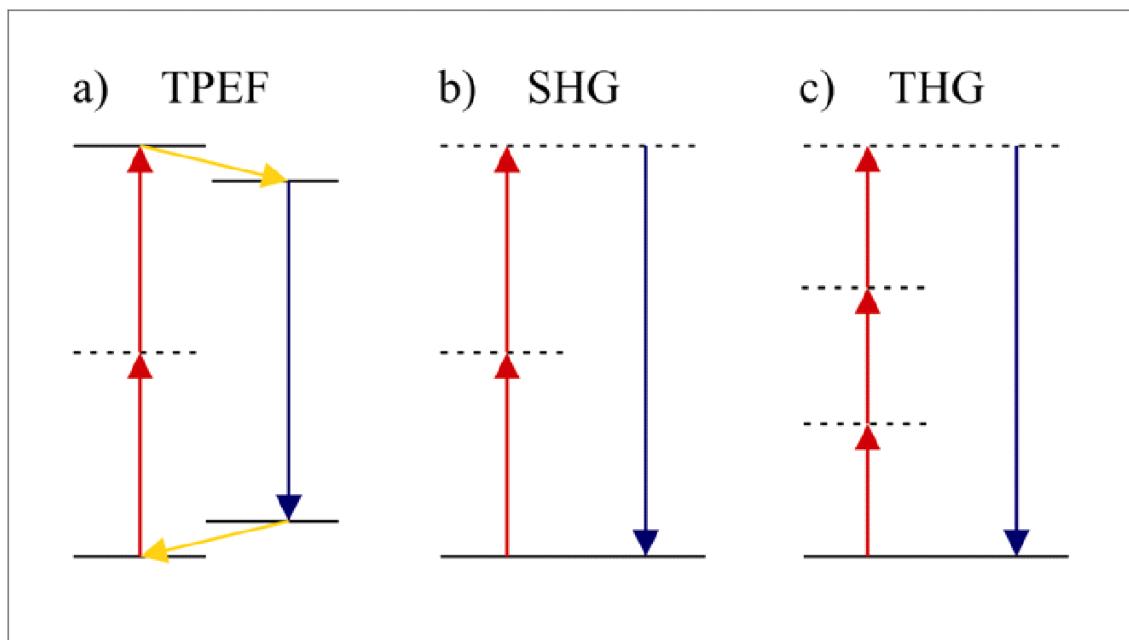


## Protocolo Aquisição Imagens SHG

Autor: Vitor B. Pelegati

Equipamentos utilizados: Laser pulsado Chameleon Discovery NX da Coherent e Microscópio Zeiss LSM 780 Invertido ou Upright.

Uma forma de representar os processos de óptica não linear é através de diagramas de níveis de energia. A figura abaixo mostra os fenômenos de óptica não linear realizados no nosso trabalho.



As setas possuem comprimento proporcional à energia  $\hbar\omega$  dos fótons (inversamente proporcional ao comprimento de onda) as linhas contínuas representam níveis de energia reais e as linhas tracejadas representam níveis de energia virtuais. A) Fluorescência excitada por absorção de dois fótons TPEF. B) Geração de segundo harmônico SHG. C) Geração de terceiro harmônico THG.

A geração de harmônicos pode ser explicada classicamente através de um modelo de um oscilador não harmônico. Em um oscilador harmônico a força restauradora é linear com o deslocamento  $F = -kx$ . Supondo uma força dissipativa proporcional à velocidade, a equação diferencial do oscilador harmônico amortecido não forçado é dada por:

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -kx - b \frac{dx}{dt}$$

ou

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \omega_o^2 x = 0$$

Onde  $\frac{b}{m} = \gamma$  e  $\frac{k}{m} = \omega_o^2$ . O deslocamento  $x$ , sem solução transiente, quando o oscilador é forçado com uma força  $F_o e^{i\omega t}$ , é dada por  $x(t) = x_o e^{i\omega t}$  com

$$x_o = \frac{1}{[\omega_o^2 - \omega^2 + i\gamma\omega]} \left( \frac{F_o}{m} \right) = \frac{1}{D(\omega)} \left( \frac{F_o}{m} \right)$$

Onde  $D(\omega) = [\omega_o^2 - \omega^2 + i\gamma\omega]$ . Para freqüências muito altas  $\omega \gg \omega_o$ ,  $D(\omega) = -\omega^2$  e a amplitude de oscilação é atenuada com o quadrado do inverso da freqüência

$$x_o = -\frac{1}{\omega^2} \left( \frac{F_o}{m} \right).$$

Por outro lado para freqüências baixas  $\omega \ll \omega_o$ ,  $D(\omega) = \omega_o^2$  e o oscilador responde como no

caso estático  $x_o = \frac{1}{\omega_o^2} \left( \frac{F_o}{m} \right) = \left( \frac{F_o}{k} \right)$ . Se  $\omega = \omega_o$  atingimos a ressonância com uma amplitude

$$x_o = \frac{1}{i\gamma\omega} \left( \frac{F_o}{m} \right)$$

amplificada dada por  $\frac{1}{i\gamma\omega}$ . Em síntese, o oscilador harmônico não responde para freqüências muito acima da ressonância mas responde para freqüências abaixo da ressonância, na forma  $F = -kx$ .

Quando uma onda eletromagnética incide sobre uma molécula ela força núcleos e elétrons. Devido à massa grande dos núcleos, a ressonância dos mesmos ocorre na região do infravermelho. Já os elétrons apresentam ressonância na região do ultravioleta podendo alcançar, dependendo da molécula, do visível ao infravermelho próximo. Nas freqüências ópticas tipicamente utilizadas em experimentos de SHG/THG apenas os elétrons respondem aos campos eletromagnéticos. Nesse caso, cada elétron está sujeito a força  $F = -e E_o e^{i\omega t}$ . A resposta linear, supondo um oscilador harmônico amortecido é dada, então, por

$$x_o = \frac{1}{D(\omega)} \left( \frac{e E_o}{m} \right)$$

Entretanto, a lei de Hooke  $F = -kx$  é apenas uma aproximação da realidade, válida para oscilações muito pequenas. Uma expansão em série de Taylor mostra que uma força mais geral seria dada por:

$$F = -kx - \beta x^2 - \eta x^3 - \dots$$

com termos cada vez menores à medida que a ordem da série cresce. Podemos utilizar o fato de que a influência dos termos de potências maiores são bem menores dos termos anteriores para desenvolver um método de aproximações sucessivas para resolver essa equação diferencial não linear.

Passo (1) desprezamos os termos  $x^{n>1}$  e encontramos  $x^{(0)}$  do oscilador harmônico

$$x^{(0)} = \frac{1}{D(\omega)} \left( \frac{e E_o}{m} \right) e^{i\omega t}$$

Passo (2): passamos esse  $[x^{(0)}]^n$  para o lado direito da equação do oscilador harmônico forçado como uma nova força:

No caso do SHG

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \omega_o^2 x = -\frac{\beta}{D(\omega)^2} \left( \frac{e E_o}{m} \right)^2 e^{i2\omega t}$$

No caso do THG

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + \omega_o^2 x = -\frac{\eta}{D(\omega)^3} \left( \frac{e E_o}{m} \right)^3 e^{i3\omega t}$$

Substituindo soluções do tipo

$$x^{(2)} = x_2 e^{i2\omega t}$$

$$x^{(3)} = x_3 e^{i3\omega t}$$

obtemos:

$$\mathbf{x}_2 = -\frac{\beta}{D(2\omega)D(\omega)^2} \left( \frac{e \mathbf{E}_o}{m} \right)^2$$

e

$$\mathbf{x}_3 = -\frac{\eta}{D(3\omega)D(\omega)^3} \left( \frac{e \mathbf{E}_o}{m} \right)^3$$

Esse é o modelo mais simples e desconsidera que os campos devem ser reais, ou que se deve combinar termos com  $e^{\pm i n \omega t}$ . Se tomarmos uma excitação da forma  $\cos(\omega t)$  o termo com  $x^2$  levaria a  $\cos^2(\omega t) = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos(2\omega t)$ , com um termo DC, chamado de retificação óptica, e um termo com o dobro da freqüência. Já o termo com  $x^3$  levaria a  $\cos^3(\omega t) = \frac{3}{4} \cos(\omega t) + \frac{1}{4} \cos(3\omega t)$  gerando um sinal na mesma freqüência e outra no terceiro harmônico.

É interessante também rever esse modelo simples em termos do vocabulário típico da óptica não linear. Sabemos que um dipolo oscilante é capaz de irradiar ondas eletromagnéticas e que esses dipolos podem ser criados pelo campo eletromagnético incidente. A densidade de dipolos de um meio  $\mathbf{P}(\mathbf{E})$  pode ser expandida em série de Taylor

$$\mathbf{P}(\mathbf{E}) = \mathbf{P}_o + \epsilon_o \chi^{(1)} : \mathbf{E} + \frac{1}{2} \epsilon_o \chi^{(2)} : \mathbf{E} \mathbf{E} + \frac{1}{6} \epsilon_o \chi^{(3)} : \mathbf{E} \mathbf{E} \mathbf{E}$$

onde as suscetibilidades de primeira,  $\chi^{(1)}$ , segunda,  $\chi^{(2)}$  e terceira ordem,  $\chi^{(3)}$ , são tensores que dependem da freqüência final do sinal gerado e dos campos incidentes. O sinal de SHG é gerado pelo termo  $\chi^{(2)}[2\omega : \omega, \omega] : \mathbf{E}_o \mathbf{E}_o e^{\pm i 2\omega t}$  enquanto o sinal do THG é gerado pelo termo  $\chi^{(3)}[3\omega : \omega, \omega, \omega] : \mathbf{E}_o \mathbf{E}_o \mathbf{E}_o e^{\pm i 3\omega t}$ .

A potência, ou intensidade em um oscilador é proporcional ao quadrado da amplitude,  $x^2$ , enquanto a intensidade de um sinal eletromagnético é proporcional ao quadrado da amplitude do campo elétrico  $\mathbf{I} \propto \mathbf{E}^2$ . Em consequência o sinal do SHG é proporcional a  $E_o^4 \propto \mathbf{I}^2$ , enquanto o sinal do THG é proporcional a  $E_o^6 \propto \mathbf{I}^3$ .

Para o segundo harmônico faremos uma explicação intuitiva, que nos levará à principal característica desse fenômeno, mostrada no final dessa seção.

Partindo da expansão de série de taylor da lei de Hooke, faremos uma operação de inversão, trocando  $x$  por  $-x$ .

$$F(-x) = -K(-x) - \beta(-x)^2 - \eta(-x)^3 + \dots$$

Para uma molécula com simetria de inversão, a força em uma posição  $-x$  deve ter o sinal trocado com relação a força em  $x$ . Assim  $F(-x) = -F(x)$ .

$$K(x) + \beta(x)^2 + \eta(x)^3 + \dots = -K(-x) - \beta(-x)^2 - \eta(-x)^3 - \dots$$

Para o termo dependente de  $x^2$  temos uma igualdade do tipo

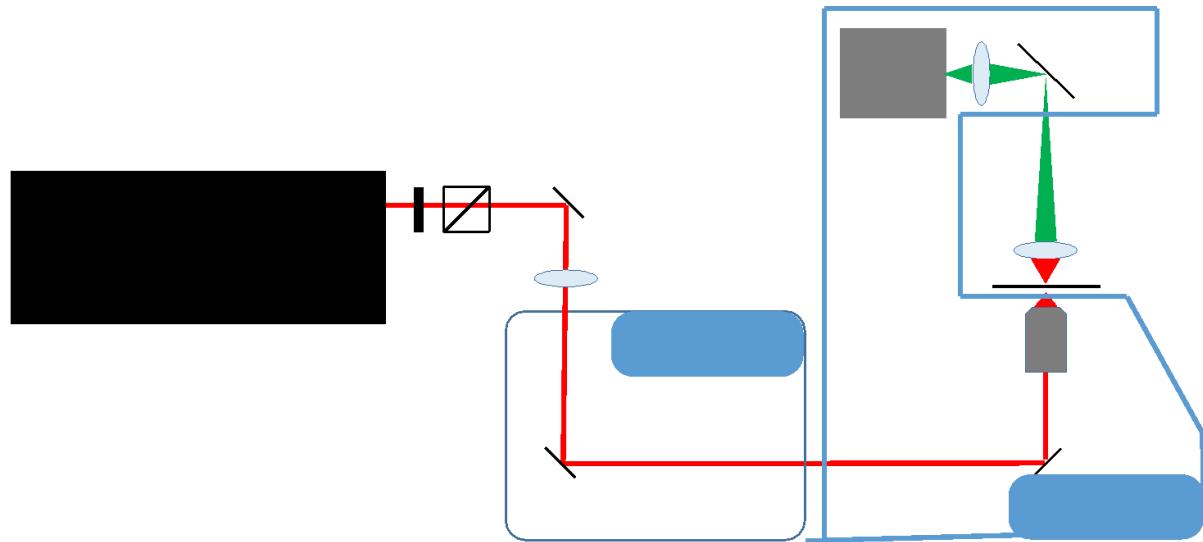
$$+\beta(x)^2 = -\beta(-x)^2 \rightarrow 2\beta x^2 = 0$$

A única solução é  $\beta = 0$ , a susceptibilidade de segunda ordem  $\chi^{(2)}$  também será zero. A conclusão é que para moléculas com simetria de inversão não teremos SHG.

Um bom gerador de SHG na biologia é o colágeno, que possui moléculas quirais, a organização das moléculas também favorece o sinal de SHG, o colágeno se arranja em hélices triplas crescendo em fibras.

### **Sistema para aquisição imagem de SHG.**

Nosso alinhamento para aquisição de imagens SHG utiliza o feixe ajustável do laser Chameleon Discovery NX (Coherent, EUA), de 660 a 1320 nm, ambos possuem taxa de repetição de 80 MHz e pulsos de <100 fs. O feixe passa por um conjunto de uma placa de meia onda e um polarizador para controle de potência, onde a polarização horizontal será transmitida.



HPL – Placa de meia onda e polarizador; PMT fotomultiplicadora.

O sinal de segundo harmônico será gerado na metade do comprimento de onda do laser. Nós geralmente utilizamos o laser em 940 nm, com SHG em 470 nm tanto na direção para frente (F-SHG) quanto para trás (B-SHG).

Referências:

L. Mandel; E. Wolf, "Optical Coherence and Quantum Optics", Cambridge University Press, New York, 1995.

E. Wolf, "Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. 1. An Integral Representation of the Image Field." Proc R Soc Lond Ser-A, 253(1274):349-357, 1959

B. Richards, E. Wolf; "Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. 2. Structure of the Image Field in an Aplanatic System." Proc R Soc Lon Ser-A, 253(1274):258-279, 1959.

L. Novotny, B. Hecht; "Principles of Nano-Optics", Cambridge University Press, New York, 2006.

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

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

PELEGATI, Vitor Bianchin. Microscopias de óptica não linear: fluorescência excitada por absorção de dois fótons, geração de segundo harmônico e geração de terceiro harmônico. 2010. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física Gleb Wataghin, Campinas, SP.

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