

## FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Temos a opção de acoplar aos microscópios um sistema de contagem de fótons correlacionados no tempo (*time-correlated single photon counting* – TCSPC). Ela se baseia no fato de que para sinais com alta taxa de repetição a intensidade da luz é tão baixa que a probabilidade de detectar mais de um fóton em um período do sinal é muito baixa. Com essa técnica construímos imagens de tempo de vida da fluorescência (*Fluorescence-lifetime imaging microscopy* – FLIM), conhecido como FLIM. Para o FLIM é necessário o uso de lasers pulsados, pode-se usar um laser CW com uma modulação rápida por AOM para gerar pulsos de ps, o importante é ter um trem de pulsos com o qual o fóton detectado será correlacionado. O FLIM constrói imagens recebendo informação da varredura do laser sobre a posição x-y em que o laser está focalizado.

Para uma taxa de repetição de 80 MHz, cada pulso estará separado de 12,5 ns, nesse período há a excitação e emissão da fluorescência. A fluorescência é uma fotoluminescência caracterizada por ter suas emissões em tempos curtos, da ordem de 10 ns. A emissão de uma fluorescência tem um decaimento exponencial do tipo  $I = I_0 e^{-t/\tau}$ . Nem todos os fótons emitidos são detectados, mas o detector do FLIM detecta os fótons individualmente, figura 1. A figura 1-b mostra a curva de decaimento da fluorescência após cada pulso, mas o que é detectado dão os pulsos mostrados na figura 1-c, independente da intensidade do pico cada evento é considerado um fóton detectado.

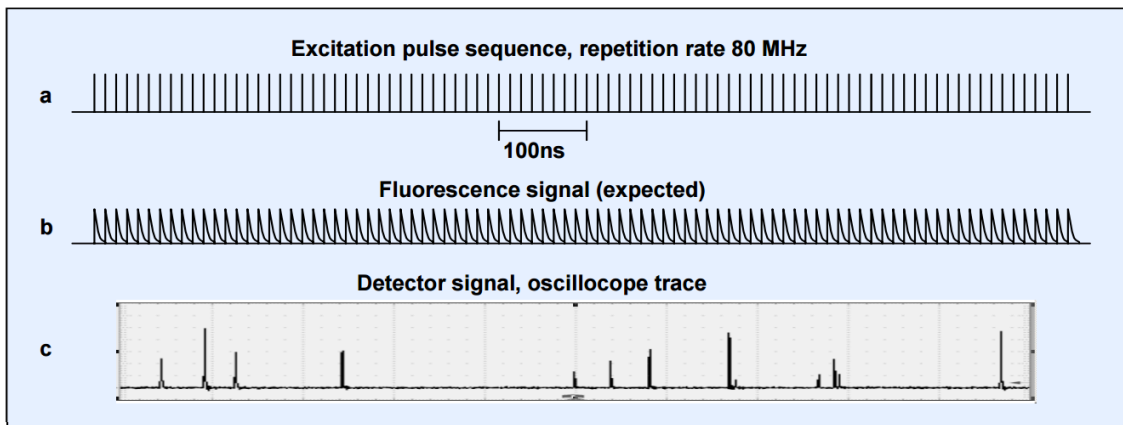


Figura 1: (A) Sequência de pulsos laser operando em 80 Mhz. (B) Fluorescência esperada emitida para cada pulso de excitação. (C) Sinal detectado como sequência de pulsos curtos [43].

Depois de detectado o fóton conta-se o tempo para a chegada do sinal do próximo pulso do laser. O sistema grava os fótons detectados com informação sobre a correlação do momento detectado com o pulso do laser para criar uma curva como a da figura 2 para cada pixel da imagem. Por isso as imagens de FLIM são de demorada aquisição, podendo levar vários minutos e com menor resolução do que uma imagem de SHG ou CARS.

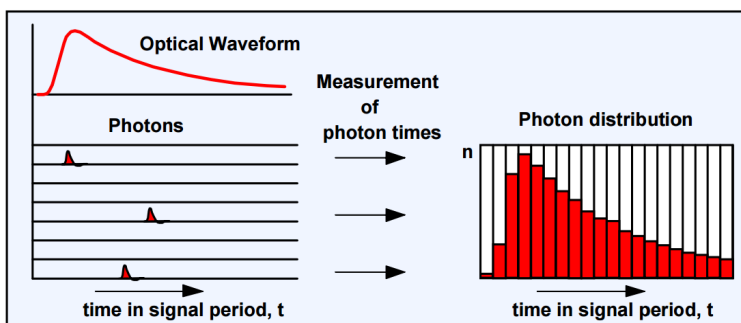


Figura 2 – Construção da curva de decaimento da fluorescência a partir da detecção de fótons individuais.

A emissão pode ter diferentes origens, assim a curva fica mais bem ajustada para mais de um decaimento,  $I = (I_1 e^{-t/\tau_1} + I_2 e^{-t/\tau_2} + I_3 e^{-t/\tau_3} + \dots) + C$ . O software SPCLImage da Becker & Hickl faz o ajuste da curva para até três componentes para cada pixel da imagem. Na imagem final, o tempo de vida é mostrado em escala de cor, figura 3.

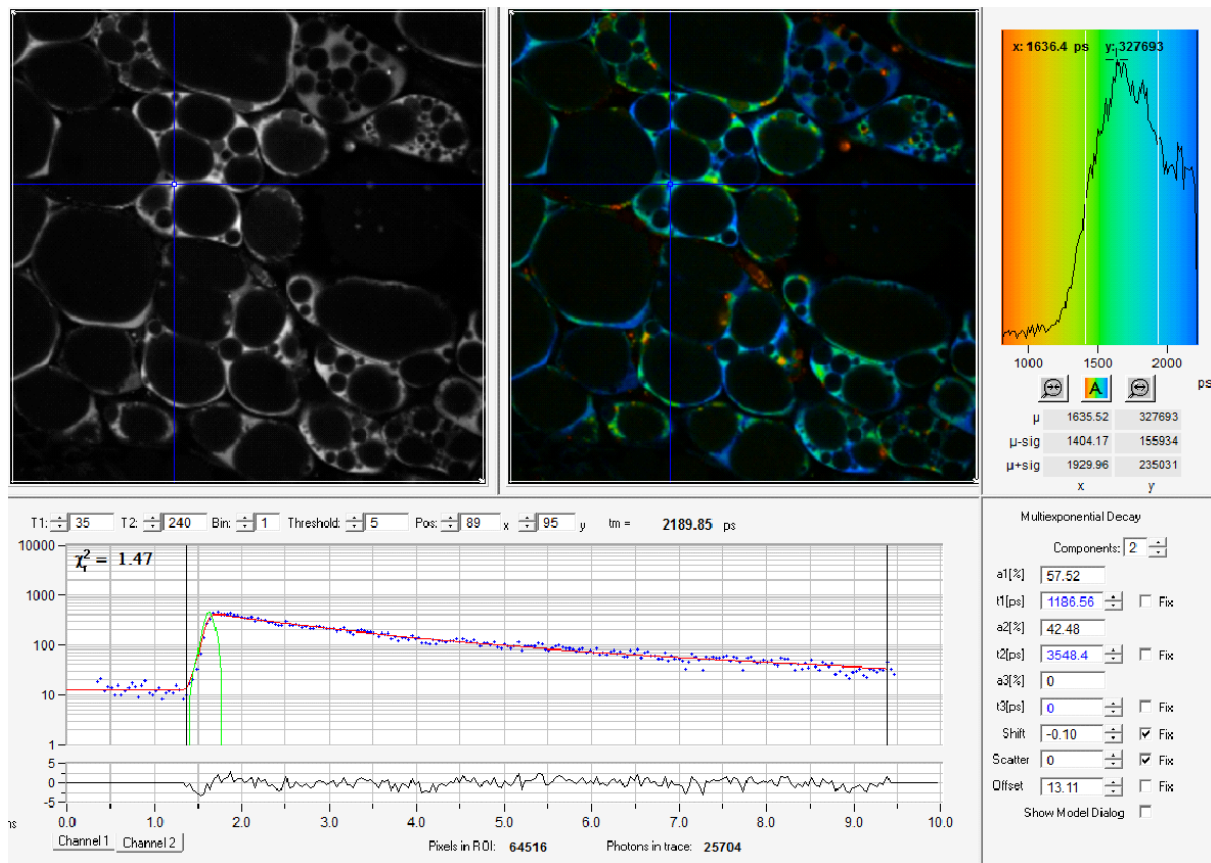


Figura 3: Tela do software do FLIM.

## Referências:

Becker, W. B. H. GmbH, *The bh TCSPC Handbook*. (2010).

PELEGATI, Vitor Bianchin. Microscopias ópticas de processos coerentes. 2016. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física Gleb Wataghin, Campinas, SP.