Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

Sebastião Pratavieira

Montagem e caracterização de um microscópio óptico
não linear para imagens de tecidos biológicos

São Carlos
2014

SEBASTIÃO PRATAVIEIRA

Montagem e caracterização de um microscópio óptico não
linear para imagens de tecidos biológicos

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

Área de concentração: Física Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2014

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

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

Pratavieira, Sebastião

Montagem e caracterização de um microscópio óptico não linear para imagens de tecidos biológicos / Sebastião Pratavieira; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2014.
106 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. Microscopia óptica. 2. Óptica não linear. 3. Fluorescência. 4. Geração de segundo harmônico. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, em especial, meus pais Fátima e Percio e meus irmãos Leandro e Angélica.

À Profa. Cristina Kurachi, pela orientação e amizade.

Aos professores Vanderlei S. Bagnato, Francisco E. G. Guimarães, Lino Misoguti, Milton Ferreira de Souza e Sérgio Carlos Zílio, por toda ajuda durante esses anos.

Aos professores membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões.

Aos amigos de graduação, do laboratório de Biofotônica, LIEPO, LAT, Grupo de Óptica e do Instituto de Física de São Carlos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Referente ao Processo nº 2009/17476-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*“Luz nos traz as novidades do Universo.
Vinda do Sol e das estrelas, diz-nos
de sua existência, suas posições,
movimentos e constituições.
Vindo de objetos ao nosso redor, vemos
o nosso caminho ao redor do mundo.
A luz é o grande transportador de energia
no mundo e no universo.
Luz proveniente de átomos e moléculas
nos conta sobre sua estrutura interna,
os movimentos de seus elétrons e núcleos,
e as regras misteriosas da teoria quântica
que regem esses movimentos”*

Sir William Henry Bragg

(tradução do autor)

Resumo

PRATAVIEIRA, S. **Montagem e caracterização de um microscópio óptico não linear para imagens de tecidos biológicos.** 2014. 106 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O diagnóstico preciso das características morfológicas e metabólicas de um tecido e/ou órgão com a finalidade de identificar alterações patológicas, ou avaliar um determinado tratamento, é de grande importância nas áreas de biologia e medicina. Uma excelente alternativa para este diagnóstico, e que permite uma visualização com resolução celular, são imagens de microscopia óptica. Tradicionalmente, analisam-se as características celulares através de processos histológicos; contudo, mais recentemente essa mesma análise tornou-se possível em tecidos sem a necessidade deste preparo histológico. Fenômenos de óptica não-linear, como a fluorescência devido à absorção de dois fótons e a geração de segundo harmônico, são exemplos de processos que podem ser realizados sem preparo histológico com o objetivo de se obter imagens microscópicas em diferentes profundidades com resolução celular. Este projeto teve por objetivo desenvolver um microscópio óptico de varredura a laser baseado em processos ópticos não lineares, para adquirir imagens de tecidos e órgãos, nas condições *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. O microscópio óptico montado é composto por: um laser de pulsos ultracurtos sintonizável (Ti:Safira), um sistema de varredura espacial (dois espelhos conectados a galvanômetros e conjugados por dois espelhos esféricos, para varredura lateral, e uma plataforma piezoelétrica para varredura axial), uma lente objetiva (20X, abertura numérica de 1,0, imersão em água e distância funcional de 2,0 mm) e um sistema de aquisição e controle. A resolução lateral obtida foi de $(0,8 \pm 0,1) \mu\text{m}$ e axial de $(4,4 \pm 1,5) \mu\text{m}$, suficiente para a realização de imagens com resolução subcelular de tecidos biológicos. Imagens de fluorescência e por geração de segundo harmônico foram obtidas com sucesso a partir de tecido *ex vivo* de pele e fígado de rato, pele de porco e de membrana corioalantóica. Estas imagens revelaram aspectos tidos como relevantes na análise morfo-histopatológica — como estruturas nucleares e de membrana, e a presença de colágeno, e com vantagens como coleta de informação vinda de diferentes camadas do tecido. A montagem desse sistema apresenta potencial para contribuir em estudos em diagnóstico e tratamento de lesões sejam feitos de modo que, no futuro, essa análise resulte em diagnósticos mais precisos e tratamentos mais efetivos.

Palavras-chave: Microscopia óptica. Óptica não linear. Fluorescência. Geração de segundo harmônico.

Abstract

PRATAVIEIRA, S. **Assembly and characterization of a nonlinear optical microscopy for biological tissues imaging**. 2014. 106 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Accurate diagnosis of the morphological and metabolic conditions of a tissue and/or an organ is essential to define the presence of pathological changes, and to evaluate the response during a number of treatments. The use of optical techniques for biological tissue imaging is an excellent alternative for this purpose. Such techniques allow non-invasive diagnostic procedures, with cellular resolution, and usually provide almost instantaneous response. The use of nonlinear optical techniques such as fluorescence promoted by two-photon absorption is one example of optical technique in which we obtain images of living tissue with spatial resolution at cellular level. The purpose of this study is the assembly and characterization of a custom-made non-linear microscope. This microscope allows customized adjustment for *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* imaging of biological samples. The excitation is done using a tunable femtosecond Ti:Sapphire laser. Two galvanometer mirrors conjugated by two spherical mirrors are used for the lateral scan and for the axial scan a piezoelectric stage is utilized. The light is focused in tissue by an 20X objective lens, in water immersion, numerical aperture of 1.0, and working distance of 2.0 mm. The lateral resolution obtained was $(0.8 \pm 0.1) \mu\text{m}$ and $(4.4 \pm 1.5) \mu\text{m}$ for axial resolution, which is sufficient for images with sub-cellular resolution to be achieved in biological tissues. Fluorescence and second harmonic generation images were performed using epithelial and hepatic tissue. Those images revealed aspects considered relevant in morpho-histopathology — such as nuclear and cytoplasm membrane structures, and the presence of collagen. By means of the microscope it is possible to have images in different depths of tissues with sub-cellular resolution. The assembly of such an equipment shall represent a potential contribution to diagnostics and lesion treatment fields, so that it may result in more precise detection of diseases and more effective treatments in the future.

Keywords: Optical microscopy. Nonlinear optics. Fluorescence. Second harmonic generation.

Lista de Figuras

Figura 1 - A linha sólida horizontal indica o eixo óptico, os pontos focais são indicados pelos pontos escuros. a) feixe de luz emitido do ponto focal da lente se propaga paralelamente ao eixo óptico após a lente; b) feixe de luz divergente emitido no plano focal da lente se torna colimado após a lente, porém não-paralelo ao eixo óptico; c) feixe de luz com uma altura h em reação ao eixo óptico após atingir a lente possui um ângulo de inclinação θ ;	30
Figura 2 - Esquema do microscópio óptico de fluorescência com amostra fixa e varredura do feixe laser. Sendo S: shutter; $\lambda/2$: placa de meia-onda; PBS: cubo polarizador; L: lentes; G: espelhos conectados aos galvanômetros; EE: espelhos esféricos; E: espelho; D: espelhos dicróicos; TPE: transdutor piezoelétrico; F: filtro óptico; PMT: tubo fotomultiplicador. Os pontos denominados O correspondem a pontos conjugados do sistema óptico. Linhas pontilhadas indicam comunicação eletrônica.....	31
Figura 3 - Visão geral do sistema de microscopia.....	33
Figura 4 - a) Espectro de emissão do meio ativo; b) modos permitidos dentro da cavidade laser ($\Delta\omega = \pi c/L$); c) combinando o espectro do meio com os modos permitidos na cavidade temos os modos presentes na cavidade.	34
Figura 5 - Espectros da intensidade em função do tempo para: a) componente ω_1 ; b) componente ω_2 c) componente ω_3 ; (componentes presentes na cavidade) d) soma das intensidades com fases aleatórias e) soma das intensidades com modos travados produzindo pulsos mais intensos.	35
Figura 6 - Eficiência de emissão do Ti:Safira - Chameleon Vision II em função da região espectral.	36
Figura 7 - Detalhe do sistema de varredura axial do microscópio. Sendo, G _i : espelhos conectados ao galvanômetro; SM _i : espelho esférico; L _i : lente.	38
Figura 8 - Funções enviadas para o sistema de galvanômetros para a realização da varredura axial. Em (a), temos uma função triangular que realiza a varredura no eixo x; em (b), a função escada para varredura y.....	39
Figura 9 - Detalhe do sistema de excitação e coleta do microscópio. Sendo: TPE: posicionador piezoelétrico; L _i : lente; F _i : filtro óptico; D _i : espelho dicróico; PMT: módulo fotomultiplicador.	40
Figura 10 - Imagem da interface usuário do <i>software</i> em LabView que controla o sistema de microscopia para aquisição única imagem.....	43
Figura 11 - Imagem da interface usuário do <i>software</i> em LabView que controla o sistema de microscopia para aquisição de duas imagens simultaneamente.	44
Figura 12 - Imagem da interface usuário do <i>software</i> em LabView que controla o sistema de microscopia para aquisição de sequência de imagens com diferentes profundidades.	45
Figura 13 - Fluxograma do procedimento para adquirir uma imagem.....	46
Figura 14 - Imagem do padrão de calibração imagem de 512 x 512 pixels. Valores de tensão aplicada nos galvanômetros: 1V (esquerda); 3V (centro); 5V (direita). Observações: o padrão de distância apresenta algumas imperfeições (pequenas bolhas) e a cada 10 linhas de espessura menor há uma linha de espessura maior. Esses detalhes podem ser observados em algumas imagens.	47

Figura 15 - Imagem do padrão de calibração imagem de 512 x 512 pixels. Valores de tensão aplicada nos galvanômetros: 1V (esquerda); 3V (centro); 5V (direita).	48
Figura 16 - Imagem de partículas fluorescente com diâmetro de: esquerda - 15 μ m; centro - 6 μ m; direita - 4 μ m.	48
Figura 17 - Imagens de partículas fluorescente com diâmetro de 200 nm, o campo de visão da imagem é de 30x30 μ m ²	50
Figura 18 - Perfil de intensidade de fluorescência em função do deslocamento lateral. Uma função gaussiana foi ajustada aos pontos experimentais para determinação da largura a meia altura.	51
Figura 19 - Perfil de intensidade de fluorescência em função do deslocamento axial. Uma função gaussiana foi ajustada aos pontos experimentais para determinação da largura a meia altura.	52
Figura 20: Imagens da fluorescência natural da pele de rato Wistar (área 1). Observa-se a fluorescência do citoplasma das células do epitélio em diferentes profundidades.	56
Figura 21 - Imagens da fluorescência natural da pele de rato Wistar (área 2). Observa-se a fluorescência do citoplasma das células do epitélio em diferentes profundidades.	58
Figura 22 - Imagem histológica das camadas típicas da pele.	59
Figura 23 - Imagens de geração segundo harmônico da pele de rato Wistar. Neste caso, observamos a distribuição das fibras de colágeno presente na pele em diferentes profundidades.	60
Figura 24 - Imagens de geração segundo harmônico em pele de porco. Neste caso, observa-se a distribuição das fibras de colágeno presentes na pele em diferentes profundidades.	62
Figura 25 - Imagens da fluorescência natural de diferentes regiões da camada superficial de fígado de rato Wistar, onde podemos visualizar as células dos hepatócitos.	64
Figura 26 - Imagem histológica de fígado rato Wistar.	65
Figura 27 - Imagem de um tumor se desenvolvendo na membrana corioalantóica de um ovo de galinha.	66
Figura 28 - Imagens de fluorescência de células aderidas de diferentes regiões em membrana corioalantóica. Os vasos sanguíneo são as regiões mais escuras nas imagens.	67
Figura 29 - Coeficiente de atenuação total em função do comprimento de onda de uma amostra de tecido cerebral. Na região visível do espectro predomina o espalhamento Mie, enquanto que no infravermelho próximo os picos de absorção da água são evidentes em 1444 e 1950 nm.	69
Figura 30 - Ilustração da posição espectral da absorção e emissão de fluorescência de fluoróforos endógenos.	70
Figura 31 - Ilustração da posição espectral da absorção e emissão de fluorescência de fluoróforos exógenos. A absorção de S ₀ para S ₁ corresponde a absorção do estado fundamental para o primeiro estado excitado, enquanto que de S ₀ para S ₂ corresponde a absorção do fundamental para o segundo estado excitado.	71
Figura 32 - Diagrama de energia de um sistema de dois níveis. O estado de menor energia (fundamental) tem energia E ₁ e o estado excitado tem energia E ₂ . O coeficiente de absorção é B ₁₂ , o de emissão estimulada é B ₂₁ , e o coeficiente de emissão espontânea é A ₂₁	82

Figura 33 - Ilustração da transição do nível g para o nível m , sendo m dado por uma função de distribuição ρf	90
Figura 34 - Ilustração dos três possíveis processos de absorção de dois fótons: a) absorção sequencial de dois fótons; b) absorção de dois fótons, passando por estado virtual e atingindo um estado excitado; c) absorção de dois fótons sendo que a transição direta (um fóton) do estado fundamental para estado excitado 2 é proibida, mas é possível indiretamente (via dois fótons). As setas azuis representam o campo de radiação incidente com determinada frequência.....	92

Sumário

1 Microscopia Óptica.....	19
2 Interação Luz – Tecidos Biológicos	23
3 Motivação	27
4 Microscópio Óptico Não-Linear.....	29
4.1 Laser.....	33
4.2 Sistema de Varredura do Feixe Laser	36
4.3 Objetiva.....	40
4.4 Sistema de Detecção	41
4.5 <i>Software</i> de Controle do Microscópio	42
4.6 Calibração do Microscópio	46
4.7 Resolução Espacial	49
5 Aplicações	55
5.1 Pele.....	55
5.2 Fígado	63
5.3 Membrana Corioalantóica.....	65
6 Estágio no Exterior	69
7 Conclusão	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICES	81
APÊNDICE A - Interação Luz-Matéria.....	81
APÊNDICE B - Equação de Schrödinger da Interação Luz-Matéria	85
APÊNDICE C - Seção de Choque de Absorção de Um e Dois Fótons	89
APÊNDICE D - Susceptibilidade Elétrica.....	95
APÊNDICE E - Geração de Segundo Harmônico	97
ANEXOS	99
ANEXO A - Especificações da Lente Objetiva	99

ANEXO B - Especificações do Módulo Fotomultiplicador.....	101
ANEXO C - Artigos e Resumos Completos Publicados.....	105

1 Microscopia Óptica

Os primeiros instrumentos de aumento visual eram lentes rudimentares utilizados inicialmente na região de Creta e Ásia Menor por volta de 2000 A.C. Isto ocorreu aproximadamente 1500 anos depois da descoberta/invenção do vidro no Egito Antigo, segundo a tradição, mercadores fenícios ao desembarcarem na Síria encontraram uma substância fundida e transparente entre as cinzas de uma fogueira, ainda quente, sobre a areia. O grego Aristófanes, em uma de suas obras, por volta de 400 A.C. referiu-se a um globo de vidro cheio de água utilizado como lente; e mais tarde, em Roma artesãos também usaram o mesmo tipo de lente de aumento. Contudo, somente a partir do século 13 que lentes polidas começaram a ser usadas e a ideia de que vidros podiam desviar a luz tornou-se mais clara.¹⁻²

Em torno do ano de 1400, os primeiros estudos em insetos começaram a ser feitos utilizando-se lentes. Hans e Zacharias Jansen foram os primeiros a combinar duas lentes em um único tubo e compor um microscópio. Em 1667, Antoni van Leeuwenhoek começou a conduzir os primeiros experimentos com microscópios capazes de ampliar 270 vezes, abrindo as portas para um novo mundo, ele estudou diferentes tipos de insetos, bactérias, protozoários, células sanguíneas, etc. Avanços na fabricação e combinação de lentes também foram realizados com o objetivo de se estudar corpos celestes, através de telescópios. Contudo, aberrações cromáticas (franjas de cor ao redor do objeto) dificultaram o amplo uso dos microscópios até o começo do século 19. Essas distorções foram eliminadas utilizando novos tipos de vidro, e a madeira e couro utilizados como suporte foram substituídas por metais como o latão. Desde então, o microscópio óptico tem sido um importante instrumento na ciência, pois possibilita a visualização de pequenas estruturas que não podem ser resolvidas a olho nu. A microscopia óptica tornou-se importante, pois é a forma mais antiga e melhor compreendida de microscopia, é não-invasiva e não-destrutiva, permite a observação em condições nativas, ou seja, permite imagens moleculares e celulares dos organismos vivos em tempo real. As estruturas de tecidos estão disponíveis em uma ampla gama de ampliações onde é possível, por exemplo, fazer uma caracterização química. Existem também um grande número de mecanismos de contraste desenvolvidos. Em particular para o estudos de organismos vivos é possível se obter resolução subcelular.²

A microscopia desempenha um papel fundamental em muitas áreas da ciência moderna. Visto que para os seres humanos provavelmente a percepção visual é a forma mais importante de obtenção de informação. Portanto, a visualização em detalhes de estruturas tem contribuído

muito para a melhor compreensão de fenômenos da natureza. Especialmente para as ciências biológicas e médicas, a microscopia trouxe um grande avanço para o entendimento dos sistemas vivos e de doenças. A propriedade mais importante de um microscópio é a resolução óptica, que é a capacidade de distinguir objetos intimamente posicionados. A resolução determina a menor estrutura de um objeto que pode ser distinguida. A maioria dos avanços na microscopia visam aumentar a resolução óptica e sempre levaram a novas descobertas da ciência. Na metade do século 19 quando Ernst Abbe estudou o poder de resolução de instrumentos ópticos foi que a microscopia óptica ganhou impulso, e tornou-se uma ferramenta indispensável em diversas áreas do conhecimento. Naquela época, a resolução do microscópio óptico era limitada por aberrações cromáticas e esféricas. Ernst Abbe e Carl Zeiss estudando a formação de imagens em microscópios ópticos perceberam a importância da natureza ondulatória da luz e seu papel central na resolução óptica.

Outros avanços ocorreram quando se descobriu outras formas de se obter imagem, além do contraste de absorção (cor), tais como: espalhamento elástico, bioluminescência, fluorescência, polarização, contraste de fase, efeitos não lineares, espalhamento Raman, entre outros. Em seguida, a microscopia óptica sofreu outras duas revoluções, primeiramente quando a microscopia confocal foi proposta por Marvin Minsky em 1957³, o que permitiu a obtenção de imagens tridimensionais e, mais recentemente, com o advento da microscopia confocal por absorção de dois fótons proposta por Winfried Denk no laboratório do Prof. Watt W. Webb na Universidade de Cornell em 1990.⁴ Esses microscópios possuem uma vasta aplicação, especialmente na investigação de sistemas biológicos, pois a morfologia tecidual e celular é de grande relevância para a avaliação diagnóstica, seja patológica, metabólica ou de monitoramento terapêutico. No caso da microscopia confocal por absorção de dois fótons, a visualização tecidual e/ou celular é obtida através da excitação de fluoróforos endógenos e/ou exógenos que absorvem simultaneamente dois fótons e emitem fluorescência, a qual é posteriormente detectada para a formação da imagem. A microscopia por absorção de dois fótons é uma técnica relativamente nova, que se tornou possível graças ao desenvolvimento de lasers de pulsos ultracurtos (ordem de femtossegundo), pois a alta intensidade de pico destes lasers aumenta a probabilidade da absorção simultânea de dois fótons.⁵ Na tabela 1 é apresentado um sumário histórico do desenvolvimento da microscopia óptica não linear.^{1-3; 5-10}

Tabela 1 - Histórico de desenvolvimento da microscopia óptica não linear.

1565: Nicolás Monardes relata a fluorescência de substâncias naturais;
1590 – 1610: Hans e Zacharias Janssen na Holanda, desenvolvem o primeiro microscópio, combinando duas lentes em um tubo;
1667: Robert Hooke na Inglaterra fez as primeiras observações de células, em especial da cortiça;
1671: Marcello Malpighi na Itália foi pioneiro na observação histológica e de anatomia humana utilizando microscopia óptica. Observou as células do fígado, cérebro, rins, baço, osso, e as camadas da pele.
1675: Anton van Leeuwenhoek na Holanda utiliza um microscópio simples, com apenas uma lente para olhar o sangue e insetos. Ele foi o primeiro a descrever células e microorganismos bacterias, utilizando um pequeno microscópio, contudo sem lentes de boa qualidade;
1729: Chester Moore Hall desenvolve lentes acromáticas combinando dois tipos de vidros;
1852: George Gabriel Stokes descreve o fenômeno da fluorescência, observado na fluorita. Observa que a fluorescência emitida ocorre em maiores comprimentos de onda;
1873 - 1878: Ernst Abbe estabelece o limite de resolução dos microscópios e observa aberrações cromáticas em lentes e cria lentes combinadas para corrigir essas aberrações. É o fundador da teoria óptica das lentes de um microscópio.
1880: Carl Zeiss em Jena na Alemanha produz a primeira objetiva com óleo de imersão, projetada por Ernst Abbe. A fabricação em massa de microscópios começa;
1904: August Köhler trabalhando na companhia Zeiss desenvolve o primeiro microscópio com iluminação ultravioleta o que possibilita imagens de microscopia de fluorescência;
1931: Maria Goeppert-Mayer, na Alemanha, propõe teoricamente a possibilidade da absorção de dois fótons através de uma análise semi-clássica;
1957: Marvin Minsky, nos EUA, faz a patente do microscópio confocal;
1961: W. Kaiser e C.G.B. Garret nos EUA observaram fluorescência devido a absorção de dois fótons no cristal $\text{CaF}_2: \text{Eu}^{2+}$, como fonte utilizaram um laser de Rubi (694 nm);
1987: Primeiro microscópio confocal comercial (Bio-Rad Laboratories - atual Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemanha);
1986: P.F. Moulton, nos EUA, desenvolveu o laser de Ti:Safira , um cristal com amplo espectro de emissão e possibilidade de geração de pulsos ultracurtos (femtosegundos) com alta energia de pico;
1990: W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb, nos EUA, demonstram o primeiro microscópio por absorção de dois fótons em tecidos biológicos. Imagens de cultura de células de rim, utilizaram laser de corante de femtosegundos;
1996: A Bio-Rad Laboratories adquire patente do microscópio por absorção de dois fótons e começa a comercializar microscópio confocal com essa possibilidade;
2008 - 2010: Primeiros sistemas para uso <i>in vivo</i> clínico e em pequenos animais se tornam disponíveis. Por exemplo, os sistemas de uso clínico DermaInspect e MPTflex Flexible (JenLab GmbH, Jena, Alemanha), e o sistema para experimentos <i>in vivo</i> em pequenos animais Ultima In Vivo (Prairie Technologies – atual BrukerNano Fluorescence Microscopy Billerica, MA, USA).

Fonte: Elaborado pelo autor

2 Interação Luz – Tecidos Biológicos

O corpo humano é um organismo vivo formado por diversos sistemas, tais como sistema respiratório, digestivo, entre outros. Cada sistema é então formado por um conjunto de órgãos específicos, sendo que cada órgão é composto por um ou mais tecidos. Os tecidos biológicos por sua vez são formados por agregados de células de mesmo ou de diferentes tipos e pela matriz extracelular, composta por proteínas e açúcares, que mantêm as células coesas, constituindo o arcabouço tecidual. Dentro de cada célula temos várias organelas que são formadas por moléculas e átomos, dividindo-a em compartimentos com diferentes morfologias e funções.¹¹⁻¹²

Quando a luz se propaga em tecidos biológicos ela é espalhada ou absorvida. Quando o meio é inhomogêneo, ou seja, o índice de refração varia espacialmente numa escala microscópica, a luz será espalhada quando se propagar por este. O espalhamento da luz em um meio é descrito pelo coeficiente de espalhamento, definido como o número médio de espalhamentos (mudanças de direção) do fóton por unidade de comprimento. Cada comprimento de onda da luz apresenta uma interação diferente com os tecidos e apresentará um espalhamento por consequência também diferente.¹¹⁻¹³

Dois tipos diferentes de espalhamento ocorrem e dependem do tamanho da partícula espalhadora comparado com o comprimento de onda da luz. Cada um deles terá uma dependência com o comprimento de onda e também uma direção preferencial para esse espalhamento. O espalhamento denominado Rayleigh ocorre quando a luz interage com partículas menores que o comprimento de onda, a intensidade da luz espalhada é inversamente proporcional à quarta potência do comprimento de onda ($I \propto \lambda^{-4}$), e é principalmente isotrópico. As principais partículas espalhadoras são membranas celulares e agregados moleculares. Enquanto que o espalhamento Mie ocorre para partículas com tamanhos próximos ao comprimento de onda da luz. A intensidade da luz espalhada depende do tamanho das partículas, mas em geral, é proporcional à meia potência do comprimento de onda ($I \propto \lambda^{0.5}$). A direção da luz espalhada é preferencialmente na direção do feixe incidente, e os principais componentes biológicos espalhadores são as organelas celulares.¹¹⁻¹²

Esses dois tipos de espalhamentos são ditos espalhamentos elásticos, pois a energia dos fótons é conservada, contudo existe um outro tipo de espalhamento onde a energia do fóton se altera, este é chamado de espalhamento inelástico. Este fenômeno ocorre pela perda de energia

de forma não-radiativa, principalmente por processos de vibração e geração de calor. Como exemplo de espalhamento inelástico podemos citar o espalhamento Raman.¹²

Outro principal fenômeno que ocorre quando a luz interage com meios biológicos é a absorção, que depende das moléculas absorvedoras (cromóforos) presentes no tecido. O coeficiente de absorção é definido como a probabilidade do fóton ser absorvido por unidade de comprimento. A absorção nas regiões espectrais do ultravioleta e visível é devida principalmente a: hemoglobina, lipídeos, melanina (principalmente ultravioleta) e proteínas estruturais. Enquanto que na região do infravermelho a absorção ocorre devido a presença da água, hemoglobina e lipídeos.¹¹⁻¹³

Algumas moléculas após absorverem a luz podem dar início a outros fenômenos ópticos, como a luminescência (fluorescência e fosforescência). As moléculas que apenas absorvem a luz chamamos de cromóforos, enquanto que as que emitem chamamos de fluoróforos. Os principais fluoróforos presentes no interior das células são o triptofano, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), a a adenina dinucleotídeo (FAD); já os presentes fora da célula são a elastina, o colágeno, as porfirinas, a queratina e a melanina.¹¹

Os aminoácidos fluorescentes fenilalanina, tirosina e triptofano, são os blocos de construção essenciais de proteínas e enzimas. Em especial, o triptofano é um aminoácido requerido por todas as formas de vida para a síntese de proteínas, sendo o maior contribuidor para a fluorescência das proteínas. O NADH e o FAD estão envolvidas no transporte de elétrons na cadeia respiratória, assim funcionam como importantes indicadores de resposta celular, pois regulam e participam das reações metabólicas. Já as porfirinas, presentes na estrutura da hemoglobina, são responsáveis pelo transporte de gases respiratórios.¹²⁻¹³

As proteínas estruturais, colágeno e elastina, são responsáveis pela rigidez e flexibilidade dos tecidos e órgãos; o colágeno é composto por fibras de proteínas dando suporte a diversos tecidos. A elastina também mantém o tecido unido e dá elasticidade. Os outros pigmentos fluorescentes presentes são a melanina e a lipofuscina. A melanina é produzida pelos melanócitos sendo responsável pela coloração da pele.¹¹⁻¹²

Tanto o espalhamento quanto a absorção dependem da condição do tecido, por exemplo, durante o processo de desenvolvimento do câncer e de outras patologias, as condições do tecido biológico são modificadas, incluindo alterações bioquímicas e estruturais. Essas mudanças alteram a forma como a luz interage com o tecido, alterando suas propriedades ópticas (absorção, espalhamento, fluorescência, etc.). A fluorescência é um fenômeno que pode ser utilizado tanto para avaliar a bioquímica do tecido, quanto como forma de se obter contraste,

ou seja, é possível obter imagens de células (morfologia) baseado na intensidade de fluorescência dos fluoróforos citados anteriormente.^{5; 12}

3 Motivação

A microscopia óptica por absorção de dois fótons tem fornecido aos pesquisadores de diversas áreas possibilidades únicas para imagens de fluorescência, oferecendo algumas vantagens em relação à microscopia de fluorescência tradicional.^{5; 7-8} As principais vantagens da excitação por dois fótons sobre a excitação convencional são:

- A absorção e emissão da fluorescência são localizadas espacialmente, num pequeno volume focal na qual a intensidade da luz é alta. Com isso, pode-se obter imagens tridimensionais com boa resolução espacial;⁸
- A utilização de maiores comprimentos de onda (infravermelho próximo) para excitação reduz o espalhamento e a absorção no tecido biológico, com isso obtêm-se profundidades de penetração maiores, em comparação à excitação na região ultravioleta e visível utilizada na microscopia confocal de fluorescência; é possível obter imagens de estruturas em uma profundidade superior a 500 µm em algumas amostras biológicas;¹⁴⁻¹⁵
- A radiação infravermelha apresenta pouca absorção no tecidos biológicos, esta excitação mostra-se menos fototóxica quando comparada a técnicas lineares e, por isso, os danos por absorção, especialmente para células vivas, são drasticamente reduzidos, pois a energia média absorvida por volume é tipicamente menor em relação aos sistemas que usam comprimentos de onda menores – por exemplo, radiação ultravioleta.⁸
- A grande maioria dos fluoróforos endógenos dos tecidos biológicos apresentam absorção de dois fótons, ou seja, não é necessário introduzir nenhum novo marcador no tecido. Com isso é possível obter informação morfológica do tecido utilizando a intensidade da fluorescência emitida nas diferentes estruturas celulares.¹⁶

Desde que as primeiras imagens de fluorescência por absorção de dois fótons foram realizadas no início da década de 1990, diversos estudos em tecidos biológicos têm sido realizados. Estudos *in vitro* nas áreas de neurociência,¹⁷⁻²⁰ imunologia,²¹ embriologia,²²⁻²³ e pesquisas em câncer empregando amostras *ex vivo* (biópsias)²⁴⁻²⁷ retiradas do paciente foram feitos com resultados excelentes, conseguindo-se diferenciar diferentes tipos de células e condições do tecido.

Embora a técnica de microscopia óptica não-linear já esteja bem estabelecida, sistemas comerciais que permitem obter imagens *in vivo* de pequenas cobaias e/ou do ser humano ainda são escassos.²⁸⁻²⁹ Os microscópios comerciais atuais somente fazem imagens não-lineares de cultura de células (*in vitro*) e/ou amostras *ex vivo*, e com isso não possibilitam a investigação

em tempo real de fenômenos importantes em sistemas vivos mais complexos. A maior parte de estudos nesta área são realizados adaptando-se microscópios existentes ou desenvolvendo sistemas customizados.

Este projeto tem por *objetivo* desenvolver um microscópio óptico não linear customizado, para adquirir imagens de fluorescência, devido à absorção de dois fótons, e de geração de segundo harmônico em tecidos biológicos, visando obter imagens em diferentes profundidades com resolução espacial subcelular. A resposta imediata e o monitoramento temporal em um único campo de observação podem ser realizados, uma vez que o método não é invasivo. A microscopia óptica não linear permite avaliar a alteração morfológica e metabólica das células nas suas condições naturais, ou seja, sem a necessidade de um preparo histológico. Além disso, por sua característica não-destrutiva, possibilita o monitoramento do mesmo tecido ao longo do tempo, importante fator para o acompanhamento da evolução de doenças, como o câncer, assim como da resposta ao tratamento. A montagem desse sistema permitirá que estudos em diagnóstico e tratamento de lesões sejam feitos e que no futuro essas análises resultem em diagnósticos mais precisos e tratamentos mais efetivos.

Após a montagem do microscópio os objetivos específicos são a determinação da resolução lateral e axial do sistema, e a obtenção de imagens de alta resolução espacial (para tecido epitelial de rato e porco, tecido hepático de rato, e de membrana corioalantóica usada como modelo tumoral de melanoma) como forma de avaliação da funcionalidade do microscópio.

4 Microscópio Óptico Não-Linear

No apêndice deste texto apresentamos alguns dos fundamentos teóricos em que se baseiam os fenômenos de absorção de dois fótons e geração de segundo harmônico. Estabelecidos estes conceitos físicos é possível discutir alguns aspectos práticos relacionados à microscopia óptica. Assim, apresentamos a descrição do microscópio detalhando cada parte que o compõe, e por fim os exemplos de aplicação do sistema.

Um microscópio óptico que obtenha imagens de fluorescência a partir da absorção de dois fótons é fundamentalmente composto pelos seguintes componentes: um laser de pulsos ultracurtos, um sistema de varredura espacial, uma lente objetiva e um sistema de detecção e controle.

No caso do laser de pulsos ultracurtos muitos parâmetros, tais como: potência média ($P_{média}$), largura de pulso (τ), taxa de repetição do pulso (f) e comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{exc.}$), são fatores críticos para a boa qualidade de uma imagem de fluorescência. Devido à natureza não-linear da excitação, a intensidade média (I_s) de emissão pode ser estimada:

$$I_s \propto \frac{P_{média}^n}{(\tau f)^{n-1}} \quad (1)$$

sendo n a ordem do processo não-linear. No caso da absorção de dois fótons, tem-se que $n = 2$.³⁰⁻³¹ Pode-se idealmente aumentar a potência média do laser, para aumentar a intensidade de emissão, entretanto, a potência média que pode ser aplicada em um sistema biológico é limitada,³² pois não deseja-se causar efeitos térmicos destrutivos, fototoxicidade e fotodegradação no tecido.

Embora já se tenha demonstrado que a largura de pulsos da ordem de 10 fs é eficiente para imagens de fluorescência, a região mais usada é a faixa de 50-100 fs. A baixa largura de pulso leva a problemas diversos. Entre eles estão a dificuldade em se controlar a dispersão de grupo devido à grande largura da banda espectral e a uma perda no sinal de fluorescência devido ao uso de elementos de controle da dispersão. Outro problema é a dificuldade de separação dos espectros de excitação e emissão, devido à sobreposição dos mesmos.

Altas taxas de repetição do laser podem aumentar a intensidade de emissão da fluorescência e reduzir o tempo de varredura da amostra. Entretanto, muitos fluoróforos possuem tempo de vida de fluorescência em torno de 5 ns, e uma taxa de repetição alta (são comuns frequências maiores do que 200 MHz), pode levar a uma saturação do fluoróforo e

diminuir a resolução, pois pode haver uma acumulação do fluoróforo no estado excitado. Assim, a melhor escolha é uma repetição em torno de 100 MHz.

Figura 1 - A linha sólida horizontal indica o eixo óptico, os pontos focais são indicados pelos pontos escuros. a) feixe de luz emitido do ponto focal da lente se propaga paralelamente ao eixo óptico após a lente; b) feixe de luz divergente emitido no plano focal da lente se torna colimado após a lente, porém não-paralelo ao eixo óptico; c) feixe de luz com uma altura h em relação ao eixo óptico após atingir a lente possui um ângulo de inclinação θ ;

Fonte: Elaborado pelo autor.

Além da escolha correta dos parâmetros de operação do laser, o desenho óptico de um microscópio não-linear é muito importante. Um elemento importante do microscópio é a objetiva. A objetiva de um microscópio não-linear tem a função de focalizar a luz infravermelha sem introduzir aberrações e dispersões temporais no pulso, com o compromisso de apresentar grande eficiência na transmissão do sinal emitido pela amostra. O restante da óptica do microscópio pode ser compreendida seguindo a aproximação paraxial, ou seja, a óptica geométrica tradicional. Na óptica geométrica, o traçado dos raios pode ser resumido nas seguintes situações, ambas reversíveis espacialmente em relação à lente:

- um feixe de luz emitido do ponto focal da lente se propaga paralelamente ao eixo óptico após a lente (figura 1, parte a);
- um feixe de luz divergente emitido no plano focal da lente se torna colimado após a lente, porém não-paralelo ao eixo óptico (figura 1, parte b).

A altura do feixe h e seu ângulo θ (figura 1, parte c) estão relacionados através da equação abaixo:

$$\tan \theta = \frac{h}{f} \quad (2)$$

Assim, variando o ângulo com que um feixe colimado atinge a lente, pode-se variar a altura do ponto focal após a lente, e com isso produzir uma varredura no plano focal.

Figura 2 - Esquema do microscópio óptico de fluorescência com amostra fixa e varredura do feixe laser. Sendo S: *shutter*; $\lambda/2$: placa de meia-onda; PBS: cubo polarizador; L: lentes; G: espelhos conectados aos galvanômetros; EE: espelhos esféricos; E: espelho; D: espelhos dicroicos; TPE: transdutor piezoelétrico; F: filtro óptico; PMT: tubo fotomultiplicador. Os pontos denominados O correspondem a pontos conjugados do sistema óptico. Linhas pontilhadas indicam comunicação eletrônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 2 é apresentado o esquema óptico do microscópio que foi montado neste estudo. Esse tipo de configuração é conhecido como detecção *backward* e *non-descanned*, pois o sinal é coletado pela mesma objetiva de excitação, sendo que a luz emitida não passa pelo sistema de varredura, é detectada antes.⁸ Todo o sistema foi montado em uma placa de ensaio em aço *honeycomb* de 2" x 4" com espessura de 2,4" (07 OBH 007, Melles Griot, Rochester, EUA), apoiada verticalmente em uma mesa óptica anti-vibração TMC (784-475-01DR, TMC, Peabody, EUA). Em suma, o feixe laser inicialmente encontra o obturador ou *shutter* S que permite o controle eletrônico da passagem do feixe para o microscópio, em seguida passa por uma placa/lâmina de meia-onda (" $\lambda/2$ ") e um cubo polarizador (PBS), a placa pode ser rotacionada afim de controlar a intensidade do feixe que vai para o microscópio. Logo após, o feixe laser passa por um telescópio colimador, formado por duas lentes (L1 e L2), que

controlam a largura do feixe. A varredura lateral (x,y) neste caso é feita através de um par de espelhos esféricos (EE) e um par de espelhos conectados a galvanômetros (G). Na sequência, o feixe é expandido utilizando um telescópio formado por duas lentes L3 e L4, para que sua cintura preencha completamente a abertura traseira da lente objetiva. O completo preenchimento da abertura traseira é necessário para que a abertura numérica total da objetiva seja utilizada, e com isso seja possível alcançar a maior resolução espacial. A lente objetiva fica afixada a um transdutor piezoelétrico (TPE), para varredura axial (z – profundidade). O sinal emitido pela amostra é isotrópico; contudo, uma parte é captada pela objetiva e faz o caminho inverso da luz de excitação, sendo desviado através de um espelho dicróico (D1) para o sistema de coleta. O sinal coletado passa inicialmente por um filtro (F1), que bloqueia completamente a luz de excitação, permitindo somente a transmissão do sinal emitido pela amostra, e o sinal resultante é focalizado por uma lente L5 na fotomultiplicadora. O sistema de coleta do sinal utilizado neste estudo é feito utilizando duas fotomultiplicadoras (PMT - do inglês: *Photomultiplier Tube*), cuja configuração permite duas opções de utilização: a) uma PMT ficando dedicada à aquisição total da fluorescência e outra, se necessário, à aquisição da geração de segundo harmônico da amostra; ou b) cada PMT ficando dedicada à coleta de fluorescência numa região espectral diferente. Os sinais são separados utilizando um segundo espelho dicróico, (D2) diferente para cada caso. O microscópio foi montado em uma placa vertical apoiada em uma mesa óptica, e sob a objetiva temos um suporte de amostras customizado tanto para lâminas e biópsias quanto para posicionar pequenos animais. Na figura 3 uma visão geral do sistema é apresentada.

Figura 3 - Visão geral do sistema de microscopia.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1 Laser

Inicialmente o laser utilizado neste estudo foi o Titânio: Safira (Libra-S - Vitesse, Coherent, Palo Alto, CA, EUA), este sistema laser possui emissão em 800 nm com potência máxima de saída de 280 mW e duração do pulso da ordem de 100 femtossegundos. Contudo, devido a limitação de potência e emissão espectral, foi adquirido um novo laser e o microscópio passou a utilizar o laser de Titânio: Safira (Chameleon Vision II, Coherent Inc., Palo Alto, CA, EUA) que fornece excitação sintonizável em comprimento de onda de 680 à 1080 nm, largura temporal de pulso de 120 femtossegundos com 80 MHz de taxa de repetição.³³ Este é um laser de estado sólido e devido ao amplo espectro de emissão do Ti: Safira é possível fazer o travamento de modos (*mode-locking*) e conseguir pulsos de femtossegundos, bem como é possível sintonizar a emissão central numa ampla região espectral. O travamento de modos, consiste na combinação em fase de um número distinto de modos longitudinais do laser. Os modos permitidos dentro da cavidade dependem do meio ativo e do seu tamanho (figura 4). Quando ondas eletromagnéticas com diferentes frequências, mas com fases aleatórias são

somadas, elas produzem um campo elétrico final, também aleatório, resultando em uma intensidade irregular (não-homogênea) em função do tempo. Entretanto, se adicionarmos em cada componente de frequência a mesma fase, o campo elétrico resultante não será aleatório (figura 5).³⁴

Figura 4 - a) Espectro de emissão do meio ativo; b) modos permitidos dentro da cavidade laser ($\Delta\omega=\pi c/L$); c) combinando o espectro do meio com os modos permitidos na cavidade temos os modos presentes na cavidade.

Fonte: Adaptado de SILFVAST³⁴.

Com o travamento dos modos podemos obter pulsos mais curtos quanto maior for o número de modos travados, sendo que o número de modos depende da largura de banda de emissão do meio laser e do tamanho da cavidade, portanto a duração do pulso vai depender da largura de banda efetiva do meio (figura 4). Assim, quanto maior for a emissão do meio ativo, maior será o número de modos travados e por consequência, menor será o tempo do pulso. Existem diferentes métodos para se fazer o travamento de modos, que pode ser classificado como ativo ou passivo. Métodos ativos tipicamente envolvem o uso de um sinal externo para induzir uma modulação da luz da cavidade. Os métodos passivos não usam um sinal externo, mas para isso é necessário introduzir algum elemento dentro da cavidade.³⁴

Figura 5 - Espectros da intensidade em função do tempo para: a) componente ω_1 ; b) componente ω_2 c) componente ω_3 ; (componentes presentes na cavidade) d) soma das intensidades com fases aleatórias e) soma das intensidades com modos travados produzindo pulsos mais intensos.

Fonte: Adaptado de SILFVAST³⁴.

O laser de Titânio: Safira possui potência máxima de 3W em 800 nm, e pode ser controlada através de cubos polarizadores e uma placa de meia-onda, até obtermos a irradiância necessária para adquirir a imagem e que não produza danos a amostra. Nessas condições a energia por pulso é da ordem de nanoJoules e a irradiância máxima no ponto focal da ordem de 10^{18} W/cm^2 . Estudos demonstram que imagens com essa irradiância podem ser feitas durante horas sem impacto na reprodução celular e na viabilidade.⁸⁻⁹ Na figura 6 é mostrado um gráfico apresentando a eficiência de emissão em função do comprimento de onda para este laser.

Figura 6 - Eficiência de emissão do Ti:Safira - Chameleon Vision II em função da região espectral.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O laser mais utilizado em microscopia por absorção de dois fótons é o Titânio: Safira, tanto apenas o oscilador (o mesmo utilizado neste estudo), quanto com o estágio amplificador que resulta em uma potência de pico maior.³⁵⁻³⁸ Contudo, outros tipos de laser de femtossegundos (fs) são alternativas, como por exemplo: laser de corante, lasers de estado sólido (por exemplo: Cr:LiSAF, Cr:LiCAF), lasers de fibra óptica dopada (por exemplo, com Yb³⁺), entre outros.^{23; 39-42} O laser de Titânio: Safira é um sistema simples de operar, pode gerar pulsos de 100 fs, com centenas de kW de potência de pico e é amplamente ajustável (680-1080 nm). Enquanto que outros tipos de laser não são sintonizáveis em uma banda ampla de emissão, lasers de fibra, por exemplo, apresentam apenas um comprimento de onda de emissão, outra diferença desses lasers alternativos é a baixa intensidade de luz emitida.

4.2 Sistema de Varredura do Feixe Laser

Geralmente em um sistema de imagem ou de microscopia tradicional toda a amostra é iluminada e a imagem é formada no olho ou em uma câmera. Neste caso, como a absorção de dois fótons ocorre somente no volume focal (processo dependente do quadrado da irradiância)

é necessário um sistema de varredura. Deste modo a varredura espacial pode ser feita de diferentes maneiras, sendo as duas principais categorias a investigação com amostra fixa (usando varredura através do feixe laser) e a varredura espacial tridimensional da amostra com o feixe focalizado fixo. No grupo em que o feixe é movido, essa varredura pode ser feita de diversas maneiras, utilizando moduladores acústico-ópticos, espelhos conectados a galvanômetros, transdutores piezoelétricos, etc.⁸

O método de varredura da amostra é simples e direto e a óptica pode ser mantida perfeitamente paraxial, resultando em aberração mínima. Além disso, o movimento de uma base piezoelétrica pode ser controlado com precisão nanométrica. No entanto, apesar da precisão de movimento da base, em geral, ela é lenta – microscópios com varredura de amostra raramente possuem uma taxa de varredura de uma imagem por minuto. Além disso, as vibrações mecânicas do sistema no estágio de digitalização podem também comprometer o registro de amostras leves de espécimes biológicas, e podem causar potenciais danos mecânicos. Assim, para tecidos biológicos, predominam os sistemas de varredura por feixe de laser.^{5;8}

O método mais comum de um sistema de varredura por feixe do laser utiliza um espelho fixado a um galvanômetro. Essa varredura atinge velocidades maiores, pois o peso do espelho de varredura é algumas ordens de magnitude menor em relação ao da base da amostra. Alguns sistemas de varredura lateral não mecânicos, tais como os defletores acústico-ópticos, também têm sido utilizados.⁸ Os mecanismos acusto-ópticos têm a vantagem de gerar um padrão de digitalização arbitrária, com tempo de estabilização (resposta) inferior a milissegundos, e também são capazes de alternar rapidamente de um ponto a outro da amostra. No entanto, defletores acusto-ópticos produzem aberrações espaciais e dispersões temporais significativas no feixe de excitação.⁸

Um sistema de varredura típico com galvanômetros consiste de dois espelhos sincronizados que se movem em conjunto para produzir um padrão de varredura em diferentes pontos do plano *xy*. Esses sistemas possuem taxa de varredura da ordem de 1 kHz. Existem diferentes formas de se fazer a varredura utilizando espelhos conectados a galvanômetros, neste estudo utilizamos a configuração conhecida como *relay scanning system*.⁴³⁻⁴⁴ Nesta técnica cada galvanômetro executa a varredura numa direção e estão conjugados através de dois espelhos côncavos.⁴⁵

Logo, o sistema de varredura lateral é composto por um par de espelhos (6M2106S40-S1, Cambridge Tech., Lexington, MA, Estados Unidos) fixados a um motor de varredura tipo galvanômetro (Mini CT Galvanometer Scanner, 6210HM4, Cambridge Tech., Lexington, MA, Estados Unidos). O motor é controlado por um amplificador (Controlador Servo Amplificador,

67321HHJ-1, Cambridge Tech., Lexington, MA, Estados Unidos) que recebe um sinal externo, proveniente de uma placa de aquisição de dados multifuncional (M Series PCI-6259, 32 entradas analógicas, 48 DIO, 4 saídas analógicas, National Instruments, Austin, TX, Estados Unidos). A placa de aquisição está também conectada ao computador, sendo o controle dos espelhos realizado via *software* LabView 7 (National Instruments, Austin, TX, Estados Unidos).

Figura 7 - Detalhe do sistema de varredura axial do microscópio. Sendo, G_i : espelhos conectados ao galvanômetro; SM_i : espelho esférico; L_i : lente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 7, temos um detalhe do sistema de varredura lateral: o feixe laser atinge primeiramente o espelho ($G1$), que realiza a varredura em x definida como sendo a função triangular (figura 8 a), e este espelho está colocado exatamente na posição focal do primeiro espelho esférico ($SM1$) de alumínio com diâmetro de 25 mm e foco de 50 mm (NT43-466, Edmund Optics, Barrington, NJ, Estados Unidos); o segundo espelho esférico ($SM2$) está posicionado exatamente na posição confocal e conjugado ao primeiro espelho. Após sair do segundo espelho esférico, o feixe atinge o segundo espelho ($G2$), que varre o feixe na direção y , segundo a função mostrada figura 8 b.

Figura 8 - Funções enviadas para o sistema de galvanômetros para a realização da varredura axial. Em (a), temos uma função triangular que realiza a varredura no eixo x; em (b), a função escada para varredura y.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o segundo espelho de varredura, o feixe laser tem que ser expandido e o padrão de varredura tem que ser transmitido até a entrada da objetiva. Para isso, uma lente (L3) de 30 mm foi posicionada para que o ponto focal coincidisse com o segundo espelho de varredura. Em seguida, uma segunda lente (L4) de foco de 200 mm foi utilizada e colocada a uma distância exatamente igual à soma dos focos das lentes, resultando numa cintura do feixe de aproximadamente 25 mm. Com isso a varredura executada em G1 está conjugada com a varredura em G2, e que por sua vez estão conjugadas com a objetiva. Assim, o feixe expandido preenche completamente a abertura traseira da objetiva, e chega com um determinado ângulo de inclinação dado pelo padrão de varredura. Este ângulo de inclinação, tanto na direção x quanto na y , produz no ponto focal da objetiva um padrão de varredura.

Em seguida, um atuador adicional (TPE) é necessário para a varredura axial. O método mais comum para essa varredura axial é fixar a objetiva do microscópio em um posicionador piezoelétrico. Devido ao peso da objetiva do microscópio, a taxa de varredura é da ordem de 100 Hz. Por conta da sua menor velocidade em comparação com os sistemas que utilizam galvanômetros, obtém-se primeiramente a imagem 2D no plano xy e, em seguida, a varredura em profundidade. Uma limitação de um posicionador piezoelétrico é o intervalo de varredura da ordem de 100 a 300 μm . Esta limitação pode ser superada através da inclusão de um sistema mais lento, do tipo servo-motor, que controla a altura do material analisado no microscópio, trabalhando em conjunto com o posicionador piezoelétrico.⁸

No caso deste estudo, temos inicialmente um posicionador piezoelétrico com um alcance máximo de 100 μm e passo de 0,1 μm (Fast PIFOC® Piezo Nanofocusing Z-Drive, 100 μm , SGS Sensor, PI GmbH & Co, Jena, Alemanha) e um controle manual com alcance de 20

mm. O posicionador piezoelétrico está conectado a um computador pessoal que possui o *software* LabView 7 (National Instruments, Austin, TX, Estados Unidos) que permite controlá-lo. Para a correta fixação deste sistema de varredura axial, foi desenhado e construído um suporte mecânico especial, como mostrado na figura 9.

Figura 9 - Detalhe do sistema de excitação e coleta do microscópio. Sendo: TPE: posicionador piezoelétrico; L_i: lente; F_i: filtro óptico; D_i: espelho dicroico; PMT: módulo fotomultiplicador.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Objetiva

A objetiva utilizada neste estudo é a Olympus XLUMPLFN20X (Olympus, Tóquio, Japão); com aumento de 20X; imersão em água; abertura numérica (NA) 1,0; distância de trabalho de 2 milímetros. A abertura numérica corresponde ao intervalo de ângulos que a objetiva pode receber luz, quanto maior a abertura numérica maior a resolução espacial e maior a intensidade do sinal detectado. Enquanto que a distância de trabalho é a distância entre a extremidade da lente frontal da objetiva e o ponto focal da objetiva. Normalmente objetivas possuem uma distância de trabalho pequena o que impede imagens com grande profundidade em tecidos biológicos. Neste trabalho a objetiva escolhida apresenta boa distância de trabalho, umas das maiores do mercado para essa aplicação. Outro parâmetro importante de uma objetiva é a transmissão óptica, para uso em microscopia não-linear é necessário apresentar boa transmissão da região do infravermelho próximo entre 700 – 1100 nm. Essa objetiva é especialmente desenhada para aplicações de microscopia por absorção de dois fótons, assim sua eficiência de coleta da luz emitida é otimizada.⁴⁶ Outras especificações da objetiva estão presentes no anexo desse texto.

4.4 Sistema de Detecção

O sinal emitido pela amostra é coletado através de um espelho dicróico (D1) com reflexão entre 360 nm e 685 nm (685DCXRU - *Custom long pass dichroic, 45 deg aoi, with reflection from 685 nm to 360 nm, 50mm diameter, min 1.5mm thick, w/ar-coating*, Chroma Technology Corp., EUA). Em seguida, a luz é focalizada por uma lente L5 ($f=20$ cm com anti-reflexo) nas fotomultiplicadoras, mas antes passa pelo filtro F1 (26347 - E700SP-2p, Chroma Technology Corp., EUA), que elimina a luz de excitação. Para a separação do sinal entre SHG e fluorescência é utilizado um espelho dicróico D2 (T425lpxr, Chroma Technology Corp., EUA), ou para separar as fluorescências verde e vermelha utilizou-se outro dicróico D2 (T590lpxr, Chroma Technology Corp., EUA).

Neste estudo, fotomultiplicadoras foram utilizadas como detectores devido ao baixo sinal luminoso emitido pelas amostras de interesse, impossibilitando a detecção com um fotodiodo ou fotodiodo de avalanche. Esses dispositivos baseiam-se no efeito fotoelétrico, sendo os diodos construídos de semicondutores, enquanto PMT feitas de metais ou semi-metais. Geralmente utiliza-se um fotodiodo de avalanche quando o sinal não é detectado por um fotodiodo comum, mas é muito intenso para uma PMT. O ganho típico de um fotodiodo de avalanche é 100 vezes enquanto o de uma PMT é da ordem de 10^6 vezes. PMT possuem baixa sensibilidade na região do vermelho e infravermelho, sendo os fotodiodos melhores neste quesito. A eficiência quântica de conversão de fótons em elétrons nas PMT é de 40% e nos fotodiodos de avalanche 80%.

A PMT utilizada neste estudo (H9305-03 - Hamamatsu, Japão) possui um detector multicalor com resposta espectral na faixa de 350-700 nm. Essa resposta é praticamente constante, permitindo que comparações de intensidade entre diferentes regiões espectrais possam ser feitas de forma direta. As duas PMT foram fixadas em uma estrutura especialmente desenhada para esse estudo (figura 9), onde se localizam também a lente e o dicróico para separação do sinal.

Um parâmetro que podemos controlar das PMT é a tensão de referência desde 0,25 até 1,0 Volts; este valor controla o ganho interno da fotomultiplicadora, quanto maior essa tensão de referência, maior o ganho e por consequência uma imagem mais intensa. Mais especificações da PMT estão presentes no anexo desse texto.

O sinal de saída da PMT é uma corrente elétrica proporcional à intensidade de luz detectada, e antes de ser lido pela placa de aquisição passa por um estágio de integração. A

eletrônica de integração foi especialmente montada para essa aplicação, consistindo de um circuito eletrônico de integração baseado em trabalhos semelhantes na literatura.⁴⁷ A integração do sinal é feita durante os 20 μ s em que o feixe laser fica parado em um ponto da amostra, e não há intervalo de tempo entre um ponto e outro da medida. O circuito eletrônico trabalha com dois circuitos integrados para cada canal, pois após realizar a integração, os capacitores do circuito precisam ser descarregados. Logo, enquanto uma parte está fazendo a integração a outra está se descarregando para a nova medida. O sinal de saída do circuito de integração é uma voltagem proporcional ao sinal luminoso detectado. Esse sinal elétrico é lido através da placa de aquisição (DAQ - BNC-2021 e PCI- 6259, National Instruments, Austin, TX, EUA), conectada a um computador pessoal.

4.5 *Software* de Controle do Microscópio

Um algoritmo em LabView (National Instruments, Austin, TX, EUA) foi escrito para o controle do microscópio e obtenção das imagens de fluorescência e geração de segundo harmônico.

Figura 10 - Imagem da interface usuário do *software* em LabView que controla o sistema de microscopia para aquisição única imagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os principais parâmetros de entrada desta rotina são o tamanho e o número de pixels da imagem. O tamanho da imagem é dado em tensão, que é convertida em micrômetros utilizando os valores obtidos na calibração (detalhes na próxima seção). Os valores típicos do número de pixels da imagem são 128, 256, 512 ou 1024; quanto maior o número de pixels, maior a qualidade da imagem, pois divide-se o tamanho da imagem pelo número de pixels – ou seja, a tensão enviada aos galvanômetros é fracionada dependendo da resolução da imagem. A imagem é de 8 bits com 256 níveis de cinza, logo a tensão lida pela placa de aquisição entre 0 e 5 Volts é digitalizada com essa resolução. Nas figura 10, figura 11 e figura 12 apresentamos uma imagem da tela de comando do *software* em LabView que controla o sistema de microscopia, onde inserimos os parâmetros da imagem e visualizamos a imagem adquirida.

Figura 11 - Imagem da interface usuário do *software* em LabView que controla o sistema de microscopia para aquisição de duas imagens simultaneamente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A primeira rotina elaborada é para aquisição de uma única imagem (figura 10), já a segunda é utilizada para aquisição de duas imagens simultaneamente (figura 11), enquanto que a terceira foi desenvolvida para aquisição de uma sequência de imagens com diferentes profundidades (figura 12). Em todas, os parâmetros de entrada são: tamanho imagem (pixel), voltagem de pico a pico e posição axial do atuador piezoelétrico. A imagem adquirida pode ser corrigida através da função *auto-contraste*, que normaliza a imagem com valores de intensidade de 0 a 255. Após a definição dos parâmetros citados anteriormente, o programa executa as seguintes etapas para adquirir uma imagem: abre o *shutter*, envia o sinal de tensão em função do tempo para o amplificador dos galvanômetros, controla a posição em *z* do posicionador piezoelétrico e faz a leitura do valor de tensão correspondente à intensidade de emissão. Após adquirir a imagem, o *shutter* é fechado e coloca o sistema de galvanômetros na posição de repouso. O fluxograma do processo é apresentado na figura 13. O tempo que o feixe laser fica parado em cada ponto da amostra (*dwell time*) foi fixado inicialmente em 20 μ s.

Figura 12 - Imagem da interface usuário do *software* em LabView que controla o sistema de microscopia para aquisição de sequência de imagens com diferentes profundidades.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A placa de aquisição tem duas saídas analógicas de tensão, que são utilizadas para controle dos galvanômetros, uma saída digital para o controle do *shutter*, e duas entradas analógicas para os sinais das fotomultiplicadoras. O tempo em que uma imagem de 128 por 128 pixels é feita é de 0,3s; de 1,3s para 256 x 256 pixels; de 5,2s com 512 x 512 pixels e com 1024 x 1024 pixels de 20s. Após a aquisição das imagens, geralmente elas são processadas utilizando o *software* Image J (National Institute of Health, EUA), onde o contraste é reforçado e um filtro *Gaussian Blur* é aplicado.

Figura 13 - Fluxograma do procedimento para adquirir uma imagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Calibração do Microscópio

Dois parâmetros fundamentais de caracterização de um microscópio são a resolução espacial e o campo de visão. O primeiro está relacionado com a capacidade do microscópio de resolver fino detalhes da amostra observada e é definido como a mínima distância necessária para distinguir dois pontos objetos próximos. O campo de visão é a área da amostra que pode ser visualizada e essa dimensão é limitada pelas aberturas ao longo do caminho óptico.

Com isso, a primeira imagem obtida foi de um padrão de distância, que consiste em uma lâmina com barras paralelas e igualmente espaçadas (1 mm Stage Micrometer with 10 μm Divisions, 3" x 1", R1L3S2P, Thorlabs, Newton, NJ, Estados Unidos). O espaçamento entre as

barras é de 10 μm , sendo as barras fluorescentes e gravadas sobre uma lâmina de vidro. A lâmina foi colocada no suporte de amostra e uma gota de água foi colocada entre a lâmina e a objetiva, para um melhor acoplamento da luz. Em seguida, a região com as barras foi colocada na posição focal da objetiva. Nas figura 14 e figura 15 temos as imagens obtidas para a calibração do microscópio.

Essa calibração também é necessária para relacionarmos a tensão enviada aos galvanômetros com a real distância varrida na imagem. Deste modo, concluí-se que, na direção horizontal y , uma tensão de 1 Volt de pico a pico (V_{pp}) corresponde a 32 μm de varredura na imagem, enquanto na direção vertical x , 1 V_{pp} corresponde a 46 μm . Logo cada voltagem aplicada corresponde a um deslocamento de $\Delta_x=0,031\text{V}/\mu\text{m}$ para a direção x e $\Delta_y=0,022\text{V}/\mu\text{m}$ para a direção y .

Figura 14 - Imagem do padrão de calibração imagem de 512 x 512 pixels. Valores de tensão aplicada nos galvanômetros: 1V (esquerda); 3V (centro); 5V (direita). Observações: o padrão de distância apresenta algumas imperfeições (pequenas bolhas) e a cada 10 linhas de espessura menor há uma linha de espessura maior. Esses detalhes podem ser observados em algumas imagens.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota-se que quanto maior o campo de visão mais as linhas horizontais aparentam estar distorcidas, indicando a presença de aberrações fora do eixo óptico no sistema. Essas aberrações são mais evidentes quando a tensão aplicada nos galvanômetros é a partir de 3 V_{pp} .

Figura 15 - Imagem do padrão de calibração imagem de 512 x 512 pixels. Valores de tensão aplicada nos galvanômetros: 1V (esquerda); 3V (centro); 5V (direita).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para um campo de visão típico de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ o tamanho do pixel é de: 780 nm, 390 nm, 195 nm, 97 nm, respectivamente para imagens com 128, 256, 512, 1024 pixels.

Imagens de partículas fluorescentes com diâmetro conhecido também foram realizadas para a calibração do sistema (F36909 FocalCheck fluorescence microscope test slide #1, Invitrogen, Life Technologies, California, EUA). Na figura 16 são apresentados exemplos de imagens de algumas partículas, utilizando a calibração anterior e o *software* Image J (National Institute of Health, EUA) determinou-se o tamanho dessas partículas. Para partículas com diâmetro de valor nominal $15 \mu\text{m}$, obteve-se $(14 \pm 1) \mu\text{m}$, já para a partícula de $6 \mu\text{m}$ o resultado foi $(5,4 \pm 0,5) \mu\text{m}$ e finalmente para a de $4 \mu\text{m}$ encontrou-se $(3,5 \pm 0,6) \mu\text{m}$. Esses valores estão dentro do esperado pois pequenas variações no diâmetro das partículas podem ocorrer, bem como a relação entre voltagem aplicada nos galvanômetros e deslocamento realizado pelo feixe laser podem também apresentar pequenas variações.

Figura 16 - Imagem de partículas fluorescente com diâmetro de: esquerda - $15 \mu\text{m}$; centro - $6 \mu\text{m}$; direita - $4 \mu\text{m}$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Resolução Espacial

Uma figura de mérito utilizada para descrever a resolução de microscópios é a largura à meia altura do perfil de intensidade no plano imagem de objetos abaixo da resolução esperada do sistema. Em microscopia de dois fótons a resolução espacial corresponde às dimensões do volume de excitação, que é menor do que a cintura do feixe de luz, devido a propriedades não lineares da excitação. A resolução é relacionada com a extensão da largura à meia altura (FWHM do inglês *Full Width at Half Maximum*) da função de dispersão de um ponto (PSF do inglês *Point Spread Function*) objeto, contudo não é definida por ela.⁵ A resolução é definida como a mínima separação entre dois objetos de tal forma que ainda possam ser suficientemente distinguíveis. Pelo critério de Rayleigh isso ocorre quando o máximo da PSF de um objeto coincide com o primeiro mínimo da PSF de outro objeto. A amplitude da PSF de um microscópio está relacionada com a amplitude do campo elétrico no plano imagem quando observa-se uma fonte pontual, ou seja, é a difração de Fraunhofer de uma abertura circular, onde as soluções estão relacionadas com funções de Bessel.^{5; 8} Com isso, a FWHM lateral e axial de um microscópio por absorção de dois são dadas por:¹⁰

$$FWHM_{lateral} = \frac{0,383\lambda}{NA^{0,91}} \quad (3)$$

$$FWHM_{axial} = \frac{0,626 \lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad (4)$$

Sendo NA a abertura numérica da objetiva, λ é o comprimento de onda do laser de excitação e n é o índice de refração do meio. No caso da fluorescência por absorção de dois fótons, as resolução axial e radial estão relacionadas com o quadrado da intensidade de luz. Comparando a resolução do microscopia não linear com a confocal, esta última tem melhor resolução. Essa diferença ocorre pois a absorção é dependente do quadrado da intensidade de excitação e, em geral, o comprimento de onda na microscopia confocal é a metade do comprimento de onda na microscopia por absorção de dois fótons.^{5; 8; 10}

Observamos que um parâmetro importante na resolução espacial do microscópio óptico não-linear é a abertura numérica (NA) da objetiva. Quanto maior for a abertura numérica melhor será a resolução. A abertura numérica está relacionada com o ângulo na qual a objetiva pode receber ou emitir luz. Através dessas expressões, podemos determinar teoricamente a

resolução lateral e axial do sistema. Na tabela 2, são apresentados os valores esperados para a resolução axial e lateral, utilizou-se para os cálculos $\lambda=800$ nm, $NA = 1$, e o índice de refração do meio como sendo o índice da água $n=1,33$.

Figura 17 - Imagens de partículas fluorescente com diâmetro de 200 nm, o campo de visão da imagem é de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a determinação da resolução deste sistema, foram feitas imagens de partículas fluorescentes de $0,2 \mu\text{m}$ (TetraSpeck™ Microspheres, $0.2 \mu\text{m}$, fluorescent beads, Invitrogen, Life Technologies, California, EUA). A solução estoque de partículas foi inicialmente diluída 1: 10000 em água deionizada, em seguida novamente diluída 1: 10000 em etanol 100%. Uma gota de aproximadamente $10 \mu\text{L}$ da solução diluída foi colocada sobre uma lamina de vidro e selada com uma lamínula de vidro e esmalte de unha incolor.

Em seguida, imagens nas três direções espaciais foram realizadas utilizando a água ($n = 1,33$) como meio de imersão, comprimento de onda de excitação de 800 nm, uma distância radial entre pixels de 30 nm ($30 \mu\text{m}$ de campo, imagem 1024 pixels) e 500 nm ao longo e direção axial. A figura 17 mostra um exemplo de imagem das partículas fluorescentes com diâmetro de 200 nm.

O perfil da intensidade de fluorescência foi montado em ambas as direções utilizando os *softwares* Image J (National Institute of Health, EUA) e o MatLab (MatLab version R2012a, Mathworks, Natick, MA, EUA), em seguida, uma função Gaussiana foi ajustada aos pontos experimentais utilizando o *software* OriginPro (OriginPro 9.0, OriginLab. Corp., Northampton, MA, EUA), representando a PSF do objeto. A resolução espacial foi então medida como sendo a FWHM da função gaussiana. Um exemplo de curva obtida para o deslocamento lateral é

apresentado na figura 18 e, na figura 19, o deslocamento axial. Após repetir o procedimento algumas vezes, encontrou-se os valores experimentais para a resolução axial e lateral, apresentados na tabela 2.

Figura 18 - Perfil de intensidade de fluorescência em função do deslocamento lateral. Uma função gaussiana foi ajustada aos pontos experimentais para determinação da largura a meia altura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar dos valores encontrados diferirem dos valores teóricos esperados, essa resolução é suficiente para a obtenção de imagens com resolução subcelular e para aplicações biológicas³⁹, possuindo um voxel de tamanho aproximado de $2,2 \mu\text{m}^3$.

Figura 19 - Perfil de intensidade de fluorescência em função do deslocamento axial. Uma função gaussiana foi ajustada aos pontos experimentais para determinação da largura a meia altura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor de resolução encontrado também está próximo da resolução de microscópios semelhantes encontrados na literatura (tabela 2). A diferença entre o valor teórico e experimental pode ocorrer devido a pequenas aberrações ópticas presentes no sistema, especialmente aberração esférica introduzida pelos espelhos esféricos utilizados no sistema de varredura lateral.³⁹

Tabela 2 - Comparação da resolução de microscópios semelhantes.

<i>Sistema Laser</i>	<i>Objetiva</i>	<i>Resolução lateral</i>	<i>Resolução axial</i>	<i>Referência</i>
Ti:Safira ($\lambda=800$ nm)	20X, NA:1,00	310 nm	1,1 μ m	valor teórico
Ti:Safira ($\lambda=800$ nm)	20X, NA:1,00	(800 $\pm$ 100) nm	(4,4 $\pm$ 1,5) μ m	este estudo
Ti:Safira ($\lambda=740$ nm)	20X, NA:0,90	(780 $\pm$ 10) nm direção x e (920 $\pm$ 6) nm direção y	(3,0 $\pm$ 0,4) μ m	³⁹
Ti:Safira (750 a 850 nm)	40X, NA:1,3 ou 20x NA:0,9	400 a 600 nm	1,2 a 2,0 μ m	DermaInspect ^{®48}
Ti:Safira (800 nm)	60X, NA:1,40	250 nm	800 nm	⁴⁹
Fibra óptica dopada com Yb³⁺ (1064 nm)	60X, NA:1,20	440 nm	1,34 μ m	⁴²

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 Aplicações

5.1 Pele

Para verificar a eficácia do sistema em adquirir imagens biológicas, foram realizados testes utilizando amostras teciduais *ex vivo* de rato Wistar. Para isso, fragmentos de pele e do fígado foram removidos de um animal logo após sua eutanásia. Esse animal faz parte de um grupo experimental de um estudo avaliando a resposta fotodinâmica na reparação da pele, e todos os procedimentos de ética em pesquisa animal foram seguidos (protocolo número 047/2011 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, e protocolos número 047/2009 e 062/2009 do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).

Após a remoção, o fragmento de pele foi posicionado entre uma lâmina e uma lamínula de vidro. Sobre a lamínula, foi colocada água para contato com a objetiva. A excitação foi feita em 800 nm, com a irradiância e o ganho da PMT ajustados de forma a se obter uma imagem com bom contraste e sem saturação. Nas figura 20 e figura 21, são apresentados exemplos de imagens da fluorescência emitida pelo tecido. O campo de visão das imagens é de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. A resolução das imagens é de 512×512 pixels, e o tempo de aquisição para cada imagem é de aproximadamente 5 segundos. As imagens da figura 20 (área 1) fazem parte de uma varredura axial (profundidade) e, neste caso, 50 imagens com separação de $0,5 \mu\text{m}$ foram obtidas.

Figura 20: Imagens da fluorescência natural da pele de rato Wistar (área 1). Observa-se a fluorescência do citoplasma das células do epitélio em diferentes profundidades.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nessas imagens pode-se observar principalmente a fluorescência do citoplasma das células do epitélio. Essa fluorescência é devida aos fluoróforos endógenos presentes, de modo que a imagem pode ser obtida sem a necessidade de fluoróforos exógenos e/ou marcadores. Os núcleos celulares não apresentam uma fluorescência muito intensa sob essas condições. A imagem apresenta resolução lateral suficiente para a discriminação da célula e do núcleo, este último da ordem de alguns micrometros. A morfologia celular observada foi condizente com achados histológicos, mostrando formato circular, integridade e justaposição com células vizinhas.

Figura 21 - Imagens da fluorescência natural da pele de rato Wistar (área 2). Observa-se a fluorescência do citoplasma das células do epitélio em diferentes profundidades.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma amostra de pele foi encaminhada para o procedimento histológico, onde foi corada com HE (hematoxilina e eosina); uma imagem dela em um microscópio tradicional de luz branca é apresentada na figura 22.

A pele consiste de duas camadas principais: a epiderme (externa) e a derme (interna). A epiderme é dividida em *stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum*, *stratum basale* (figura 22). As únicas células em divisão são as da camada basal (entre epiderme/derme), e se movem em direção à superfície, as células epiteliais vão sofrendo modificações morfológicas e metabólicas, até que na camada mais superficial, apenas células mortas estão presentes, as quais terminam por ser eliminadas por meio da descamação da pele. A derme formada pelo *stratum papillare* e pela camada reticular, contém fibras de colágeno e elastina, que fazem parte da matriz extracelular. Elas contribuem para a sustentação da pele, além de estarem presentes ao redor dos vasos sanguíneos. É na derme também que estão localizados os neurônios sensitivos de pressão e dor, os folículos capilares e as glândulas sudoríparas e sebáceas.

Figura 22 - Imagem histológica das camadas típicas da pele.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 23, apresenta imagens de geração de segundo harmônico (excitação em 800 nm) da derme da pele, este sinal é proveniente das fibras de colágeno, fenômeno bastante citado na literatura.⁵⁰⁻⁵¹ Nesta região a varredura axial foi de 35 μm com intervalos de 1 μm. É possível observar a distribuição das fibras de colágeno com diâmetro aproximado de 2 μm e em uma quantidade elevada, característica de uma pele sadia.

Figura 23 - Imagens de geração segundo harmônico da pele de rato Wistar. Neste caso, observamos a distribuição das fibras de colágeno presente na pele em diferentes profundidades.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Outro exemplo de imagens de SHG é apresentado na figura 24, obtido da derme de pele de porco *ex vivo* (material adquirido em um supermercado local) com excitação em 800 nm. A varredura axial total, neste caso, foi de 50 μm com intervalos de 1 μm . O sinal de SHG é gerado nas fibras de colágeno, e é emitido preferencialmente paralelo à direção de incidência da excitação devido a condição de *phase matching*. A propagação desse sinal se dá na mesma direção da excitação; entretanto, o sinal de SHG perde sua direção preferencial após a ocorrência de múltiplos espalhamentos no tecido e, por isso, pode ser detectado no modo de reflexão.

Figura 24 - Imagens de geração segundo harmônico em pele de porco. Neste caso, observa-se a distribuição das fibras de colágeno presentes na pele em diferentes profundidades.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparativamente, as fibras de colágeno de rato são maiores, com cordões mais definidos, enquanto na derme do porco o colágeno se apresenta de forma mais densa quanto à sua distribuição, e mais ordenada quanto ao arranjo. Por conta disso, o tecido conjuntivo também é mais denso, resultando em uma pele mais firme.

A profundidade máxima para obtenção de imagens de fluorescência, neste caso foi de 40 μm , isso devido às características de absorção e espalhamento da amostra, bem como do tamanho da epiderme. Combinando as imagens de fluorescência e de geração de segundo harmônico a profundidade máxima obtida foi de aproximadamente 80 μm , condizente com estudos semelhantes.⁸

5.2 Fígado

Após a remoção, a biópsia de fígado foi também posicionada entre uma lâmina e uma lamínula de vidro. O comprimento de onda de excitação também foi de 800 nm, pois mostrou-se suficiente para a obtenção das imagens. A irradiância utilizada também foi sempre da ordem de poucos mW/cm^2 .

Na figura 25, vêem-se imagens da fluorescência natural das células de fígado de rato (hepatócitos), onde também se observa a fluorescência do citoplasma das células. Os hepatócitos possuem fluorescência natural, principalmente devido aos lipopigmentos e às flavinas.⁵²⁻⁵⁴

Figura 25 - Imagens da fluorescência natural de diferentes regiões da camada superficial de fígado de rato Wistar, onde podemos visualizar as células dos hepatócitos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível verificar no citoplasma dos hepatócitos estruturas granulares fluorescentes que são compatíveis com os lipossomos repletos de lipopigmentos. Também neste caso, o núcleo celular é pouco fluorescente. Uma parte do fígado também foi encaminhada para o procedimento histológico, onde foi corada com HE. Na figura 26 é apresentada uma imagem em um microscópio tradicional de luz branca. O formato e o tamanho dos hepatócitos na imagem de fluorescência devido a absorção de dois fótons estão compatíveis com a histologia da peça.

Figura 26 - Imagem histológica de fígado rato Wistar.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Membrana Corioalantóica

A membrana corioalantóica de ovos de galinha, conhecido como CAM (do inglês, Chorioallantoic Membrane) é um dos modelos *in vivo* mais utilizado para o estudo da angiogênese e do comportamento do endotélio vascular. É um modelo que permite o acesso facilitado aos vasos sanguíneos e ao embrião, além de ser um método simples, barato e de fácil instalação em ambiente laboratorial.⁵⁵⁻⁵⁶ Esse modelo previamente vascularizado pode ser usado para o desenvolvimento de um tumor com a inserção de um pedaço de biópsia ou células em cultura sobre a membrana, havendo a exploração de diversas linhagens celulares para viabilização do modelo tumoral (figura 27).

Estudos de modelo tumoral em membrana corioalantóica com células de melanoma murino estão em desenvolvimento no laboratório de Biofotônica.⁵⁷⁻⁵⁸ Assim, o microscópio foi adaptado para adquirir imagens do tumor dentro do ovo. Essa adaptação permitiu que o ovo ficasse sob a objetiva e a região onde o tumor estava presente próxima ao ponto focal da objetiva. Uma gota de água foi colocada entre a objetiva e a membrana. A excitação foi em 800 nm e foi utilizado o marcador acriflavina (Sigma Aldrich, EUA) para um melhor contraste das células. Esse é um marcador que se adere principalmente aos núcleos celulares.

Figura 27 - Imagem de um tumor se desenvolvendo na membrana corioalantóica de um ovo de galinha.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Através dessa adaptação foi possível fazer imagens do modelo tumoral de CAM, e com isso visualizar como as células se aglomeram ao redor de um vaso sanguíneo (figura 28). Como o vaso sanguíneo é uma forma de alimentação e crescimento do tumor, era esperado que as células buscassem a região em torno do vaso.⁵⁷⁻⁵⁸ As imagens adquiridas mostraram claramente esse comportamento das células tumorais.

Figura 28 - Imagens de fluorescência de células aderidas de diferentes regiões em membrana corioalantóica. Os vasos sanguíneos são as regiões mais escuras nas imagens.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 Estágio no Exterior

A soma do coeficiente de absorção com o coeficiente de espalhamento de um material resulta no coeficiente de atenuação total. Cada tecido biológico apresenta um coeficiente de atenuação total característico. A atenuação total do tecido é a composição da influência de cada componente do tecido. Uma curva típica do coeficiente de atenuação total é apresentada na figura 29. Nela observamos a maior atenuação na região de comprimentos de onda próximas a 400 nm, a qual diminui conforme nos deslocamos para o 1000 nm. Isso ocorre principalmente devido ao espalhamento Mie, que é maior para menores comprimentos de onda.

Figura 29 - Coeficiente de atenuação total em função do comprimento de onda de uma amostra de tecido cerebral. Na região visível do espectro predomina o espalhamento Mie, enquanto que no infravermelho próximo os picos de absorção da água são evidentes em 1444 e 1950 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na literatura é definida uma “janela óptica” entre 650 – 950 nm¹², onde a luz apresenta baixa atenuação pelos constituintes dos tecidos biológicos, levando a uma maior profundidade média de penetração. Esta característica se relaciona com as vantagens apresentadas pela microscopia por absorção de dois fótons, discutidas anteriormente. A excitação por dois fótons, por exemplo, em 800 nm, tem uma profundidade de penetração maior do que a de um em 400 nm. Contudo, medidas do espectro de atenuação total para diversos tecidos sugerem que, além dessa tradicional janela óptica, existe ainda uma outra entre 1600 e 1870 nm.^{14; 59-60} O

conhecimento sobre essa "nova" janela óptica pode abrir novas possibilidades de diagnóstico e tratamento utilizando luz. Alguns estudos nessa área foram realizados durante o período de Março a Agosto de 2013, ao longo de um estágio de doutorado realizado no laboratório do Prof. Robert Alfano, da City College of New York – Institute for Ultrafast Spectroscopy and Lasers. Realizamos imagens nessa região e alguns trabalhos foram publicados (Sordillo. L. A.; Pu, Y.; Pratavieira, S.; Budansky, Y.; Alfano, R. R.; Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows. *Journal of Biomedical Optics*, v. 19, p. 056004, 2014.)

Figura 30 - Ilustração da posição espectral da absorção e emissão de fluorescência de fluoróforos endógenos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Outro trabalho realizado durante este estágio foi o desenvolvimento da ideia de utilizar novos marcadores fluorescentes para microscopia por absorção de dois fótons. O objetivo desse projeto, em especial, foi testar novos marcadores para que imagens de microscopia por dois fótons mais profundas possam ser feitas em tecidos biológicos. Em geral, utilizamos os fluoróforos endógenos para as imagens de microscopia, com excitação realizada em torno de 800 nm, região em que há boa profundidade de penetração. Entretanto, a fluorescência desses compostos se encontra na região do visível (em torno de 500 nm - figura 30); nesta região, a absorção e o espalhamento nos tecidos ainda é alta, como discutido anteriormente.

Esse é um fator limitante para se obter imagens com maiores profundidades em tecidos biológicos. Uma alternativa é utilizar fluoróforos exógenos que apresentem emissão na região de baixa atenuação — ou seja, tanto a absorção quanto a emissão estando localizadas dentro da janela óptica (figura 31). Para que a absorção também esteja localizada dentro da região

esperada, podemos utilizar outras transições de absorção, como por exemplo, a transição de S_0 (estado fundamental) para S_2 (segundo estado excitado). Um estudo sobre esse projeto foi publicado na revista *Journal of Applied Physics* (Pu, Y.; Shi, L.; Pratavieira, S.; Alfano, R. R.; Two-photon excitation microscopy using the second singlet state of fluorescent agents within the tissue optical window. *Journal of Applied Physics*, v. 114, p. 153102, 2013).

Figura 31 - Ilustração da posição espectral da absorção e emissão de fluorescência de fluoróforos exógenos. A absorção de S_0 para S_1 corresponde a absorção do estado fundamental para o primeiro estado excitado, enquanto que de S_0 para S_2 corresponde a absorção do fundamental para o segundo estado excitado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

7 Conclusão

O microscópio óptico desenvolvido neste estudo permite a obtenção de imagens de fluorescência devido a absorção de dois fótons, bem como imagens de geração de segundo harmônico.

Com a lente objetiva de 20 x e NA 1,0; a resolução lateral do sistema é de $(0,8 \pm 0,1) \mu\text{m}$ e axial de $(4,4 \pm 1,5) \mu\text{m}$, suficiente para visualizar estruturas sub-celulares em diferentes profundidades. O suporte de amostra do microscópio é customizado e flexível para a realização de imagens de biópsias, imagens *in vivo*, e imagens de membrana corioalantóica em ovos.

Imagens em diferentes profundidades de pele de rato e porco foram obtidas com sucesso. Células de melanoma se aglomerando ao redor de vasos sanguíneos em modelo de membrana corioalantóica também foram observadas através desse sistema. O microscópio permite uma resposta imediata e de forma não-invasiva, e com isso alterações morfológicas podem ser observadas em tempo real. Esse sistema permitirá a realização de novos estudos em Biofotônica, contribuindo com o desenvolvimento das técnicas ópticas em áreas da saúde.

REFERÊNCIAS

- 1 DOUGLAS, R. W. **A history of glassmaking**. Henley-on-Thames: G. T. Foulis, 1972.
- 2 BRADBURY, S. **The evolution of the microscope**. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1967.
- 3 MINSKY, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. **Scanning**, v. 10, n. 4, p. 128-138, 1988. ISSN 0161-0457.
- 4 DENK, W.; STRICKLER, J. H.; WEBB, W. W. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 73-76, 1990. ISSN 0036-8075.
- 5 SO, P. T. C. et al. Two-photon excitation fluorescence microscopy. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 2, p. 399-429, 2000. doi: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.399. ISSN 1523-9829.
- 6 MARCU, L.; FRENCH P. M. W.; ELSON D. S. **Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging** - principles and applications in biomedical diagnostics. Florida: CRC Press, 2014.
- 7 PAWLEY, J. **Handbook of biological confocal microscopy**. New York: Springer, 2006.
- 8 MASTERS, B. R.; SO, P. T. **Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy**. Oxford: Oxford University Press, 2008.
- 9 KONIG, K. Multiphoton microscopy in life sciences. **Journal of Microscopy**, v. 200, pt. 2, p. 83-104, 2000. ISSN 0022-2720.
- 10 ZIPFEL, W. R.; WILLIAMS, R. M.; WEBB, W. W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 1369-1377, 2003. ISSN 1087-0156.
- 11 NIEMZ M. H. **Laser tissue interactions fundamentals and applications**. New York: Springer, 2007.
- 12 PRASAD, P. N. **Introduction to biophotonics**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.
- 13 PRATAVIEIRA, S. et al. Optical imaging as auxiliary tool in skin cancer diagnosis. In: LA PORTA, C. (Ed.). **Skin cancers** - risk factors, prevention and therapy. InTech - Open Access Publisher, 2011. v. 1, p. 159-172.
- 14 SORDILLO, L. A. et al. Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, n. 5, 2014. ISSN 1083-3668.
- 15 PU, Y. et al. Enhancing the depth of tissue microscope imaging using two-photon excitation of the second singlet state of fluorescent agents. In: OPTICAL BIOPSY, 12., 2014, San Francisco. **Proceedings...** San Francisco: SPIE, 2014. (Proceedings of SPIE, v. 8940). doi:10.1117/12.2035334
- 16 ZIPFEL, W. R. et al. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 12, p. 7075-7080, 2003. ISSN 0027-8424.

17 SACCONI, L. et al. In vivo multiphoton nanosurgery on cortical neurons. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12, n. 5, p. 050502, 2007. ISSN 1083-3668.

18 LIN, A. J. et al. In vivo optical signatures of neuronal death in a mouse model of Alzheimer's disease. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 46, n. 1, p. 27-33, 2014. ISSN 1096-9101.

19 BALAJI, J.; DESAI, R.; MAITI, S. Live cell ultraviolet microscopy: a comparison between two- and three-photon excitation. **Microscopy Research and Technique**, v. 63, n. 1, p. 67-71, 2004. ISSN 1059-910X.

20 SHIH, A. Y. et al. Two-photon microscopy as a tool to study blood flow and neurovascular coupling in the rodent brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1277-1309, 2012. ISSN 1559-7016.

21 KONJUFCA, V.; MILLER, M. J. Two-photon microscopy of host-pathogen interactions: acquiring a dynamic picture of infection in vivo. **Cell Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 551-559, 2009. ISSN 1462-5822.

22 ELICEIRI, K. W. et al. Analysis of histology specimens using lifetime multiphoton microscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 8, n. 3, p. 376-380, 2003. ISSN 1083-3668.

23 DIASPRO, A. et al. Multi-photon excitation microscopy. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 5, p. 36, 2006. doi:10.1186/1475-925X-5-36. ISSN 1475-925X.

24 CICCHI, R. et al. Multiphoton morpho-functional imaging of healthy colon mucosa, adenomatous polyp and adenocarcinoma. **Biomedical Optics Express**, v. 4, n. 7, p. 1204-1213, 2013. ISSN 2156-7085.

25 GALLI, R. et al. Non-linear optical microscopy of kidney tumours. **Journal Biophotonics**, v. 7, n. 1-2, p. 23-27, 2014. ISSN 1864-0648.

26 PERRY, S. W.; BURKE, R. M.; BROWN, E. B. Two-photon and second harmonic microscopy in clinical and translational cancer research. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 2, p. 277-91, 2012. ISSN 1573-9686.

27 ERICSON, M. B. et al. Two-photon laser-scanning fluorescence microscopy applied for studies of human skin. **Journal Biophotonics**, v. 1, n. 4, p. 320-330, 2008. ISSN 1864-0648.

28 KONIG, K. Clinical multiphoton tomography. **Journal Biophotonics**, v. 1, n. 1, p. 13-23, 2008. ISSN 1864.

29 KONIG, K. et al. Clinical two-photon microendoscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 70, n. 5, p. 398-402, 2007. ISSN 1059-910X.

30 MASTERS, B. R. Correlation of histology and linear and nonlinear microscopy of the living human cornea. **Journal Biophotonics**, v. 2, n. 3, p. 127-139, 2009. ISSN 1864-0648.

- 31 ESPOSITO, A. et al. Notes on theory and experimental conditions behind two-photon excitation microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 63, n. 1, p. 12-17, 2004. ISSN 1059-910X.
- 32 SARDER, P. et al. All-near-infrared multiphoton microscopy interrogates intact tissues at deeper imaging depths than conventional single- and two-photon near-infrared excitation microscopes. **Journal of Biomedical Optics**, v. 18, n. 10, p. 106012, 2013. ISSN 1560.
- 33 COHERENT, I. Chameleon vision. 2014. Disponível em: <https://www.coherent.com/downloads/ChameleonVision_DS_0211revA.pdf>. Acesso em: 20 out. 2014.
- 34 SILFVAST, W. T. **Laser fundamentals**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- 35 THEER, P.; DENK, W. On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy. **Journal of the Optical Society of America A-optics image science and vision**, v. 23, n. 12, p. 3139-3149, 2006. ISSN 1084-7529.
- 36 QIAO, L. L. et al. Two-color two-photon excitation of indole using a femtosecond laser regenerative amplifier. **Optics Communications**, v. 282, n. 5, p. 1056-1061, 2009. ISSN 0030-4018.
- 37 THEER, P.; HASAN, M. T.; DENK, W. Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti: Al₂O₃ regenerative amplifier. **Optics Letters**, v. 28, n. 12, p. 1022-1024, 2003. ISSN 0146-9592.
- 38 FUJITA, K. et al. Real-time imaging of two-photon-induced fluorescence with a microlens-array scanner and a regenerative amplifier. **Journal of Microscopy**, v. 194, pt. 2-3, p. 528-531, 1999. ISSN 0022-2720.
- 39 CICCHI, R. et al. Multidimensional custom-made non-linear microscope: from ex-vivo to in-vivo imaging. **Applied Physics B**, v. 92, n. 3, p. 359-365, 2008. ISSN 0946-2171/1432-0649.
- 40 SAKADZIC, S. et al. Multi-photon microscopy with a low-cost and highly efficient Cr:LiCAF laser. **Optics Express**, v. 16, n. 25, p. 20848-20863, 2008. ISSN 1094-4087.
- 41 DO, D.; YOO, H.; GWEON, D. G. Fiber-optic raster scanning two-photon endomicroscope using a tubular piezoelectric actuator. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, n. 6, p. 066010, 2014. ISSN 1560-2281.
- 42 CONCHELLO, J.-A. et al. A custom-built two-photon microscope based on a mode-locked Yb³⁺-doped fiber laser. In: **THREE-DIMENSIONAL AND MULTIDIMENSIONAL MICROSCOPY: image acquisition and processing**, 19., 2012, San Francisco. **Proceedings...** San Francisco: SPIE, 2012. (Proceedings of SPIE, v. 8227). doi: 10.1117/12.907648.
- 43 ANDERSON, R. J.; LARSON, C. Reflective relay optics for use in laser deflection systems. **Applied Optics**, v. 10, n. 7, p. 1605-1610. 1971. ISSN 0003-6935.
- 44 RAGHAVACHARI, R.; KESSLER, D.; LIANG, R. An afocal beam relay for laser XY scanning systems. In: **DESIGN AND QUALITY FOR BIOMEDICAL TECHNOLOGIES**, 5.,

2012, San Francisco. **Proceedings...** San Francisco: SPIE, 2012 (Proceedings of SPIE, v. 8215). doi: 10.1117/12.905285

45 AMOS, W. B. How the Confocal laser scanning microscope entered biological research. **Biology of the Cell**, v. 95, n. 6, p. 335- 342. 2003. ISSN: 1768-322X.

46 ZINTER, J. P.; LEVENE, M. J. Maximizing fluorescence collection efficiency in multiphoton microscopy. **Optics Express**, v. 19, n. 16, p. 15348-15362, 2011. ISSN 1094-4087.

47 EUROPEAN Laboratory for Non-linear Spectroscopy. Dual channel gated integrator 2013. Disponível em: <<http://lens.unifi.it/ew/>> Acesso em: 20 out. 2014.

48 KONIG, K.; RIEMANN, I. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. **Journal of Biomedical Optics**, v. 8, n. 3, p. 432-439, 2003. ISSN 1083-3668

49 SACCONI, L. et al. Multiphoton multifocal microscopy exploiting a diffractive optical element. **Optics Letters**, v. 28, n. 20, p. 1918-1920, 2003. ISSN 0146-9592.

50 WU, S. et al. Quantitative analysis on collagen morphology in aging skin based on multiphoton microscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 4, p. 040502, 2011. ISSN 1560-2281.

51 COX, G. et al. 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. **Journal of Structural Biology**, v. 141, n. 1, p. 53-62, 2003. ISSN 1047-8477.

52 LIN, J. et al. Assessment of liver steatosis and fibrosis in rats using integrated coherent anti-Stokes Raman scattering and multiphoton imaging technique. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 11, p. 116024, 2011. ISSN 1560-2281.

53 THORLING, C. A. et al. Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging provide a novel method in studying drug distribution and metabolism in the rat liver in vivo. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 8, p. 086013, 2011. ISSN 1560-2281.

54 BRACKMANN, C. et al. Nonlinear microscopy of lipid storage and fibrosis in muscle and liver tissues of mice fed high-fat diets. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 6, p. 066008, 2010. ISSN 1560-2281.

55 SAMKOE, K. S.; CRAMB, D. T. Application of an ex ovo chicken chorioallantoic membrane model for two-photon excitation photodynamic therapy of age-related macular degeneration. **Journal of Biomedical Optics**, v. 8, n. 3, p. 410-417, 2003. ISSN 1083-3668.

56 CAVARGA, I. et al. Photodynamic effect of hypericin after topical application in the ex ovo quail chorioallantoic membrane model. **Planta Medica**, v. 80, n. 1, p. 56-62, 2014. ISSN 0032-0943.

57 BUZZA, H. H. et al. Evaluation of the photodynamic therapy effect using a tumor model in chorioallantoic membrane with melanoma cells. In: OPTICAL METHODS FOR TUMOR TREATMENT AND DETECTION: MECHANISMS AND TECHNIQUES IN

PHOTODYNAMIC THERAPY, 23., San Francisco. **Proceedings...** San Francisco: SPIE, 2014. (Proceedings of SPIE, v. 8931). doi:10.1117/12.2040714

58 BUZZA, H. H. et al. Evaluation of vascular effect of photodynamic therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology**, v. 138, p. 1-7, 2014. ISSN 1011-1344.

59 SORDILLO, L. A. et al. Deep tissue imaging of microfracture and non-displaced fracture of bone using the second and third near-infrared therapeutic windows. In: **PHOTONIC THERAPEUTICS AND DIAGNOSTICS**, 10., 2014, San Francisco. **Proceedings...** San Francisco: SPIE, 2014. (Proceedings of SPIE, v. 8926).

60 SORDILLO, L. A. et al. Third therapeutic spectral window for deep tissue imaging. In: **OPTICAL BIOPSY**, 12., 2014, San Francisco. **Proceedings...** San Francisco: SPIE, 2014. (Proceedings of SPIE, v. 8940).

61 ZÍLIO, S. C. **Óptica Moderna: fundamentos e aplicações**. São Carlos: Instituto de Física de São Carlos, 2009.

62 BOYD, R. W. **Nonlinear optics**. Burlington: Academic Press, 2008.

63 COHEN-TANNOUDJI, C.; DIU, B.; LALOE, F. **Quantum mechanics**. Weinheim: Wiley-VCH, 1992.

64 MELIKECHI, N.; ALLEN, L. 2-photon electric-dipole selection-rules and nondegenerate real intermediate states. **Journal of the Optical Society of America B-optical physics**, v. 3, n. 1, p. 41-44, 1986. ISSN 0740-3224.

65 BONIN, K. D.; MCILRATH, T. J. 2-Photon Electric-Dipole Selection-Rules. **Journal of the Optical Society of America B-optical physics**, v. 1, n. 1, p. 52-55, 1984. ISSN 0740-3224.

66 BURRIS, J.; MCILRATH, T. J. Theoretical-study relating the 2-photon absorption cross-section to the susceptibility controlling 4-wave mixing. **Journal of the Optical Society of America B-optical physics**, v. 2, n. 8, p. 1313-1317, 1985. ISSN 0740-3224.

67 DEL COSO, R.; SOLIS, J. Relation between nonlinear refractive index and third-order susceptibility in absorbing media. **Journal of the Optical Society of America B-optical physics**, v. 21, n. 3, p. 640-644, 2004. ISSN 0740-3224.

68 CICCHI, R. et al. From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy. **Journal of Biophotonics**, v. 6, n. 2, p. 129-142, 2013. ISSN 1864-0648.

69 KÖNIG, K. et al. Optical skin biopsies by clinical CARS and multiphoton fluorescence/SHG tomography. **Laser Physics Letters**, v. 8, n. 6, p. 465-468, 2011. ISSN 16122011.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Interação Luz-Matéria

Microscopia óptica é umas das primeiras técnicas de estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, essa interação consiste em um dos fenômenos mais importantes e sempre desafiou o homem, que busca o seu completo entendimento. Em especial na microscopia, a radiação consiste da parte visível do espectro, que chamamos de luz. O conteúdo do presente capítulo faz parte da ementa de cursos avançados de mecânica quântica e óptica não-linear, e pode ser encontrado em livros-textos da área.⁶¹⁻⁶³

A primeira análise que podemos fazer é considerar a interação da radiação eletromagnética com um gás composto de átomos de um elétron livre e um núcleo, sendo que o átomo possui dois estados eletrônicos: o estado fundamental e o excitado. Suponhamos também que existam três processos diferentes possíveis: absorção estimulada (induzida), emissão estimulada (induzida) e emissão espontânea. Num regime de resposta linear, a absorção estimulada e os processos de emissão são proporcionais à densidade de radiação do campo de radiação externo. No processo de emissão espontânea, o átomo excitado emite radiação sem a necessidade de que um campo de radiação externo interaja com o átomo.

Esquemáticamente, estes três processos são mostrados na figura 32. A linha vertical apontando para cima, do estado fundamental para o estado excitado, representa a absorção de um fóton. A linha vertical com a ponta da seta apontando do estado excitado para o estado fundamental representa a emissão de um fóton. As linhas onduladas horizontais representam radiação com energia por fóton igual à diferença de energia entre os níveis excitado e fundamental. O nível de energia mais baixo é o estado fundamental (E_1), e o nível de maior energia é o estado excitado (E_2). Os coeficientes para as transições foram derivados por Einstein e são chamados de coeficientes de Einstein. Contudo, eles não são constantes físicas universais.

Figura 32 - Diagrama de energia de um sistema de dois níveis. O estado de menor energia (fundamental) tem energia E_1 e o estado excitado tem energia E_2 . O coeficiente de absorção é B_{12} , o de emissão estimulada é B_{21} , e o coeficiente de emissão espontânea é A_{21} .

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 32, o primeiro processo é caracterizado pelo coeficiente de Einstein B_{12} , que representa o processo de absorção da luz. Inicialmente, o estado do elétron é o estado fundamental (E_1); quando a luz interage com o átomo, este absorve o fóton e o elétron passa para o estado excitado (E_2). O segundo processo mostrado na figura 32, é caracterizado pelo coeficiente de Einstein B_{21} , onde o elétron já está no estado excitado antes que a luz incida no átomo. Quando a radiação atinge o sistema, ela induz a transição eletrônica do estado excitado para o estado fundamental com a emissão de um fóton. Este processo é chamado emissão estimulada e foi apresentado por Einstein. A emissão estimulada é coerente, ou seja, os fótons emitidos têm a mesma direção, fase e polarização do fóton incidente. A emissão estimulada é um dos processos críticos na operação dos lasers.

Finalmente, há um terceiro processo mostrado na figura 32, caracterizado pelo coeficiente de Einstein A_{21} , em que nenhum campo de radiação interage com o átomo. Inicialmente, o elétron está no estado excitado e espontaneamente passa para o estado fundamental com a emissão de um fóton. Diferente da emissão estimulada, a radiação obtida por processos de emissão espontânea é uma radiação incoerente, ou seja, os fótons emitidos não apresentam necessariamente a mesma direção, fase e polarização do fóton incidente (absorvido). Nos sistemas de microscopia de fluorescência para imagens biológicas, normalmente são utilizados os processos de absorção e emissão espontânea. Num conjunto de átomos, a intensidade total de emissão é proporcional ao número de átomos no estado excitado multiplicado pela probabilidade de transição do estado excitado para o estado fundamental.

Para relacionar os coeficientes de absorção e os de emissão espontânea e estimulada, consideremos a situação de equilíbrio térmico em que o número de absorções por unidade de tempo, do estado fundamental para o estado excitado, deve ser igual ao número de emissões por unidade de tempo do estado excitado para o estado fundamental. O número de

absorções/excitações por unidade de tempo pode ser entendido também como a taxa, ou a probabilidade por unidade de tempo, destas transições. A taxa de absorção (induzida) é proporcional ao coeficiente de Einstein B_{12} , ao número de átomos no estado fundamental (n_1) e à densidade de energia da radiação incidente $\rho(\nu)$, sendo $\rho(\nu)$ a densidade de energia por unidade de volume e frequência. Já a taxa de emissão estimulada ou induzida é proporcional ao coeficiente de Einstein B_{21} , ao número de átomos no estado excitado (n_2) e à densidade de energia da radiação incidente. Finalmente, a taxa de emissão espontânea é proporcional apenas ao coeficiente de Einstein A_{21} e ao número de átomos no estado excitado.^{34; 61}

Tomando a situação de equilíbrio termodinâmico, onde a taxa de absorção é igual a de emissão, temos que:

$$B_{12}\rho(\nu)n_1 = [A_{21} + B_{21}\rho(\nu)]n_2 \quad (5)$$

Porém, de acordo com o princípio básico da mecânica estatística, quando um conjunto de átomos está em equilíbrio termodinâmico, a razão entre o número de átomos no estado fundamental n_1 , com energia E_1 , e no estado excitado n_2 , com energia E_2 , é determinada pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{g_1}{g_2} e^{-(E_2-E_1)/kT} = \frac{g_1}{g_2} e^{-E/kT} = \frac{g_1}{g_2} e^{-h\nu/kT} \quad (6)$$

tal que E é a diferença de energia entre os dois estados, h é a constante de Planck, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura (em Kelvin), ν é a frequência da luz (Hz), e g_i é a degenerescência do i -ésimo nível. Se combinarmos as equações acima, temos:

$$\rho(\nu) = \frac{A_{21}/B_{21}}{\frac{B_{12}}{B_{21}} \frac{g_1}{g_2} e^{h\nu/kT} - 1} \quad (7)$$

Assumiremos (sem perda de generalidade, pois os coeficientes de Einstein não dependem da radiação incidente) que a densidade de energia que interage com o átomo é dada pela lei de Planck, que fornece a distribuição de radiação emitida por um corpo negro, ou seja, a densidade de energia emitida em função da frequência, para uma dada temperatura:

$$\rho(\nu) = \frac{8\pi\nu^2}{c^3} \frac{h\nu}{e^{h\nu/kT} - 1} \quad (8)$$

sendo h a constante de Planck e c a velocidade da luz no vácuo. Se compararmos as duas expressões de densidade de energia, considerando átomos de dois níveis sem degenerescência, obteremos as relações (9) e (10):

$$\frac{B_{12}}{B_{21}} = \frac{g_2}{g_1} = 1 \quad (9)$$

$$A_{21} = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} B_{21} \quad (10)$$

Com isso, podemos relacionar a taxa de emissão espontânea à taxa de emissão estimulada:

$$\frac{B_{21}\rho(\nu)}{A_{21}} = \frac{1}{e^{h\nu/kT} - 1} \quad (11)$$

O coeficiente B de Einstein pode ser calculado a partir do coeficiente A, o qual, por sua vez, está relacionado com o tempo de vida de emissão espontâneo (τ):

$$\frac{1}{\tau} = A_{21} \quad (12)$$

Se um átomo possuir vários estados excitados, ou seja, pode emitir várias linhas diferentes, o tempo de vida médio espontâneo pode ser expresso como:

$$\frac{1}{\tau_{\text{médio}}} = \sum_n A_{n1} \quad (13)$$

sendo n os possíveis estados excitados. Neste caso, portanto, o tempo de vida depende da soma das probabilidades de todas as possíveis transições.^{34; 61}

APÊNDICE B - Equação de Schrödinger da Interação Luz-Matéria

Com os coeficientes de Einstein é possível calcular as relações entre a taxa de emissão espontânea, a taxa de emissão estimulada e a taxa de absorção, com base na termodinâmica e através de uma abordagem semi-clássica, mas não podemos calcular as magnitudes absolutas destas quantidades. Assim, um estudo mais aprofundado em mecânica quântica é necessário, com o qual, através da equação de Schrödinger, é possível calcular as probabilidades de transição do estado fundamental para o excitado e as probabilidades de emissão espontânea e estimulada.

Entretanto, mesmo utilizando essas ferramentas a solução analítica exata não é possível, contudo há alguns modelos (procedimentos) numéricos que podem simular muito bem esse problema (quase exatamente) através de cálculos *ab-initio* dependentes do tempo, como: *time-dependent coupled-cluster*, *time-dependent quantum Monte-Carlo*, *time-dependent full configuration interaction*, etc. O problema principal é que esses métodos são extremamente caros computacionalmente e muitas vezes inviáveis. *Time-Dependent Density Functional Theory* (TDDFT) é um método alternativo que equilibra razoavelmente o custo computacional e precisão, ou seja há um ganho no custo porém os cálculos não são tão precisos, embora haja muito trabalho sendo desenvolvido para melhorar isso.

Assim, vamos usar a teoria das perturbações dependente do tempo, que oferece uma solução muito satisfatória para o problema. Para aplicar a teoria das perturbações dependente do tempo é necessário escrever o operador correspondente a energia total do sistema, ou seja, a hamiltoniana (H) do sistema átomo – radiação:

$$\begin{aligned}
 H = \sum_n \left(\frac{p_n^2}{2m} + V(\vec{r}_n) \right) &+ \frac{1}{2} \int (|\vec{E}|^2 + |\vec{B}|^2) dr^3 - \frac{e}{c} \sum_n \vec{A}(\vec{r}_n, t) \cdot \vec{p}_n \\
 &+ \frac{e^2}{2mc^2} \vec{A}(\vec{r}_n, t) \cdot \vec{A}(\vec{r}_n, t) - \sum_n \frac{e\hbar}{2mc} \vec{\sigma}_n \cdot \vec{B}(\vec{r}_n, t)
 \end{aligned} \tag{14}$$

sendo que o primeiro termo da expressão corresponde à hamiltoniana do elétron livre, e a soma da energia cinética e potencial é feita sobre todos elétrons de valência, e na qual $\vec{p}_n$ é o operador momento do n -ésimo elétron e $V(\vec{r}_n)$ é o operador do potencial de Coulomb, sendo $\vec{r}_n$ a posição

do n -ésimo elétron. Ou seja, este primeiro termo corresponde a molécula e seus níveis de energia e é muito difícil determinar com precisão.

O segundo termo da expressão representa a energia do campo de radiação, no qual, por sua vez, $\mathbf{E}$ e $\mathbf{B}$ representam, respectivamente, as componentes elétrica e magnética do campo. Esse termo pode ser também escrito através dos operadores de criação e aniquilação de fótons, na forma:

$$H = \frac{1}{2} \int (|\vec{E}|^2 + |\vec{B}|^2) d\mathbf{r}^3 = \sum_{\vec{k}, \alpha} \hbar \omega_k (N_{\vec{k}, \alpha} + 1/2) \quad (15)$$

com $N_{\vec{k}, \alpha} = a_{\vec{k}, \alpha}^\dagger a_{\vec{k}, \alpha}$ chamado de “operador número”, pois indica o número de fótons na direção $\vec{k}$, com polarização α , e energia igual a $\hbar \omega_k$.

Logo, os três primeiros termos da expressão da hamiltoniana átomo – campo representam o sistema livre sem interação, que podemos chamar de H_0 . Enquanto os três outros termos representam a interação. O primeiro termo da interação é a interação direta entre os elétrons através de seu momento $\mathbf{p}_n$ e o campo de radiação, representada pelo operador de campo $\mathbf{A}(\mathbf{r}_n, t)$ (potencial vetor). O segundo termo da interação corresponde à interação entre os modos do campo de radiação mediado pelo elétron e, por fim, o terceiro termo representa a interação do *spin* com o campo, sendo $\boldsymbol{\sigma}_n$ o operador de Pauli. Esse termo de interação somente é tratado para campos fracos, onde sua análise é conhecida, para campos intensos a interação correta é desconhecida.⁶²⁻⁶³

Analisando as ordens de grandeza, podemos desprezar os dois últimos termos da interação e fazer a aproximação de dipolo elétrico aplicada no primeiro termo de interação. Contudo, é importante ressaltar que, apesar destes termos não influenciarem no cálculo da magnitude das probabilidades de transição, eles são importantes pois determinam a probabilidade de ocorrência de uma dada transição, ou seja, se esta transição é “permitida” ou “proibida” pelas regras de seleção. Com isso, a maior contribuição para a amplitude da probabilidade vem do termo de dipolo, já que campos eletromagnéticos induzem dipolos elétricos.

Como o tamanho do átomo é muito pequeno em comparação com o comprimento de onda do campo eletromagnético incidente (região do visível), a variação espacial do potencial vetor pode ser considerada constante. Portanto, a dependência espacial é removida e a interação é apenas uma função do tempo.

Deste modo, o termo de interação entre o campo e o átomo é dado por:

$$H_{int}(t) = -\frac{e}{c} \sum_n \vec{A}(\vec{r}_n, t) \vec{p}_n \cong -e\vec{r}\vec{E}(t) = -\vec{\mu}\vec{E}(t) \quad (16)$$

O campo eletromagnético pode ser simplificado como sendo uma onda monocromática plana dado por:

$$\vec{E}(t) = \vec{E}_0 e^{-i\omega t} + c.c. \quad (17)$$

Assim, a hamiltoniana do sistema é dada pela soma da hamiltoniana do átomo livre (independente do tempo) mais a hamiltoniana de interação (dependente do tempo).

$$H(t) = H_0 + H_{int}(t) \quad (18)$$

Assumindo que as soluções da equação de Schrödinger para o átomo livre são conhecidas, e que as funções de onda associadas com os autoestados são representadas por:

$$\varphi_n(\vec{r}, t) = u_n(\vec{r}) e^{-i\omega_n t}, \quad (19)$$

sendo:

$$\omega_n = E_n/\hbar \text{ e } H_0 u_n(\vec{r}) = E_n u_n(\vec{r}) \quad (20)$$

é possível utilizar a teoria de perturbações dependente do tempo e resolver a equação de Schrödinger para o sistema átomo – campo.

$$i\hbar \frac{\partial \psi(\vec{r}, t)}{\partial t} = H(t) \psi(\vec{r}, t) \quad (21)$$

Como os autoestados de H_0 formam um conjunto completo, podemos expressar a solução do sistema átomo – campo como sendo uma combinação linear desses autoestados, ou seja:

$$\psi(\vec{r}, t) = \sum_l a_l(t) u_l(\vec{r}) e^{-i\omega_l t} \quad (22)$$

Substituindo essa solução na equação de Schrödinger, multiplicando em seguida os dois lados por $(u_m^*(\vec{r}))$ e utilizando a condição de ortogonalidade, obtemos:

$$i\hbar \frac{da_m(t)}{dt} = \sum_l a_l(t) V_{ml} e^{-i\omega_{lm} t} \quad (23)$$

sendo $\omega_{lm} = \omega_l - \omega_m$ e

$$V_{ml} = \int u_m^*(\vec{r}) H_{int} u_l(\vec{r}) d^3r = \langle u_m | H | u_l \rangle \quad (24)$$

Para solução por teoria das perturbações, é necessário introduzir um parâmetro λ em que controlamos o grau de perturbação do sistema, tal que seja $\lambda = 0$ o caso onde não existe perturbação, e $\lambda = 1$ a situação física sem aproximação. Substituindo V_{ml} por λV_{ml} e expandindo $a_m(t)$ em função do parâmetro λ , encontramos que:

$$\frac{da_m(t)^N}{dt} = (i\hbar)^{-1} \sum_l a_l^{(N-1)} V_{ml} e^{-i\omega_{lm}t} \quad (25)$$

sendo que $N = 1, 2, 3, \dots$ e corresponde ao grau de aproximação para encontrarmos as probabilidades de transição eletrônica num átomo.⁶²⁻⁶³

APÊNDICE C - Seção de Choque de Absorção de Um e Dois Fótons

No caso da absorção linear, ou seja, de um único fóton, tomamos $N=1$, que corresponde à interação de primeira ordem do campo. Assumindo que, na ausência do campo, o átomo encontra-se no nível fundamental (g), ou seja:

$$a_g^{(0)}(t) = 1 \text{ e } a_l^{(0)}(t) = 0 \quad (26)$$

para qualquer l diferente de g e para todo instante de tempo, obtemos que:

$$\begin{aligned} a_m^{(1)}(t) = & \frac{\mu_{mg}E}{\hbar(\omega_{mg} - \omega)} [e^{-i(\omega_{mg} - \omega)t} - 1] \\ & + \frac{\mu_{mg}E^*}{\hbar(\omega_{mg} + \omega)} [e^{-i(\omega_{mg} + \omega)t} - 1] \end{aligned} \quad (27)$$

O primeiro termo desta expressão corresponde ao processo de absorção de um fóton, ou seja, a transição do estado fundamental g para um estado excitado m . Já o segundo termo corresponde ao processo de emissão espontânea, sendo a transição de um estado excitado m para o fundamental. Como estamos interessados em calcular a amplitude de probabilidade do átomo se encontrar no estado m num dado instante de tempo t ou, em outras palavras, calcular a probabilidade de transição para um determinado estado m , desprezaremos o segundo termo da equação anterior, e assim encontraremos que a amplitude de probabilidade num dado instante de tempo t é dada por:

$$p_m^{(1)}(t) = |a_m^{(1)}(t)|^2 = \frac{|\mu_{mg}E|^2}{\hbar^2} f(t) \quad (28)$$

sendo

$$f(t) = \frac{4 \sin^2[(\omega_{mg} - \omega)t/2]}{(\omega_{mg} - \omega)^2} \quad (29)$$

No caso limite, onde temos tempos longos, ou seja, $t \rightarrow \infty$, mas a perturbação ainda é suficientemente fraca, temos que:

$$p_m^{(1)}(t) = \frac{2\pi|\mu_{mg}E|^2 t}{\hbar^2} \delta(\omega_{mg} - \omega) \quad (30)$$

Este resultado não corresponde à situação física real, pois a frequência de transição não é bem definida, mas sim uma distribuição contínua de frequências dada por:

$$\rho_f(\omega_{mg})d\omega_{mg} = P_{\omega_{mg}} + d\omega_{mg} \quad (31)$$

tal que $P_{\omega_{mg}}$ é a probabilidade de transição para frequência entre ω_{mg} e ω_{mg} , e ρ_f representa a distribuição de probabilidade dos estados finais, ou seja, o estado final possui uma distribuição de energias (figura 33).

Figura 33 - Ilustração da transição do nível g para o nível m , sendo m dado por uma função de distribuição ρ_f .

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com isso, a probabilidade de transição deve ser calculada considerando todas as possíveis frequências de transição com suas respectivas amplitudes. Assim a probabilidade de transição será dada por:

$$\begin{aligned} p_m^{(1)}(t) &= \frac{2\pi|\mu_{mg}E|^2 t}{\hbar^2} \int_0^\infty \rho_f(\omega_{mg})\delta(\omega_{mg} - \omega)d\omega_{mg} \\ &= \frac{2\pi|\mu_{mg}E|^2 t}{\hbar^2} \rho_f(\omega_{mg} - \omega) \end{aligned} \quad (32)$$

sendo que $\rho_f(\omega_{mg} - \omega)$ significa que a densidade do estado final é calculada para a frequência ω da radiação incidente. A probabilidade do átomo se encontrar no estado excitado é linearmente dependente do tempo; conseqüentemente, podemos definir a taxa de transição da absorção linear ($R_{mg}^{(1)}$). Com isso, obtemos a seguinte equação de taxa:

$$R_{mg}^{(1)} = \frac{p_m^{(1)}(t)}{t} = \frac{2\pi|\mu_{mg}E|^2}{\hbar^2} \rho_f(\omega_{mg} - \omega) \quad (33)$$

A absorção linear pode também ser descrita através de uma secção de choque de absorção ($\sigma_{mg}^{(1)}(\omega)$), dada por:

$$R_{mg}^{(1)} = \sigma_{mg}^{(1)}(\omega)I \quad (34)$$

Como a intensidade é dada por $I = (nc/2\pi)|E|^2$, obtemos que a secção de choque de absorção linear corresponde a:

$$\sigma_{mg}^{(1)}(\omega) = \frac{4\pi^2}{nc} \frac{|\mu_{mg}|^2}{\hbar^2} \rho_f(\omega_{mg} - \omega) \quad (35)$$

Para o caso da absorção de dois fótons, precisamos resolver até a segunda ordem da teoria de perturbação dependente do tempo, ou seja, utilizar N=1 e N=2 na equação (25). Assim, considerando que g é o estado fundamental, m o estado excitado 1, e n o estado excitado 2, encontramos que a amplitude de probabilidade de segunda ordem é dada por:

$$\frac{d}{dt} a_m^{(2)}(t) = -(i\hbar)^{-1} \sum_m \frac{\mu_{nm}\mu_{mg}E^2}{\hbar(\omega_{mg} - \omega)} [e^{i(\omega_{ng}-2\omega)t} - e^{i(\omega_{nm}-\omega)t}] \quad (36)$$

Desconsiderando o segundo termo entre colchetes, o qual não corresponde a uma absorção de dois fótons, podemos encontrar que a probabilidade do elétron no nível n de energia do átomo é:

$$p_n^{(2)}(t) = |a_n^{(2)}(t)|^2 = \left| \sum_m \frac{\mu_{nm}\mu_{mg}E^2}{\hbar^2(\omega_{mg} - \omega)} \right|^2 \left| \frac{e^{i(\omega_{ng}-2\omega)t} - 1}{\omega_{ng} - 2\omega} \right|^2 \quad (37)$$

Novamente, se tomarmos o limite de tempos longos, encontramos:

$$p_n^{(2)}(t) = \left| \sum_m \frac{\mu_{nm}\mu_{mg}E^2}{\hbar^2(\omega_{mg} - \omega)} \right|^2 2\pi t \delta(\omega_{ng} - 2\omega) \quad (38)$$

Assumindo também que o nível n é um contínuo (distribuição) de estados com certa distribuição, chegamos a:

$$p_n^{(2)}(t) = \left| \sum_m \frac{\mu_{nm}\mu_{mg}E^2}{\hbar^2(\omega_{mg} - \omega)} \right|^2 2\pi t [\rho_f(\omega_{ng})]_{(\omega_{mg}=2\omega)} \quad (39)$$

Podemos também calcular a taxa de transição de absorção de dois fótons ($R_{ng}^{(2)}$), e a seção de choque de absorção de dois fótons ($\sigma_{ng}^{(2)}$), definidas como:

$$R_{ng}^{(2)} = \frac{p_n^{(2)}(t)}{t} = \sigma_{ng}^{(2)}(\omega) I^2 \quad (40)$$

Com isso, obtemos que a seção de choque de absorção de dois fótons é dado por:

$$\sigma_{ng}^{(2)}(\omega) = \frac{8\pi^3}{n^2 c^2} \left| \sum_m \frac{\mu_{nm} \mu_{mg}}{\hbar^2 (\omega_{mg} - \omega)} \right|^2 \rho_f(\omega_{ng} = 2\omega) \quad (41)$$

Essa expressão é válida tanto para a absorção sequencial de dois fótons, ou seja, quando o primeiro fóton é ressonante com a transição de g para m , quanto para a absorção não-ressonante. No caso da absorção ressonante, são absorvidos pelo menos dois fótons sucessivamente antes que ocorra a emissão de luz. Contudo deve existir uma seção de choque linear para a absorção do primeiro fóton (figura 34 a). Quando os dois fótons absorvidos têm a mesma energia (frequência), este caso é chamado de “degenerado”. Entretanto, não necessariamente os dois fótons absorvidos precisam ter a mesma energia; no caso não-degenerado temos, $\omega_{ng} = \omega_1 + \omega_2$.

Figura 34 - Ilustração dos três possíveis processos de absorção de dois fótons: a) absorção sequencial de dois fótons; b) absorção de dois fótons, passando por estado virtual e atingindo um estado excitado; c) absorção de dois fótons sendo que a transição direta (um fóton) do estado fundamental para estado excitado 2 é proibida, mas é possível indiretamente (via dois fótons). As setas azuis representam o campo de radiação incidente com determinada frequência.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A somatória em m , na equação 41 pode ser feita sobre estados virtuais; essa consideração foi feita pela primeira vez em 1931 por Maria Göppert-Mayer.³⁰ Com isso, temos a absorção de um primeiro fóton até um estado virtual, e em seguida a absorção de outro fóton levando a um estado excitado. Os estados virtuais são estados intermediários entre o estado

fundamental e o excitado, tal que sua energia está contida neste intervalo. A lei de conservação da energia aplica-se somente para a transição total, e não para as transições que envolvem os estados intermediários. A probabilidade de absorção de dois fótons através dos estados intermediários ou virtuais está inversamente relacionada com a diferença de energia entre o estado inicial e o final.⁶²

Comparando as ordens de grandeza das secções de choque linear ($\sigma_{ng}^{(1)} \approx 10^{-13} \text{cm}^2/\text{fóton}$) e não-linear ($\sigma_{ng}^{(2)} \approx 10^{-50} \text{cm}^4/\text{s}/\text{fóton}^2$), observamos que a absorção de dois fótons trata-se de um processo que possui uma probabilidade muito baixa de ocorrer.⁶²⁻⁶³ A unidade da secção de choque de segunda ordem pode ser interpretada como sendo a secção de choque normalizada pela irradiância da luz utilizada no experimento, ou como sendo a secção de choque de absorção do primeiro fóton multiplicada pela secção de choque do segundo fóton e pelo intervalo de tempo para esse segundo fóton chegar.

Logo, a absorção de luz de um material (α) é a soma da absorção linear (α_0) e da absorção não linear (β):

$$\alpha = \alpha_0 + \beta I \quad (42)$$

Devido à sua baixa probabilidade de ocorrer somente após a invenção do laser foi que W. Kaiser e C.G. B. Garret observaram com laser de Rubi (694 nm) o processo de absorção de dois fótons do cristal $\text{CaF}_2: \text{Eu}^{2+}$. Para se obter uma ideia do tempo necessário para que os fótons interajam para realizar, podemos utilizar o princípio da incerteza de Heisenberg:

$$\Delta E \Delta t \geq \hbar/2 \quad (43)$$

para o qual ΔE é a diferença de energia entre o estado real e virtual, e Δt o tempo de vida do estado virtual. Portanto,

$$\Delta t \geq \hbar/(4\pi\Delta E) \quad (44)$$

Se considerarmos, por exemplo, uma diferença de energia de 1,55 eV entre o estado real e o virtual (correspondente a um fóton com $\lambda = 800 \text{ nm}$), e sabendo que $\Delta E = h\nu$, obtemos $\Delta t \sim 0,2$ femtosegundos. Com isso, é necessário que os fótons cheguem quase simultaneamente para haver interação.

Portanto, a absorção de dois fótons é um processo de duas etapas. Na primeira, há uma transição do estado g para o estado m e, nesta transição virtual, a energia não é conservada. O

mesmo ocorre na segunda transição de m para o estado n , mas na transição total do estado g para o estado final n , a energia é conservada. A figura 34 b ilustra este processo.

Outro ponto importante na absorção de dois fótons está relacionado com a paridade das funções de onda que representam cada estado. Como a excitação eletromagnética introduz um termo de dipolo (ou momento de dipolo transiente), as transições por um fóton somente ocorrem entre estados de paridades diferentes.

No caso da absorção de dois fótons, existe uma probabilidade de transição para um estado excitado de mesma paridade do fundamental, desde que o processo de absorção de dois fótons tenha dois termos de dipolo. Essas probabilidades de transição estão relacionadas com polaridade da molécula. Pois, no caso de moléculas apolares ou moléculas centrossimétricas, a molécula não apresenta um dipolo elétrico permanente, assim a absorção de dois fótons somente ocorre em estados excitados que são proibidos por absorção de um fóton. Na figura 34 c, representamos esse processo, onde a transição direta (um fóton ou dois fótons sequencial) do estado fundamental para estado excitado 2 é proibida – pois esses estados possuem a mesma paridade – mas é possível indiretamente (via absorção de dois fótons).

Para moléculas centrossimétricas, por exemplo, a paridade se inverte para os processos de excitação de um fóton e de dois fótons. Assim, os estados moleculares que podem ser acessados por excitação de um fóton não podem ser acessíveis no caso de excitação de dois fótons e vice-versa.

Já para moléculas polares que possuem um dipolo elétrico permanente, uma grande mudança no momento de dipolo pode ocorrer resultando em transições via absorção de dois fótons para estados que também podem ser acessados via absorção de um fóton. Assim, durante uma transição, seja por absorção de um ou dois fótons, devem ocorrer à conservação da energia, do momento angular e do *spin* do sistema átomo/molécula – campo de radiação. Como os fótons apresentam *spin* ± 1 , o processo de absorção de um fóton precisa alterar o *spin*. No caso da absorção de dois fótons, o *spin* dos fótons pode ser +2, 0, ou -2, com isso não necessariamente o estado final tem multiplicidade de *spin* diferente do inicial.⁶⁴⁻⁶⁵

APÊNDICE D - Susceptibilidade Elétrica

Outra maneira de interpretarmos a interação luz-matéria é através da resposta do meio quando incidimos radiação eletromagnética neste. A resposta do meio à radiação eletromagnética pode ser mensurada através da polarização $\mathbf{P}$ do meio. Polarização é o momento de dipolo por unidade de volume, e depende da amplitude $\mathbf{E}$ do campo elétrico da onda óptica aplicada.⁶²

$$\vec{P}(\omega) = \epsilon_0 [\chi^{(1)}\vec{E}(\omega) + \chi^{(2)}\vec{E}(\omega)\vec{E}(\omega) + \chi^{(3)}\vec{E}(\omega)\vec{E}(\omega)\vec{E}(\omega) + \dots] \quad (45)$$

Ou para um meio com resposta instantânea e transparente (sem absorção) podemos rescrever a polarização em função de ω :

$$\vec{P}(t) = \epsilon_0 [\chi^{(1)}\vec{E}(t) + \chi^{(2)}\vec{E}(t)\vec{E}(t) + \chi^{(3)}\vec{E}(t)\vec{E}(t)\vec{E}(t) + \dots] \quad (46)$$

Sendo: $\mathbf{E}$ o campo elétrico da onda óptica aplicada (grandeza real) e χ a susceptibilidade elétrica do meio, relaciona a resposta deste com o campo eletromagnético aplicado. A ordem de grandeza das diferentes susceptibilidades são: $\chi^{(1)} \approx 1$; $\chi^{(2)} \approx 10^{-10}(m/V)$; $\chi^{(3)} \approx 10^{-20}(m/V)^2$. Sendo que $\chi^{(1)}$ é relacionado com coeficientes de absorção linear e índice de refração linear do meio, ou seja, $Re[\chi^{(1)}]$ com o índice de refração do meio, e $Im[\chi^{(1)}]$ com o coeficiente de absorção. Enquanto que $\chi^{(2)}$ é relacionado com a geração de segundo harmônico, soma ou diferença de frequência e retificação óptica (sistemas não simétricos ou meios não centrosimétricos). A terceira ordem $\chi^{(3)}$ corresponde aos processos de geração de terceiro harmônico: soma ou diferença de frequência e retificação óptica; espalhamento inelástico (Raman); e de absorção de dois fótons. Em especial, a susceptibilidade de terceira ordem ($\chi^{(3)}$) que sabemos ser um número complexo, onde a parte puramente real corresponde a processos paramétricos (onde não há absorção de energia); e a parte puramente imaginária corresponde a processos não paramétricos (absorção de energia). Sendo $Re[\chi^{(3)}]$ relacionado com a dependência do índice de refração com a intensidade (luz); e $Im[\chi^{(3)}]$ com a absorção de dois fótons (matéria).

A secção de choque de absorção (σ e β), discutidas anteriormente, estão relacionadas com a parte imaginária da susceptibilidade de terceira ordem ($\chi_I^{(3)}$) através das seguintes expressões:^{62; 66; 67}

$$\sigma^{(2)} = \frac{4\pi^2 \hbar \omega_1^2 \chi_I^{(3)}}{n_1^2 c^2} \quad (47)$$

$$\chi_I^{(3)} = \frac{n_0^2 \epsilon_0 c \lambda \beta}{3\pi} \quad (48)$$

APÊNDICE E - Geração de Segundo Harmônico

No caso de moléculas centrossimétricas, o que significa que o momento de dipolo molecular é nulo em repouso, ao incidirmos luz a nuvem de elétrons está sujeita a uma força oscilante ao longo do eixo molecular, cuja frequência é ω . Como a molécula é centrossimétrica a oscilação resultante da nuvem de elétrons é também centrossimétrica e gera uma radiação de mesma frequência ω . Essa radiação é conhecida como espalhamento Rayleigh, e é linear no sentido de que a frequência espalhada é exatamente a mesma que a do feixe de iluminação. Neste exemplo, de uma molécula centrossimétrica não há geração de segundo harmônico (ou seja, frequência de 2ω).⁶⁸ Entretanto, essas moléculas são capazes de gerar harmônicos ímpares, por exemplo 3ω e 5ω .

Para moléculas não-centrossimétricas onde existe uma região doadora (D) e uma região aceptora (A) de elétrons, nas extremidades opostas da molécula e que agem em conjunto para favorecer o movimento eletrônico na direção $D \rightarrow A$. Numa visão clássica, quando é aplicado um campo de radiação nessa molécula o elétron fará um movimento não simétrico, resultando em componentes de frequência adicionais, pois a nuvem de elétrons já não é centrossimétrica em repouso. Além da componente linear de frequência ω , outras frequências não-lineares aparecerão, como 0 e 2ω . A componente de frequência 0 é chamada de retificação óptica e tecnicamente deveria não ser referida como a radiação, uma vez que representa um campo elétrico estático. Já a frequência 2ω é chamada geração de segundo harmônico (SHG do inglês *Second Harmonic Generation*).

Colágeno do tipo I é a proteína mais predominante no organismo humano, sendo um componente primário em diversos tecidos tais como: a pele, osso, tendão, e córnea. Estes tecidos são birrefringentes e consistem em estruturas altamente ordenadas e, portanto, passíveis de serem estudadas por microscopia de SHG. Sua estrutura é constituída de três hélices polipeptídicas entrelaçadas, e a componente principal da hiperpolarizabilidade do colágeno é paralela ao eixo do colágeno, e é gerado a partir das fibrilas da casca exterior. Outras estruturas endógenas conhecidas por produzir SHG são complexos miosina, microtúbulos e celulose.⁶⁸⁻⁶⁹

ANEXOS

ANEXO A - Especificações da Lente Objetiva

Data Sheet

XLUMPLFLN 20XW

XLUMPLFLN-W objective

This XLUMPLFLN-W objective allows the measurement of cell membrane electric potential.

05/13 GEN

Numerical Aperture (NA)	1
Working distance (W.D.) (mm)	2
Field Number (F.N.)	22
Cover Glass Thickness (mm)	0
Immersion	Water
Spring	-
Correction Collar	-
Iris Diaphragm	-
Waterproof & Oil proof function	Yes
Ultra Wide anti-reflection coating	Yes
Super apochromatic	-
Brightfield	Excellent
Darkfield	N/A
DIC	Good
Phase Contrast	N/A
Relief Contrast	N/A
Polarized Light	Limitation
Fluorescence (B, G Excitation)	Excellent
UV Fluorescence (at 365nm)	Excellent
IR DIC	Good
Multi photon excitation	Good

Specifications, design and accessories are subject to change without any notice or obligation on the part of the manufacturer.

OLYMPUS

Espectro de transmitância da objetiva

ANEXO B - Especificações do Módulo Fotomultiplicador

H9305-03 Hamamatsu

HAMAMATSU

COMPACT SIDE-ON PMT PHOTOSENSOR MODULES H9305 SERIES

The H9305 series photosensor modules contain a high-voltage power supply circuit and a 13-mm (1/2") diameter side-on photomultiplier tube in a compact aluminum housing. The 13-mm (1/2") side-on photomultiplier tube has a reflection mode photocathode that delivers high quantum efficiency at wavelengths above 600 nm, an adequate gain of up to 10^7 and fast time response. A high S/N ratio can be obtained even when measuring extremely low level light at high speeds.

The H9305 series uses a Cockcroft-Walton circuit with low power consumption. Five types are available according to the required spectral response range. Flexible cables are used for easy installation in equipment.

Product Variations

Type No.	Spectral Response	Features
H9305-01	185 nm to 750 nm	High sensitivity in UV to visible range
H9305-02	185 nm to 900 nm	For general applications in UV to near IR range
H9305-03	185 nm to 900 nm	High sensitivity in UV to near IR range
H9305-04	185 nm to 830 nm	Low dark current in UV to near IR range
H9305-05	185 nm to 650 nm	For general applications in UV to visible range

Specifications

Parameter			H9305 Series					Unit
Suffix			-01	-02	-03	-04	-05	—
Input Voltage			+11.5 to +15.5					V
Max. Input Voltage			+18					V
Max. Input Current			7					mA
Max. Output Signal Current			10					μA
Max. Control Voltage			+1.2 (Input impedance: 1 MΩ)					V
Recommended Control Voltage Adjustment Range			+0.25 to +1.0					V
Effective Area			3.7 × 13.0					mm
Sensitivity Adjustment Range			1: 10 ⁴					—
Peak Sensitivity Wavelength			420	400	450	530	340	nm
Cathode	Luminous Sensitivity	Min.	80	200	350	140	20	μA/lm
		Typ.	120	300	500	200	40	
	Blue Sensitivity Index (CS 5-58)		10	—	—	—	5	—
	Red/White Ratio		—	0.3	0.4	0.15	—	—
Radiant Sensitivity *1			90	77	105	70	48	mA/W
Anode	Luminous Sensitivity *2	Min.	100	400	1000	300	50	A/lm
		Typ.	700	2000	2000	700	300	
	Radiant Sensitivity *1 *2		5.2 × 10 ⁵	5.2 × 10 ⁵	4.2 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁵	3.6 × 10 ⁵	A/W
	Dark Current *2 *3	Typ.	1	1	2	0.1	0.5	nA
Max.		10	10	10	1	5		
Rise Time *2			1.4					ns
Ripple Noise *2 *4 (peak to peak) Max.			0.5					mV
Settling Time *5			10					s
Operating Ambient Temperature			+5 to +50					°C
Storage Temperature			-20 to +50					°C
Weight			110					g

*1: Measured at the peak sensitivity wavelength *2: Control voltage = ±1.0 V *3: After 30 minutes storage in darkness

*4: Cable RG-174/U, Cable length 450 mm, Load resistance = 1 MΩ, Load capacitance = 22 pF

*5: The time required for the output to reach a stable level following a change in the control voltage from +1.0 V to +0.5 V.

Subject to local technical requirements and regulations, availability of products included in this promotional material may vary. Please consult with our sales office. Information furnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or omissions. Specifications are subject to change without notice. No patent rights are granted to any of the circuits described herein. ©2003 Hamamatsu Photonics K.K.

Current Output Type Photosensor Modules

Characteristics (Cathode radiant sensitivity, PMT gain)

Sensitivity Adjustment Method

Dimensional Outlines (Unit: mm)

DETAILS OF INPUT WINDOW

ANEXO C - Artigos e Resumos Completos Publicados

- PIRES, L.; NOGUEIRA, M. S.; PRATAVIEIRA, S.; MORIYAMA, L. T.; KURACHI, C. Time-resolved fluorescence lifetime for cutaneous melanoma detection. **Biomedical Optics Express**, v. 5, p. 3080, 2014.
- ZHANG, L.; PU, Y.; XUE, J.; PRATAVIEIRA, S.; XU, B.; ACHILEFU, S.; ALFANO, R. R. Tryptophan as the fingerprint for distinguishing aggressiveness among breast cancer cell lines using native fluorescence spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, p. 037005, 2014.
- ULIANA, M. P.; PIRES, L.; PRATAVIEIRA, S.; BROCKSOM, T. J.; OLIVEIRA, K. T.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Photobiological characteristics of chlorophyll a derivatives as microbial PDT agents. **Photochemical & Photobiological Sciences** v. 13, p. 1137, 2014.
- SORDILLO, L. A.; PU, Y.; PRATAVIEIRA, S.; BUDANSKY, Y.; ALFANO, R. R. Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, p. 056004, 2014.
- PU, Y.; SHI, L.; PRATAVIEIRA, S.; ALFANO, R. R. Two-photon excitation microscopy using the second singlet state of fluorescent agents within the -tissue optical window. **Journal of Applied Physics**, v. 114, p. 153102, 2013.
- RUMALA, Y. S.; MILIONE, G.; NGUYEN, T.; PRATAVIEIRA, S.; HOSSAIN, Z.; NOLAN, D.; SLUSSARENKO, S.; KARIMI, E.; MARRUCCI, L.; ALFANO, R. R. Tunable supercontinuum light vector vortex beam generator using a q-plate. **Optics Letters**, v. 38, p. 5083, 2013.
- GRECCO, C.; MORIYAMA, L. T.; COSCI, A.; PRATAVIEIRA, S.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Necrosis response to photodynamic therapy using light pulses in the femtosecond regime. **Lasers in Medical Science**, v. 01, p. 01, 2012.
- ESTRACANHOLLI, E.S.; NICLODELLI, G.; PRATAVIEIRA, S.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Mathematical methods to analyze spectroscopic data - new applications. **Advanced Aspects of Spectroscopy**. v.1, p. 483-498, 2012.
- PRATAVIEIRA, S.; ANDRADE, C. T.; SALVIO, A. G.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Optical imaging as auxiliary tool in skin cancer diagnosis. In: LA PORTA, C. (Ed.). **Skin cancers - risk factors, prevention and therapy**. [s.l.] InTech - Open Access Publisher, 2011. v. 1, p. 159-172.
- RUMALA, Y. S.; MILIONE, G.; NGUYEN, T.; PRATAVIEIRA, S.; HOSSAIN, Z.; NOLAN, D.; SLUSSARENKO, S.; KARIMI, E.; MARRUCCI, L.; ALFANO, R. R. Tuning

vector vortex in spatially coherent supercontinuum multicolored optical beam using q-plate. In: **Proceedings of SPIE**. San Francisco: OSA, 2014. v. 89990D.

- PRATAVIEIRA, S.; BUZZÁ, H. H.; JORGE, A. E.; GRECCO, C.; PIRES, L.; COSCI, A.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Assembly and characterization of a nonlinear optical microscopy for in vivo and ex vivo tissue imaging. In: **Proceedings of SPIE BiOS**, San Francisco: OSA, 2014. p. 894828.

- SOUZA, L. M.; PRATAVIEIRA, S.; INADA, N. M.; KURACHI, C.; CORBI, J.; GUIMARÃES, F. E. G.; BAGNATO, V. S. Efficacy of photodynamic therapy against larvae of : confocal microscopy and fluorescence-lifetime imaging. In: **Proceedings of SPIE BiOS**, San Francisco: OSA, 2014. p. 89472D.

- SORDILLO, L. A.; PRATAVIEIRA, S.; PU, Y.; SALAS-RAMIREZ, K.; SHI, L.; ZHANG, L.; BUDANSKY, Y.; ALFANO, R. R. Third therapeutic spectral window for deep tissue imaging. In: **Proceedings of SPIE BiOS**. San Francisco: OSA, 2014. p. 89400V.

- ZHANG, L.; PU, Y.; XUE, J.; PRATAVIEIRA, S.; XU, B.; ACHILEFU, S.; ALFANO, R. R. Tryptophan content for monitoring breast cancer cell aggressiveness by native fluorescence spectroscopy. In: **Proceedings of SPIE BiOS**. San Francisco: OSA, 2014. p. 894015.

- PU, Y.; SHI, L.; PRATAVIEIRA, S.; ALFANO, R. R. Enhancing the depth of tissue microscope imaging using two-photon excitation of the second singlet state of fluorescent agents. In: **Proceedings of SPIE BiOS**, San Francisco: OSA, 2014. p. 894017.

- KURACHI, C.; PIRES, L.; NOGUEIRA, M. S.; PRATAVIEIRA, S. Lifetime fluorescence for the detection of skin lesions. In: **Biomedical optics**. Washington: OSA, 2014. p. BS4B.3.

- PU, Y.; SHI, L.; PRATAVIEIRA, S.; ALFANO, R. R. Second singlet (S₂) state of fluorescent agents pumped by two-photon for deeper tissue imaging. In: **Frontiers in optics**. Washington: OSA, 2013. p. FW5A.4.

- MONTANHA, S. S.; PRATAVIEIRA, S.; JACOMASSI, D. P.; RASTELLI, A. N. S.; BAGNATO, V. S. Diffusion analysis of one photosensitizer in bovine teeth using fluorescence optical imaging. In: **Proceedings of SPIE**. San Francisco. SPIE Photonics West Lasers in Dentistry XVIII, 2012.

- TRIBIOLI, J. T.; JACOMASSI, D. P.; RASTELLI, A. N. S.; PRATAVIEIRA, S.; BAGNATO, V. S.; KURACHI, C. Optical characterization of one dental composite resin using bovine enamel as reinforcing filler. In: **Proceedings of SPIE**. San Francisco. Lasers in Dentistry XVIII, 2012.