

frequência anti-Stokes ω_4 ($\omega_4 = \omega_p - \omega_s + \omega_p$) que é coerente na fase em relação aos feixes de entrada.

Como esse é um processo de excitação forçada, a natureza coerente do processo resulta na geração de um campo que propaga em uma direção específica com um vetor de onda \vec{k}_4 definido pela relação:

$$\vec{k}_4 = \vec{k}_p - \vec{k}_s + \vec{k}_p \quad (1)$$

Onde $\vec{k}_n = 2\pi n_n / \lambda_n$. A equação acima descreve a condição de casamento de fase, que é uma consequência da geração coerente do sinal, e dependente da dispersão no índice de refração do material. Essa equação é importante quando a dispersão do material é significativa, os feixes devem incidir em ângulos específicos para que a equação seja satisfeita, a figura 1-B ilustra essa situação.

No caso do CARS a intensidade do sinal é dado pela seguinte equação:

$$I_{CARS} \propto |\chi^{(3)}|^2 A_1^2 A_2^* \left(\frac{\sin(\Delta k L / 2)}{(\Delta k L / 2)} \right)^2 \quad (2)$$

O resultado da equação acima revela que a intensidade do campo gerado pela polarização no meio será proporcional a $|\chi^{(n)}|^2$, essa dependência do módulo da susceptibilidade não linear não sofrerá alteração se, ao invés de considerarmos ondas longitudinais em z , utilizarmos um feixe fortemente focalizado. A equação acima também prevê grande eficiência para o perfeito casamento de fase, $\Delta k = 0$, para objetos grandes, com L grande. Já para objetos muito pequenos, $L \rightarrow 0$, as condições de casamento de fase são relaxadas, pois $\Delta k L \approx 0$ mesmo com $\Delta k \neq 0$. Outro fator que facilita o casamento de fase é a forte focalização dos feixes no

foco das objetivas utilizadas para microscopia de óptica não linear. As várias direções dos raios de luz no foco fornecem vetores de onda para casamento de fase com grande ângulo entre si.

Emissão para frente e para trás: Quando L é muito pequeno, da ordem de grandeza de um comprimento de onda, os dipolos oscilantes do material irradiam com o mesmo padrão de um dipolo oscilante, com intensidade igual para frente e para trás. Para um volume grande, os dipolos na direção do feixe oscilam coerentemente, e nessa direção ocorre o casamento de fase com interferência construtiva entre os campos. Na direção oposta ao deslocamento dos feixes ocorre o contrário. Como consequência, a intensidade da luz gerada em objetos grandes é maior para frente (*forward*), mesma direção do campo, e pequena para trás (*backward*). Mas para objetos pequenos a intensidade tende a ser a mesma nas duas direções. Na microscopia de óptica não linear essa consequência é explorada, as imagens com sinal detectado para frente mostram estruturas grandes, e para trás estruturas pequenas.

CARS não ressonante: Caso a frequência vibracional das moléculas moléculas ω_R não for a mesma que a frequência do batimento, será gerado um sinal mais fraco, por estar fora da ressonância, que é comumente chamado de CARS não ressonante.

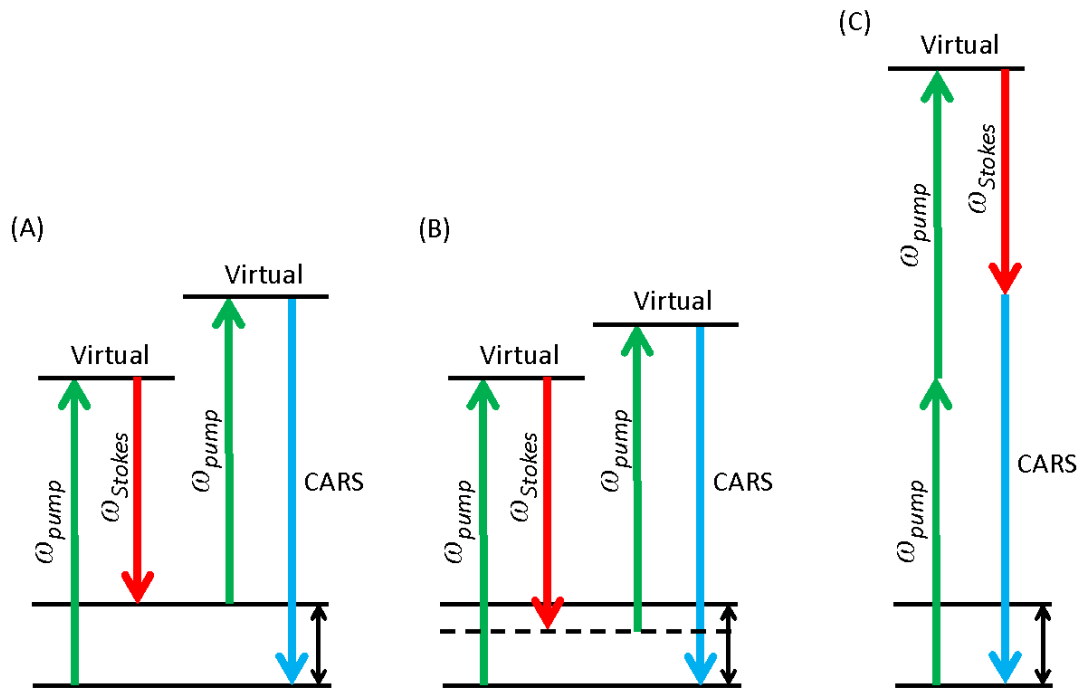


Figura 2: Contribuições para o sinal de CARS - (A) Ressonante. (B) Não ressonante devido a linhas Raman fora de ressonância. (C) Não ressonante devido à absorção de dois fótons.

O termo não ressonante de $\chi^{(3)}$, que vamos escrever como $\chi_{NR}^{(3)}$ é de particular importância, ele é integrado pelas contribuições de transições eletrônicas de níveis virtuais, envolvendo linhas Raman fora de ressonância e absorção de um e dois fótons. Esse termo sempre contribuí para o sinal, mesmo quando longe da ressonância, e flutuações nesse sinal, devido à flutuação na intensidade dos lasers, limita seriamente sensibilidade do CARS. Grande contribuição do sinal não ressonante é devido a água presente em amostras biológicas.

Alinhamento e aquisição para CARS.

O sistema para imagens de CARS utiliza dois feixes do laser Chameleon Discovery NX (Coherent, EUA). Um feixe é fixo em 1040 nm e o outro é ajustável de 660 a 1320 nm, ambos possuem taxa de repetição de 80 MHz e pulsos de 100 fs. Cada feixe passa por um conjunto de uma placa de meia onda e um polarizador para controle de potência, onde a polarização horizontal será

transmitida. O feixe ajustável passa por uma linha de atraso para coincidência temporal dos pulsos. Os feixes são unidos através de espelho dicróico passa baixa 1000 nm (1000SP), depois utilizamos uma lente de distância focal de 1 m para controlar a abertura dos feixes na entrada do sistema de varredura. A figura 3 mostra o esquema experimental.

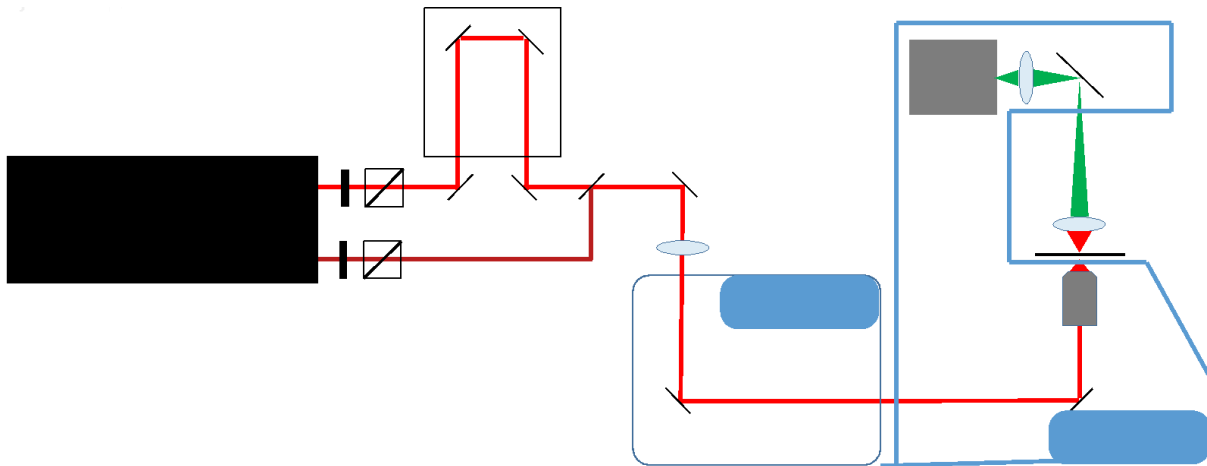


Figura 3: HPL – Placa de meia onda e polarizador; DL – linha de atraso; PMT fotomultiplicadora.

Para as imagens de CARS vamos trabalhar com o deslocamento Raman de 2847 cm^{-1} , nesse nível de energia vamos excitar as vibrações moleculares de estiramento simétrico e assimétrico, devido à largura espectral dos pulsos, da ligação CH_2 . Esse nível de energia vibracional terá ressonância principalmente com lipídios. Para tal nível de energia precisamos do feixe ajustável em 803 nm e o sinal de CARS estará em 653 nm . O microscópio utilizado é um Axio observer (Zeiss) com sistema de varredura LSM 780. Na figura 4 temos um gráfico representativo dos comprimentos de onda dos feixes do laser, do CARS e dos efeitos de segunda ordem (SHG e SFG).

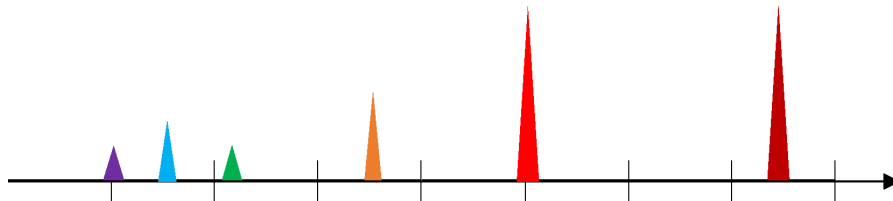


Figura 4: Gráfico Com posicionando os feixes dos lasers e as emissões de CARS e de segunda ordem (SHG e SFG).

Para aquisição do sinal detectado para frente (*forward CARS*), utilizamos um espelho dicróico passa alta 705 (705LP) para refletir o sinal de CARS para uma fotomultiplicadora (PMT) e um filtro passa banda com largura de 40 nm centrado em 650 nm (650-40BP) que separa o sinal de qualquer outra luminescência gerada na amostra. Para detecção do sinal gerado para trás (*backward CARS*) podemos utilizar o detector interno de 32 canais do LSM780 escolhendo o comprimento de onda desejado.

Referências

Shen, Y. R. *The Principles of Nonlinear Optics*. (Wiley-Interscience, 1984).

Boyd, R. W. *Nonlinear Optics*. (Academic Press, 2003).

RAMAN, C. V. & KRISHNAN, K. S. A New Type of Secondary Radiation. *Nature* **121**, 501–502 (1928).

Long, D. A. *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. (John Wiley & Sons Ltd, 2002).

Zumbusch, A., Holtom, G. R. & Xie, X. S. Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering. *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4142–4145 (1999).

Maker, P. D. & Terhune, R. W. Study of Optical Effects Due to an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength. *Phys. Rev.* **137**, A801–A818 (1965).

Begley, R. F. Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.* **25**, 387 (1974).

Cheng, J.-X. & Xie, X. S. Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine. *Science (80-.)*. **350**, aaa8870-aaa8870 (2015).

Cheng, J. X., Book, L. D. & Xie, X. S. Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt. Lett.* **26**, 1341–1343 (2001).

Volkmer, A., Book, L. D. & Xie, X. S. Time-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Imaging based on Raman free induction decay. *Appl. Phys. Lett.* **80**, 1505 (2002).

Freudiger, C. W. *et al.* Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Science (80-.)*. **322**, 1857–1861 (2008).