

**Fluorescência por absorção de dois fótons em corantes
com aplicações biológicas.**

ALOÍSIO MIGUEL GARCIA

2013

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Instituto de Ciências Exatas - ICEX
Programa de Pós Graduação em Física

Fluorescência por absorção de dois fótons em corantes com aplicações biológicas

Aloísio Miguel Garcia

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria de Paula

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS, como requisito parcial para a ob-
tenção do grau de Mestre em Física.
Área de Concentração: Biofísica.

Março de 2013

Agradecimentos

A Jesus Cristo, mestre dos mestres, que me deu e tem dado forças, através do evangelho, para continuar lutando pelos meus ideais e nunca perder a esperança.

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Professora Dra. Ana Maria de Paula, que além de ter me ajudado muito na minha pesquisa, tem me ajudado também, através de seus conselhos, em alguns momentos difíceis que passei nesse período de mestrado.

Ao meu amigo Mychel Gonçalves Silva, do grupo de Biofotônica, por ter ajudado na montagem experimental.

A todos os integrantes do grupo de Biofotônica.

Ao Paulo Campos-Júnior pela oportunidade de participar de sua pesquisa sobre como as células de Leydig se distribuem no testículo de um porco selvagem, Caititu, *Tayassu tajacu*.

À Barbara Hissa e à Professora Maria de Fátima Leite do ICB por terem fornecidos alguns corantes essenciais para minha pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório Raman do Departamento de Física UFMG, pela utilização do espectrômetro para medidas de absorção de 1 fóton.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Física UFMG.

À CAPES, Fapemig e CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

Utilizamos a técnica de fluorescência por absorção de dois fótons para estudar alguns corantes importantes para aplicações em imagens biológicas. Algumas amostras biológicas são autofluorescentes, ou seja, elas possuem alta seção transversal de absorção e absorvem e emitem radiação. Entretanto a maioria das amostras não são autofluorescentes e necessitam serem marcadas por algum corante fluorescente para visualização. O objetivo do nosso trabalho foi estudar alguns destes corantes para marcação biológica. Estudamos o análogo da lei de Lambert Beer para um processo de absorção de dois fótons e apresentamos as técnicas de microscopia e espectroscopia de fluorescência utilizadas para a obtenção dos resultados. Para as medidas de espectroscopia de fluorescência por absorção de dois fótons, implementamos uma montagem experimental utilizando para a excitação das amostras um laser pulsado de Ti-safira. O laser é sintonizável na faixa de comprimentos de onda de 680 até 1080 nm e permite pulsos ultra curtos, da ordem de 140 fs, altas taxas de repetição, alta potência de pico e grandes larguras de banda espectral. A fluorescência é coletada por uma objetiva e através de uma fibra óptica é direcionada a um espectrômetro acoplado a uma câmera CCD para análise espectral. Através de um modulador acusto-óptico programável controlamos a dispersão temporal do pulso. A dispersão é responsável pelo atraso temporal das componentes da banda espectral e conseqüentemente pelo alargamento do pulso ao percorrer um meio dispersivo.

Medimos os espectros de fluorescência para vários corantes e obtivemos seus espectros de fotoluminescência de excitação por dois fótons (TPE). Para a rodamina 6G comparamos o espectro de TPE com dados da literatura. Obtivemos também espectros de absorção por 1 fóton (1PA) para os corantes rodamina 6G, DAPI e ER-Tracker Red, além de mostrarmos uma comparação entre os espectros de 1PA e TPE para a rodamina 6G. Mostramos os resultados da dependência da fluorescência com a potência para os corantes rodamina 6G e ER-Tracker Red.

Usando microscopia multi-fótons, colaborei na obtenção de imagens de cortes de tecido biológico, parte do projeto de mestrado de Paulo Campos- Júnior, em pesquisa sobre como as células de Leydig se distribuem no testículo de um porco selvagem, Caititu, *Tayassu tajacu*.

Palavras-chaves: Absorção de Dois Fótons, Corantes, Espectroscopia, Microscopia

Abstract

We use the technique of fluorescence by two photon absorption to study some dyes that are important for applications in biological imaging. Some biological samples are autofluorescent, i.e. they have a high absorption cross section and absorb and emit radiation. However most samples are not autofluorescent and need to be marked by a fluorescent dye for visualization. The aim of our study was to investigate some of these dyes for biological labeling. We studied the analog of the Lambert Beer's law for a process of two-photon absorption and present the techniques of fluorescence microscopy and spectroscopy that we used to obtain the results. We implemented an experimental setup for the two-photon absorption fluorescence spectroscopy using a pulsed Ti-sapphire laser. The laser is tunable in the wavelength range of 680 to 1080 nm and allows ultra short pulses, on the order of 140 fs, high repetition rates, high peak power and large spectral bandwidth. The fluorescence is collected by a lens and through an optical fiber is directed to a spectrometer coupled to a CCD camera for spectral analysis. We used a programmable acousto-optic modulator control the temporal dispersion of the pulse. The dispersion is responsible for the time delay of the spectral components on the pulse bandwidth and consequently introduces a pulse broadening as the beam passes through a dispersive medium.

We measured the fluorescence spectra for various dyes and obtained their two-photon excitation photoluminescence spectra (TPE). For rhodamine 6G we compared the measured TPE spectrum with data on the literature. We also obtained the one photon absorption spectra (1PA) for rhodamine 6G dye, DAPI and ER-Tracker Red, and we show a comparison between the 1PA and TPE spectra for rhodamine 6G. We show also results for the dependence of the fluorescence with the excitation power, for the dyes rhodamine 6G and ER-tracker red.

Using multi-photon microscopy, I collaborated in the imaging of biological tissue sections, as part of the Masters research work of Paulo Campos-Junior, on studies of how the Leydig cells are distributed in the testis of a wild pig, Caititu, *Tayassu tajacu*.

Keywords: Two Photon Absorption, Dyes, Spectroscopy, Microscopy

Sumário

Resumo	v
Abstract	vii
1 Introdução	3
2 Corantes	7
2.1 Rodamina 6G	7
2.2 Alexa	8
2.3 DAPI	9
2.4 ER-tracker red	10
2.5 Amostras	10
3 Técnicas	13
3.1 Microscopia	13
3.1.1 Microscopia confocal	13
3.1.2 Microscopia por absorção de dois fótons	14
Propriedades ópticas de microscopia por dois fótons	14
Instrumentação para microscopia por absorção de dois fótons	15
3.2 Espectroscopia de fluorescência por absorção de dois fótons	17
3.2.1 Montagem experimental	17
Isolador de Faraday	19
Dazzler	19
Calibração da transmissão da objetiva no infravermelho	20
3.2.2 Absorção de Dois Fótons, Parte Teórica	22
Efeitos de Saturação	24
3.2.3 Seção de choque por absorção de dois fótons	24
4 Resultados	27
4.1 Espectroscopia de absorção e emissão	27
4.1.1 Medidas de absorção	27
4.1.2 Espectros de Fluorescência	30
4.2 Seção transversal de TPE para alguns corantes importantes na biologia	32

4.2.1	Otimização da segunda ordem da fase do pulso de laser	32
4.2.2	Espectro TPE para a rodamina 6G	33
4.2.3	Espectro TPE: DAPI, alexa 488, alexa 546, Er-tracker red	36
4.2.4	Comparação da absorção de 1 fóton e TPE	38
4.2.5	Dependência da fluorescência com a potência de excitação	39
4.3	Microscopia de fluorescência por absorção de dois fótons	41
4.3.1	Aplicação do corante DAPI como marcador biológico	41
4.3.2	Aplicação do corante ER-tracker como marcador biológico	42
5	Conclusões	45

Lista de Figuras

1.1	Diagrama esquemático mostrando os níveis de energia em uma transição de dois fótons	3
2.1	Estrutura química da rodamina 6G	7
2.2	Níveis de energia para a rodamina 6G	8
2.3	Estrutura química do corante alexa 488	9
2.4	Estrutura química do corante alexa 546	9
2.5	Estrutura química do corante DAPI	9
2.6	Estrutura química do corante ER-tracker red	10
3.1	Princípio de varredura da microscopia confocal	14
3.2	Fluorescência por 1 e 2 fótons	15
3.3	Desenho esquemático mostrando a microscopia multifótons	16
3.4	Espectroscopia de fluorescência	18
3.5	Esquema de funcionamento do modulador acusto-óptico, Dazzler	20
3.6	Diagrama de níveis de energia para os estados essenciais	23
4.1	Espectro de absorção por 1 fóton para rodamina 6G	28
4.2	Espectros de absorção da rodamina 6G em vários solventes.	28
4.3	Comparação dos espectros de absorção para o corante DAPI em diferentes sol- ventes.	29
4.4	Comparação dos espectros de absorção normalizado para o corante ER-tracker red.	29
4.5	Espectros de fluorescência para rodamina 6G e ER-tracker red.	30
4.6	Espectros de fluorescência para DAPI e alexa 488.	31
4.7	Espectro de fluorescência para o alexa 546	31
4.8	Intensidade de fluorescência em função do fator de dispersão	32
4.9	TPE rodamina 6G retirada da literatura	34
4.10	Duas medidas de TPE para rodamina 6G	34
4.11	TPE rodamina 6G dissolvidas em MeOH e PBS.	35
4.12	Seções transversais de TPE para rodamina 6G e DAPI.	37
4.13	Seções Transversais de TPE Para Alexa 488 e Alexa 546.	37
4.14	TPE ER-tracker red	37

4.15	Espectros de 1PA e PLE para rodamina 6G	38
4.16	Dependência da fluorescência com a potência de excitação	40
4.17	Dependência da fluorescência com a potência de excitação	40
4.18	Imagem de microscopia de dois fótons de corte de tecido biológico	42
4.19	Microscopia multi-fótons das células SKHelp1	43
4.20	Imagem multi-fótons mostrando o retículo nucleoplasmático	43
4.21	Imagem de microscopia por absorção de um fóton de células SKHelp1	43

Lista de Tabelas

2.1	Tabela de concentrações, amostras absorção de 2 fótons.	11
2.2	Tabela de concentrações, amostras absorção 1 fóton.	11
3.1	Potência transmitida pela objetiva.	21
4.1	Tabela de dados, espectros de fluorescência.	30

Capítulo 1

Introdução

Esse trabalho consiste em estudos de fluorescência por absorção de dois fótons em alguns corantes importantes para aplicações biológicas. A primeira evidência de absorção de dois fótons foi obtida por Göppert Mayer em 1931, e depois também foi observado por Axe em 1964 [1]. O processo de absorção de dois fótons [2], descrito teoricamente por Maria Göppert-Mayer, envolve a absorção quase-simultânea de dois fótons (de energias E_1 e E_2) por um material, por exemplo uma molécula de um corante. Essa absorção ocorre quando as energias $E_1 + E_2$ estão em ressonância com um dos estados eletrônicos do sistema. Devido a excitação, a molécula é levada para um estado \mathbf{r} acima do estado fundamental \mathbf{g} como mostra a figura 1.1.

Esse processo pode ser pensado como uma interação inicial de um fóton de energia E_1 com a molécula, a qual é deixada em um estado de virtual temporário, com energia E_1 acima do

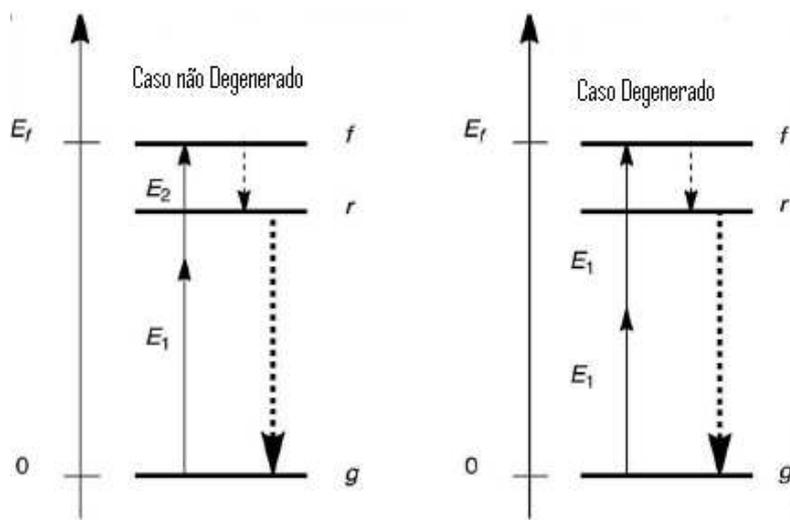


Figura 1.1

Diagrama esquemático dos níveis de energia, mostrando a excitação de uma molécula, de um estado \mathbf{g} para um estado \mathbf{f} por um processo de absorção de dois fótons (linha contínua), retirada de [2]. Os fótons podem ter a mesma energia E_1 (caso degenerado, $E_f = 2E_1$) ou energias diferentes E_1 e E_2 (caso não degenerado, $E_f = E_1 + E_2$). Depois da excitação o sistema relaxa rapidamente para um estado \mathbf{r} , um nível vibrônico de baixa energia (linha tracejada). O sistema finalmente retorna ao estado fundamental por meios radiativos ou não Radiativos (linha tracejada em negrito).

estado fundamental. Este não é um estado real da molécula e ele existe somente para um curto intervalo de tempo τ_ν . Se durante τ_ν um segundo fóton de energia E_2 interage com a molécula, ela pode ser levada para o estado excitado **f**. A ordem de magnitude para τ_ν , que pode ser estimado do princípio da incerteza, é de $10^{-15} - 10^{-16}$ s para fótons de energia na faixa do visível e infravermelho próximo. A palavra quase-simultâneo para 2PA (do inglês two photon absorption) é usado para indicar que os dois fótons interagem com a molécula dentro do intervalo de tempo τ_ν e que não existe um estado real intermediário nesse processo. A existência de um estado eletrônico de energia apropriada, como no caso de 1PA (do inglês one photon absorption), não é suficiente para que ocorra a absorção de dois fótons. As regras de seleção devem também ser satisfeitas para que o processo de 2PA possa ocorrer.

Algumas amostras biológicas são fluorescentes, ou seja, elas possuem naturalmente alta seção transversal de absorção e emitem radiação que é comumente denominada autofluorescência. Logo não há necessidade de marcá-las com algum marcador fluorescente. Entretanto, a maioria das estruturas biológicas não são autofluorescentes e necessitam serem acopladas a algum corante fluorescente para serem visualizadas por espectroscopia de fluorescência. Esses corantes são escolhidos com duas propriedades específicas: possuir transições eletrônicas específicas para um determinado comprimento de onda de absorção e ter uma afinidade particular para uma determinada molécula, marcando-a dentro da amostra. A maioria dos corantes vêm com um radical que funciona como uma ponte na ligação química entre o corante e a molécula que se deseja marcar. Apresentamos resultados de microscopia e espectroscopia por absorção de dois fótons para alguns corantes relevantes na biologia. No capítulo 2, apresentamos uma breve discussão sobre os corantes que trabalhamos e os detalhes de preparação das amostras estudadas, seção 2.5.

No capítulo 3, apresentamos as técnicas de microscopia e espectroscopia de fluorescência, que utilizamos para a obtenção dos resultados, seções 3.1 e 3.2. Para a medida de espectroscopia de fluorescência por absorção de dois fótons, implementamos uma montagem experimental utilizando para a excitação das amostras um laser pulsado de Ti-safira sintonizável na faixa de comprimento de onda de 680 até 1080 nm, que permite pulsos ultra curtos, da ordem de 140 fs, altas taxas de repetição, alta potência de pico e grandes larguras de banda espectral. A fluorescência é coletada por uma objetiva e através de uma fibra óptica é direcionada a um espectrômetro acoplado a uma câmera CCD para uma análise espectral. Essa montagem experimental está mostrada na subseção 3.2.1. Mostramos também a parte teórica da fluorescência por absorção de dois fótons, seção 3.2.2, onde discutimos o análogo da lei de Lambert Beer para um processo de absorção de dois fótons, as consequências dos efeitos de saturação, e os cálculos utilizados para obtenção da seção de choque de absorção de dois fótons.

No capítulo 4 estão mostrados todos os resultados. Na seção 4.1 apresentamos as medidas de caracterização das amostras de corante, a subseção 4.1.1 mostra os espectros que medimos de absorção por 1 fóton (1PA) para os corantes rodamina 6G, DAPI e ER-tracker red e comparamos com o que temos na literatura e na subseção 4.1.2 mostramos os espectros de fluorescência para os corantes rodamina 6G, ER-tracker red, DAPI, alexa 488 e alexa 546. Na seção 4.2

são mostrados os espectros de TPE (do inglês two photon excitation) para todos os corantes estudados. Na subseção 4.2.1 mostramos os resultados das medidas, usando o sistema dazzler, para controle da intensidade de fluorescência em função do fator de dispersão do pulso para a rodamina 6G. A dispersão é responsável pelo atraso temporal das componentes da banda espectral e conseqüentemente pelo alargamento do pulso ao percorrer um meio dispersivo. Com essa medida garantimos a melhor configuração para obtermos a mais alta intensidade de fluorescência. Para a rodamina 6G comparamos o seu espectro de TPE com o que temos na literatura. Também, para a rodamina 6G, comparamos os espectros de 1PA e PLE (do inglês photoluminescence excitation) 4.2.4 . E na subseção 4.2.5 mostramos os resultados da dependência da fluorescência com a potência para os corantes rodamina 6G e ER-tracker red.

Usando microscopia multi-fótons, colaborei na obtenção de imagens multi-fótons no projeto de mestrado de Paulo Campos- Júnior, em pesquisa sobre como as células de Leydig se distribuem no testículo de um porco selvagem, Caititu, *Tayassu tajacu* [3]. Esses resultados estão mostrados na seção 4.3. A primeira vantagem de se usar microscopia multi-fótons é que os fótons gerados têm maiores energias do que o feixe de excitação, o que é diferente numa microscopia tradicional. Para os marcadores fluorescentes mais comumente usados, a absorção multi-fótons ocorre próximo do infravermelho, no intervalo de 700 até 1000 nm, onde a emissão ocorre no intervalo espectral do visível. Luz próximo do infravermelho não só penetra mais profundamente na amostra como também gera menos fototoxicidade. A segunda vantagem é que o sinal, S , depende da intensidade da luz, ou seja, $S \propto I^n$. Como consequência disso, quando focamos o feixe de laser sobre a objetiva do microscópio a absorção multi-fótons fica concentrada espacialmente na região perifocal. O mesmo não acontece na microscopia confocal, onde a absorção acontece em todo o cone de luz de excitação. A falta de excitação fora da região focal em microscopia não linear reduz o foto-dano e assim aumenta a viabilidade do tecido, que é crucial para uma imagem a longo tempo.

No capítulo 5 apresentamos nossas conclusões e perspectivas.

Capítulo 2

Corantes

Neste trabalho medimos os espectros de fluorescência e de TPE para alguns corantes: rodamina 6G, alexa 488, alexa 546, DAPI e ER-tracker red, que são corantes bastantes utilizados como marcadores biológicos. Obtemos também, para a rodamina 6G e ER-tracker red, a dependência da fluorescência com a potência para a absorção de dois fótons e os espectros de 1PA para a rodamina 6G, DAPI e ER-tracker red. Exceto para o corante ER-tracker red, que foi dissolvido em (DMSO), todos os outros foram dissolvidos em solução salina (PBS). A solução de PBS contém cloreto de sódio e fosfato de sódio e tem como finalidade manter um valor de pH praticamente constante, quando adicionados à diferentes meios. Já o (DMSO) é um composto muito usado como solvente aprótico e polar, em laboratório e na indústria, com fórmula $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. É produzido pela oxidação do dimetilsulfureto (DMS ou sulfeto de dimetila), que por sua vez é produzido por alguns processos biológicos, inclusive no repolho.

2.1 Rodamina 6G

A estrutura química para a rodamina 6G está representada na figura 2.1. A concentração molar para a rodamina 6G é igual a 479,02 g/mol. Sua eficiência quântica é igual a $\eta_1 = 0,95$, como mostra a referência [4].

Rodaminas [5] são corantes bastante conhecidos e que tem sido muito usados na detecção de uma molécula, na determinação da sequência de DNA, como marcadores fluorescentes, devido as suas altas fluorescências na região espectral do visível. As geometrias moleculares de corantes rodamina também são bem conhecidas e indicam que todas as estruturas são não

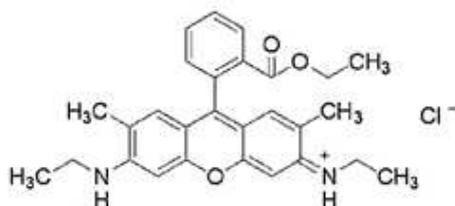


Figura 2.1
Estrutura química da rodamina 6G, retirada de [5].

centro-simétricas. Em geral para as moléculas centro-simétricas, a absorção de dois fótons não ocorre para uma transição que corresponde a metade da frequência de excitação. Contudo para as moléculas não centro-simétricas, devido à flexibilização de simetria, o pico de absorção de um fóton pode coincidir com o pico de absorção de dois fótons.

A figura 2.2, retirada de [6], mostra esquematicamente os níveis de energia para uma molécula de rodamina junto com o espectro de absorção da rodamina 6G. A escala vertical está em número de onda em cm^{-1} . O pico de absorção mais intenso ocorre na transição do estado fundamental S_0 para o estado excitado S_1 em 18605 cm^{-1} (537 nm). A segunda transição é para o estado S_2 em 28660 cm^{-1} (349 nm). Estas transições serão importantes para a comparação com o espectro de absorção de dois fótons no capítulo 4.

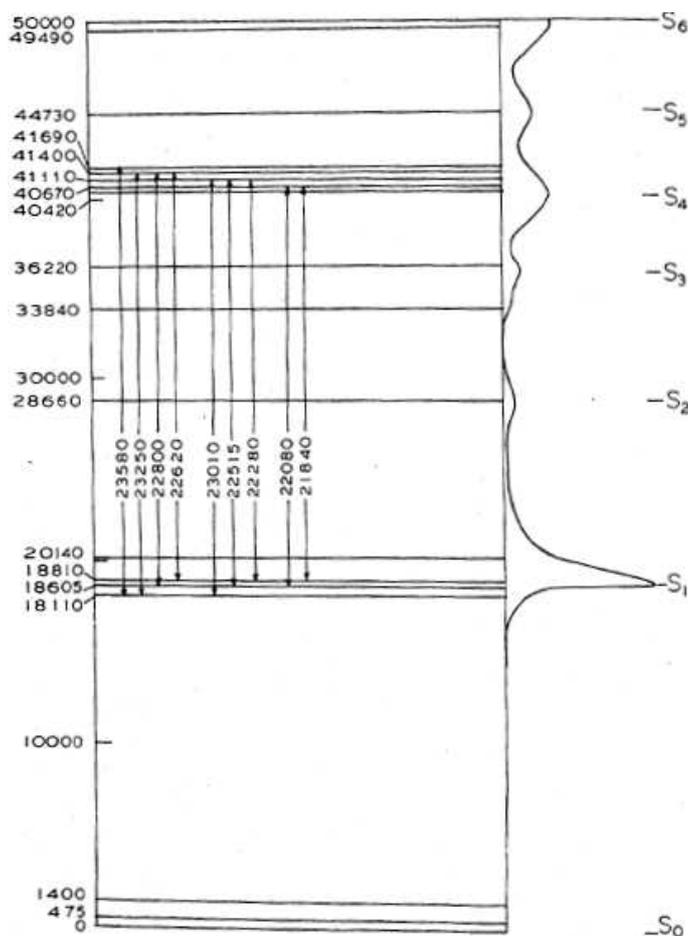


Figura 2.2

Níveis de energia para uma molécula de rodamina junto com o espectro de absorção da rodamina 6G. Figura retirada da referência [6], escala vertical em número de onda em cm^{-1} .

2.2 Alexa

As estruturas químicas para os corantes alexa 488 e alexa 546, retiradas de [7], estão representadas nas figuras 2.3 e 2.4.

O número nos nomes desses corantes [7] corresponde aproximadamente ao comprimento de

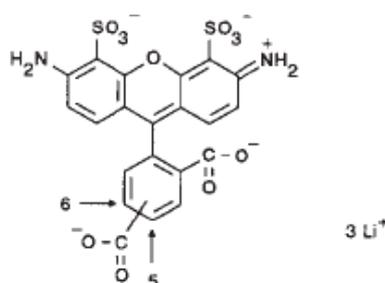


Figura 2.3
Estrutura química do corante alexa 488.

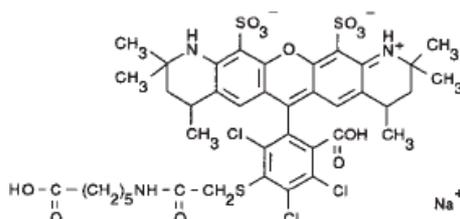


Figura 2.4
Estrutura química do corante alexa 546.

onda máximo de excitação por um fóton para cada um dos corantes. As eficiências quânticas, η_1 , para o alexa 488 e alexa 546 são 0,92 e 0,79 respectivamente. Esses valores foram retirados da referência [8]. Todos os corantes alexa possuem uma insensibilidade para um intervalo muito grande de pH. Aqueles que absorvem para comprimentos de onda maior que 480 nm têm elevados coeficientes de extinção molar, típico de fluoresceínas ou rodaminas. O coeficiente de extinção molar é a capacidade que um mol de substância tem em absorver luz em um dado comprimento de onda, segundo a lei de Lambert-Beer, que será discutida na seção 4.1.1.

2.3 DAPI

A estrutura química do corante DAPI está representada na figura 2.5. A concentração molar para o dapi é igual a 277,3 g/mol. Sua eficiência quântica, η_1 , é igual a 0,58.

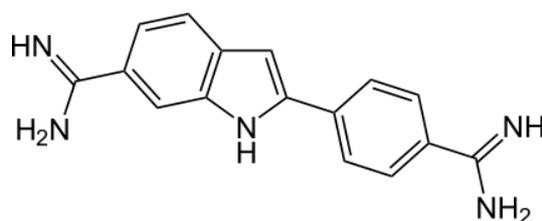


Figura 2.5
Estrutura química do corante DAPI.

DAPI ou 4',6-diamidino-2-phenylindole é um marcador fluorescente que liga fortemente na região A-T do DNA. Pesquisas também indicaram que a fluorescência é maior quando esse corante está ligado ao DNA.

2.4 ER-tracker red

ER-tracker são marcadores de células vivas, que são altamente seletivos para o retículo endoplasmático. Esses marcadores em baixas concentrações não são tóxicos às células. O marcador ER-tracker red vem conjugado com o corante glibenclamida BODIPY TR. Glibenclamida é uma droga tomada diariamente por milhões de pacientes diabéticos para corrigir hiperglicemia. Ela tem sido usada para investigar as atividades das células pancreáticas β , secreções de insulina e também para estudar a função da célula do miocárdio. Glibenclamida se liga aos receptores de sulfoniluréias de canais K^+ , sensíveis a ATP, que são proeminentes no ER; a atividade farmacológica de glibenclamida poderia potencialmente afetar a função de ER. Expressões variáveis de receptores sulfonilureia em alguns tipos de células especializadas pode resultar em não marcação de ER. A figura 2.6 mostra a estrutura química para o ER-tracker red. Sua concentração molar é igual a 915,2 g/mol.

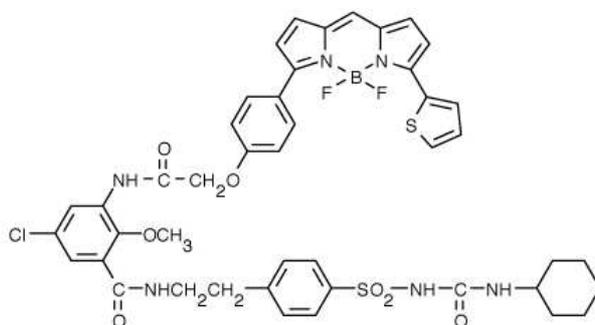


Figura 2.6

Estrutura química do corante ER-tracker red. Figura retirada de [9].

2.5 Amostras

Nas medidas dos espectros de fluorescência, espectros de TPE e a dependência da fluorescência com a potência, para todas as amostras estudadas, usamos as concentrações mostradas na tabela 2.1. Nessa tabela, exceto para o corante ER-tracker red, especificamos as respectivas eficiências quânticas de fluorescência por absorção de um fóton. Usamos a concentração de $110 \mu M$ para a rodamina 6G para comparação com espectro TPE e seção de choque de absorção de dois fótons da literatura para normalização da eficiência de coleta da fluorescência em nossa montagem experimental.

Nas medidas dos espectros de 1PA, para rodamina 6G, DAPI e ER-tracker Red, usamos as concentrações mostradas na tabela 2.2. Essas concentrações foram escolhidas para comparar com dados da literatura.

Corante	Concentração molar (μM)	Eficiência quântica
Rodamina 6G	110,0	0,95
ER-tracker Red	6,0	-
DAPI	3,6	0,58
Alexa 488	6,2	0,92
Alexa 546	3,7	0,79

Tabela 2.1

Tabela de concentrações, amostras absorção de 2 fótons.

Corante	Concentração molar (μM)
Rodamina 6G	21,0
ER-tracker Red	6,0
DAPI	144

Tabela 2.2

Tabela de concentrações, amostras absorção 1 fóton.

Capítulo 3

Técnicas

3.1 Microscopia

Nesse trabalho foram usadas duas técnicas de microscopia: Microscopia confocal, onde a amostra absorve um único fóton, e microscopia por absorção de dois fótons, onde a amostra absorve dois fótons quase simultâneos em um intervalo de femtosegundos.

3.1.1 Microscopia confocal

Para esse tipo de microscopia foi utilizado um microscópio da Olympus Fluoview (FV300), que é um microscópio confocal de varredura a laser. Nesse caso temos um laser de argônio onde sua emissão está em 488 nm e um laser de He-Ne onde sua emissão está em 543 nm. As imagens de fluorescência das amostras são obtidas em planos focais, rejeitando quase todas as excitações vindas de um ponto acima ou abaixo deste plano focal. Uma fenda circular (pinhole) a excitação fora do foco para produzir imagens com alto contraste.

A figura 3.1, retirada de [10], mostra um esquema da montagem para microscopia confocal. Utilizamos um microscópio confocal, FV300, projetado pela Olympus, onde podemos controlar manualmente a abertura da fenda. O microscópio possui diferentes modos de varredura: imagens de um único plano (XY) ou imagens de vários planos, ou seja, podemos obter imagens para planos XY em várias profundidades na amostra e depois formar uma imagem tridimensional (XYZ). Também podemos obter os dois casos anteriores com imagens no tempo (XYT) e (XYZT). O sistema possui fibras ópticas para acoplamento das fontes de luz do laser, espelhos dicromáticos, polarizadores, espelhos, fotomultiplicadores, lente coletora, e etc.

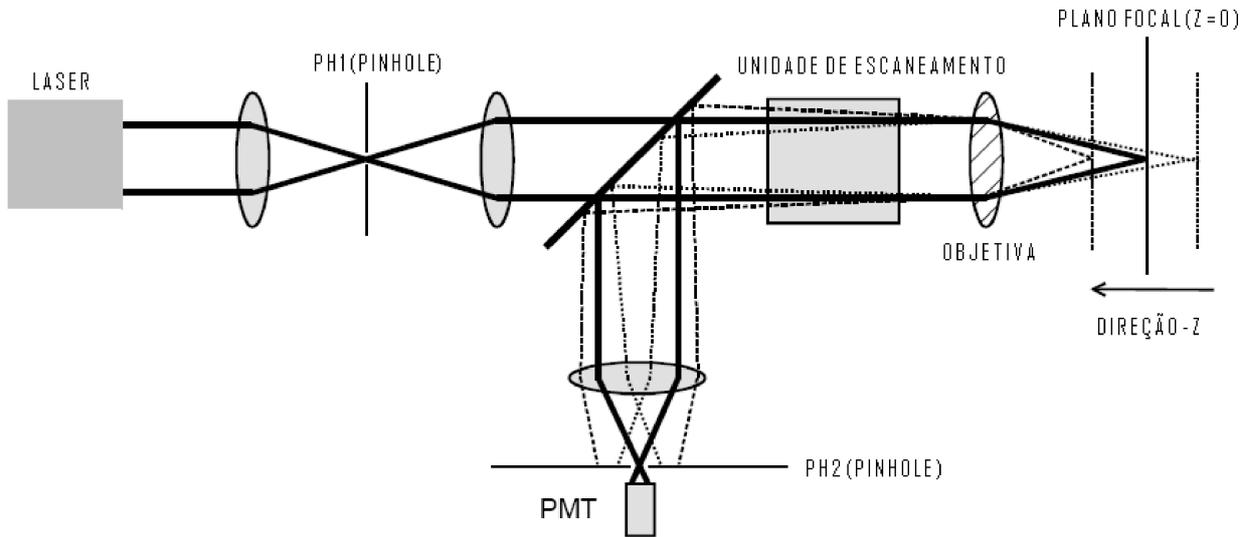


Figura 3.1

Princípio de varredura da microscopia confocal: O pinhole PH2 é confocal com o ponto de luz no plano Focal. O Pinhole PH1 é usado para gerar uma fonte de luz pontual. Figura retirada de [10].

3.1.2 Microscopia por absorção de dois fótons

Propriedades ópticas de microscopia por dois fótons

Uma característica importante de TPM (do inglês Two Photon Microscopy) é que a fluorescência está limitada a um volume focal, [11]. Veja a figura 3.2, foto obtida em nosso laboratório. Excitamos uma amostra de rodamina 6G com um laser de argônio 488 nm e observamos uma intensidade padrão de fluorescência por todo o caminho óptico, parte de cima da figura. Enquanto que no segundo caso, excitamos a mesma amostra agora com um laser de Ti-Safira para um comprimento de onda de 800 nm e observamos uma intensidade de fluorescência apenas no volume focal. No último caso como a probabilidade de excitação é proporcional ao quadrado da intensidade do laser, logo a absorção induzida por dois fótons ocorre somente no foco, onde o fluxo de fótons é maior. Devido a esse fato temos uma melhoria no contraste das imagens e uma redução da região de foto-interação, diminuindo a foto-degradação total da amostra. Outra grande vantagem de usar TPM é a possibilidade de se obter imagens mais profundas em amostras biológicas, devido à redução de espalhamento Rayleigh, que é inversamente proporcional ao comprimento de onda elevado à quarta potência.

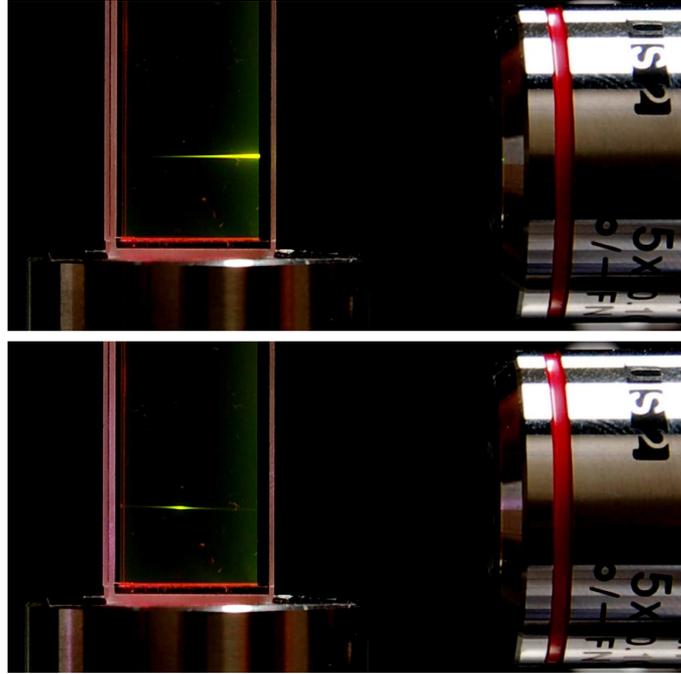


Figura 3.2

Fotografia da fluorescência para uma amostra de rodamina 6G. Acima a fluorescência por absorção de 1 fóton, e abaixo a fluorescência por absorção de dois fótons.

Instrumentação para microscopia por absorção de dois fótons

Como a absorção por dois fótons é um processo de segunda ordem, com uma pequena seção transversal, da ordem de $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s}$, definido como 1 GM em homenagem a Goppert-Mayer, altos fluxos de fótons são necessários para que tenhamos uma eficiente absorção pela amostra. Podemos alcançar essa absorção usando um laser pulsado ultra curto. O número de fótons absorvidos, n_a , por molécula de corante e por pulso é dado pela equação 3.1:

$$n_a \approx \frac{p_0^2 \delta}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{(NA)^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2 \quad (3.1)$$

onde τ_p é a largura temporal do pulso, δ é a seção transversal por absorção de dois fótons para um comprimento de onda λ , p_0 é a potência média do laser, f_p é a taxa de repetição do laser, (NA) é a abertura numérica da objetiva, \hbar é a constante de Planck e c é a velocidade da luz. A equação 3.1 mostra que para uma mesma potência média do laser e uma mesma taxa de repetição, a probabilidade de excitação é aumentada tanto pelo aumento da abertura numérica da objetiva (NA) quanto pela redução da largura temporal do pulso τ_p . O aumento de (NA) corresponde a um confinamento espacial da excitação a um pequeno volume focal.

Para esse tipo de microscopia, temos um laser pulsado femtosegundo, laser de Ti-safira, sintonizável de 680 até 1080 nm, que é capaz de gerar um trem de pulso de 140 fs com uma taxa de repetição de 80 MHz. A figura 3.3 mostra um desenho esquemático da microscopia multifótons. O laser infravermelho (Ti-safira) é direcionado para os espelhos móveis, depois de ser refletido pelo espelho dicróico 1 (um espelho dicróico tem a propriedade de separar a luz conforme determinados comprimentos de onda, ou seja, uma parte é refletida enquanto a

outra é transmitida). Depois dos espelhos móveis, o feixe de laser incide em um espelho e é refletido para a objetiva que excita a amostra. A amostra emite fluorescência que retorna pelo caminho original, agora sendo transmitida pelo espelho dicróico 1. A fluorescência então atinge o espelho dicróico 2, SDM 570, onde comprimentos de onda abaixo de 570 nm são refletidos para o detetor CH1 (fotomultiplicadora, PMT), enquanto que comprimentos de onda acima de 570 nm são transmitidos para o detetor, CH2. Antes de cada detetor temos um par de filtros selecionáveis. No detetor, CH1, temos os filtros passa-banda BA 560-600 e BA 430-460, que são usados para selecionar um intervalo de comprimento de onda do feixe que será transmitido para o mesmo. No detetor, CH2, temos o filtro passa-banda BA 560-600 e o filtro passa-alta BA 565 IF.

Um outro caminho que pode ser utilizado para a coleta da fluorescência é através do detetor CH4. Para detecção, neste caminho inserimos um espelho dicróico 3, logo acima da objetiva, que transmite o infravermelho e reflete os comprimentos de onda do visível. No CH4 temos um filtro passa-banda, para comprimentos de onda na faixa do azul. A coleta da fluorescência do DAPI, corante utilizado na marcação das células do testículo de um porco selvagem, *Tayassu tajacu*, foi feita utilizando o detetor, CH4. Esses resultados, usando a técnica de TPM, serão mostrados na seção 4.3.

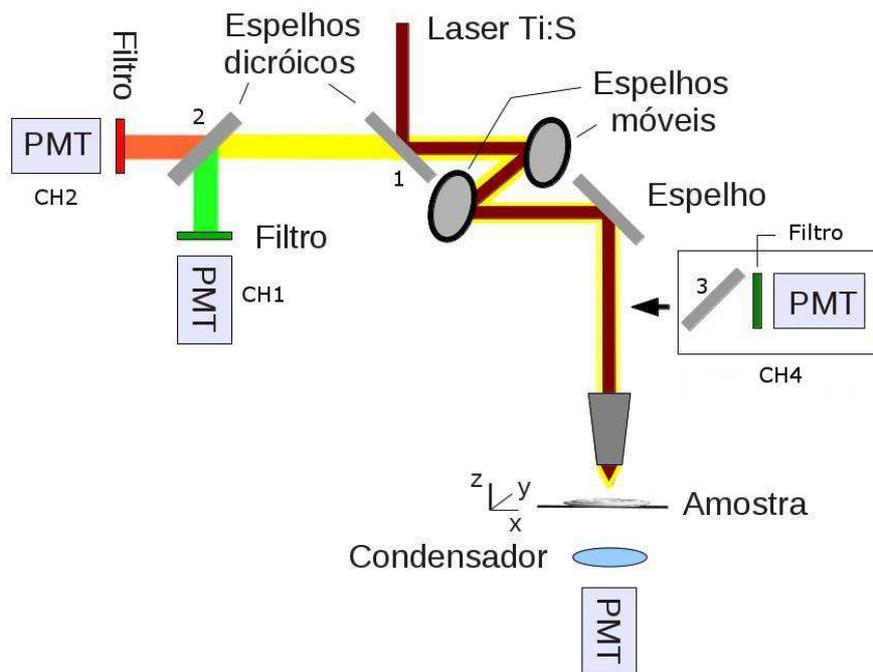


Figura 3.3

Microscopia multifótons. O laser infravermelho (Ti-S) é refletido pelo espelho dicróico 1 para os espelhos móveis e espelho que o direciona para a objetiva do microscópio. A amostra emite fluorescência que retorna pelo caminho original, agora sendo transmitida pelo espelho dicróico 1. O espelho dicróico 2 (com corte em 570 nm) separa a fluorescência em dois detetores (PMT), CH1 e CH2. Comprimentos de onda acima de 570 nm são transmitidos para o detetor, CH2 e comprimentos de onda abaixo de 570 nm são refletidos para o CH1. Filtros passa-banda na frente de cada detetor elimina laser espalhando e seleciona a faixa de banda de fluorescência a ser medida. Inserindo o espelho dicróico 3, que transmite o infravermelho e reflete o visível, podemos detectar a fluorescência no detetor CH4. No CH4 temos um filtro passa-banda no azul. Imagem retirada de [12].

3.2 Espectroscopia de fluorescência por absorção de dois fótons

Utilizamos essa técnica para a obtenção de espectros de TPE para os corantes descritos no capítulo 2 e também para a obtenção da dependência da fluorescência com a potência de excitação.

3.2.1 Montagem experimental

Para a obtenção das medidas de espectroscopia por absorção de dois fótons, implementamos a montagem experimental mostrado na figura 3.4.

Um laser de Ti-safira sintonizável de 690 até 1080 nm é utilizado para excitar a nossa amostra. Um isolador de Faraday é usado para permitir a transmissão da luz em apenas uma direção, ou seja, para evitar que um feixe retorne à cavidade do laser. Uma breve discussão sobre o funcionamento do isolador óptico de Faraday é apresentada no final desta seção.

Uma placa de meia onda e um polarizador são usados para controlar a intensidade de iluminação. Uma placa de meia onda é utilizada para girar o plano de polarização do feixe de 90° . Isto pode ser conseguido com um cristal anisotrópico cujo os índices de refração dependem das direções de propagação (birrefringência). Esse cristal faz com que a diferença de fase entre as componentes emergentes sejam de π , ou seja, a diferença de caminho óptico deve ser de meia onda, $\lambda/2$.

À medida que o nosso pulso se propaga por todo o caminho óptico, fenômenos dispersivos ocorrem, devido a largura espectral do pulso femtosegundos. A origem do fenômeno dispersivo [13] está nas características dos materiais, por exemplo, o índice de refração do meio material por onde o pulso se propaga. Esse fenômeno faz com que cada componente espectral de um mesmo pulso óptico viaje a diferentes velocidades. Após uma certa distância de propagação, estes componentes estarão atrasados entre si e o pulso estará temporalmente alargado. As diferentes velocidades de propagação das componentes espectrais do pulso resultam numa dispersão da velocidade de grupo, ou simplesmente dispersão, que é a medida do alargamento temporal do pulso, numa banda espectral, após sua propagação. Para pré compensar esta dispersão e minimizar a duração do pulso nós usamos um modulador acusto óptico (Dazzler). O funcionamento do dazzler será descrito no final desta seção. Controlando a largura do pulso podemos otimizar a intensidade de fluorescência.

Depois de passar pelo dazzler, um conjunto de íris (Newport M-ID-1.0) e espelhos são utilizados para direcionar o feixe para um espelho dicróico. O espelho dicróico transmite aproximadamente 95% para comprimentos de onda $\lambda \leq 700$ nm e reflete aproximadamente 100% para $\lambda > 700$ nm. Esse dicróico é utilizado para separar a luz de fluorescência da luz de excitação. Uma objetiva de microscópio (Olympus UPLSAPO 20X, N.A. 0,75) é utilizada como lente focalizadora do feixe de laser e lente de coleta da fluorescência. A amostra foi colocada em uma cubeta com dimensões da base de 10×0.4 mm e altura de 5 cm. Uma fibra óptica coleta o sinal de fluorescência, levando-o até um espectrômetro Andor modelo Semrock S301i

com uma CCD (DU401A-BR-DD). Para levar o feixe até a entrada da fibra nós usamos duas lentes focalizadoras. E por fim um filtro foi utilizado para bloquear toda a luz de laser espalhada. A aquisição de dados é feita através do software Andor Solis.

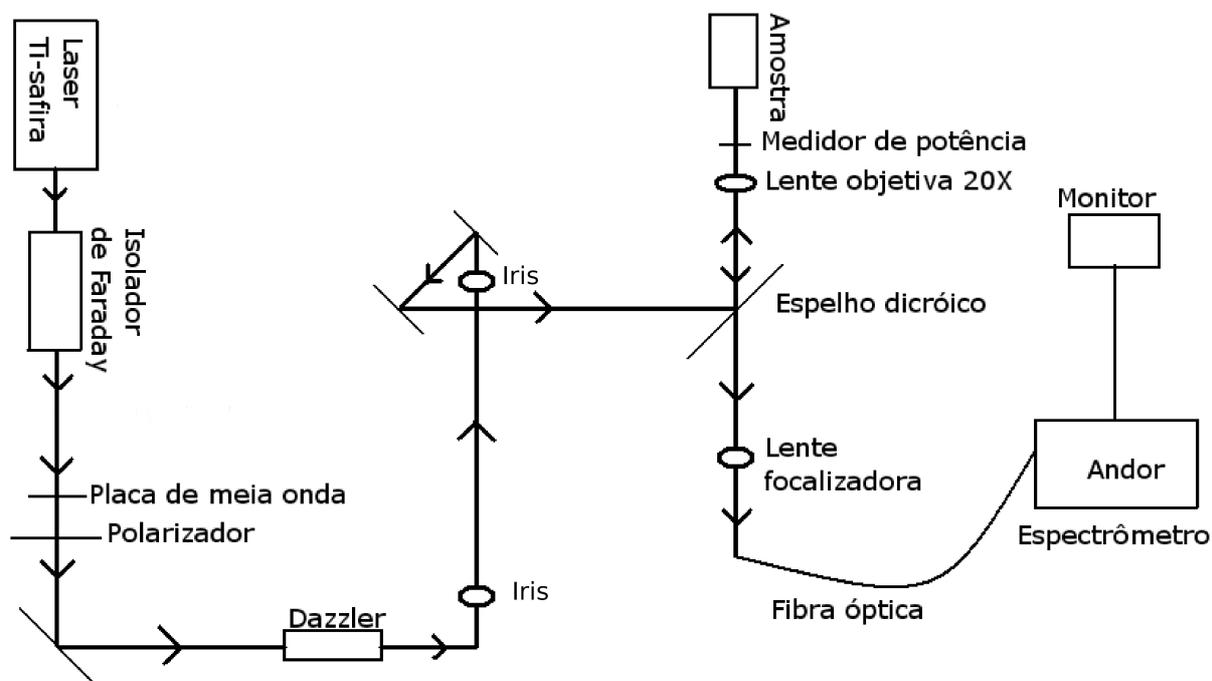


Figura 3.4

Espectroscopia de fluorescência. Um laser de Ti-safira é utilizado para excitar a nossa amostra. O isolador de Faraday é usado para permitir a transmissão da luz em apenas uma direção e evitar que feixes refletidos retorne à cavidade do laser. Uma placa de meia onda e um polarizador são usados para controlar a intensidade de iluminação. Para reduzir a dispersão do pulso utilizamos um modulador acusto óptico (Dazzler). Depois de passar pelo dazzler, um conjunto de íris (Newport M-ID-1.0) e espelhos são utilizados para direcionar o feixe para um espelho dicróico. Uma objetiva de microscópio (Olympus UPLSAPO 20 \times e N.A. 0,75) é utilizada como lente focalizadora do feixe de laser e lente de coleta da fluorescência. Uma fibra óptica coleta o sinal de fluorescência, levando-o até um espectrômetro Andor modelo Semrock S301i com uma CCD (DU401A-BR-DD). Para levar o feixe até a entrada da fibra nós usamos duas lentes focalizadoras. Um filtro foi utilizado para bloquear toda a luz de laser espalhada.

Isolador de Faraday

Um rotor de Faraday é utilizado para girar a polarização da luz. O rotor de Faraday [14] e [15], descoberto em 1845 por Michael Faraday, é um dispositivo magneto-óptico, onde a luz é transmitida através de um meio transparente a qual é exposta a um campo magnético. As linhas de campo magnético têm aproximadamente a mesma direção do feixe de laser, ou direções opostas. Se a luz é linearmente polarizada na mesma direção do campo magnético, esta direção de polarização é continuamente girada durante a passagem através do meio. O ângulo total de giro β pode ser calculado como:

$$\beta = \nu B d \quad (3.2)$$

Onde ν é uma constante característica de resposta do material ao campo magnético, constante de Verdet, B é a densidade de fluxo magnético (na direção de propagação) e d é o comprimento do meio do rotor. O campo magnético é usualmente gerado com um conjunto de ímãs permanentes e materiais ferromagnéticos, que são otimizados para que os objetivos sejam conseguidos.

Um aspecto importante é que a mudança na direção de polarização é somente definida pela direção do campo magnético e o sinal da constante Verdet. No que diz respeito à origem física da rotação da polarização, pode-se considerar um feixe linearmente polarizado como a superposição de dois feixes circularmente polarizados. O campo magnético causa uma diferença na velocidade de fase entre estas componentes circularmente polarizadas. O resultado é um relativo deslocamento de fase correspondente a uma mudança na direção linear de polarização.

Um isolador de Faraday é feito de três partes: um polarizador de entrada (no nosso caso: polarização horizontal), um rotor de Faraday e um polarizador de saída, chamado um analisador (polarizado a 45°). A luz que viaja para frente se torna polarizada horizontalmente pelo polarizador de entrada. O rotor de Faraday vai rodar a polarização em 45° . O analisador em seguida, permite que a luz seja transmitida através do isolador. A luz que viaja no sentido inverso torna-se polarizada em 45° pelo analisador. O rotor de Faraday vai rodar novamente a polarização em 45° . Isto significa que a luz é polarizada verticalmente. Como o polarizador de entrada é alinhado horizontalmente, a luz será extinta. Em um isolador de Faraday o rotor é escolhido para dar uma rotação de 45° .

Dazzler

O modulador acusto-óptico programável, Dazzler, é baseado em um cristal de TeO_2 modulado por uma onda acústica, em radio-frequência, propagando colinear com o feixe de laser no cristal [16]. A onda acústica modula o cristal criando uma rede de difração programável que difrata o feixe do modo 1 para o modo 2, veja a figura 3.5 O laser incidente no cristal percebe um índice de difração diferente em cada eixo do cristal birefringente (eixo ordinário, modo 1, e eixo extraordinário, modo 2). A rede de difração programada é eficiente apenas para uma frequência dentro da faixa de frequências do pulso de laser. Assim controlando a forma e o tempo de lançamento da onda acústica no cristal é possível difratar comprimentos de onda diferentes dentro do pulso em posições diferentes ao longo da propagação no cristal.

A amplitude da onda acústica controla a intensidade difratada. Portanto, é possível modular tanto a amplitude como a fase do pulso difratado. Os pulsos no modo 1 e modo 2 emergem do cristal em posições e ângulos diferentes, permitindo selecionar um trem de pulsos modulado (no modo 2) para ser usado em experimentos. Com o modulador Dazzler podemos programar os valores de segunda, terceira e quarta ordem da fase da onda do pulso difratado, permitindo diminuir a dispersão do pulso ou o alargamento temporal do mesmo.

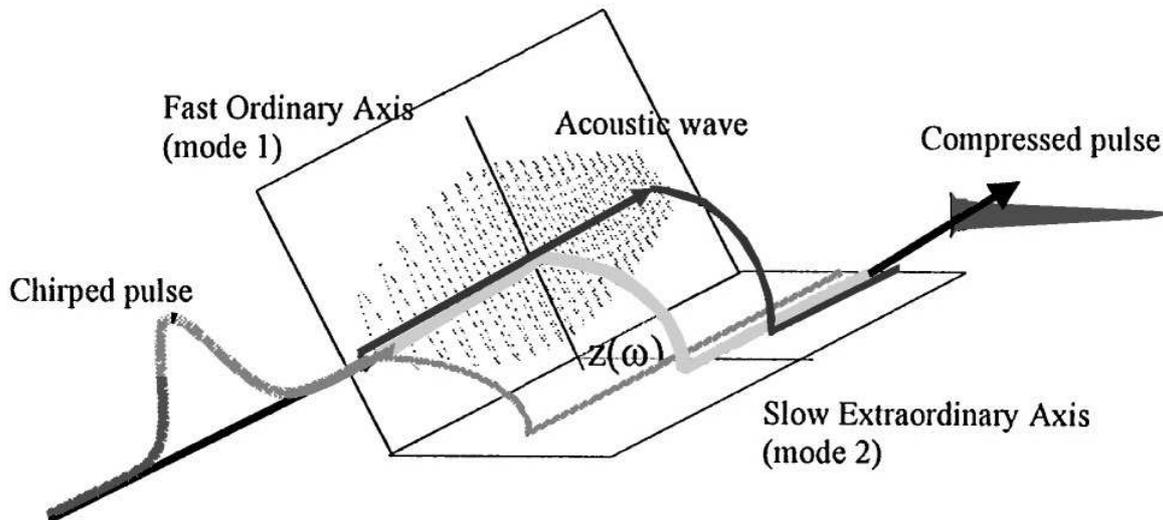


Figura 3.5

Esquema de funcionamento do modulador acusto-óptico, Dazzler (da referência [16]).

Calibração da transmissão da objetiva no infravermelho

Para as medidas de TPE é necessário variar o comprimento de onda de excitação, mantendo a potência na amostra fixa. Como não foi possível inserir o medidor de potência entre a objetiva e a amostra, por falta de espaço, tivemos que fazer uma calibração da potência transmitida pela objetiva para os vários comprimentos de onda a serem medidos. Para essa calibração sintonizamos uma potência antes da objetiva de 5 mW e medimos a potência depois da objetiva, sem amostra, para comprimentos de onda de 700 até 1000 nm. A tabela 3.1 mostra os dados dessa calibração. A potência transmitida diminuiu com o aumento do comprimento de onda, pois a objetiva não é otimizada para o infravermelho.

Comprimento de onda (nm)	Porcentagem de potência depois da objetiva (%)
700	92
710	90
720	90
730	90
740	88
750	88
760	86
770	86
780	86
790	84
800	82
810	82
820	80
830	78
840	76
850	76
860	74
870	74
880	74
890	72
900	72
910	70
920	70
930	70
940	68
950	68
960	66
970	66
980	64
990	62
1000	62

Tabela 3.1

Potência transmitida pela objetiva.

3.2.2 Absorção de Dois Fótons, Parte Teórica

Usando suposições equivalentes aos da lei de Lambert Beer para 1PA, [17] a atenuação de um feixe de luz exclusivamente de 2PA é dado pela equação 3.3:

$$\frac{\partial I}{\partial Z} = -N_m \alpha_2 I^2 = -N_m \delta F I \quad (3.3)$$

onde I é a intensidade de excitação, Z é a distância que a luz percorre o meio, N_m é o número de moléculas por unidade de volume e α_2 é o coeficiente molecular de 2PA. A intensidade pode também ser expressada em termos do fluxo de fótons, $F = I/h\nu$. Na equação 3.3, δ é conhecido como a seção de choque de 2PA, ou seja, a probabilidade da molécula de absorver dois fótons. Se o feixe de luz é plano polarizado, o valor de δ para uma transição do estado fundamental g para um estado final f é dado pela seguinte equação 3.4:

$$\delta_{max} = \frac{2\pi h\nu^2 L^4}{\varepsilon_0^2 n^2 c^2} \left(\frac{1}{\Gamma}\right) S_{fg} \quad (3.4)$$

onde:

$$S_{fg} = \left[\sum_i \frac{\langle \mu_{gi} \mu_{if} \rangle}{(E_{gi} - h\nu)} \right]^2 \quad (3.5)$$

Aqui, E_{gi} é o intervalo de energia entre o estado fundamental e um estado intermediário i e Γ é a meia largura para uma banda máxima de 2PA em unidades de energia. O somatório é sobre todos os estados da molécula. O fator $L = (n^2 + 2)/3$, onde n é o índice de refração, representa o aprimoramento do campo óptico do meio relativo ao vácuo. O termo μ_{kl} é a amplitude de oscilação do momento de dipolo induzido pelo campo elétrico de um feixe de luz cuja frequência corresponde a diferença de energia entre os estados k e l . As várias transições dos vetores momento de dipolo μ_{kl} giram com a molécula em solução, assim uma média de sua projeção deve ser feita sobre todas as orientações da molécula. Essa média não é simples, mas o resultado é um $1/5$ se todos os momentos μ_{gi} e μ_{if} são co-paralelos. Isto é verdadeiro na grande maioria dos absorvedores de dois fótons, assim podemos omitir a notação vetorial, equação 3.6:

$$S_{fg} = \frac{1}{5} \left[\left(\frac{\Delta\mu_{gf} \mu_{gf}}{h\nu} \right)^2 + \sum_{i \neq f,g} \left(\frac{\mu_{gi}^2 \mu_{if}^2}{(E_{gi} - h\nu)^2} \right) \right] \quad (3.6)$$

Onde a primeira parte da equação 3.6 é o termo D, Dipolar, e a última parte é o termo T, de dois fótons. O fator $\Delta\mu_{gf}$ representa a mudança no momento de dipolo estático do estado final relativo ao estado fundamental.

Em todas as moléculas centro simétricas todos os momentos de dipolo estático são zero e o termo D é nulo. Então a seção de choque de absorção por 2PA é dominada pela interação do estado fundamental com os dois estados excitados. Em tais casos, o somatório na equação 3.6 é reduzido a um único termo e a seção de choque de 2PA pode ser aproximada pela equação 3.7, onde C é uma constante.

$$\delta_{max} \approx C \frac{\mu_{gi}^2 \mu_{if}^2}{((E_{gi}/h\nu) - 1)^2 \Gamma} \quad (3.7)$$

Os três estados essenciais neste modelo têm simetrias alternadas: ambas as funções de onda, estados fundamental e final $|g\rangle$ e $|f\rangle$, são simétricos com relação ao centro de inversão, enquanto que o estado intermediário, $|i\rangle$, é anti-simétrico. Para uma molécula linear de simetria D_{2h} esses estados são classificados como $1A_g$, $1B_{1u}$ e $2A_g$ mostrado na figura 3.6, retirada da referência [17].

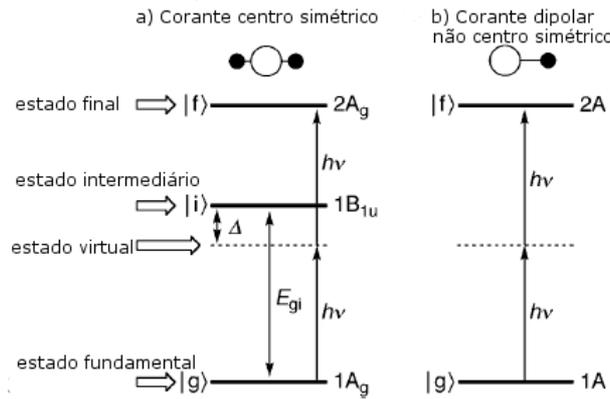


Figura 3.6

Diagrama de níveis de energia para os estados essenciais. Os estados são classificados por simetrias D_{2h} e C_2 , mas o diagrama é geral para a transição mais baixa de 2PA em algumas moléculas centro simétricas ou não centro simétricas.

No caso de 2PA, a frequência óptica ν não está em ressonância com essas transições, mas ela cria um estado virtual, não estacionário, que é uma superposição de $|g\rangle$ e $|i\rangle$. Esse estado virtual existe somente enquanto a molécula recebe o campo do primeiro fóton. A presença de $|i\rangle$ com paridade ímpar, nesta superposição, permite que um segundo fóton de frequência ν induza uma transição de dipolo elétrico para o estado final $|f\rangle$ de paridade par. A transição $1A_g \leftrightarrow 2A_g$ é então permitida para 2PA, mas proibida em 1PA. Essa inversão nas regras de seleção entre 1PA e 2PA é geral para todos os corantes centro simétricos. Em moléculas não centro simétricas a transição $g \leftrightarrow f$ de dipolo elétrico, figura 3.6, é permitida e o termo D da equação 3.6 é não nulo. Neste caso $|f\rangle$ desempenha o papel de $|i\rangle$ e a transição ocorre para 1PA e 2PA. O termo T tem uma pequena contribuição em corantes dipolares, pois ele está relacionado com os estados mais elevados. Neste caso como $|i\rangle$ está acima de $|f\rangle$, assim $\Delta > h\nu$. Agora se $|i\rangle$ é menor que $|f\rangle$, como na figura 3.6a), então $\Delta < h\nu$ e o termo D para corantes dipolares na equação 3.6, assumindo $\Delta\mu_{kl} \approx \mu_{kl}$, é intrinsecamente menor que o termo T para sistemas centro simétricos.

A fluorescência é decorrente de uma interação entre o corante e o campo eletromagnético de excitação. Esse processo é descrito pela equação de Schrödinger dependente do tempo, em que o Hamiltoniano contém um termo de interação de dipolo elétrico: $\vec{E}_\gamma \cdot \vec{r}$, onde \vec{E}_γ é o vetor campo elétrico dos fótons e \vec{r} é o operador posição. Esta equação pode ser resolvida por teoria de perturbação. A solução de primeira ordem corresponde à excitação de um fóton (OPE) e as

transições multi-fótons são representadas pelas soluções de altas ordens. No caso de TPE, a probabilidade de ocorrer uma transição entre o estado inicial da molécula $|i\rangle$ e o estado final $|f\rangle$ é dado por:

$$P \approx \left| \sum_m \frac{\langle f | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | m \rangle \langle m | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | i \rangle}{\epsilon_\gamma - \epsilon_m} \right|^2 \quad (3.8)$$

onde ϵ_γ é a energia fotônica associada com o vetor campo elétrico \vec{E}_γ , o somatório é sobre todos os estados m e ϵ_m é a diferença de energia entre o estado m e o estado intermediário. Note que o operador de dipolo tem paridade ímpar e a transição de momento de um fóton $\langle f | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | i \rangle$ nos diz que os estados inicial e final têm paridade opostas. O momento de dois fótons $\langle f | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | m \rangle \langle m | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | i \rangle$ permite transições em que os dois estados têm a mesma paridade [11].

Efeitos de Saturação

Um importante fator, baseado em fotodegradação da amostra, é dado pela saturação da fluorescência [1]. Para intensidades de excitações, I , maior que um valor limite, I_{sat} , a fluorescência diminui menos rapidamente que $\cong I$ para 1PE (do inglês one photon excitation), ou $\cong I^2$ para 2PE (do inglês two photon excitation).

3.2.3 Seção de choque por absorção de dois fótons

Como TPE [18] é um processo de segunda ordem, o número de fótons absorvidos por cada molécula, por unidade de tempo, é proporcional à seção de choque por absorção de dois fótons δ e também proporcional ao quadrado da intensidade incidente I . Em um experimento particular, o número total de fótons absorvidos por unidade de tempo N_{abs} é também uma função da concentração do corante C e do volume de amostra iluminado:

$$N_{abs}(t) = \int_V dV \delta C(r, t) I^2(r, t) \quad (3.9)$$

Na ausência de saturação e fotodegradação, $C(r, t)$ pode ser assumido como uma constante. Contudo no caso quando separamos a dependência temporal e espacial da intensidade de excitação, nós temos:

$$N_{abs}(t) = \delta I_0^2(t) \int_V dV S^2(r) \quad (3.10)$$

Onde $S(r)$ e $I_0(t)$ descrevem as distribuições espaciais e temporais do feixe incidente, ou seja, $I(r, t) = S(r)I_0(t)$.

Assumindo que não exista nenhuma emissão estimulada, o número de fótons fluorescentes coletados por unidade de tempo $F(t)$ é dado por:

$$F(t) = 1/2 \phi \eta_2 N_{abs} \quad (3.11)$$

Onde η_2 e ϕ são a eficiência quântica de fluorescência do corante e a eficiência de coleta da fluorescência do sistema de medida, respectivamente. Aqui o fator 1/2 reflete o fato de que dois

fótons são necessários para cada evento de excitação. Na prática somente a média temporal do fluxo de fótons fluorescentes $\langle F(t) \rangle$ é medido:

$$\langle F(t) \rangle = 1/2\phi\eta_2 C\delta \langle I_0^2(t) \rangle \int_V dV S^2(r) \quad (3.12)$$

Nós notamos que $\langle F(t) \rangle$ é proporcional a $\langle I_0^2(t) \rangle$, e não a $\langle I_0(t) \rangle^2$. Como a maioria dos detectores dão somente um sinal, que é proporcional a $\langle I_0(t) \rangle$, nós reescrevemos a equação 3.12 em termos da intensidade média:

$$\langle F(t) \rangle = 1/2g\phi\eta_2 C\delta \langle I_0(t) \rangle^2 \int_V dV S^2(r) \quad (3.13)$$

Onde $g = \langle I_0^2(t) \rangle / \langle I_0(t) \rangle^2$ é uma medida da coerência temporal de segunda ordem da fonte de excitação.

A distribuição espacial de intensidade tridimensional, no ponto focal, de uma lente objetiva, com uma iluminação uniforme, é dado pela equação 3.14:

$$\int_{V \rightarrow \infty} S^2(r) dV \approx \frac{8n\lambda^3}{\pi^3(N.A.)^4} \quad (3.14)$$

A equação 3.14 é válida para amostras espessas tal que a mesma seja muito mais espessa que a largura do foco. A relação entre a intensidade no ponto focal geométrico I_0 e a potência instantânea incidente P é dado pela equação 3.15:

$$I_0(t) = \frac{\pi(N.A.)^2}{\lambda^2} P(t) \quad (3.15)$$

onde $N.A./\lambda$ é uma aproximação para o raio do feixe no plano focal. Substituindo a equação 3.15 e a relação 3.14 na equação 3.13 nós encontramos a média temporal do fluxo de fótons detectados:

$$\langle F(t) \rangle = 1/2g\phi\eta_2 C\delta \frac{8n \langle P(t) \rangle^2}{\pi\lambda} \quad (3.16)$$

Para uma excitação pulsada o valor de g , que mede o grau de coerência temporal de segunda ordem, é dado pela equação 3.17:

$$g = g_p / (f\tau) \quad (3.17)$$

$$g_p = \tau \int_{-1/(2f)}^{1/(2f)} I_0^2(t) dt / \left[\int_{-1/(2f)}^{1/(2f)} I_0(t) dt \right]^2 \quad (3.18)$$

Onde f é a taxa de repetição do pulso e τ é a largura do pulso. O valor de g para um modo pulsado é maior do que para um modo CW, logo nesse último caso precisamos de maior potência para excitar a amostra.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Espectroscopia de absorção e emissão

Inicialmente apresentamos os espectros de absorção e espectros de fluorescência para os vários corantes descritos no capítulo 2. Os espectros de absorção foram obtidos utilizando o espectrômetro UV-VIS-NIR (UV-3600 Shimadzu) do laboratório Raman (Dep. Física, UFMG)fei.

4.1.1 Medidas de absorção

Preparamos uma amostra de Rodamina 6G de concentração $C = 20 \mu M$. Para essa preparação diluimos 1 mg de rodamina 6G em 1 ml de PBS (solução salina). Depois misturamos 10 μl dessa solução em 1 ml de PBS, obtendo agora uma solução de concentração $C = 9,9 \mu g/ml$. Para converter para concentração molar, usamos uma relação de proporcionalidade. Para rodamina 6G, $1 M = 1 mol/L = 479,02 g/L$. Então $C = 9,9 \mu g/ml$ equivale a uma concentração molar de $C = 21 \mu M$.

Preparada a amostra e usando espectroscopia de absorção, medimos o espectro de absorção por um fóton (1PA) para a amostra de rodamina 6G. Nesse experimento temos como fonte de excitação uma lâmpada que emite uma ampla faixa de comprimentos de onda. Nesse caso sintonizamos uma faixa de 200 até 600 nm. O espectro da rodamina 6G está mostrado na figura 4.1. Percebemos que uma parte pequena do espectro está abaixo de zero. Para verificar isso, medimos a linha de base da água e a mesma ficou também abaixo de zero. Isso ocorreu também com a amostra de DAPI. Para apresentarmos o eixo y em termos do coeficiente de extinção molar, usamos a relação da lei de Lambert-Beer, $A = \epsilon lc$. Onde A é a absorbância, ϵ é o coeficiente de extinção molar, l é a distância percorrida pela radiação através da solução e c é a concentração. Para a nossa medida $l = 1 cm$.

O pico mais intenso no espectro corresponde a um estado excitado de não equilíbrio S_1 , como mostra a seção 2.1. Tentativas anteriores a essa, para a obtenção do espectro de absorção, não deram certo, principalmente por causa da concentração elevada da solução. Uma concentração elevada faz com que a fluorescência da amostra interfira no espectro de absorção. Por esse motivo diluimos nossa solução de 0,5 mg/ml para $9,9 \mu g/ml$. Podemos comparar esse espectro

com resultados da literatura, figura 4.2(a) retirada do artigo [5]. Na figura 4.2(a) o solvente mais parecido com o que utilizamos, PBS, é a água. Esses espectros são bem parecidos, porém os coeficientes de extinção molar estão diferentes.

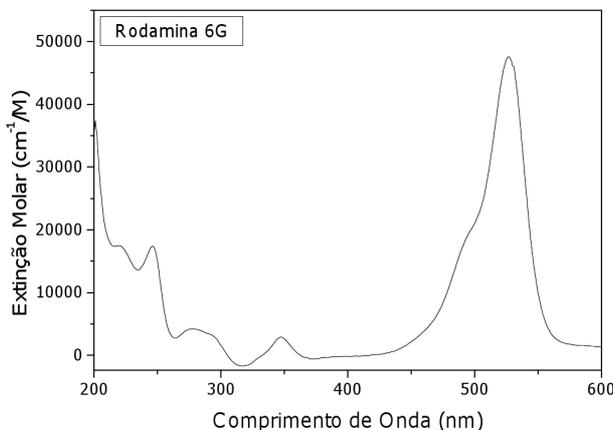
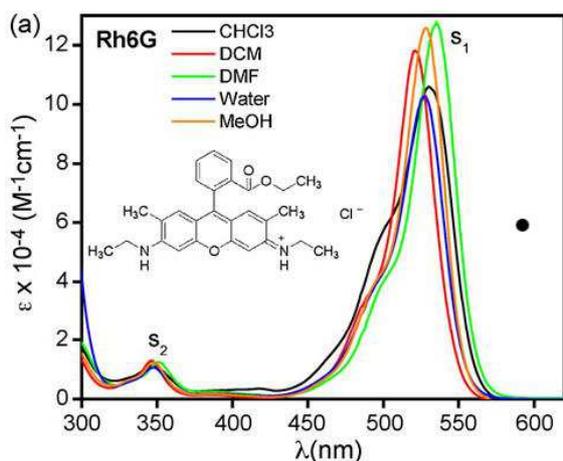
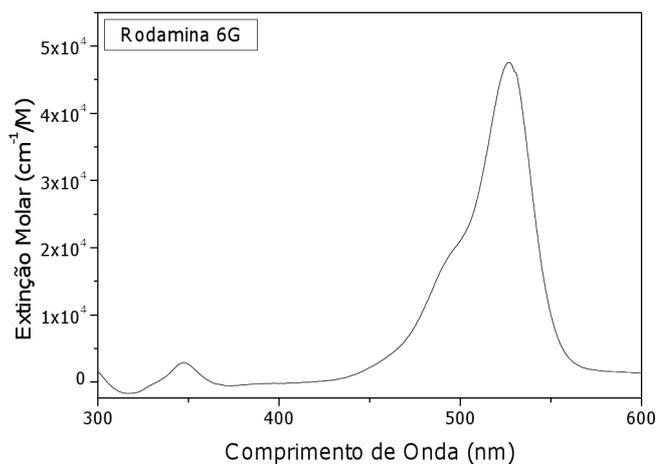


Figura 4.1
Espectro de absorção por 1 fóton para rodamina 6G, $C = 21 \mu M$.



(a) Espectro de absorção da rodamina 6G em vários solventes. Figura retirada de [5]



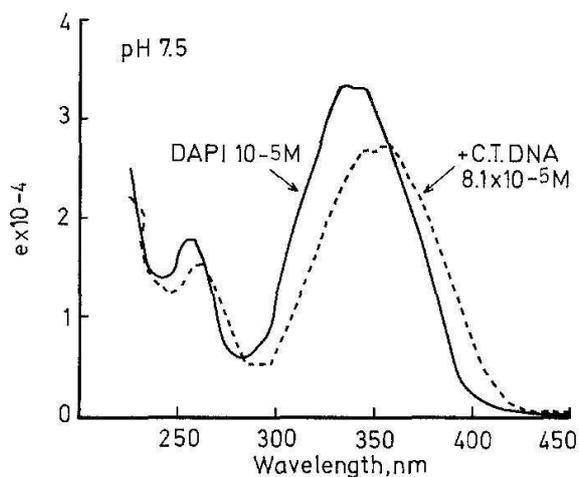
(b) Espectro de absorção da rodamina 6G dissolvida em PBS

Figura 4.2
Espectros de absorção da rodamina 6G em vários solventes.

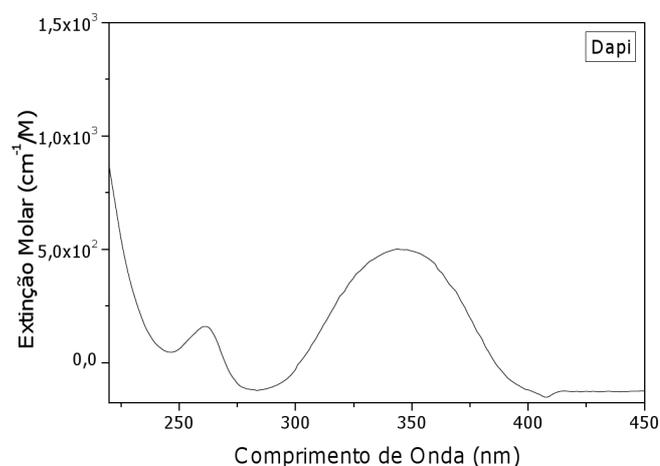
Os espectros de absorção para os corantes DAPI e ER-tracker red estão apresentados nas figuras 4.3 e 4.4. Como já descrito para a rodamina 6G, usamos a lei de Lambert-Beer para converter absorbância em coeficiente de extinção molar. Apresentamos também uma comparação entre os espectros de absorção que medimos e os da literatura.

A solução DAPI foi preparada, diluindo $42 \mu l$ de DAPI, concentração inicial de $C=1 \text{ mg/ml}$, em 1 ml de PBS, obtendo a concentração final de $C=40 \mu g/ml$. Convertendo para concentração molar temos $C = 144 \mu M$.

A solução de ER-tracker red foi preparada, diluindo $6 \mu l$ de ER-tracker red, concentração inicial de $C=1 \text{ mM}$, em 1 ml de (DMSO), obtendo a concentração final de $C=6 \mu M$.



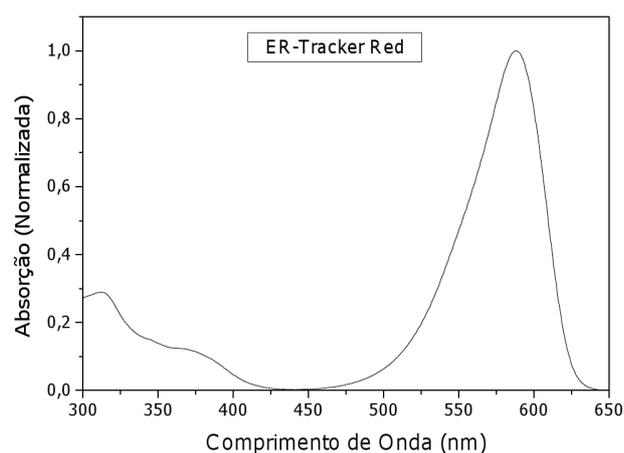
(a) Espectro de absorção do DAPI ligado e não ligado ao DNA em 5 mM de PO_4 , 1 mM de EDTA, pH 7.5. e = Coeficiente de extinção molar. Gráfico retirado de [19]



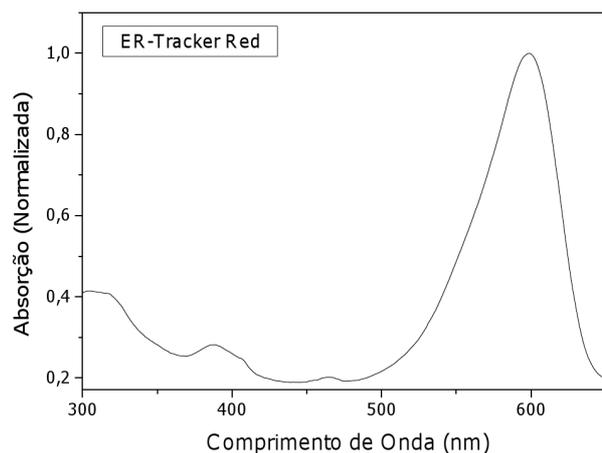
(b) Espectro de absorção para o corante DAPI dissolvido em PBS

Figura 4.3

Comparação dos espectros de absorção para o corante DAPI em diferentes solventes.



(a) Espectro de absorção normalizado para o corante ER-tracker red. O solvente utilizado não está especificado na literatura. Tabela de dados retirada de [20]



(b) Espectro de absorção normalizado do corante ER-tracker red dissolvido em DMSO

Figura 4.4

Comparação dos espectros de absorção normalizado para o corante ER-tracker red.

Das figuras 4.3 e 4.4, obtemos os valores do pico máximo de absorção que correspondem aproximadamente a comprimentos de onda de excitação de 346 nm para o DAPI e 598 nm para o ER-tracker red.

4.1.2 Espectros de Fluorescência

Utilizando a montagem experimental descrita no capítulo 3, mostrada na figura 3.4, medimos os espectros de fluorescência para os corantes estudados: rodamina 6G, ER-tracker red, DAPI, alexa 488 e alexa 546. As concentrações das soluções de corantes são as apresentadas na tabela 2.1. Os comprimentos de onda de excitação, potências de laser (medidas antes da objetiva) e tempos de integração utilizados estão descritos na tabela 4.1.

Corante	λ (nm)	Potência (mW)	Tempo de integração (s)
Rodamina 6G	820	30	1
ER-tracker red	730	120	2
DAPI	950	90	30
Alexa 488	810	80	20
Alexa 546	800	70	20

Tabela 4.1

Tabela de dados, espectros de fluorescência.

Os espectros estão mostrados nas figuras 4.5, 4.6 e 4.7. Caso haja transições eletrônicas por um e dois fótons para um mesmo estado excitado, os espectros de fluorescência são os mesmos nos dois casos no processo de emissão. Para todos os espectros, subtraímos o background (linha de base) e dividimos cada um deles pelos seus respectivos tempos de integração, potências de excitação ao quadrado e concentrações.

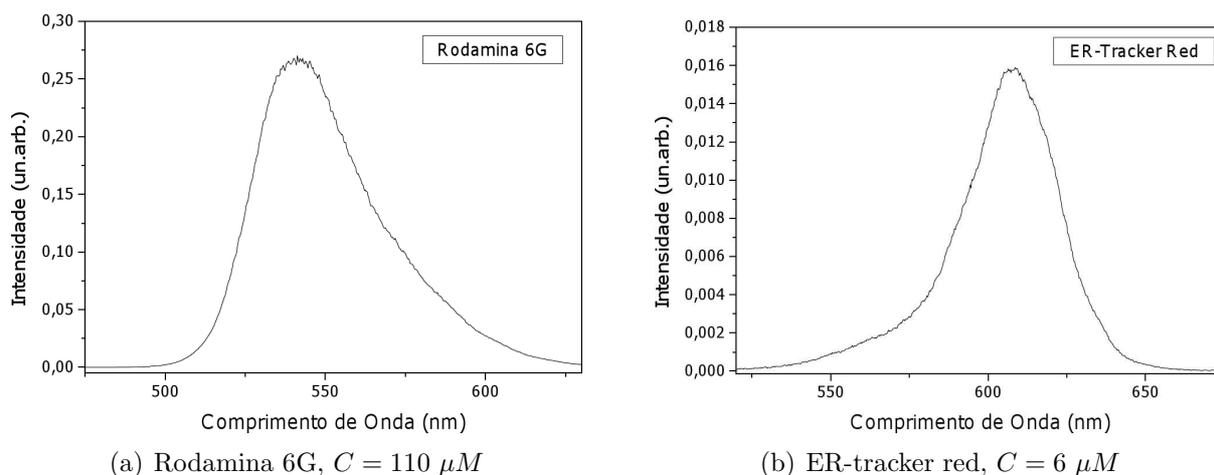


Figura 4.5

Espectros de fluorescência para rodamina 6G e ER-tracker red.

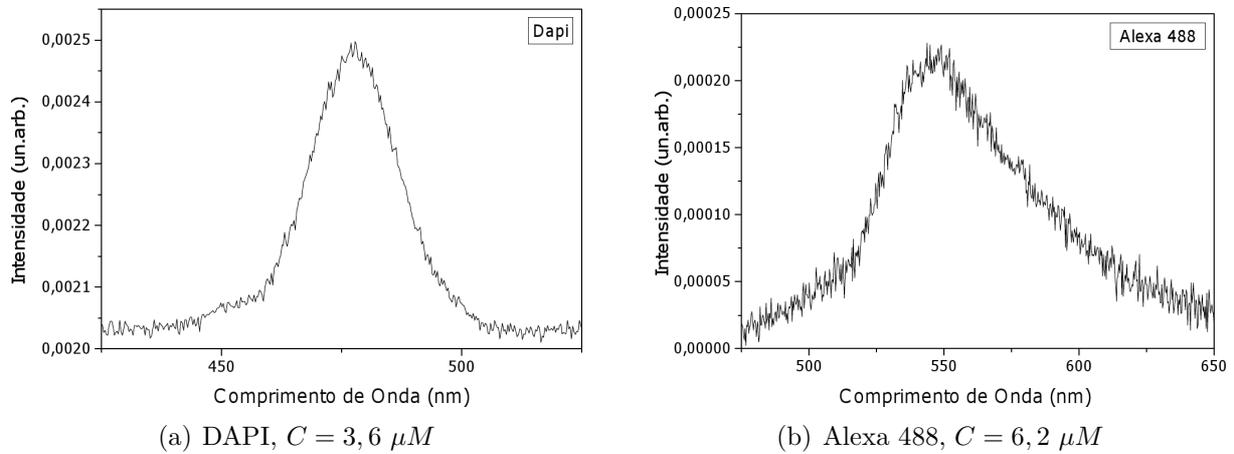


Figura 4.6
Espectros de fluorescência para DAPI e alexa 488.

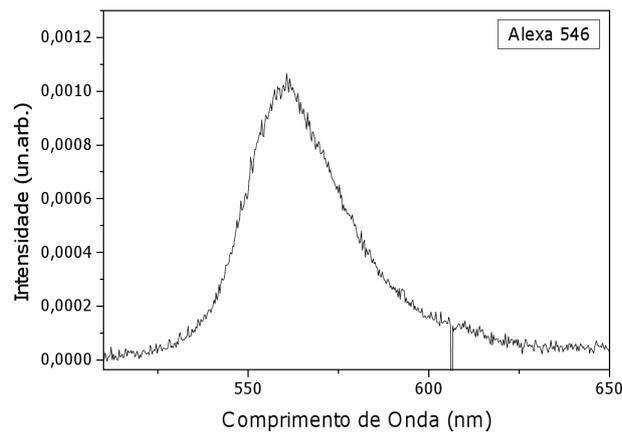


Figura 4.7
Espectro de fluorescência para alexa 546, $C = 3,7 \mu M$.

4.2 Seção transversal de TPE para alguns corantes importantes na biologia

Para obter a seção transversal TPE medimos o espectro de fotoluminescência variando o comprimento de onda de excitação na faixa de 700 a 1000 nm com passos de 10 em 10 nm. Para estas medidas mantemos fixa a potência antes da objetiva, e calculamos a potência na amostra através da medida de transmissão da objetiva (veja tabela 3.1). Para cada espectro de fotoluminescência medimos o valor da intensidade no pico de emissão e plotamos em função de comprimento de onda.

4.2.1 Otimização da segunda ordem da fase do pulso de laser

Inicialmente, para garantir a melhor configuração para a obtenção da mais alta intensidade da fluorescência por absorção de dois fótons, utilizamos o modulador acústico óptico programável (dazzler). Com isso podemos reduzir a dispersão de segunda ordem do pulso, ou seja, otimizar o alargamento temporal do mesmo, causado pelos componentes ópticos no caminho do pulso.

Para otimizar a dispersão de segunda ordem, medimos para uma amostra de rodamina 6G, dissolvida em PBS e concentração molar de 1 mM, a intensidade de fluorescência em função do fator de dispersão de segunda ordem da fase do pulso (veja a descrição de funcionamento do Dazzler), figura 4.8.

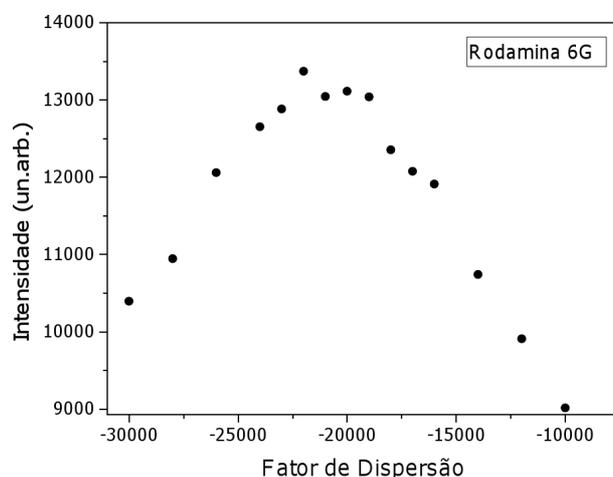


Figura 4.8

Intensidade de fluorescência em função do fator de dispersão da fase do pulso, comprimento de onda de excitação 790 nm.

O resultado mostrado na figura 4.8 foi obtido utilizando um laser de Ti-safira, modo pulsado, cujo comprimento de onda de excitação foi de 790 nm. A potência antes da objetiva, ou seja, antes de atingir a amostra foi de 80 mW. Mantendo o comprimento de onda de excitação fixo em 790 nm variamos, usando o software do dazzler, o fator de dispersão e coletamos para cada um desses valores o espectro de emissão. Variar o fator de dispersão resulta em

diminuir o alargamento temporal do pulso. Depois, medimos para cada espectro o valor da intensidade de fluorescência na posição do pico máximo e obtemos o gráfico apresentado na figura 4.8. Os espectros de emissão foram visualizados através do software Andor solis, que vem acompanhando o espectrômetro. Para essa medida usamos um tempo de integração de 10 s.

Observando o gráfico, percebemos que a intensidade de fluorescência têm seus maiores valores para fatores de dispersão de segunda ordem no intervalo de -23000 até -20000 fs^2 . Estes valores, são os valores necessários para pré-compensar as dispersões nos componentes ópticos (objetiva, isolador de Faraday, etc) na nossa montagem. Nas medidas posteriores, nós usamos um fator de dispersão de segunda ordem de -22000 fs^2 , onde obtivemos a fluorescência máxima.

4.2.2 Espectro TPE para a rodamina 6G

Para a obtenção da seção transversal de TPE, usamos a equação 3.16. Trabalhando esta equação chegamos na seguinte relação, equação 4.1:

$$\delta = \frac{\langle F(t) \rangle \lambda}{\eta_2 B \langle P(t) \rangle^2} \quad (4.1)$$

Onde B é igual a:

$$B = \frac{8g\phi Cn}{2\pi} \quad (4.2)$$

O valor de B é fixo, pois os valores do grau de coerência temporal de segunda ordem g, a eficiência de coleta de fluorescência ϕ , a concentração da amostra C e o índice de refração n da amostra permanecem os mesmos durante a medida de PLE. $\langle F(t) \rangle$ é o fluxo médio de fótons que coletamos através do espectrômetro. O valor da potência depois da objetiva, $\langle P(t) \rangle$, que aparece na equação 4.1 foi obtido utilizando um medidor de potência, veja a descrição da montagem experimental.

As seções transversais de TPE foram obtidas calculando, para cada comprimento de onda do PLE normalizado, os valores de δ , usando a equação 4.1. A unidade de medida da seção transversal por absorção de dois fótons é GM, em homenagem a Maria Goeppert-Mayer. A unidade um GM é igual a $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s} \text{ foton}^{-1}$. Os espectros de PLE normalizados foram obtidos multiplicando o PLE pelo comprimento de onda de excitação e dividindo-o pela potência de excitação depois da objetiva ao quadrado. Os valores da potência depois da objetiva foram obtidos usando uma regra de proporcionalidade com os valores da potência antes da objetiva e a tabela de potência. Para fazer os calculos representados pela equação 4.1 precisamos encontrar os valores de B, equação 4.2, para cada um dos corantes. O valor de B para a rodamina 6G foi obtido igualando a intensidade do PLE normalizado com a intensidade do espectro de TPE retirado da literatura, figura 4.9, para um comprimento de onda de 820 nm.

Nessa análise, usamos a equação 4.1. Para encontrar o valor de B da rodamina 6G, preparamos uma solução de concentração $110 \mu\text{M}$, que é a mesma no espectro da literatura. Como o

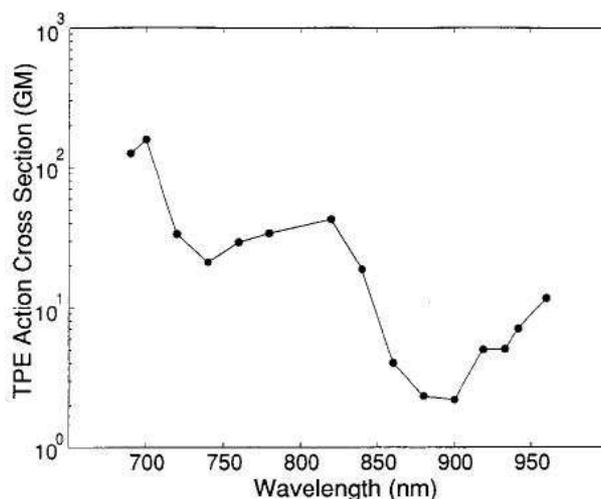


Figura 4.9

TPE rodamina 6G em escala logarítmica dissolvida em MeOH. Figura retirada de [21].

valor de B depende da concentração, seu valor será diferente para cada um dos corantes. Obtido o valor de B para a rodamina 6G, encontramos o valor do termo $8g\phi n/2\pi$, representado pela equação 4.2, pois sabemos a sua concentração ($110 \mu M$). Estamos considerando que o valor desse termo é fixo para a nossa montagem, o que na prática não é verdade, pois ao retirarmos uma cubeta com uma determinada amostra e colocarmos uma outra podemos estar mudando a eficiência de coleta ϕ . Esse é uma das dificuldades de comparar os espectros de TPE ente si.

Para tentarmos estimar esse erro, fizemos duas medidas da seção transversal de TPE para a amostra de rodamina 6G. Entre uma medida e outra, retiramos e colocamos a cubeta com a solução de rodamina 6G da montagem experimental. Esse resultado está mostrado na figura 4.10. Assim calculamos uma barra de erro que corresponde a diferença entre a média da seção transversal dos espectros de TPE e a seção transversal dos espectros de TPE individuais.

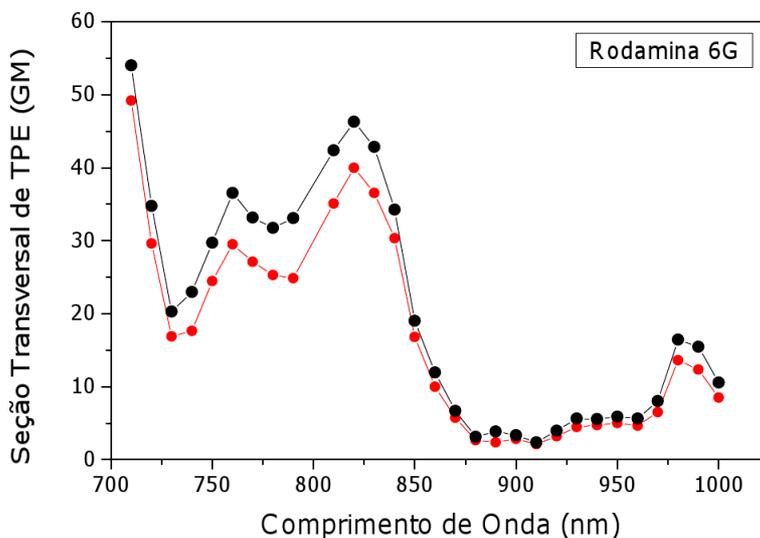
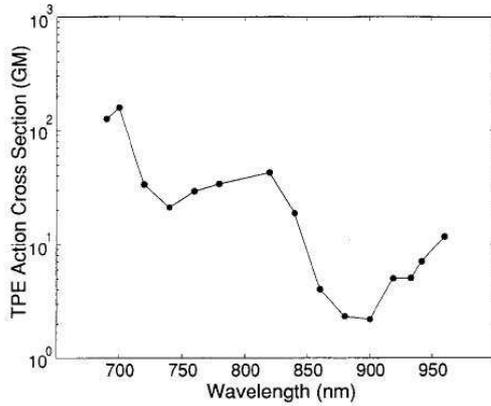


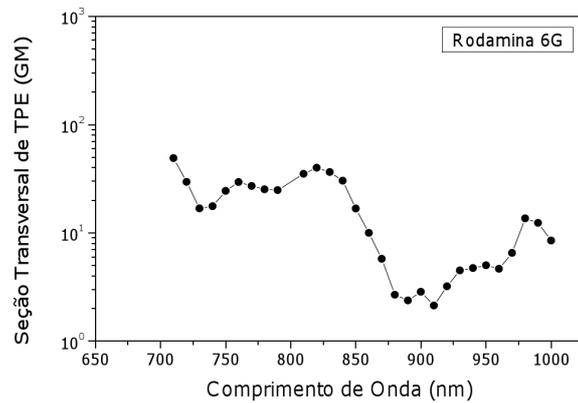
Figura 4.10

Comparação entre duas medidas de TPE para a rodamina 6G, $C = 110 \mu M$.

Podemos também comparar o espectro da rodamina 6G com o que temos na literatura. A figura 4.11(a) mostra o espectro de TPE para a rodamina 6G, retirada de [21], que está dissolvida em MeOH. A figura 4.11(b) mostra o espectro de TPE que medimos, que está dissolvido em PBS. Em ambos os casos a concentração é de $C = 110 \mu M$. Percebemos que mesmo dissolvidos em solventes diferentes, os espectros são bem parecidos. Entretanto nosso resultado tem melhor resolução espectral (passo de 10 nm), ou seja, apresenta mais detalhes das transições por absorção de dois fótons.



(a) TPE rodamina 6G em escala logarítmica, dissolvida em MeOH. Figura retirada de [21]



(b) TPE rodamina 6G em escala logarítmica, dissolvida em PBS

Figura 4.11
TPE rodamina 6G dissolvidas em MeOH e PBS.

4.2.3 Espectro TPE: DAPI, alexa 488, alexa 546, Er-tracker red

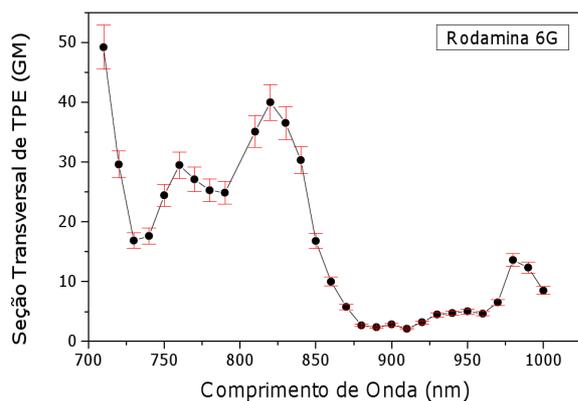
Apresentamos agora os resultados de TPE para os vários corantes estudados. Utilizamos o valor de B obtido para a rodamina e calculamos a seção de choque para os outros corantes. Os valores das eficiências quânticas de fluorescência, para a absorção de dois fótons, η_2 estão tabeladas na seção 2.5. Estamos considerando que as eficiências quânticas de fluorescência por absorção de dois fótons são idênticas às eficiências quânticas por absorção de um fóton, pois os processos de emissão são os mesmos nos dois casos. Não encontramos na literatura, para a amostra de ER-tracker red, o valor de sua eficiência quântica de fluorescência. Portanto plotamos seu espectro em função da seção transversal de absorção multiplicado pela eficiência quântica $\delta\eta_2$. As informações, para todas as amostras, quanto aos solventes utilizados, às potências de excitação antes da objetiva, tempos de integração e concentrações molares estão especificados na seção 4.1.2. Para essa medida, primeiramente coletamos os espectros de emissão para cada comprimento de onda com passos de 10 em 10 nm. Feito isso, obtemos os espectros de PLE plotando a intensidade de fluorescência no pico em função do comprimento de onda de excitação de cada um dos espectros de emissão.

Para encontrarmos os valores de B para os outros corantes multiplicamos o termo, $8g\phi n/2\pi$, por suas concentrações. A seguir os valores de B para todos os corantes. Rodamina 6G: $B = 1,023 \times 10^9 \mu\text{M}$; DAPI: $B = 0,033 \times 10^9 \mu\text{M}$; alexa 488: $B = 0,057 \times 10^9 \mu\text{M}$; alexa 546: $B = 0,034 \times 10^9 \mu\text{M}$ e ER-tracker red: $B = 0,055 \times 10^9 \mu\text{M}$.

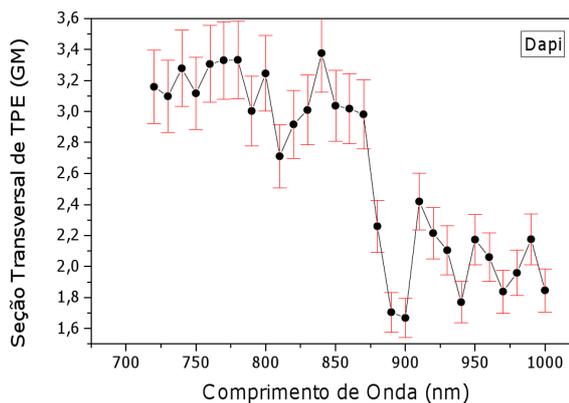
Os espectros da seção transversal de TPE para os vários corantes importantes estão mostrados nas figuras 4.12, 4.13 e 4.14. Repetimos o espectro para a rodamina 6G, agora com a barra de erro estimada pelas duas medidas de PLE.

A barra de erro que aparece em todos os espectros de TPE é a mesma, pois ela independe da amostra e sim do alinhamento óptico ao tirarmos e colocarmos a amostra na montagem experimental.

4.2. SEÇÃO TRANSVERSAL DE TPE PARA ALGUNS CORANTES IMPORTANTES NA BIOLOGIA



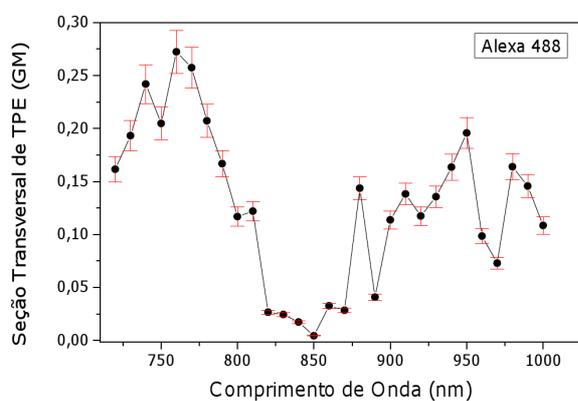
(a) Seção transversal de TPE para rodamina 6G, $C = 110 \mu M$



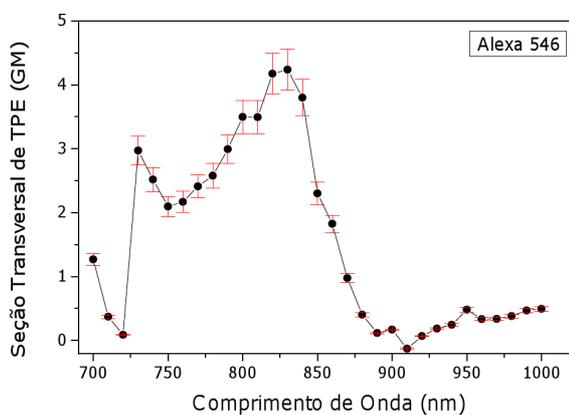
(b) Seção transversal de TPE para o DAPI, $C = 3,6 \mu M$

Figura 4.12

Seções transversais de TPE para rodamina 6G e DAPI.



(a) Seção Transversal de TPE Para Alexa 488, $C = 6,2 \mu M$



(b) Seção Transversal de TPE Para Alexa 546, $C = 3,7 \mu M$

Figura 4.13

Seções Transversais de TPE Para Alexa 488 e Alexa 546.

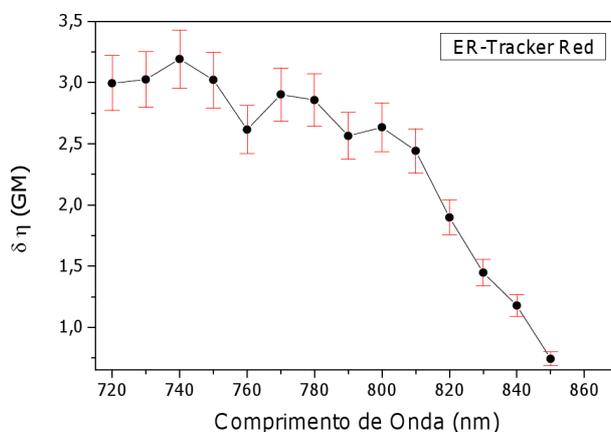


Figura 4.14

TPE ER-tracker red, $C = 6 \mu M$.

4.2.4 Comparação da absorção de 1 fóton e TPE

Como método comparativo, a figura 4.15 mostra os espectros de PLE e 1PA em um mesmo eixo de coordenadas para a rodamina 6G. Para fazer essa comparação multiplicamos o comprimento de onda do espectro de 1PA por dois para ver se seu pico de absorção corresponde a metade do comprimento de onda do pico de absorção do espectro de PLE.

Observamos que aparecem dois picos para absorção de dois fótons na região em torno de 800 nm, onde no espectro 1PA aparece apenas estruturas bem fracas. Os picos equivalentes ao dobro da absorção 1PA, estão fora da região espectral do laser. Sabemos que para moléculas com centro de simetria a transição de PLE correspondente a metade da frequência de excitação é proibida. Contudo para moléculas que não tem centro de simetria, que é o caso da rodamina 6G, devido ao relaxamento de simetria, os picos de PLE e 1PA podem coincidir. Estes picos estão começando a aparecer no extremos de nosso espectro.

Uma explicação para a observação dos picos em torno de 800 nm, é que algum estado singleto mais elevado é alcançado com maior probabilidade para PLE do que para 1PA. Ou seja, as regras de seleção favorecem uma excitação para níveis de energia mais elevado do que transições induzidas por um fóton [21].

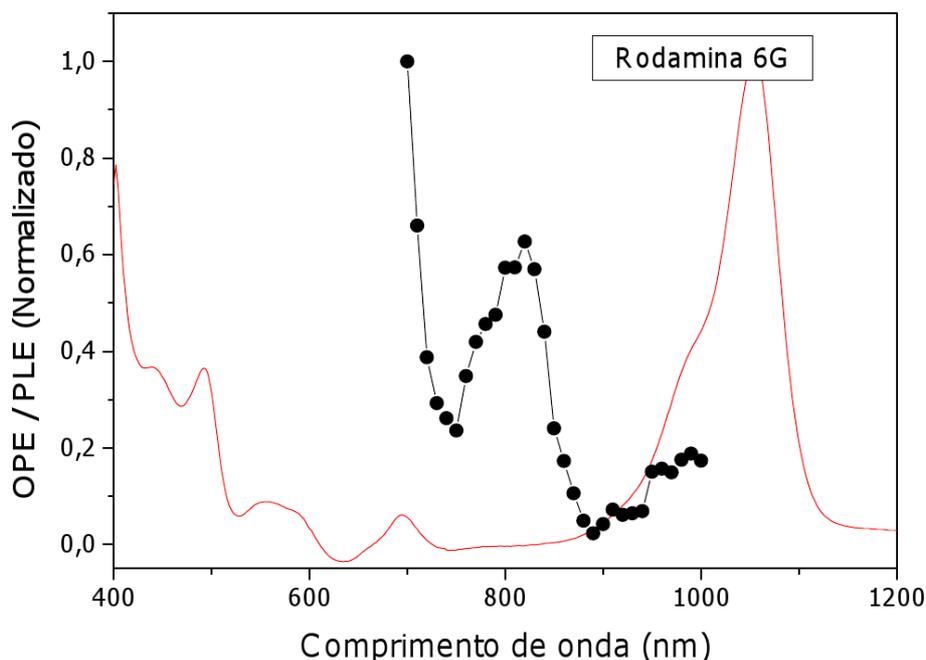


Figura 4.15

Espectro de 1PA e PLE para rodamina 6G. A pontos e linha pontilhada em preto representa o espectro de PLE e a linha em vermelho, o espectro de 1PA.

4.2.5 Dependência da fluorescência com a potência de excitação

Testamos experimentalmente, para a rodamina 6G ($C = 110 \mu M$) e ER-tracker red ($C = 6,0 \mu M$), a dependência da fluorescência por absorção de dois fótons com a potência de excitação. Essas medidas foram feitas para um determinado comprimento de onda de excitação. A intensidade do pulso no volume focal é dado pela seguinte equação:

$$I_0(t) = \frac{\pi(N.A.)^2}{\lambda^2} P(t) \quad (4.3)$$

Enquanto que a taxa de fluorescência por absorção de dois fótons depende da potência segundo a seguinte equação:

$$\langle F(t) \rangle = 1/2g\phi\eta_2 C\delta \frac{8n \langle P(t) \rangle^2}{\pi\lambda} \quad (4.4)$$

Esses resultados foram obtidos coletando os espectros de emissão, usando um determinado comprimento de onda de excitação, para várias potências diferentes de excitação. Em seguida plotamos o logaritmo da intensidade do pico do espectro de emissão em função do logaritmo da potência. Para a rodamina 6G, usamos um comprimento de onda de excitação de 820 nm. A figura 4.16 mostra o gráfico em escala logarítmica da intensidade de fluorescência em função da potência de excitação para a rodamina 6G. Fazendo a regressão linear obtemos uma inclinação de $1,87 \pm 0,02$. O fato de não termos conseguido um fator quadrático para a potência pode estar relacionado a efeitos de saturação. Para o corante ER-tracker red, obtemos a dependência da intensidade de fluorescência com a potência usando um comprimento de onda de excitação de 740 nm. Esse gráfico está mostrado na figura 4.17. Fazendo uma regressão linear obtemos uma inclinação de $1,22 \pm 0,01$. Esse resultado nos mostra que estamos tendo um efeito de saturação [22], pois deveríamos obter um valor 2.

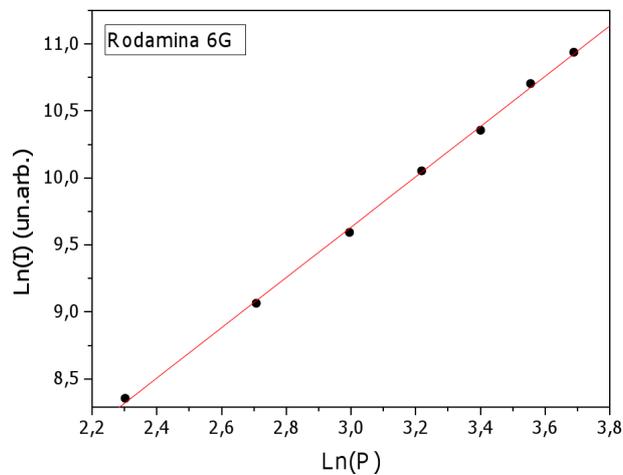


Figura 4.16

Intensidade de fluorescência (I) em função da potência de excitação (P) em escala logarítmica para a rodamina. Fazendo a regressão linear obtemos uma inclinação de $1,87 \pm 0,02$.

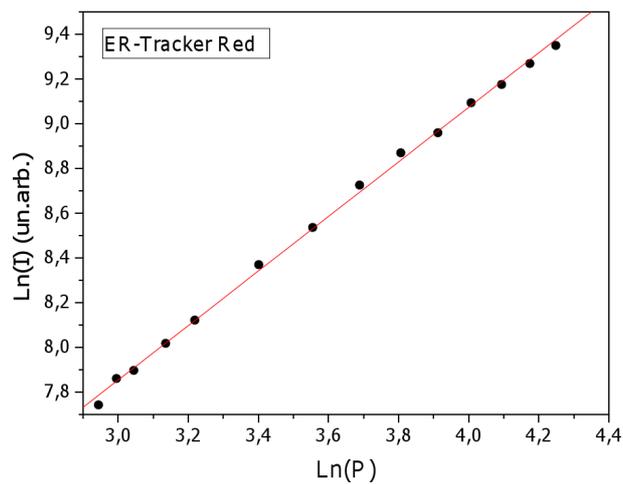


Figura 4.17

Intensidade de fluorescência (I) em função da potência de excitação (P) em escala logarítmica para o ER-tracker red. Fazendo a regressão linear obtemos uma inclinação de $1,22 \pm 0,01$.

4.3 Microscopia de fluorescência por absorção de dois fótons

A técnica de microscopia multi-fótons é muito importante, pois através dela obtemos imagens mais profundas e com alto contraste em tecidos biológicos. Além disso temos também menos foto-degradação da amostra. A seguir são apresentadas imagens de microscopia por absorção de dois fótons, usando como marcador biológico os corantes DAPI e ER-tracker red.

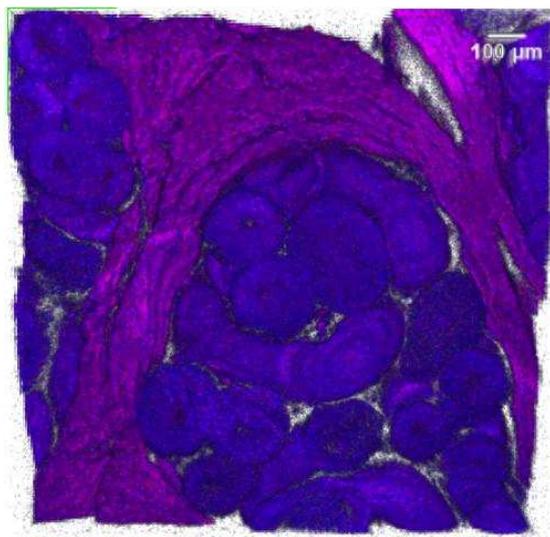
4.3.1 Aplicação do corante DAPI como marcador biológico

Como aplicação biológica da absorção por dois fótons, colaborei na obtenção de imagens multi-fótons no projeto de mestrado de Paulo Campos-Júnior, em pesquisa sobre como as células de Leydig se distribuem no testículo de um porco selvagem, Caititu, *Tayassu tajacu*. Estes resultados foram apresentados em congresso internacional pelo Paulo [3].

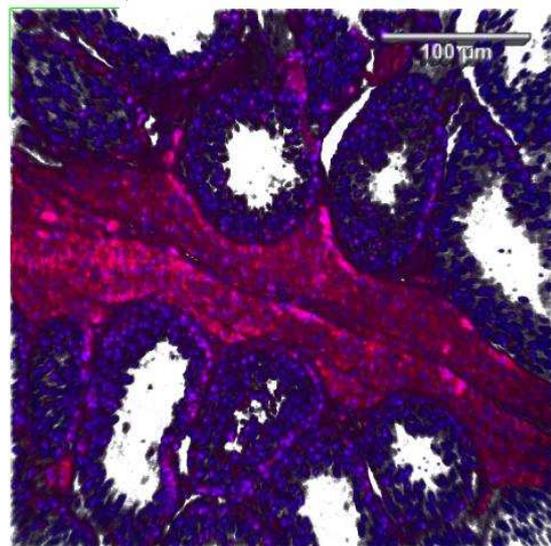
Para isso, fizemos imagens por microscopia multi-fótons de cortes de tecido do testículo onde o núcleo das células de todo o tecido estava marcado pelo corante DAPI, que tem afinidade pelo DNA. Também marcamos com o corante Cy3 uma enzima denominada 3β -HSD (3β -hydroxysteroid dehydrogenase) que é uma enzima encontrada exclusivamente no retículo endoplasmático liso das células de Leydig, onde tem a função de atuar na via de produção de testosterona.

Estudamos cortes de tecidos espessos, aproximadamente $200\ \mu\text{m}$, para obter a posição específica das células de Leydig e sua interação com os túbulos, e assim estudar a importância dessas células na diferenciação das espermatogônias. A possibilidade de obter imagens em grandes profundidades por microscopia de dois fótons foi importante para o desenvolvimento deste projeto. A seguir as imagens que obtemos por microscopia de dois fótons, figura 4.18.

A figura 4.18 a) mostra que as células de Leydig (em vermelho) circundam os túbulos seminíferos (em azul). Entretanto observou-se também que um pouco de células de Leydig estavam também presentes entres os túbulos seminíferos, como mostra a figura 4.18 b).



(a) Figura 1



(b) Figura 2

Figura 4.18

Cortes de tecido do testículo de um Caititu. Em vermelho temos as células de Leydig, que estão marcadas com Cy3. Esse corante tem afinidade por uma enzima encontrada no retículo endoplasmático liso das células de Leydig. Em azul está representado os túbulos seminíferos, que estão marcados com o corante DAPI.

4.3.2 Aplicação do corante ER-tracker como marcador biológico

Utilizamos o corante ER-tracker para marcar o retículo endoplasmático e o retículo nucleoplasmático, presentes nas células SKHepl1 [23]. Para visualizar essas estruturas reticulares, nós usamos microscopia por absorção de dois fótons e microscopia confocal. Para a microscopia multi-fótons, usamos um comprimento de onda de excitação de 820 nm. A seguir uma imagem de fluorescência por dois fótons, figura 4.19.

A parte granulada em todo o citoplasma representa a fluorescência do retículo endoplasmático, enquanto que os "riscos" finos no núcleo das células representam a fluorescência do retículo nucleoplasmático. A figura 4.20 mostra com mais detalhes as estruturas reticulares dentro do núcleo das células.

Para microscopia por absorção de um fóton, obtemos a imagem de fluorescência usando um comprimento de onda de excitação de 543 nm como mostra a figura 4.21. A escolha do comprimento de onda de excitação foi feita observando nosso espectro de absorção, figura 4.4(b). A desvantagem de se usar microscopia por absorção de um fóton é que a fluorescência satura muito rapidamente.

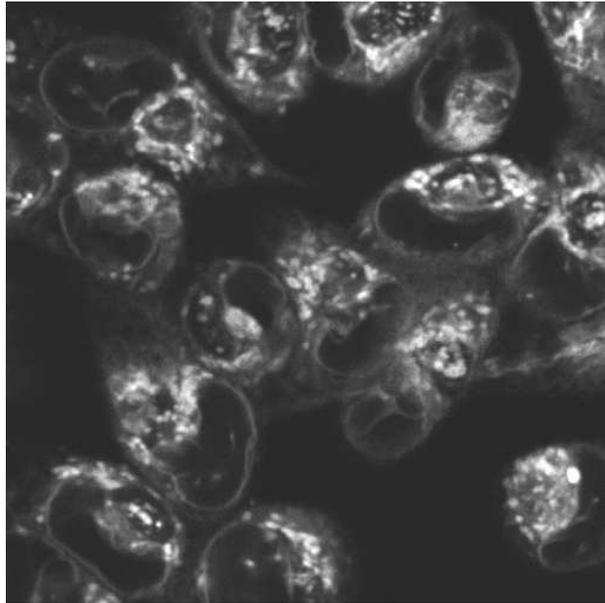


Figura 4.19
 Imagem de microscopia multi-fótons do retículo endoplasmático (fluorescência aparece como granuloso em todo o citoplasma) e do retículo nucleoplasmático (os “riscos” finos no núcleo das células) presentes nas células SKHep1.

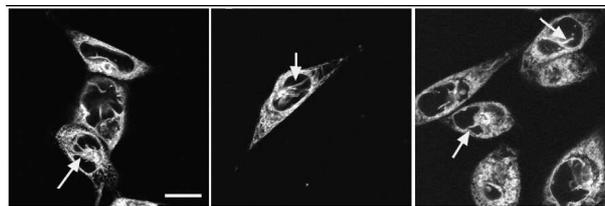


Figura 4.20
 Imagem de microscopia por absorção de dois fótons. As setas apontam para a fluorescência do retículo nucleoplasmático. Figura retirada de [23].

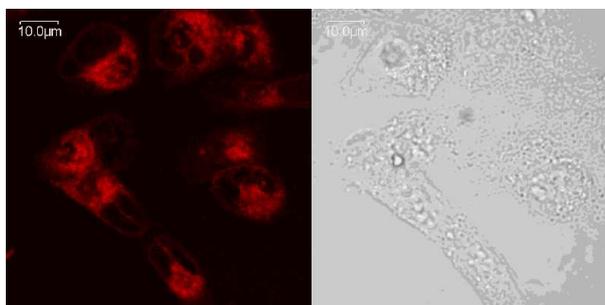


Figura 4.21
 Imagem de microscopia por absorção de um fóton das células SKHep1. Em vermelho temos a fluorescência do retículo endoplasmático e do retículo nucleoplasmático.

Capítulo 5

Conclusões

Apresentamos uma montagem experimental e obtivemos resultados de fluorescência por absorção de dois fótons em alguns corantes importantes para aplicações biológicas. Também obtivemos imagens em tecidos biológicos marcados com alguns destes corantes.

Por meio do sistema dazzler, implementado na nossa montagem experimental, conseguimos coletar um melhor sinal de fluorescência para as nossas amostras, pois conseguimos reduzir a dispersão do pulso, ou seja, conseguimos reduzir o alargamento temporal do mesmo. Esse sistema é muito importante principalmente quando estivermos trabalhando com amostras pouco fluorescentes. Observando os resultados mostrados na seção 4.2, percebemos a dificuldade de se comparar os espectros de fluorescência para diferentes corantes. Para uma boa comparação é necessário garantirmos uma eficiência de coleta bem próximo para todas as medidas. Entretanto obtivemos resultados com melhor resolução espectral que os da literatura para a rodamina 6G. Estudos mais detalhados dos níveis de energia da molécula precisam ser feitos para explicar melhor as transições de dois fótons observadas.

Quanto aos espectros de 1PA a posição das bandas de absorção coincidem com o que temos na literatura, porém o nosso coeficiente de extinção molar foi menor. Suspeitamos que possa ter ocorrido um problema de calibração no espectrômetro de absorção.

Na seção 4.2.5, onde estão mostrados os resultados da dependência da fluorescência com a potência, esperaríamos encontrar um valor 2 para a inclinação da reta após uma regressão linear. O valor abaixo de dois que encontramos se deve principalmente à efeitos de saturação que possa ter ocorrido com as nossas amostras.

E para finalizar utilizamos a técnica de microscopia por absorção de dois fótons em algumas amostras. Essa técnica foi importante, pois permitiu obter imagens mais profundamente no tecido e obter um melhor contraste nas imagens de microscopia. As medidas de TPE foram importantes para a escolha do comprimento de onda de excitação para obtenção destas imagens.

Referências Bibliográficas

- [1] Diaspro, A., Chirico, G., and Collini, M. Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy,. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **38**, 101–109 (2005).
- [2] Rumi, M. and Perry, J. Two-photon absorption: an overview of measurements and principles. *Advances in Optics and Photonics* **2**(4), 451–518 (2010).
- [3] Campos-Junior, P. H. A., Costa, G. J. M., Lacerda, S. M. S. N., Neto, J. V. R., de Paula, A. M., Garcia, A. M., Hofmann, M.-C., and França, L. R. The spermatogonial stem cell niche is not dependent on Leydig cells in the collared peccary (tayassu tajacu),. In *Proceedings of the XXI North American Testis Workshop*,, 59 (American Society of Andrology, Montreal, Canada, 2011).
- [4] Allen, M. W. Measurement of fluorescence quantum yields. https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_58470.PDF.
- [5] Nag, A. and Goswami, D. Solvent effect on two-photon absorption and fluorescence of rhodamine dyes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **206**(2), 188–197 (2009).
- [6] Venkateswarlu, P., George, M. C., Rao, Y. V., Jagannath, H., Chakrapani, G., and Miahnahri, A. Transient excited singlet absorption in rhodamine 6G. *Pramāna - J. Phys.* **28**(1), 59–71 (1987).
- [7] Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R., Bishop-Stewart, J., Bhargat, M., Millard, P., Mao, F., Leung, W., and Haugland, R. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **47**(9), 1179 (1999).
- [8] Fluorescence quantum yields (qy) and lifetimes (t) for alexa fluor dyes—table 1.5. <http://www.invitrogen.com/site>.
- [9] Er-tracker red (bodipy tr glibenclamide), for live-cell imaging. <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/E34250>.
- [10] Olympus FV 300 FLUOVIEW confocal fluorescence microscope. http://cns.fas.harvard.edu/facilities/docs/SOP071_r1_0_OlympusFluoviewConfocal.pdf.

- [11] So, P., Dong, C., Masters, B., and Berland, K. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annual review of biomedical engineering* **2**(1), 399–429 (2000).
- [12] de Paula, A. M. and Cesar, C. L. Fotônica aplicada à biologia celular. In *Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares*, Resende, R. R., Leite, M. F., and Guatimosim, S., editors, chapter 2. Sarvier, São Paulo (2012).
- [13] de Lacerda Rocha, M. Dispersão. <https://http://www.kyatera.fapesp.br>.
- [14] Isolador de faraday. https://http://http://www.rp-photonics.com/faraday_rotators.html.
- [15] Fowles, G. R. *Introduction to Modern Optics*. Holt, Rinehart and Winston, Inc, United States of America, (1975).
- [16] Verluise, F., Laude, V., Cheng, Z., Spielmann, C., and Tournois, P. Amplitude and phase control of ultrashort pulses by use of an acousto-optic programmable dispersive filter: pulse compression and shaping. *Optics Letters* **25**(8), 575–577, April (2000).
- [17] Pawlicki, M., Collins, H., Denning, R., and Anderson, H. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes. *Angewandte Chemie International Edition* **48**(18), 3244–3266 (2009).
- [18] Xu, C. and Webb, W. W. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. Am. B* **13**, 101–109 (1996).
- [19] Lin, M., Comings, D., and Alfi, O. Optical studies of the interaction of 4'-6-diamidino-2-phenylindole with dna and metaphase chromosomes. *Chromosoma* **60**(1), 15–25 (1977).
- [20] Spectra. <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/644>.
- [21] Albota, M., Xu, C., and Webb, W. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Applied optics* **37**(31), 7352–7356 (1998).
- [22] Oulianov, D., Tomov, I., Dvornikov, A., and Rentzepis, P. Observations on the measurement of two-photon absorption cross-section. *Optics communications* **191**(3), 235–243 (2001).
- [23] Echevarria, W., Leite, M., Guerra, M., Zipfel, W., Nathanson, M., et al. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature cell biology* **5**(5), 440–446 (2003).