

Exercícios lasers

Inês Corvelho

1.

a. A fluorescência é um tipo de fenómeno de emissão de luz de uma substância, que ocorre quando a substância relaxa para um estado inferior do estado excitado por forma de emissão de fotões.

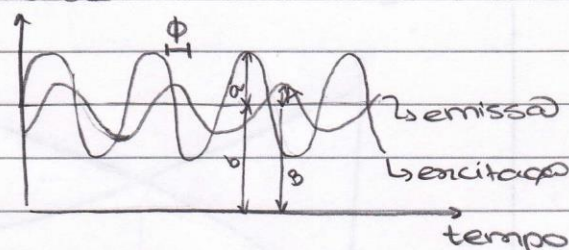
Quando um material é estimulado por radiação de "excitação", com uma modulação sinusoidal, a resposta de fluorescência também é sinusoidal, tendo a mesma frequência, mas com uma modulação e fase relativa que dependem do tempo de vida.

Devido ao "tempo de atraso", entre a excitação e a emissão, o sinal apresenta um desfasamento (ϕ) relativamente à excitação. Desta modo, o "atraso de fase", ϕ , pode ser utilizado para calcular o tempo de vida. Além do atraso de fase, o sinal resultante apresenta uma modulação, sendo que o sinal de emissão é dado pela convolução da resposta ao impulso com a modulação sinusoidal.

$$\tan \phi = \omega \tau$$

$$M = \frac{B/A}{b/a} = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}}$$

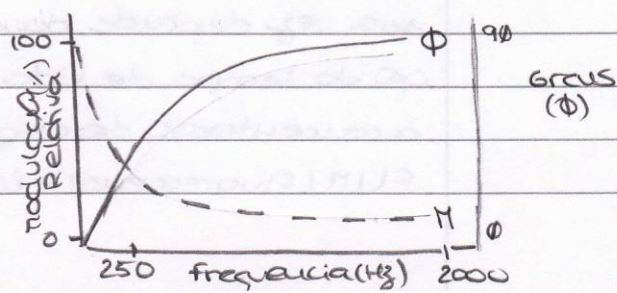
Intensidade



A cima está descrito como a fase (ϕ) e a modulação (M) se relacionam com o tempo de vida. À medida que a frequência de modulação se aproxima de valores próximos do tempo de vida do fluoróforo, a fase aumenta e devido a decaimentos sucessivos (de emissão), a modulação começa a tender para zero. Esta gama de frequências é a que permite obter mais informação relativamente aos parâmetros da amostra. Associando o tempo de vida a uma frequência de corte, e observando a curva relativa à fase, é possível compreender que à medida que nos aproximamos do tempo de vida, a fase vai aumentar até atingir ($\phi = 90^\circ$)

$$0 < \phi < 90^\circ$$

$$1 < M < \infty$$



b.

Relação da fase com tempo de vida (τ)

$$\tan \phi = \omega \tau$$

para $f \approx 210 \text{ kHz}$

$\phi = 50 \text{ graus}$

$$\omega = 2\pi f$$

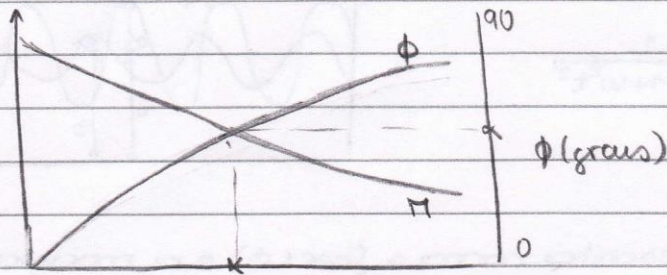
$$\tan \phi = 2\pi f \cdot \tau \quad \Rightarrow \quad \tau = \frac{\tan \phi}{2\pi f}$$

$$\tau = \frac{\tan(50^\circ)}{2\pi \cdot 210 \times 10^3}$$

$$\tau = 9,03 \times 10^{-7} \text{ s}$$

c.

i. Tempo de vida diminui à medida que a concentração de oxigênio aumenta.



$$\tan \phi = 2\pi f \cdot \tau$$

Para um tempo de vida mais pequeno a gama de frequências relevantes para os parâmetros da amostra irá ocorrer para maiores frequências.

ii. O sinal de fluorescência depende do tempo de vida, que por sua vez depende da concentração de oxigênio. Através da alteração do tempo de vida do fluoróforo é possível compreender qual a concentração de oxigênio em células.

FLIM (Fluorescence - lifetime imaging microscopy) é uma técnica que

permite formação de imagem baseados nos diferentes da taxa de decaimentos da fluorescência, que permite qualificar concentrações locais de oxigênio.

2.

a.

número de onda, σ

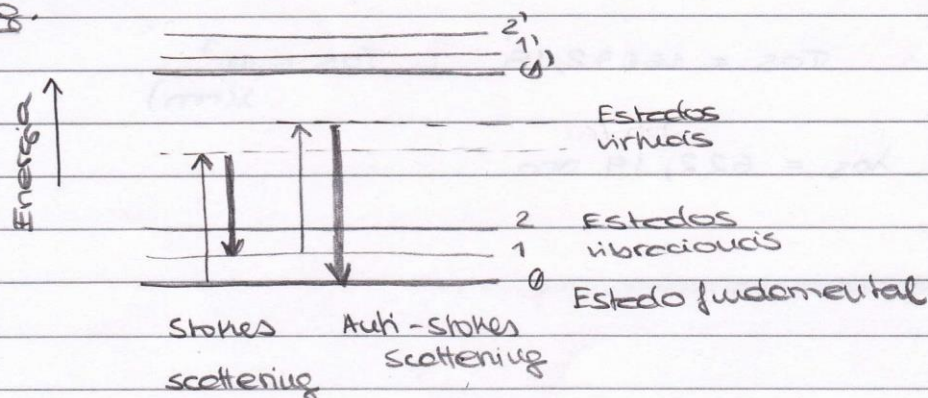
$3 \mu\text{m}$

$$\sigma (\text{cm}^{-1}) = \frac{10^7}{\lambda (\text{nm})} = \frac{10^7}{3000 \text{ nm}} \Rightarrow \sigma = 3333,3 \text{ cm}^{-1}$$

b. O scattering espontâneo de Raman é inelástico, sendo que a energia do fóton que sofre scattering é diferente da energia do fóton incidente. No scattering espontâneo de Raman, uma porção da energia do fóton incidente é absorvida por uma molécula (no estado fundamental) de forma a promover a molécula para um estado vibracional excitado de maior energia. O fóton que sofreu scatter a uma frequência ω_s resulta de uma transição do estado virtual para o estado excitado vibracional. Assim o fóton scattered possui menor energia que o fóton incidente e consequentemente um maior comprimento de onda. Isto é designado por Stokes scattering.

A frequência vibracional da molécula excitada, iguala-se à diferença de frequências entre a luz scattered e a luz incidente.

Em contraste, se a molécula já se encontra inicialmente no estado excitado, então o fóton que sofre scatter vai ter uma energia superior à do fóton incidente e a molécula relaxa do estado excitado para o estado fundamental. Isto é designado por anti-Stokes scattering.



Stokes $\hbar\omega_s = \hbar\omega_i - \hbar\omega$

Anti-Stokes $\hbar\omega_{as} = \hbar\omega_s + \hbar\omega$

Laser 785 nm $\sigma(\text{cm}^{-1}) = \frac{10^7}{\lambda(\text{nm})}$

Em números de onda,

Stokes $\sigma_s = \sigma_i - \sigma_{\text{molécula}}$

AntiStokes $\sigma_{as} = \sigma_i + \sigma_{\text{molécula}}$

$\sigma_{\text{molécula}}$ (determinado em 2a))

$\sigma_i \rightarrow$ Excitação da molécula

$\sigma_i = \frac{10^7}{785 \text{ nm}}$ ou $\sigma_i = 12738,85 \text{ cm}^{-1}$

$\sigma_s = 12738,85 - 3333,3$ | transição Stokes
 $\sigma_s = 9405,52 \text{ cm}^{-1}$

$\sigma_{as} = 12738,85 + 3333,3$ | transição AntiStokes
 $\sigma_{as} = 16072,18 \text{ cm}^{-1}$

Comparando com o λ do laser, 785

$\sigma_s = 9405,52$; $\sigma_s = \frac{10^7}{\lambda(\text{nm})}$

$\lambda_s = 1063,20 \text{ nm}$

$\sigma_{as} = 16072,18$; $\sigma_{as} = \frac{10^7}{\lambda(\text{nm})}$

$\lambda_{as} = 622,19 \text{ nm}$

c. A frequência vibracional da molécula excitada, Ω , iguala-se à diferença de frequências entre a luz que sofreu scatter, ω_s e a luz incidente, ω_i .

$$\Omega = \omega_i - \omega_s$$

Deste modo, com este shift podem ser identificados os modos vibracionais da molécula. Devido à estrutura molecular única em cada tipo de moléculas, estes "shift" de frequências pode ser utilizado como "impressão digital" para identificação molecular.

Quando uma fonte interage com uma molécula, os fotões scattered podem perder ou ganhar energia, Stokes scattering e Anti-Stokes scattering, respetivamente, que é energia, quantizada relativamente aos modos vibracionais.

Num espectómetro IR, é observado que ocorre absorção para determinadas valores quantizados de energia.

d. Uma aplicação médica da espectroscopia de Raman é a deteção do cancro da mama. Este tipo de cancro é o segundo mais comum e apesar de ser diagnosticado em muito dos casos é uma das maiores causas de morte em mulheres.

A espectroscopia de Raman consegue diferenciar entre tecido mamário maligno e tecido mamário benigno. O espectro de Raman relativamente à região em volta do humor apresenta bandas de intensidade mais reduzida correspondentes ao colagénio e bandas de intensidade alta correspondentes ao ácido nucleico quando comparado com um espectro normal.

Além do diagnóstico, a espectroscopia de Raman também pode ser utilizada para deteção de tumores que possam estar nos margens durante o procedimento cirúrgico de remoção do tumor.

Através da combinação de dados morfológicos e estruturas químicas que constituem o tecido, foi desenvolvido um modelo que permite a distinção de tecidos cancerosos para tecidos normais e de tecidos benignos para tecidos normais, sendo o colagénio e a gordura os parâmetros chave deste algoritmo.

Tudo isto é possível visto que, através dos modos vibracionais é possível a identificação molecular.

3.

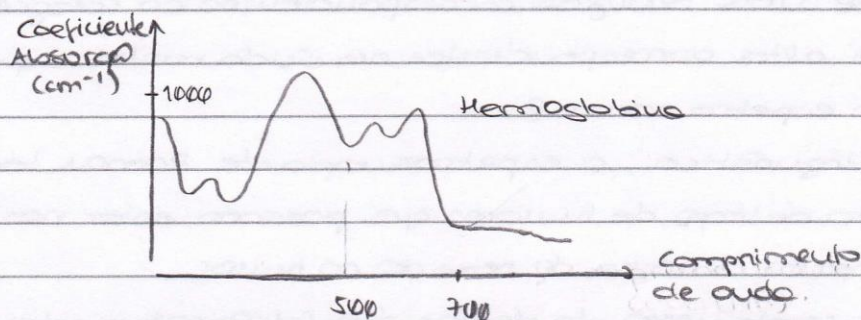
a. Optical trap é formado por um feixe de laser muito focado em conjunto com lentes de alta abertura numérica (NA). Cada fóton possui um momento que pode ser transferido para partículas durante a interação. Uma partícula dielétrica é atraída pelo gradiente no local mais focado do feixe (beam waist) e experimenta uma força devido ao momento transferido dos fótons que sofreram scatter. A força óptica resultante tem sido tradicionalmente dividida em dois componentes, 1) força de scattering, na direção de propagação da luz e 2) gradient force, na direção do gradiente espacial de luz.

Neste processo, o laser induz fluctuating dipoles na partícula dielétrica e a sua interação com esses dipolos com o campo elétrico no foco, dá origem ao gradient trapping force. Este gradiente é proporcional tanto à polarização do dielétrico como ao gradiente de intensidade ótica no foco.

Isto permite manipular e detectar partículas com dimensões na ordem dos μm e nm . Assim é possível manipular e estudar partículas de dimensões muito reduzidas.

b.

i/ii. Os glóbulos vermelhos são células constituídas por hemoglobina. O espectro de absorção da hemoglobina é conhecido e pode ser retratado:



É possível verificar que possui um elevado coeficiente de absorção para comprimentos de onda da ordem dos 550 nm, mas um baixo coeficiente de absorção para comprimento de onda da ordem dos 980 nm.

Para que ocorra "optical trapping", é necessário a utilização do laser de 980 nm, visto que, nesta gama quase não ocorre absorção e através do momento transferido dos fótons que sofreram scatter é possível que ocorra o processo.

c. O estudo físico e das propriedades químicas de um objeto microscópico é feito utilizando optical trapping juntamente com a espectroscopia de Raman. Um exemplo é o sistema LTRS (Laser tweezers Raman spectroscopy) aplicado para a detecção de variação de hemoglobina nos glóbulos vermelhos em doentes diabéticos.