de transmissão em 340. Para o SHG usaremos um filtro band pass em 475, para transmitir o sinal de SHG e um filtro shortpass 700 para bloquear o laser. Na frente da PMT do FV300 também colocaremos um filtro shortpass 700 para bloquear a reflexão do

laser. As imagens foram obtidas com uma objetiva Uplan FL N da Olympus de 40x e NA 1.3 de imersão a óleo

### 3.7 Sistema para Caracterização do sinal de THG

Em nosso trabalho também fizemos uma caracterização do sinal, estudando a dependência da intensidade do sinal com relação à intensidade do laser. Para isso usamos uma montagem experimental simples, onde usamos uma lente com distância focal de 2,5cm focalizando o laser na interface do vidro de uma lâmina de microscópio com o ar. Essa lente foi colocada em um estágio de translação em três dimensões para um alinhamento fino do laser na superfície da lâmina. Após a lâmina colocamos o mesmo filtro usado na montagem anterior para absorver o laser e transmitir o sinal de THG. Esse sistema foi montado na entrada de um monocromador de 30cm da Acton Research modelo Spectra-Pro 300i em conjunto da CCD “back-illuminated” da Princeton Instruments. Essa montagem é ilustrada pela figura 3.28.

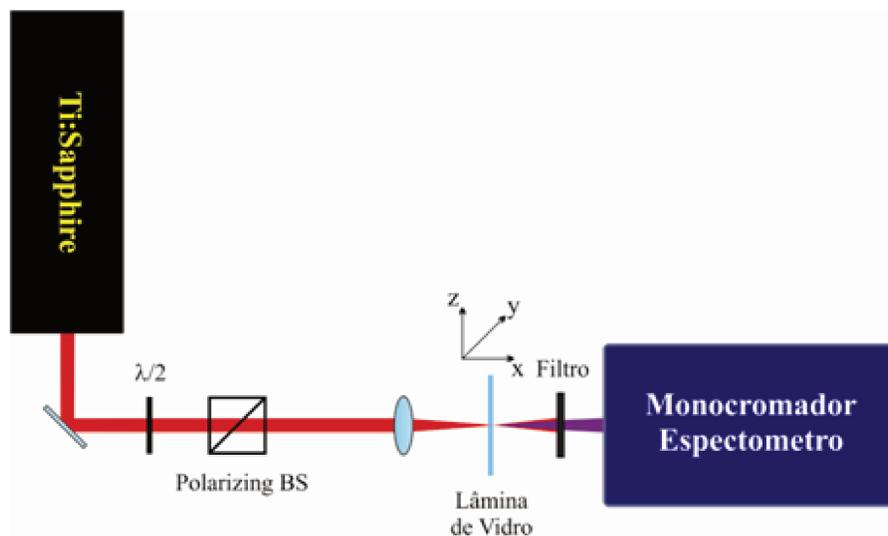


Figura 3.28: Montagem experimental para caracterização do sinal de THG.

O monocromador é equipado com duas grades de difração com blaze de 500nm, uma com 1200 e outra com 300 linhas/mm. Ele e a CCD são comandados pelo computador através do programa WinSpec.

A CCD (Charge-coupled device) é composta de uma matriz de pixels de 100x1200 fotodiodos de silício na configuração “back-illuminated” e refrigerada a nitrogênio líquido.



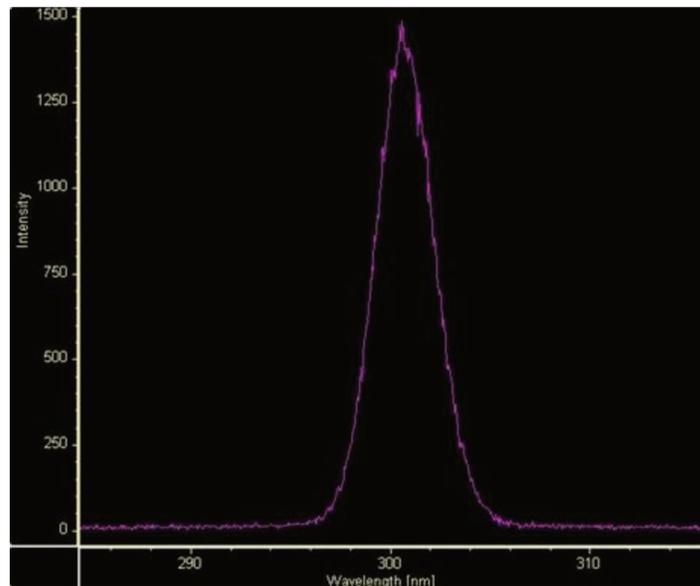
## Capítulo 4

### Resultados

Nesse capítulo apresentaremos os resultados obtidos com as microscopias SHG, THG e TPEF. Trabalhamos com amostras biológicas e não biológicas, e os resultados são, em sua maioria, imagens. Exceto se mencionado, as imagens foram obtidas com uma velocidade de varredura de  $8\mu\text{s}/\text{pixel}$ , em uma resolução de  $512 \times 512$  pixels, com laser em  $940\text{nm}$ , o que nos dá um sinal de THG em  $313\text{nm}$  e SHG em  $470\text{nm}$ .

#### 4.1 THG para uma interface vidro-ar

Para caracterizar o sinal de THG utilizamos a montagem experimental da figura 3.28 do capítulo anterior, utilizando o laser em  $900\text{nm}$  obtivemos o THG em  $300\text{nm}$ . Os resultados são como o da curva mostrado pela figura 4.1, onde temos um gráfico da intensidade do sinal pelo comprimento de onda.



*Figura 4.1: Intensidade do sinal de THG em 300nm*

O sinal de THG só ocorria quando laser estava focalizado na interface entre ar e vidro. Isso era visualizado quando movíamos a localização do vidro e o sinal sumia, o mesmo não acontecia com o sinal do laser em 900nm que independente da posição da amostra sempre era detectado pelo monocromador.

Variamos a potência do laser, tomada antes da lente, de 430mW à 1140mW, e fizemos as mesmas medidas do gráfico da figura 4.1 para as diferentes potências. Depois fizemos uma integração da intensidade total de THG gerado para cada curva. O resultado é visto na figura 4.2 que mostra um gráfico log-log da intensidade de THG em função da potência do laser.

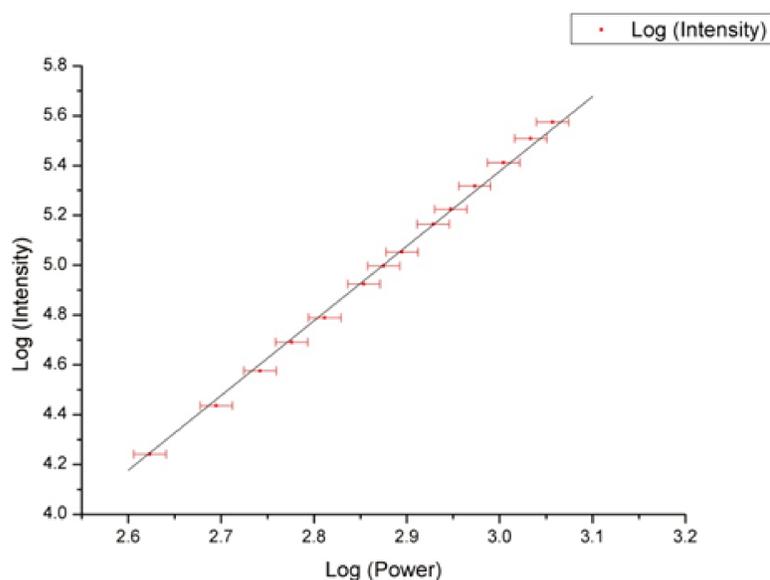
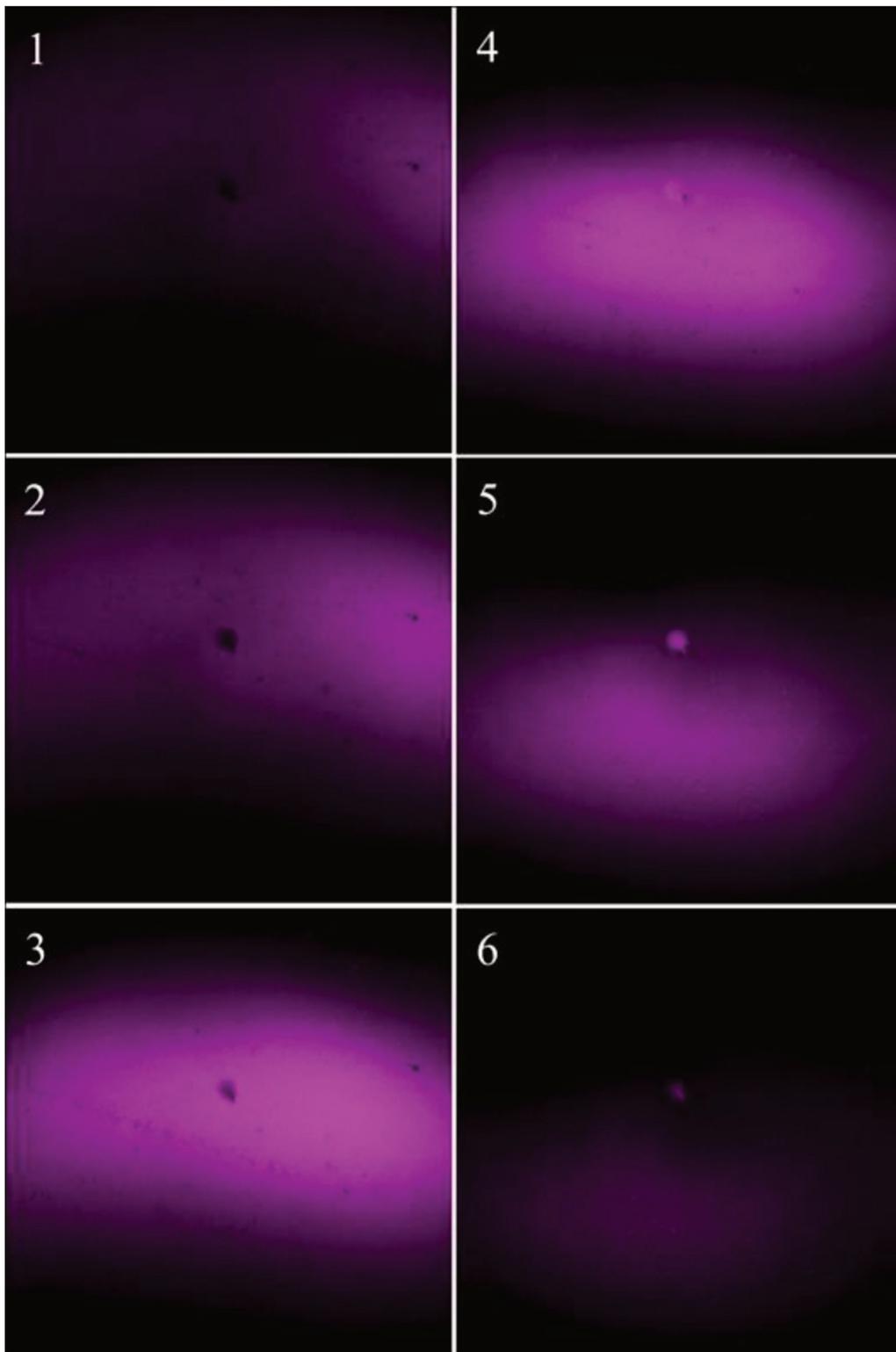


Figura 4.2: Gráfico log-log da intensidade pela potência, a curva em preto está ajustada com inclinação de 3, as barras de erro são referentes à imprecisão do instrumento de medição.

Esse resultado mostra a dependência que a intensidade do sinal de THG tem com o cubo da intensidade do laser,  $I_{THG} \propto [I_{Laser}]^3$ .

Realizamos o mesmo experimento, mas dessa vez, no microscópio, utilizando a montagem experimental da figura 3.27 do capítulo anterior. No lugar da amostra colocamos apenas uma lamínula de vidro, que possui espessura de 17 $\mu$ m e fizemos várias imagens de

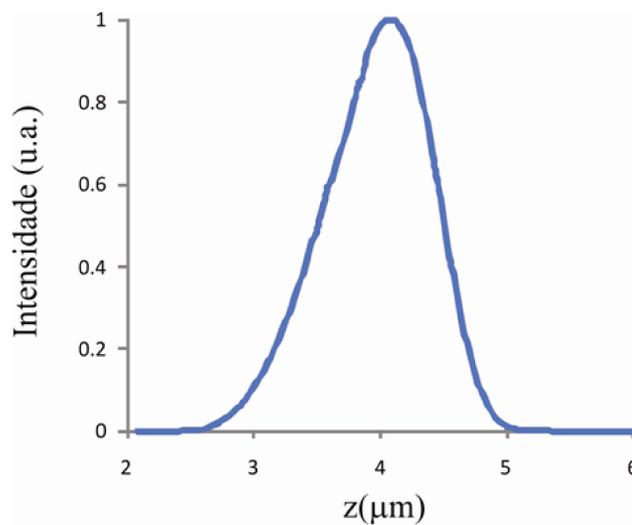
varredura em diferentes profundidades, variação da distância entre a objetiva e a amostra. As imagens são mostradas na figura 4.3.



*Figura 4.3: Imagens de THG gerado em uma interface vidro-ar.*

Na parte 1 da figura 4.3 o sinal é mais forte na parte superior da imagem, e na parte 6 o sinal é mais forte na parte inferior da imagem, isso é devido a uma pequena inclinação apresentada pela lamínula. É possível também visualizar deficiências na superfície do vidro, inclusive uma pequena protuberância circular no meio da imagem.

Com essas imagens, fizemos um gráfico da intensidade, realizando uma integração da intensidade em cada ponto das imagens, do THG em função da distância em  $z$ , conforme mostrado na figura 4.4

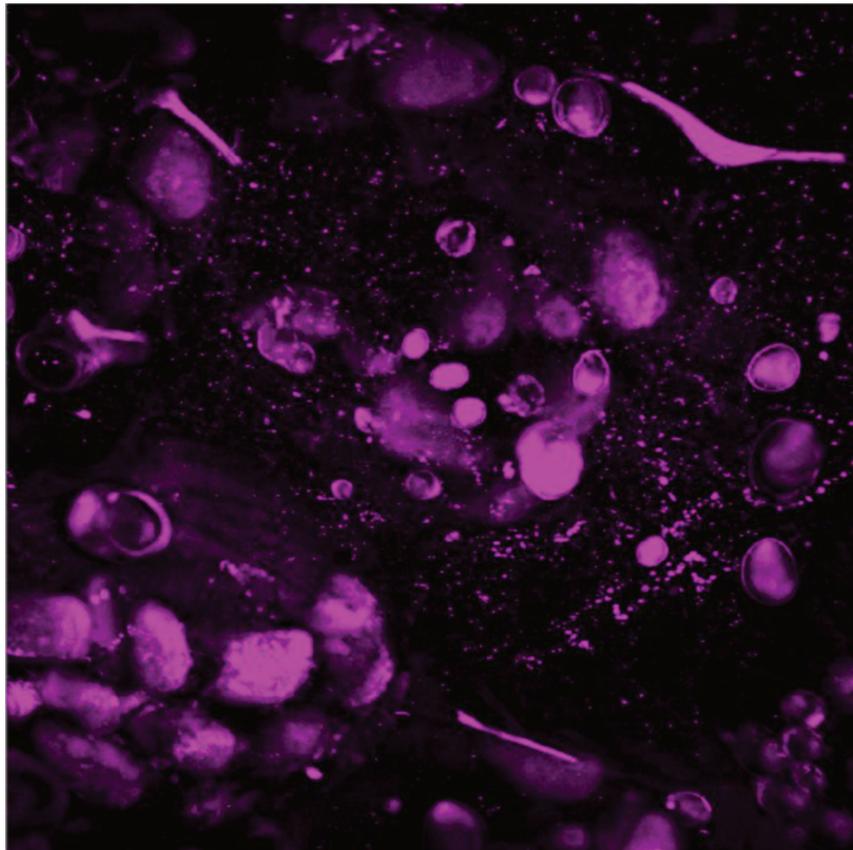


*Figura 4.4: Intensidade de THG gerado em uma interface vidro-ar.*

Durante a realização de imagens de várias amostras, é comum termos um sinal muito intenso quando a focalização do laser se aproxima da interface com a lamínula, esse sinal pode ser confundido com o sinal que deveria ser gerado na amostra. Tomamos muito cuidado para termos certeza de que o sinal era gerado na amostra e não na interface com a lamínula.

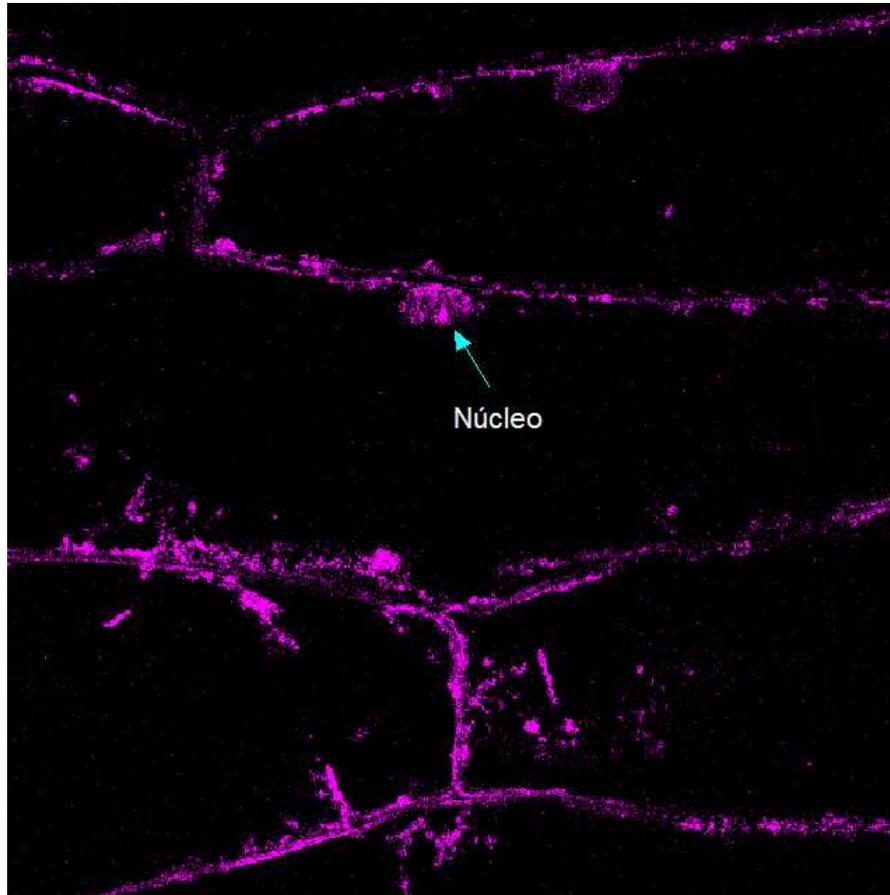
## 4.2 Resultados para Microscopia THG

A primeira amostra que utilizamos para testes foi uma batata. Cortamos uma fatia bem fina do interior da batata, colocamos sobre uma lamínula. Aqui uma grande preocupação nossa foi não colocarmos nada sobre a amostra que pudesse diminuir nosso sinal. Escolhemos uma região da borda fatia, para que o sinal gerado não fosse atenuado, e fizemos imagens de terceiro harmônico.



*Figura 4.5: THG de batata em magenta*

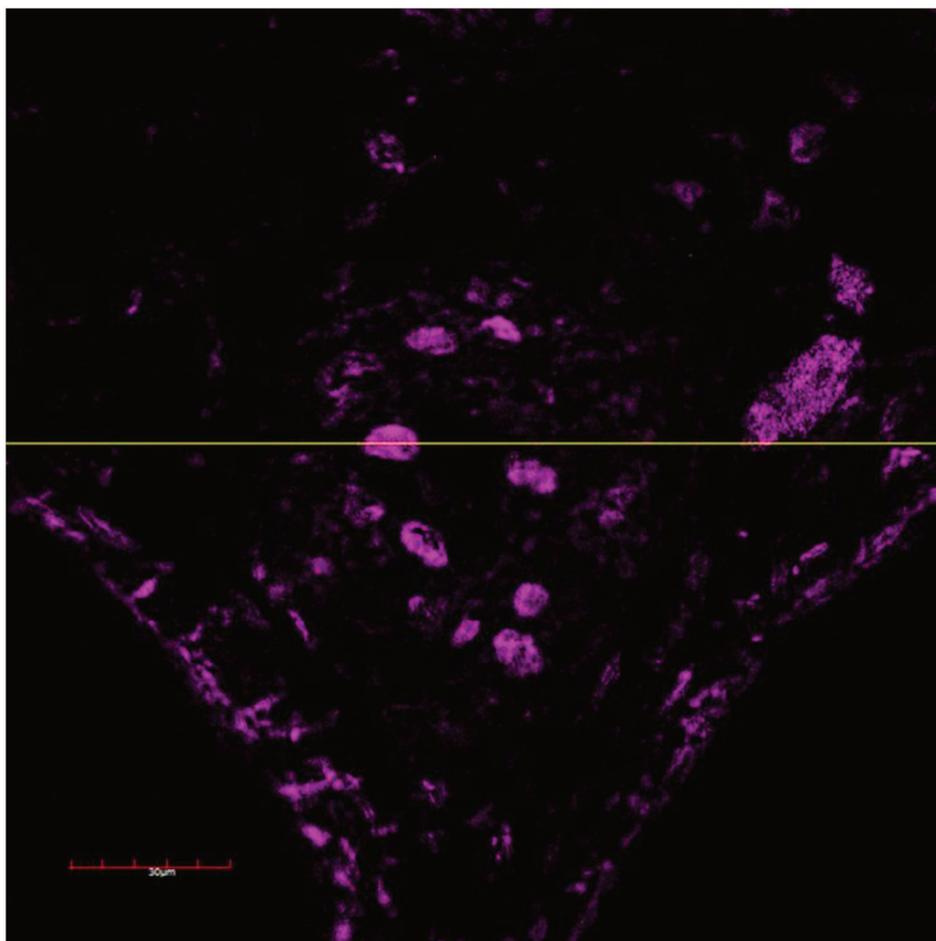
Usamos também como amostra preliminar uma cebola, tiramos uma camada de célula do interior da cebola e fizemos a seguinte imagem.



*Figura 4.6: THG de uma mostra de cebola*

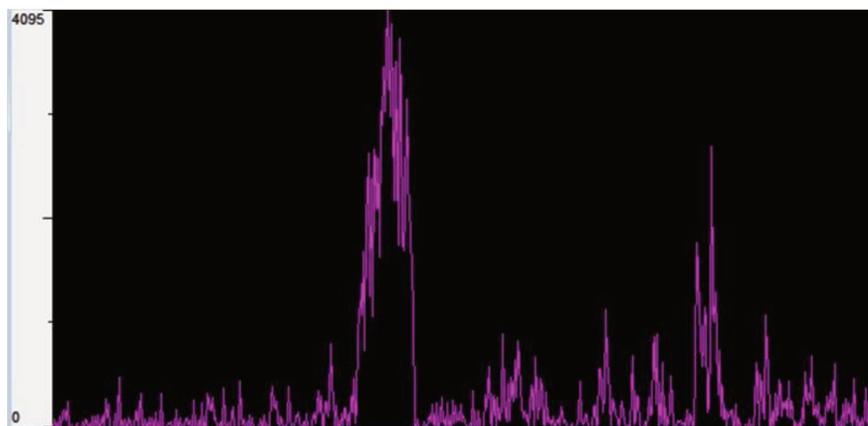
Na imagem da figura 4.6 podemos identificar o núcleo da cebola sem necessidade de marcação. Para as duas imagens utilizamos uma objetiva de 40x de imersão em óleo.

Fizemos imagens de cortes de 10 $\mu$ m de espessura de amostras de próstata de rato. A amostra foi congelada e montada em lâmina com glicerina e PBS. Nesse caso temos uma perda de sinal pois estamos usando uma lâmina de vidro, como é padrão em preparação de amostras para microscopia confocal. A imagem da amostra de próstata é mostrada na figura 4.7.



*Figura 4.7: THG de uma mostra de próstata, resolução de 1024x1024 pixels*

Uma das nossas preocupações em amostras que estão em lâmina de vidro é a se a intensidade do sinal será suficiente para obtermos uma imagem sem ruído. Para isso tiramos o perfil de intensidade na linha horizontal amarela, mostrado na figura 4.8.



*Figura 4.8: Intensidade do sinal pela linha amarela da figura 4.7*

Vemos que o sinal gerado é suficiente para termos uma imagem bem definida. Em amostras não biológicas o resultado é ainda melhor, pois a intensidade do laser incidindo sobre a imagem pode ser maior, sem a preocupação de danificar as amostras. Na figura 4.9 fizemos uma imagem em três dimensões de uma folha de polycaprolactone (PCL) que é um polímero biodegradável. Com a microscopia THG podemos ver a organização das fibras. E na figura 4.10 vemos a sobreposição de todas as fatias, que nos dá a informação da organização das fibras e de sua posição espacial.

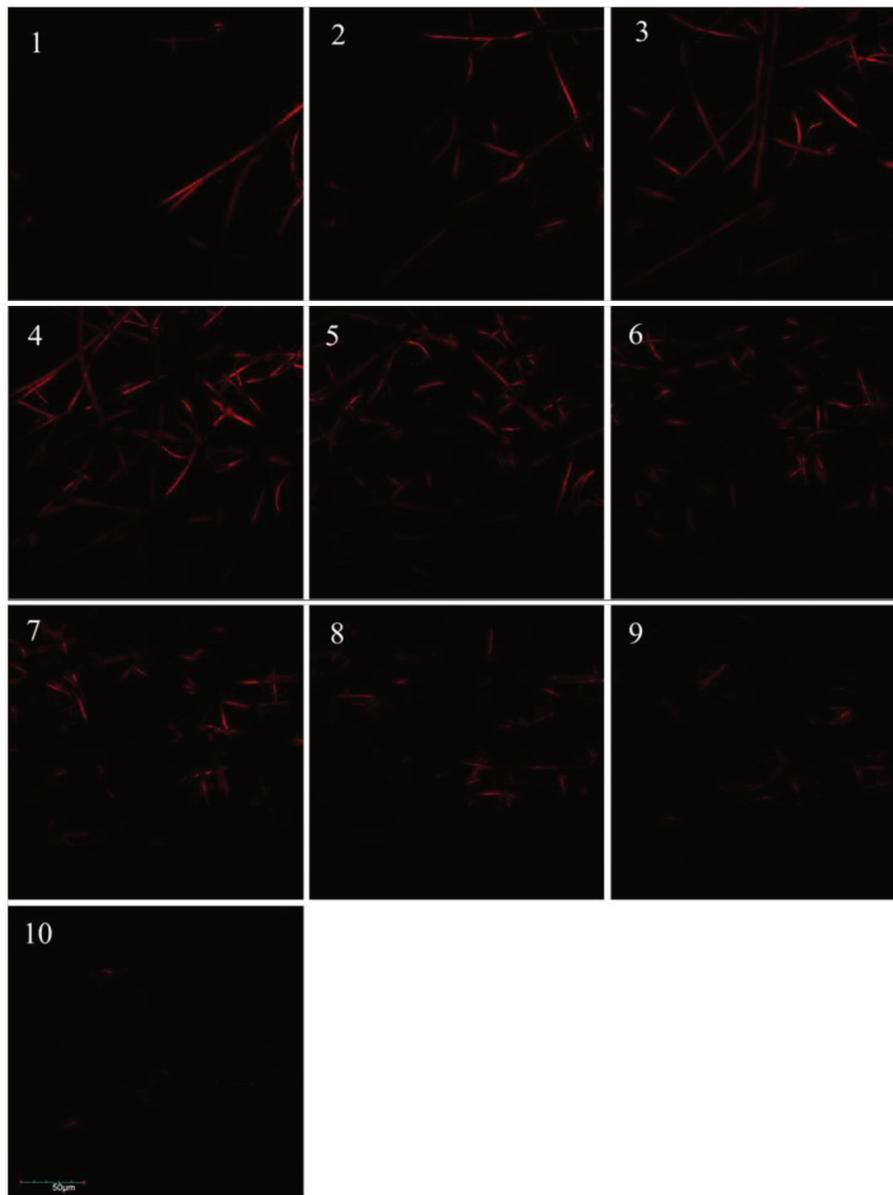
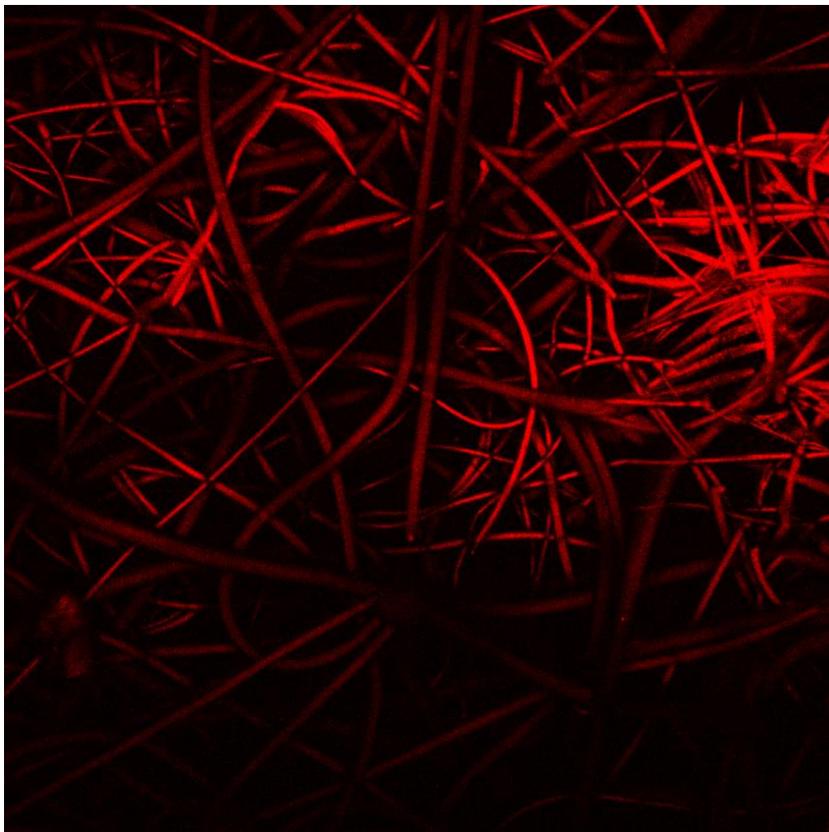


Figura 4.9: THG de PCL em vermelho, Objetiva de 60x, resolução de 2048x2048 pixels

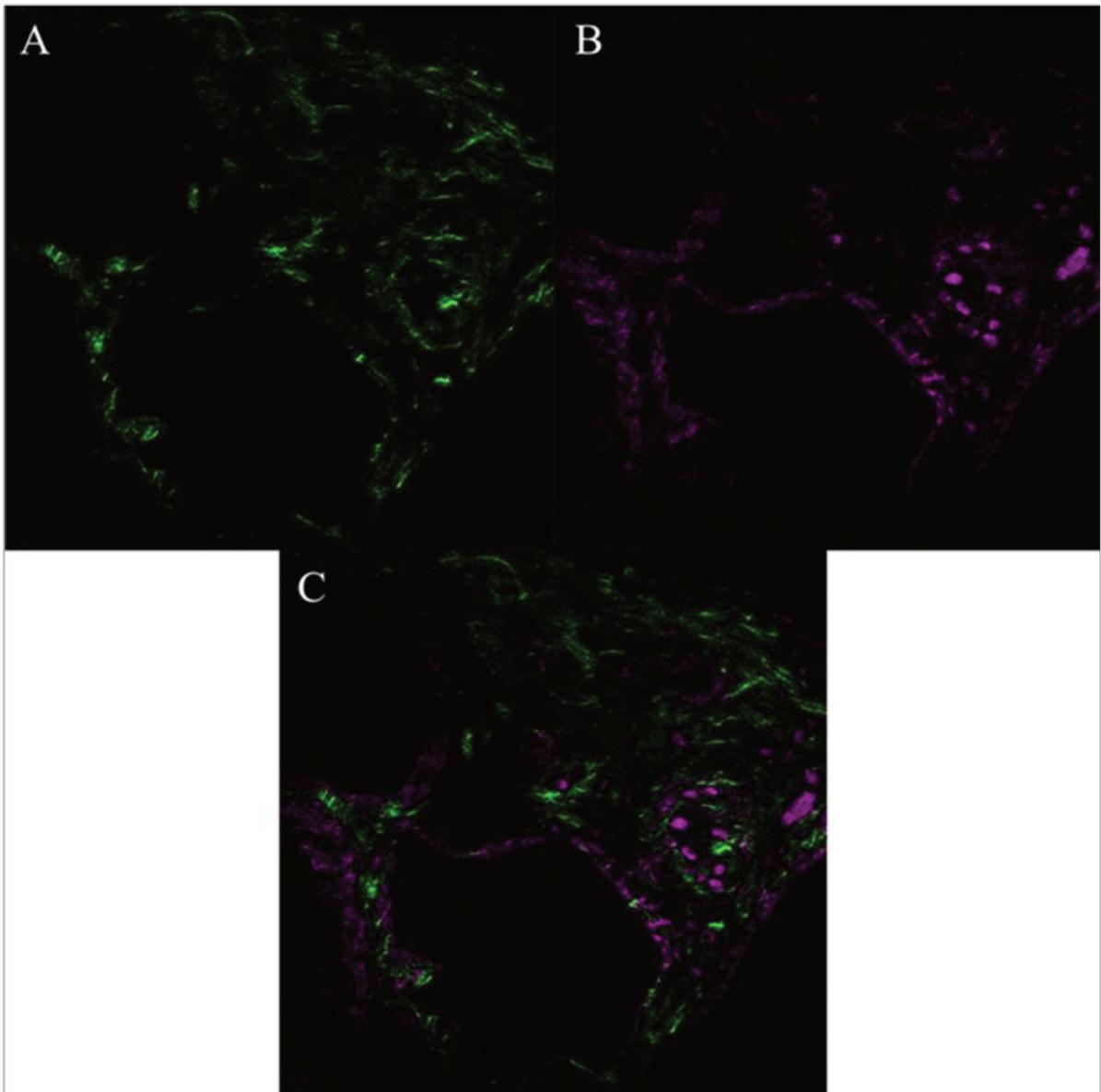


*Figura 4.10: THG de PCL em vermelho, superposição das imagens da figura 4.9.*

### 4.3 Integração entre as técnicas THG, SHG e TPEF.

Utilizando a montagem da figura 3.21 conseguimos fazer imagens de THG, SHG e TPEF de uma mesma região da amostra. As imagens são construídas separadamente, e depois são mescladas em uma imagem através do programa fluoview que acompanha o microscópio.

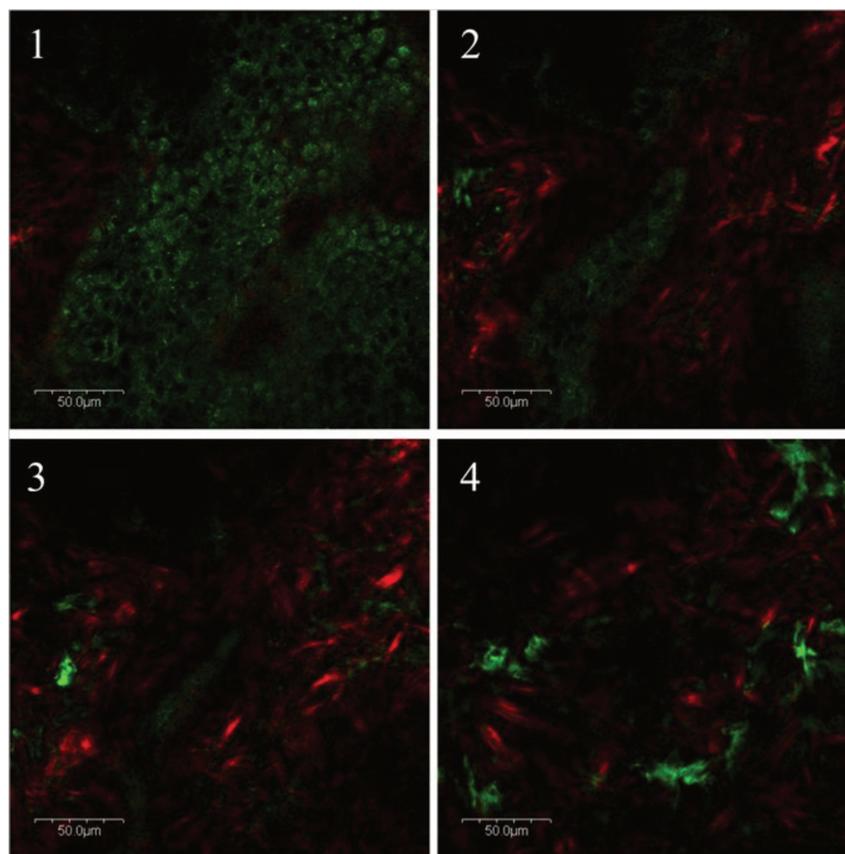
A figura 4.11 mostra uma amostra de próstata de rato.



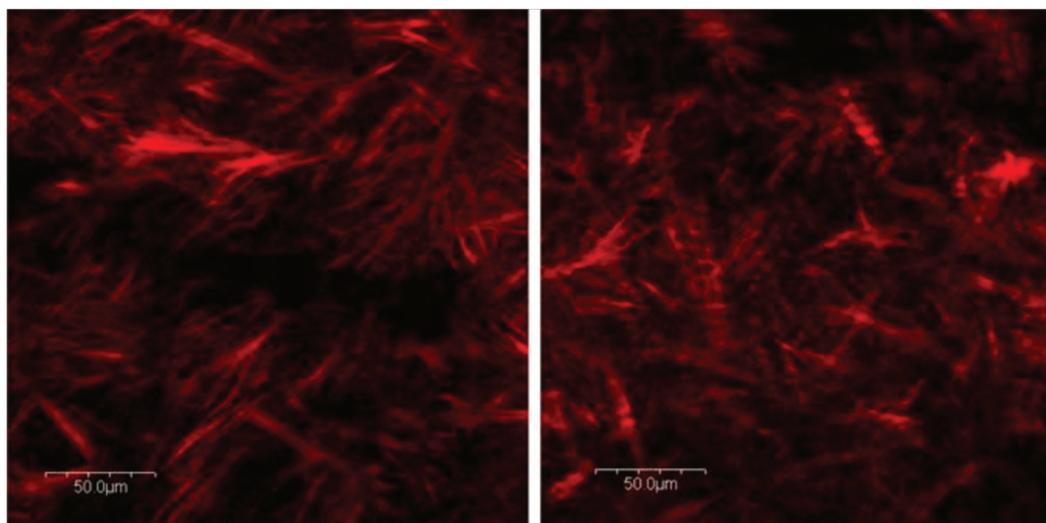
*Figura 4.11: Em A temos a imagem de SHG (Verde), em B THG (Magenta) e em C SHG (verde) e THG (Magenta).*

As imagens foram feitas em momentos diferentes, primeiro fizemos a imagem do SHG e depois mudamos o filtro e fazemos o THG. Da mesma forma podemos fazer imagens em três dimensões, na figura 4.12 temos uma amostra de córnea humana que

apresenta a patologia keratoconus, e que foi retirada durante um transplante de córnea há poucas horas da obtenção das imagens.



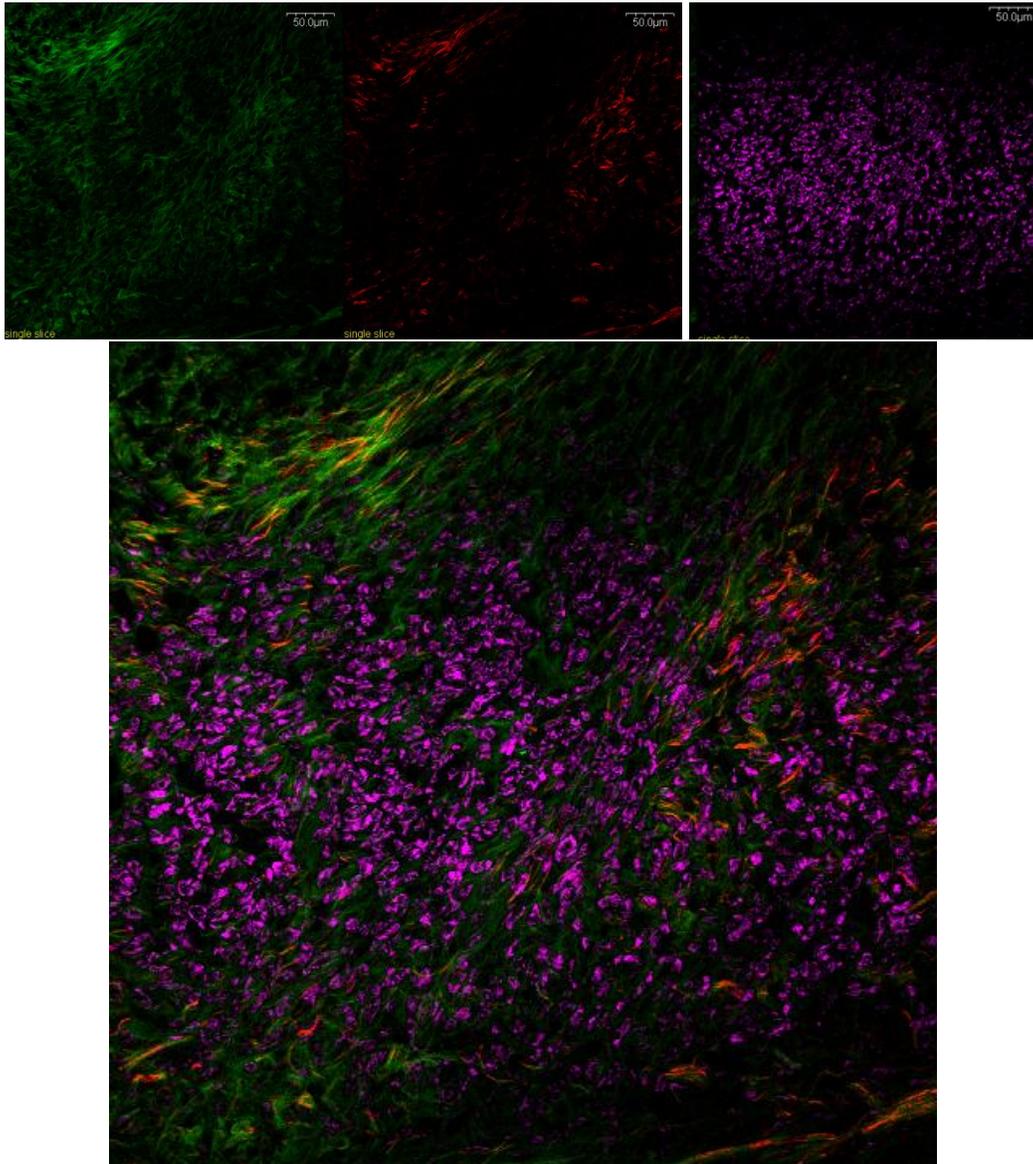
*Figura 4.12: Imagens de córnea, THG em verde e SHG em vermelho*



*Figura 4.13: Imagens de córnea, SHG em vermelho; Na esquerda córnea sem tratamento; Na direita córnea que passou por processo de crosslink (CXL).*

O crosslink, ou crosslinking, é utilizado para diminuir as irregularidades da córnea, criando novas ligações entre as moléculas de colágeno.

A figura 4.14 mostra uma amostra congelada de fibroma humano, corado com Hematoxilina e Eosina.



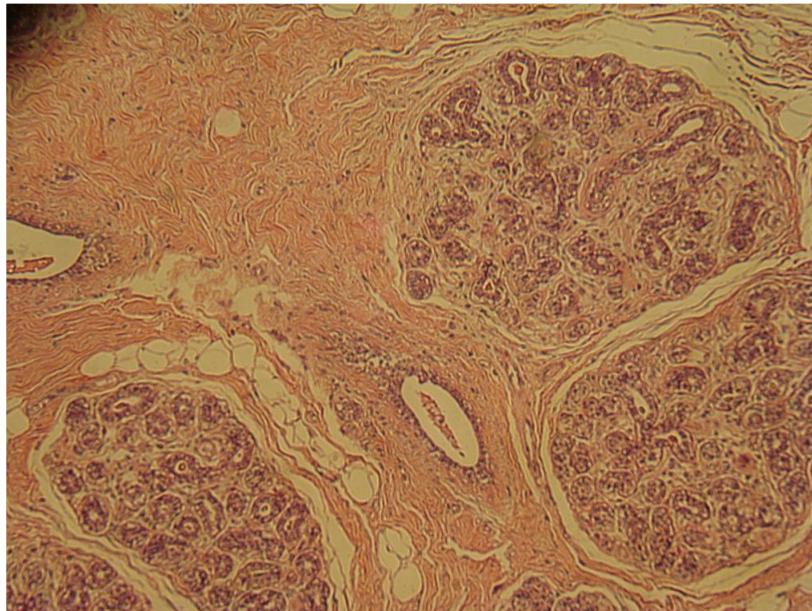
*Figura 4.14: Imagens de um fibroma, TPEF em verde; SHG em vermelho e THG em magenta.*

## 4.4 Microscopia NLO para Amostras Fixadas.

A fixação em parafina e a marcação com Hematoxilina (H) e Eosina (E), a marcação com os dois corantes é conhecida como HE, é uma das técnicas mais populares entre patologistas para executar diagnóstico médico em seções histológicas. Esta técnica é referida como o padrão ouro para investigações histológicas e possui a habilidade de gerar contraste entre o citoplasma das células e seu núcleo.

Durante a fixação as amostras passam por vários processos que diluem os lipídios, isso é suficiente para zerar o sinal de THG gerado em tal amostra, o que foi constatado. Mas depois que o tecido é corado com HE, as amostras voltam a ter a condição necessária de variação de  $\chi^{(3)}$  e sinal de THG é possível<sup>32</sup>.

Realizamos imagens com TPEF de HE, SHG e THG de várias amostras de tecidos. A figura 4.15 mostra a imagem gerada com iluminação branca de uma amostra de mama humana normal.

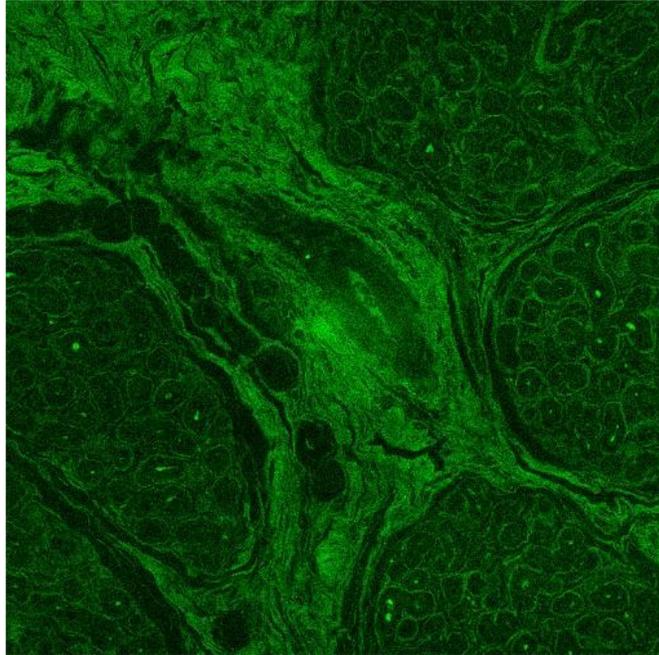


*Figura 4.15: Imagem de mama marcado com HE, com objetiva de 10x*

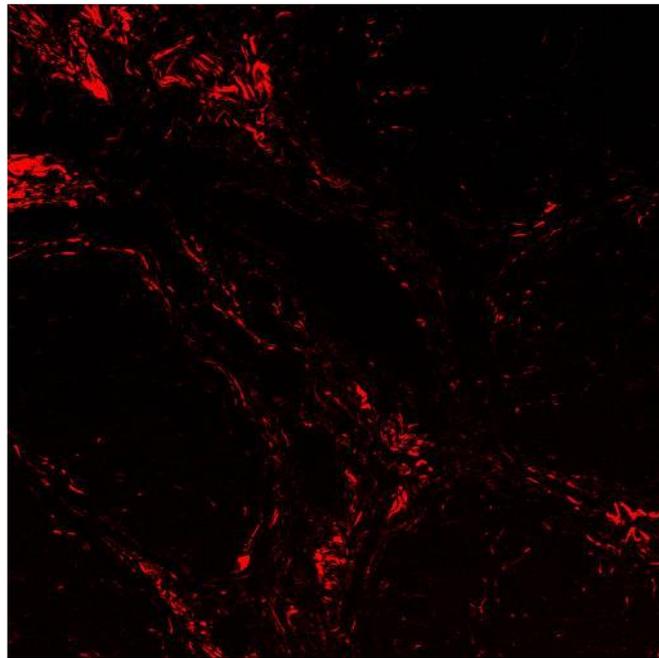
As imagens geradas com microscopia NLO da mesma região são mostrada abaixo

---

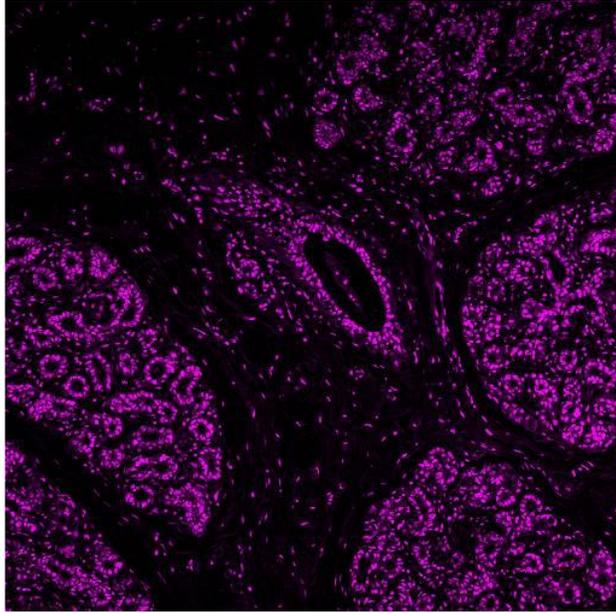
<sup>32</sup> R. Cisek, J. Rowlands, V. Barzda; "Nonlinear multicontrast microscopy of hematoxylin-andeosin-stained histological sections". Journal of Biomedical Optics. 15(2), 026018 (2010).



*Figura 4.16: Imagem de amostra de mama marcada com HE, em verde TPEF, com objetiva de 10x*

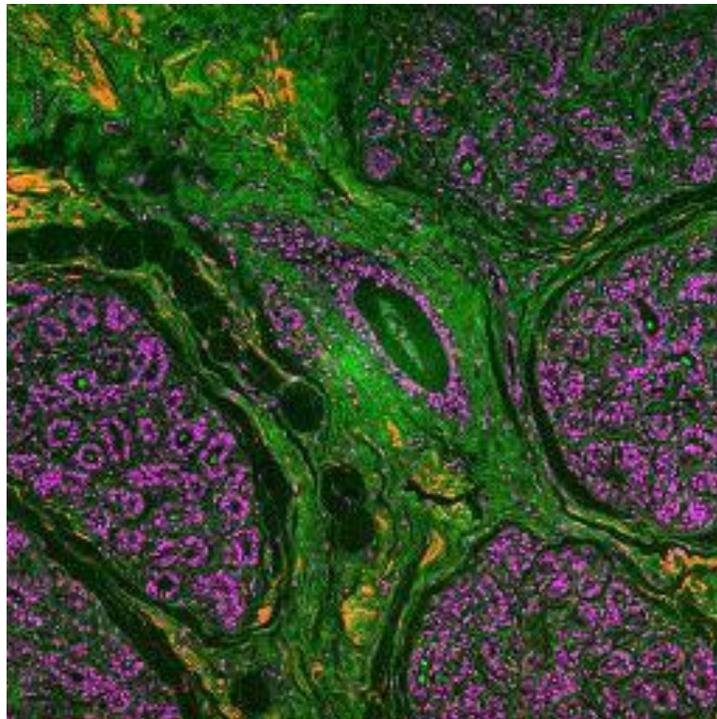


*Figura 4.17: Imagem de amostra de mama marcada com HE, em vermelho SHG, com objetiva de 10x*



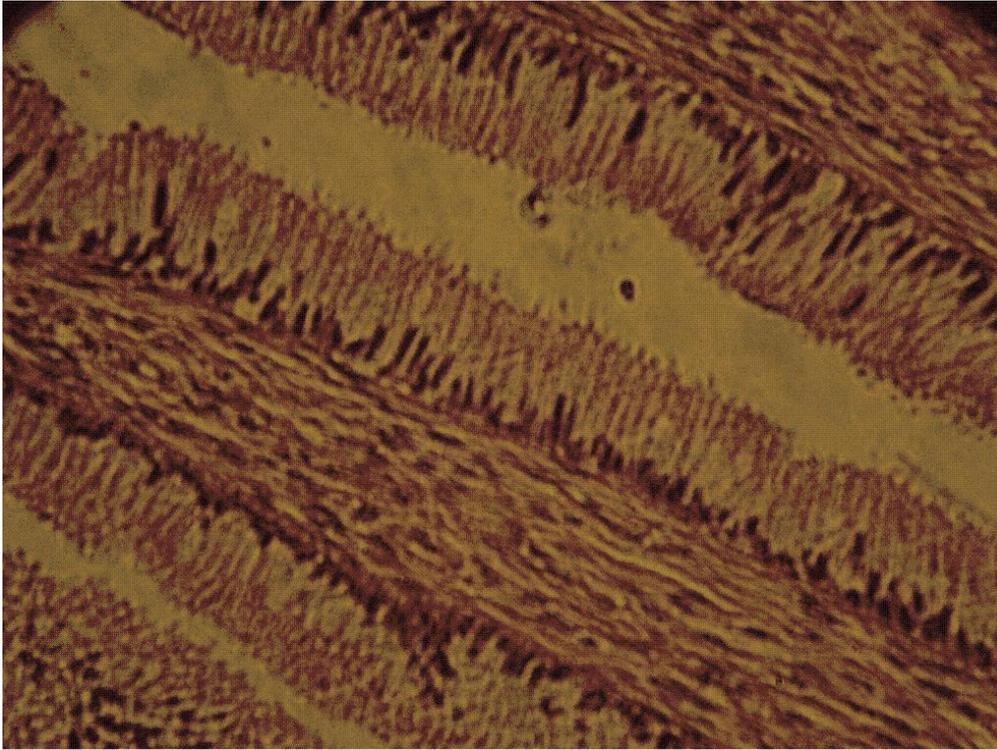
*Figura 4.18: Imagem de amostra de mama marcada com HE, em magenta THG, com objetiva de 10x*

Mesclando as imagens das figuras 4.16 à 4.18.

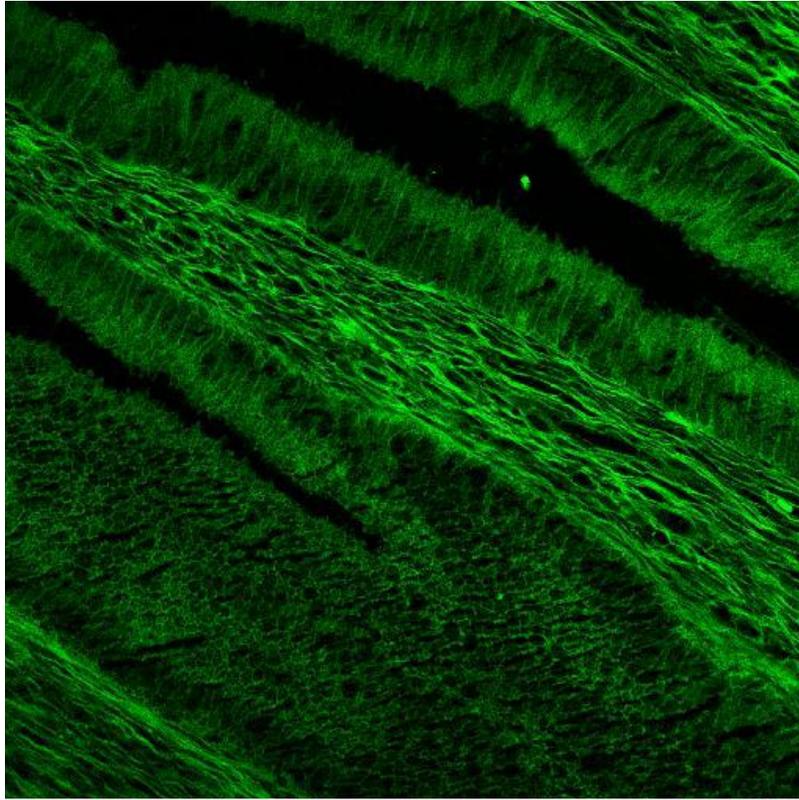


*Figura 4.19: Imagem de amostra de mama marcada com HE, em verde TPEF, em vermelho SHG e em magenta THG, com objetiva de 10x*

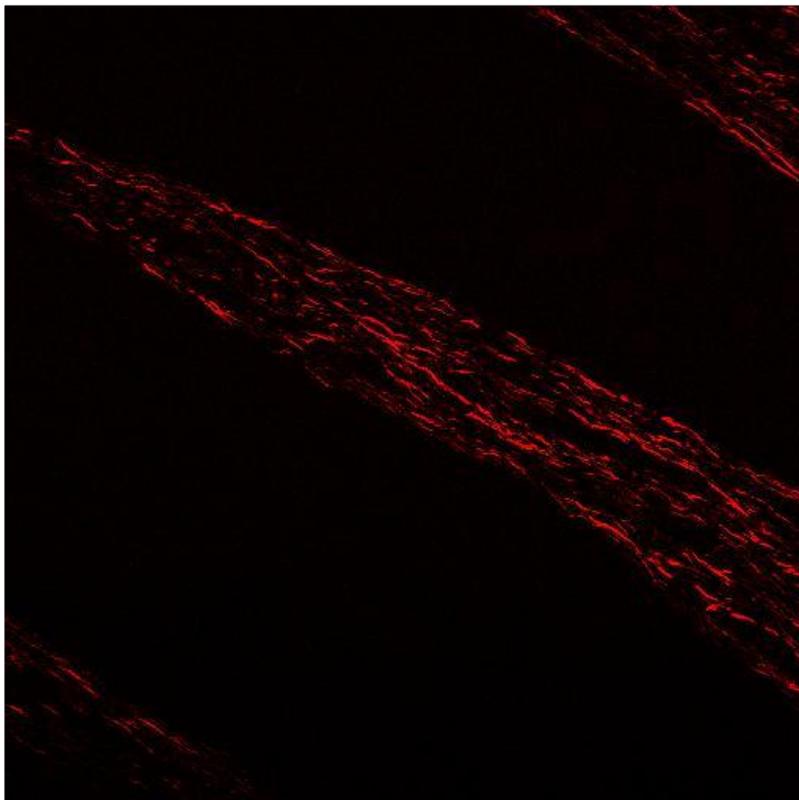
As figuras 4.20 à 4.23 mostram os mesmos resultados para um objetiva de 40x com amostras de útero humano normal.



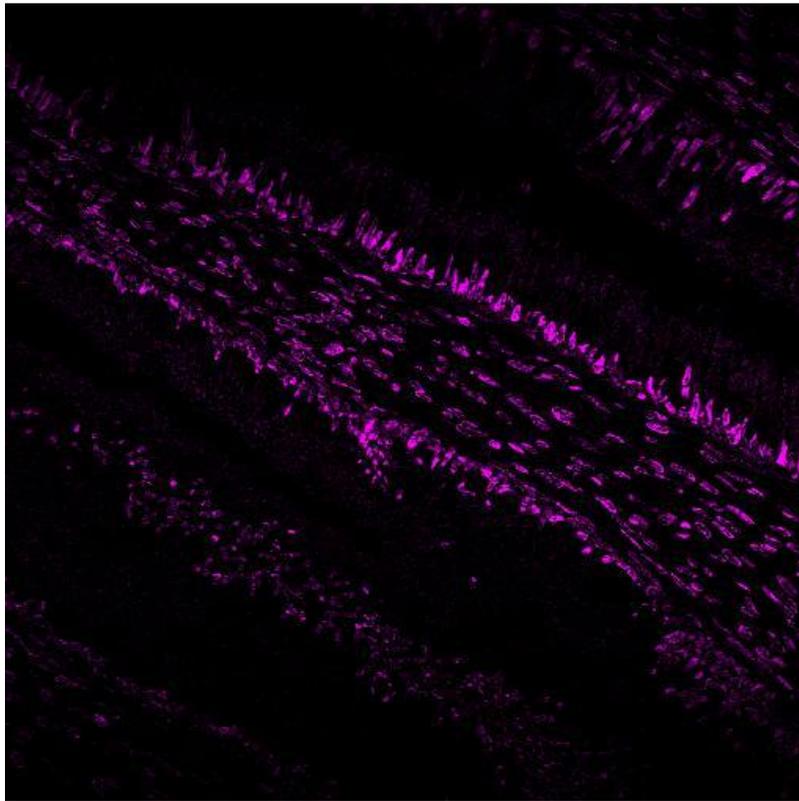
*Figura 4.20: Imagem de útero marcado com HE, com objetiva de 40x*



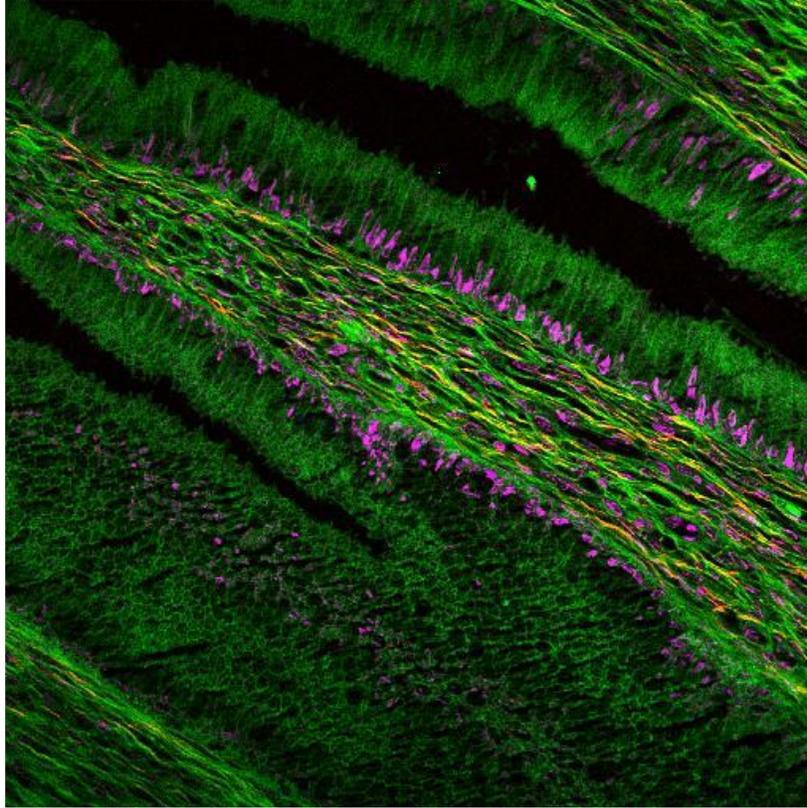
*Figura 4.21: Imagem de útero marcado com HE, em verde TPEF, com objetiva de 40x*



*Figura 4.22: Imagem de útero, em vermelho SHG, com objetiva de 40x*



*Figura 4.23: Imagem de útero, em magenta THG, com objetiva de 40x*



*Figura 4.24: Imagem de amostra de útero marcada com HE, em verde TPEF, em vermelho SHG e em magenta THG, com objetiva de 40x*

Com a microscopia de óptica não linear acrescentamos informação às imagens da figura 4.15 e 4.17. O THG em magenta mostra os núcleos das células epiteliais e o SHG em vermelho mostra as fibras de colágeno.



## Capítulo 5

### Conclusões e Perspectivas

Durante nosso trabalho estudamos os aspectos teóricos e experimentais de um sistema de microscopias de óptica não linear, com atenção especial para a geração de terceiro harmônico. O sinal de terceiro harmônico gerado por um meio com grande volume é cancelado devido a interferência destrutiva associada a mudança de fase, mudança de fase de Gouy, que um feixe de excitação sofre ao passar pelo foco. Realizamos um estudo teórico de um caso simples para uma interface entre dois meios com diferentes valores de  $\chi^{(3)}$ .

Construímos um sistema experimental que possibilita a integração das três técnicas, TPEF, SHG e THG, que podem ser utilizadas separadamente ou em conjunto. Passamos para a realização de imagens de várias amostras, sempre com a preocupação de obtermos imagens claras, com boa proporção entre sinal e ruído.

A grande dificuldade desse trabalho foi encontrar a melhor forma de trabalhar com o terceiro harmônico gerado no ultravioleta. Obtivemos sucesso na integração das técnicas com criatividade, no entanto, dependendo da amostra, muitas vezes opacas e com grande espessura, a intensidade do laser deve ser alta ao ponto de causar danos nas mostras.

A microscopia por geração de terceiro harmônico se mostrou como uma ferramenta que pode ser adaptada aos atuais procedimentos de fixação, possibilitando o acesso à biblioteca de amostras marcadas com hematoxilina e eosina. Estudos com amostras cancerígenas já estão em andamento. A geração de segundo harmônico continua abrindo possibilidades para o estudo de formações de colágeno.

Com a experiência adquirida neste trabalho, teremos mais conhecimento para a implementação de outras técnicas de óptica não linear, entre elas a microscopia CARS [Coherent Anti-Stokes Raman Scattering] e SRS [Stimulated Raman Scattering], que serão possíveis em pouco tempo, com um conjunto de lasers já adquiridos pelo grupo.



## Apêndice A – Função de Green da equação de onda

Queremos a solução de

$$\nabla^2 G(\vec{r}, t; \vec{r}', t') - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} G(\vec{r}, t; \vec{r}', t') = -\delta(\vec{r} - \vec{r}') \delta(t - t') \quad (\text{A.1})$$

Vamos partir de

$$\delta(t \pm R/c) \quad (\text{A.2})$$

$$R = |\vec{r} - \vec{r}'| \quad (\text{A.3})$$

As derivadas primeira e segunda da função delta são

$$\frac{\partial}{\partial t} \delta(t \pm R/c) = -\frac{\delta(t \pm R/c)}{t \pm R/c} \quad (\text{A.4})$$

$$\frac{\partial^2}{\partial t^2} \delta(t \pm R/c) = 2 \frac{\delta(t \pm R/c)}{(t \pm R/c)^2} \quad (\text{A.5})$$

Por outro lado as derivadas espaciais conduzem à

$$\nabla \delta(t + R/c) = \nabla c \delta(R + ct) = c \frac{d}{dR} \delta(R + ct) \nabla R \quad (\text{A.6})$$

$$\nabla \delta(t + R/c) = -\frac{\delta(t + R/c)}{c(t + R/c)} \vec{R} \quad (\text{A.7})$$

$$\nabla \delta(t - R/c) = \nabla c \delta(R - ct) = -c \frac{d}{dR} \delta(R - ct) \nabla R \quad (\text{A.8})$$

$$\nabla \delta(t + R/c) = \frac{\delta(t + R/c)}{c(t + R/c)} \vec{R} \quad (\text{A.9})$$

$$\nabla \delta(t \pm R/c) = \mp \frac{\delta(t + R/c)}{c(t + R/c)} \vec{R} \quad (\text{A.10})$$

E laplaciano

$$\nabla^2 \delta(t \pm R/c) = \mp \frac{1}{c} \nabla \cdot \left[ \frac{\delta(t+R/c) \vec{R}}{c(t+R/c) R} \right] = \mp \frac{1}{c} \frac{\delta(t+R/c)}{(t+R/c)} \nabla \cdot \frac{\vec{R}}{R} \mp \frac{1}{c} \frac{\vec{R}}{R} \cdot \nabla \left[ \frac{\delta(t+R/c)}{(t+R/c)} \right] \quad (\text{A.11})$$

$$\nabla^2 \delta(t \pm R/c) = \mp \frac{1}{c} \left[ \frac{\delta(t+R/c)}{(t+R/c)} \frac{2}{R} + \frac{\vec{R}}{R} \cdot \frac{1}{(t+R/c)} \nabla \delta(t+R/c) + \frac{\vec{R}}{R} \cdot \delta(t+R/c) \nabla \frac{1}{(t+R/c)} \right] \quad (\text{A.12})$$

$$\nabla^2 \delta(t \pm R/c) = \mp \frac{1}{c} \left[ \frac{\delta(t+R/c)}{(t+R/c)} \frac{2}{R} + (\mp) \frac{\vec{R}}{R} \cdot \frac{\vec{R}}{R} \frac{1}{(t+R/c)} \frac{\delta(t+R/c)}{c(t+R/c)} + \frac{\vec{R}}{R} \cdot \delta(t+R/c) \nabla \frac{1}{(t+R/c)} \right] \quad (\text{A.13})$$

$$\nabla \frac{1}{(t+R/c)} = \frac{d}{dR} \frac{1}{t+R/c} \nabla R = - \frac{1}{(t+R/c)^2} \frac{1}{c} \frac{\vec{R}}{R} = - \frac{1}{c} \frac{\vec{R}/R}{(t+R/c)^2} \quad (\text{A.14})$$

$$\nabla \frac{1}{(t-R/c)} = \frac{d}{dR} \frac{1}{t-R/c} \nabla R = - \frac{1}{(t-R/c)^2} \left( -\frac{1}{c} \right) \frac{\vec{R}}{R} = + \frac{1}{c} \frac{\vec{R}/R}{(t-R/c)^2} \quad (\text{A.15})$$

$$\nabla \frac{1}{(t \pm R/c)} = \mp \frac{1}{c} \frac{\vec{R}/R}{(t \pm R/c)^2} \quad (\text{A.16})$$

$$\nabla^2 \delta(t \pm R/c) = \mp \frac{1}{c} \left[ \frac{\delta(t+R/c)}{(t+R/c)} \frac{2}{R} + \frac{\delta(t+R/c)}{c(t+R/c)^2} + \frac{\delta(t+R/c)}{c(t+R/c)} \right] \quad (\text{A.17})$$

$$\nabla^2 \delta(t \pm R/c) = \mp \frac{2}{Rc} \frac{\delta(t+R/c)}{(t+R/c)} + \frac{2}{c^2} \frac{\delta(t+R/c)}{(t+R/c)^2} \quad (\text{A.18})$$

$$\nabla^2 \left[ \frac{\delta(t \pm R/c)}{4\pi R} \right] = \frac{\delta(t \pm R/c)}{4\pi} \nabla^2 \frac{1}{R} + \frac{2}{4\pi} \nabla \delta(t \pm R/c) \cdot \nabla \frac{1}{R} + \frac{1}{4\pi R} \nabla^2 \delta(t \pm R/c) \quad (\text{A.19})$$

$$\nabla^2 \left[ \frac{\delta(t \pm R/c)}{4\pi R} \right] = -\delta(t \pm R/c) \delta(\vec{r} - \vec{r}') + \frac{1}{2\pi c^2} \frac{\delta(t \pm R/c)/R}{(t \pm R/c)^2} \quad (\text{A.20})$$

$$-\frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left[ \frac{\delta(t \pm R/c)}{4\pi R} \right] = -\frac{1}{2\pi c^2} \frac{\delta(t \pm R/c)/R}{(t \pm R/c)^2} \quad (\text{A.21})$$

$$\nabla^2 \left[ \frac{\delta(t \pm R/c)}{4\pi R} \right] - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left[ \frac{\delta(t \pm R/c)}{4\pi R} \right] = -\delta(t \pm R/c) \delta(\vec{r} - \vec{r}') \quad (\text{A.22})$$

Para  $r=r'$ , condição imposta por

$$\delta(\vec{r} - \vec{r}') \quad (\text{A.23})$$

$$R = |\vec{r} - \vec{r}'| = 0 \quad (\text{A.24})$$

Logo

$$\nabla^2 \left[ \frac{\delta(t \pm R/c)}{4\pi R} \right] - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left[ \frac{\delta(t \pm R/c)}{4\pi R} \right] = -\delta(t) \delta(\vec{r} - \vec{r}') \quad (\text{A.25})$$

Fazendo  $t = t - t'$

$$\nabla^2 \left[ \frac{\delta(t - t' \pm R/c)}{4\pi R} \right] - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left[ \frac{\delta(t - t' \pm R/c)}{4\pi R} \right] = -\delta(t - t') \delta(\vec{r} - \vec{r}') \quad (\text{A.26})$$

Assim, temos para a solução particular para a função de Green.

$$G_{\mp} = \frac{\delta(t - t' \pm R/c)}{4\pi R} \quad (\text{A.27})$$

É uma solução particular da função de Green da equação de onda.

Para

$$G_{+} \rightarrow t - t' - R/c = 0 \rightarrow t = t' + R/c$$

Temos a solução retardada, em que o efeito ocorre após a causa, i.e.,  $t > t'$

Para

$$G_{-} \rightarrow t - t' + R/c = 0 \rightarrow t = t' - R/c$$

Temos a função de Green adiantada, em que  $t < t'$ . O tempo  $R/c$  é o tempo em que a luz gasta para percorrer a distância  $R$ . Note que o  $G_+$  significa uma fonte de ondas, e o  $G_-$  sumidouro de ondas.

## Bibliografia

- [1] L. Moreaux, O. Sandre, and J. Mertz, "Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy," *J Opt Soc Am B* 17(10), 1685-1694 (2000).
- [2] L. Moreaux, O. Sandre, S. Charpak, M. Blanchard-Desce, and J. Mertz, "Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy," *Biophys J* 80(3), 1568-1574 (2001).
- [3] P. J. Campagnola, M. D. Wei, A. Lewis, and L. M. Loew, "High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation," *Biophys J* 77(6), 3341-3349 (1999).
- [4] P. J. Campagnola, A. C. Millard, M. Terasaki, P. E. Hoppe, C. J. Malone, and W. A. Mohler, "Threedimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues," *Biophys. J.* 82(1), 493-508 (2002).
- [5] R. Barille, L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, P. Vacher, and T. Ducret, "Visualization of intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics with simultaneous two-photon-excited fluorescence and third-harmonic generation microscopes," *Appl Phys Lett* 79(24), 4045-4047 (2001).
- [6] C.-K. Sun, S.-W. Chu, S.-Y. Chen, T.-H. Tsai, T.-M. Liu, C.-Y. Lin, and H.-J. Tsai, "Higher harmonic generation microscopy for developmental biology," *J. Struct. Biol.* 147, 19-30 (2004). S. W. Chu, S. Y. Chen, T. H. Tsai, T. M. Liu, C. Y. Lin, H. J. Tsai, and C. K. Sun, "In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy," *Opt Express* 11(23), 3093-3099 (2003). <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=OPEX-11-23-3093>
- [7] V. Barzda, C. Greenhalgh, J. A. der Au, S. Elmore, J. van Beek and J. Squier, "Visualization of mitochondria in cardiomyocytes by simultaneous harmonic generation and fluorescence microscopy", *Optics Express*, Vol. 13, Issue 20, pp. 8263-8276 (2005)

- [8] L. Sacconi L, D. A. Dombeck and W. W. Webb, "Overcoming photodamage in second-harmonic generation microscopy: Real-time optical recording of neuronal action potentials", PNAS 103 (9) 3124-3129 (2006).
- [9] I. Freund, M. Deutsch, and A. Sprecher, "Connective-Tissue Polarity - Optical 2nd-Harmonic Microscopy, Crossed-Beam Summation, and Small-Angle Scattering in Rat-Tail Tendon," Biophys J 50(4), 693-712 (1986)
- [10] Y. C. Guo, P. P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin, and R. R. Alfano, "Second harmonic tomography of tissues," Opt. Lett. 22(17), 1323-1325 (1997).
- [11] J. A. Squier, M. Muller, G. J. Brakenhoff, and K. R. Wilson, "Third harmonic generation microscopy," Opt Express 3(9), 315-324 (1998).  
<http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=OPEX-3-9-315>
- [12] M. Muller, J. Squier, K. R. Wilson, and G. J. Brakenhoff, "3D microscopy of transparent objects using thirdharmonic generation," J Microsc-Oxford 191, 266-274 (1998).
- [13] A. C. Millard, P. W. Wiseman, D. N. Fittinghoff, K. R. Wilson, J. A. Squier, and M. Muller, "Third-harmonic generation microscopy by use of a compact, femtosecond fiber laser source," Appl Optics 38(36), 7393-7397 (1999).
- [14] D. Yelin, D. Oron, E. Korkotian, M. Segal, and Y. Silberberg, "Third-harmonic microscopy with a titaniumsapphire laser," Appl Phys B-Lasers O 74, S97-S101 (2002).
- [15] D. Oron, E. Tal, and Y. Silberberg, "Depth-resolved multiphoton polarization microscopy by third-harmonic generation," Opt Lett 28(23), 2315-2317 (2003).
- [16] L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, R. Barille, P. Vacher, and P. Voisin, "Imaging of Ca<sup>2+</sup> intracellular dynamics with a third-harmonic generation microscope," Opt. Lett. 26, 515-517 (2001).

- [17] Thomaz, A. A. “Ferramenta Biofotônica Integrada para Manipulações e Microscopias Confocais”. Dissertação de mestrado orientada por Carlos lenz César, defendida em dezembro de 2007
- [18] 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.
- [19] H. Weyl; “Ausbreitung elektromagnetischer Wallen über einem ebenen Leiter” Ann. Phys. (Leipzig), 60:481-500, 1919.
- [20] L. Mandel; E. Wolf, “Optical Coherence and Quantum Optics”, Cambridge University Press, New York, 1995.
- [21] 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
- [22] 21B. 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.
- [23] L. Novotny, B. Hecht; “Principles of Nano-Optics”, Cambridge University Press, New York, 2006.
- [24] R. Boyd, Nonlinear Optics (Academic, New York, 1992)
- [25] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, and Y. Silberberg, “Nonlinear scanning laser microscopy by third-harmonic generation,” Appl. Phys. Lett. 70, 922–924 (1997).
- [26] J.-X. Cheng and X. S. Xie, "Green's function formulation for third harmonic generation microscopy," J. Opt. Soc. Am. B 19, 1604-1610 (2002)
- [27] Equação 2.90 do Novotny L., “Principle of Nano-Optics”, Cambridge University Press, 2006.
- [28] D. Débarre and E. Beaufrepaire, “Quantitative Characterization of Biological Liquids for Third-Harmonic Generation Microscopy,” Biophys J. 92(2): 603–612 (2007).

[29]

[http://www.physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics\\_173\\_273/245A\\_Rev\\_D\\_Millenia%20V\\_User\\_Manual.pdf](http://www.physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/245A_Rev_D_Millenia%20V_User_Manual.pdf)

[30] Adriana Fontes, “Sistema de Micromanipulação e Microanálise com Pinças Ópticas”, (2004)

[31] D. Yelin, D. Oron, E. Korkotian, M. Segal, Y. Silberberg, “Third-harmonic microscopy with a titanium–sapphire laser”. *Appl. Phys. B* 74, S97–S101 (2002).

[32] R. Cisek, J. Rowlands, V. Barzda; “Nonlinear multicontrast microscopy of hematoxylin-andeosin-stained histological sections”. *Journal of Biomedical Optics*. 15(2), 026018 (2010).