

## Lasers e Óptica Biomédica

Exame (época normal) 7 de junho de 2017

1. [5] Considere a técnica de espectroscopia de fluorescência no domínio da frequência. Imagine uma amostra sendo excitada por um laser modulado sinusoidalmente.
  - a. Considere um indicador fluorescente com vida útil de 1 microssegundo. Qual é o atraso de fase relativo entre o sinal de excitação e a emissão fluorescente, quando a frequência de modulação do laser é i) 1 kHz, ii) 250 kHz e iii) 1 MHz
  - b. Faça uma representação esquemática mostrando o sinal de excitação e o sinal de emissão fluorescente no mesmo gráfico, em função do tempo, considerando as relações de fase e amplitude esperadas para uma situação semelhante a ii).
  - c. Explique brevemente o comportamento observado para a fase e para a amplitude de modulação dos sinais fluorescentes.

a) Considerando

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

Com  $\tau = 1 \text{ us}$ , obtemos para i, ii e iii, respectivamente:

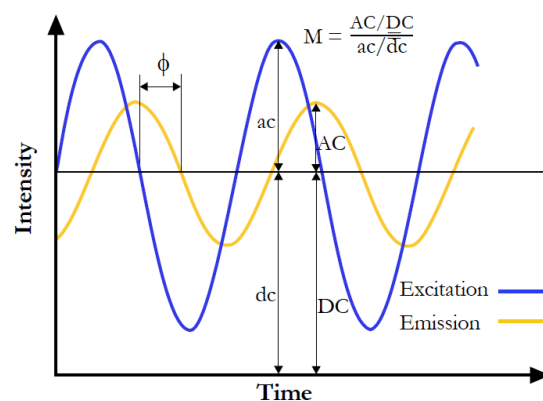
$\Rightarrow 0,4 \text{ graus}; -57,5 \text{ graus}; -81 \text{ graus}$

b) Para ii) temos  $f = 25 \text{ kHz}$  e  $-57,5 \text{ graus}$

Também  $M = 0,53$ , então devemos ter  $0,53b/a = B/A$

Desta forma, você deve desenhar um gráfico semelhante a:

Fazendo com que  $-57,5 \text{ graus}$  e  $M = 0,53$

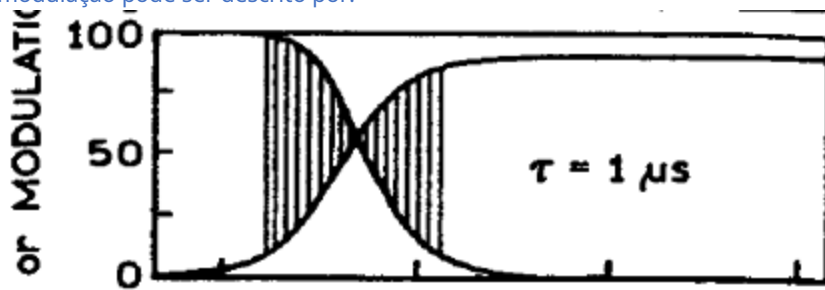


c) Quando um fluoróforo é excitado por um laser modulado em uma determinada frequência  $f$ , ele responderá com um

emissão com comportamento senoidal semelhante, mas com amplitude e fase que dependem da relação entre a frequência de modulação e o tempo de vida, conforme dado acima.

Isso acontece porque para cada “ponto” de excitação no tempo, o fluoróforo responderá com um decaimento exponencial proporcional ao seu tempo de vida.

Desta forma, à medida que mudamos a frequência o comportamento observado pela fase e amplitude da modulação pode ser descrito por:



Para frequências pequenas comparadas a  $1/\tau$ , a resposta do fluoróforo é rápida o suficiente para que o atraso de fase seja quase zero e a modulação próxima de 100%.

À medida que nos aproximamos de  $f \sim 1/\tau$ , o tempo de decaimento começa a ser grande comparado com o período de modulação. Desta forma o atraso de fase aumentará para valores em torno de 45 graus, e, devido à sobreposição dos decaimentos exponenciais a modulação diminuirá, reduzindo o contraste para cerca de 50%.

Se a frequência continuar aumentando, a modulação tende a zero conforme a fase se aproxima de 90 graus.

## 2. [5] Raman.

- Explique brevemente em que consiste o espalhamento Raman.
  - Discuta as vantagens e desvantagens relativas do uso de um sistema Raman com um laser emitindo a 488 nm ou a 1064 nm.
  - Considerando que você deseja detectar uma transição vibracional em  $1020 \text{ cm}^{-1}$ , em qual comprimento de onda a transição Raman aparecerá usando o laser de 488 nm e usando o laser de 1064 nm?
- a) O sinal Raman surge do espalhamento inelástico onde a radiação laser incidente interage com a estrutura do nível vibracional da amostra, resultando em fótons sendo espalhados com energia maior ou menor (onde a diferença corresponde exatamente à energia do laser incidente menos ou mais a energia de um nível vibracional específico). O espalhamento inelástico tem baixa probabilidade e só pode ser observado para intensidades relativamente altas, alcançáveis apenas com lasers. O sinal de espalhamento cresce com a intensidade do incidente, a frequência da radiação e o número de moléculas excitadas. O sinal observado pode fornecer dados que permitem a identificação e em alguns casos a quantificação de espécies químicas na amostra.
- b) Quanto menor o comprimento de onda, maior será o sinal Raman resultante, portanto, em 488 nm, o sinal Raman deverá ser muito mais longo do que aquele obtido com o laser de 1064 nm. Por outro lado, 488 nm ainda é energético o suficiente para estimular o comportamento de fluorescência na amostra, o que dificultará ainda mais a análise do sinal Raman. Geralmente um compromisso deve ser feito, dependendo

no material alvo e seu plano de fundo.

c) Uma transição em 1020 cm<sup>-1</sup> corresponde ao comprimento de onda infravermelho de 9803 nm, dado por:

$$\sigma[in\ cm^{-1}] = \frac{10^7}{\lambda[in\ nm]}$$

Se usarmos um laser a  $\lambda_{exc}=488\text{ nm}$  para excitar a amostra, o sinal Raman (1020 cm<sup>-1</sup>) aparecerá em  $\lambda_{sc}$  conforme dado por:

$$\sigma_{Raman}[cm^{-1}] = \frac{10^7}{\lambda_{exc}[in\ nm]} - \frac{10^7}{\lambda_{sc}[in\ nm]}$$

O que resulta em  $\lambda_{sc} = 513,6\text{ nm}$

Se o laser de 1064 nm for usado, o sinal de dispersão aparecerá em -----nm.-

### 3. Considere captura óptica e micromanipulação.

- Explique brevemente o que é e descreva as condições necessárias para alcançá-lo.
  - Imagine que você tem uma fibra com um feixe gaussiano divergente de saída e a aponta para uma partícula de tamanho micron em uma solução. Descreva o que você acha que pode acontecer.
- a) Captura óptica é a técnica pela qual pequenas micropartículas podem ser selecionadas, capturadas e manipuladas utilizando um campo óptico com características adequadas. Cada fóton carrega uma pequena quantidade de momento que pode transferir para a matéria na forma de uma força que atua sobre ela. Esta força é muito pequena, mas quando o feixe de luz incide numa pequena micropartícula, a força resultante pode ser suficiente para afastar a partícula da fonte de fótons. Isso é chamado de força de dispersão. Se, além disso, o feixe estiver fortemente focado, e na condição de a partícula não absorver os fótons, os fótons que entram e saem da partícula, na região do gradiente de campo, podem gerar uma força puxando a partícula em direção ao máximo do gradiente. Isso é chamado de força gradiente. O equilíbrio entre essas duas forças pode criar pontos de força resultante zero onde as partículas ficam presas de forma estável.
- b) Um feixe gaussiano divergente terá predominantemente forças de espalhamento atuando nas partículas e elas serão afastadas. Como o feixe, no entanto, possui um gradiente na direção transversal, a partícula que atravessa o feixe será puxada em direção ao eixo óptico e afastada da fibra. Quando a partícula é empurrada contra a superfície de uma lâmina microscópica e a fibra é inclinada, isso pode ser usado para captura óptica 2D. Isso acontecerá desde que a partícula não absorva neste comprimento de onda, e que tenhamos energia suficiente.