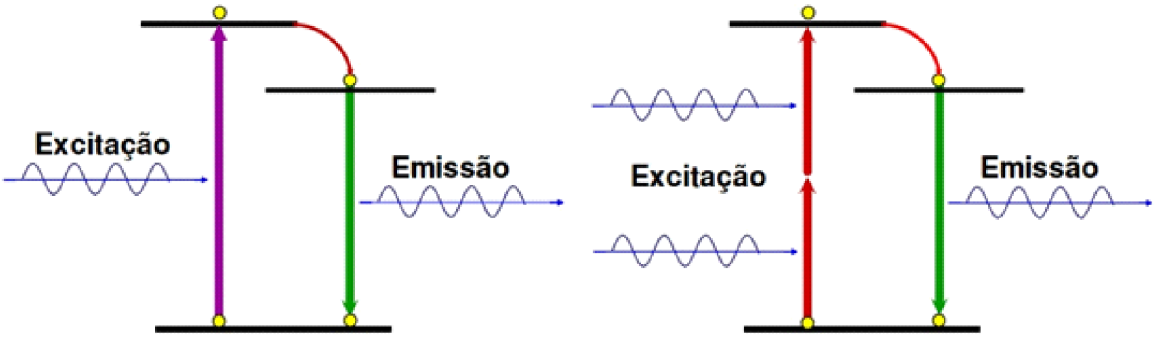
Fluorescência Excitada por Absorção de Dois Fótons (TPEF)

Na fluorescência por absorção de um fóton, um elétron é excitado de um estado fundamental para um estado excitado, de onde pode decair para o estado fundamental emitindo um fóton. Na ausência de interação spin-órbita a regra de seleção para a transição óptica exige que os estados inicial e final tenham o mesmo spin. Transições entre estados de spins diferentes são proibidas e o processo de decaimento é lento. Esse processo é chamado fosforescência. Já os processos permitidos por spin são rápidos e chamados de fluorescência.

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



Como o processo por excitação de dois fótons precisa de dois fótons para excitação para cada fóton emitido, a intensidade do sinal gerado será proporcional ao quadrado da intensidade da excitação, e não será proporcional ao feixe de excitação com na absorção de um fóton. Analogamente em um processo que necessita da absorção de três fótons, no caso da geração de terceiro harmônico, a intensidade do sinal depende da intensidade do feixe de excitação ao cubo.

A possibilidade de utilizar um comprimento de onda no infravermelho para excitação de moléculas que emitem no visível, ou ultravioleta (UV) é favorável para a penetração do laser na

amostra. O espalhamento de luz é proporcional ao inverso da quarta potência do comprimento de onda, ou seja, $I_{espalhado} \propto \lambda^{-4}$. Isso significa que um laser com o dobro do comprimento de onda é 16 vezes menos espalhado, penetrando 16 vezes mais em amostras não absorvedoras. Considerando que amostras biológicas, de um modo geral, absorvem mais no visível do que no infravermelho, a penetração do feixe de excitação se torna ainda maior.

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