

# Pulsos Láser de Femtosegundo en Espectroscopía y Microscopía de dos Fotones

## (Femtosecond Laser Pulses in two-photon Spectroscopy and Microscopy)

Yves Coello y Marcos Dantus<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, *Michigan State University*

<sup>2</sup>East Lansing, MI 48824, EE. UU.

### Resumen

Se describe la aplicación de pulsos láser ultracortos ( $\leq 10$ fs) en espectroscopía y microscopía de dos fotones llevada a cabo en nuestro grupo de investigación, subrayando las ventajas y requerimientos de este enfoque. Además se presenta una breve descripción de la manipulación de pulsos, de las distorsiones de fase experimentadas por los pulsos láser de femtosegundo y de cómo corregir tales distorsiones utilizando manipuladores de pulsos.

**Palabras claves:** pulsos láser de femtosegundos, manipulador de pulsos, caracterización de pulsos, espectroscopía no lineal, microscopía de dos fotones.

### Abstract.

The application of shaped ultrashort laser pulses ( $\leq 10$ fs) in two-photon spectroscopy and microscopy carried out in our group is described, highlighting the advantages and requirements of this approach. In addition, a brief description of pulse shaping, phase distortions experienced by femtosecond laser pulses and how to correct these distortions using a pulse shaper is also presented.

**Keywords:** femtosecond laser pulses, pulse shaping, pulse characterization, nonlinear spectroscopy, two-photon microscopy.

### 1. Introducción

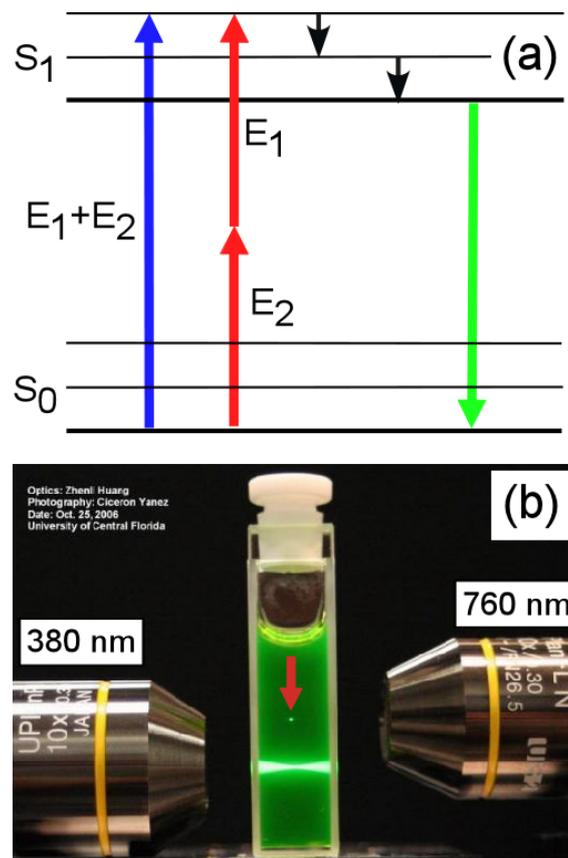
La posibilidad de una absorción simultánea de dos fotones fue predicha teóricamente por Maria Göppert-Mayer (1906-1972) en 1931<sup>1</sup>, aunque su verificación experimental no fue posible hasta el descubrimiento del láser. El concepto se basa en que dos fotones de energías  $E_1$  y  $E_2$  pueden ser absorbidos simultáneamente por un átomo o molécula (no secuencialmente a través de un estado electrónico intermedio) y excitar al sistema tal como lo haría un solo fotón de energía  $E_1+E_2$  (Fig. 1(a)). La probabilidad de una excitación de dos o

---

<sup>3</sup> coelloyv@msu.edu

más fotones es muy pequeña y por lo tanto se requiere una intensidad muy grande de radiación para que la excitación ocurra.

El desarrollo de generadores de pulsos láser de femtosegundo<sup>2</sup> ( $1\text{fs}=10^{-15}\text{s}$ ) ha hecho posible la obtención de intensidades pico suficientes para la observación de una variedad de procesos multifotónicos. Potencias pico antes inimaginables se obtienen hoy cotidianamente con instrumentos comerciales. Esto es posible gracias a la brevedad de los pulsos de femtosegundo. Por ejemplo, un típico generador de pulsos láser no amplificado produce pulsos de 10 fs con una repetición de 100 MHz y una potencia promedio de 500 mW, lo cual equivale a una energía de 5 nJ/pulso y a una potencia pico de 0.5 MW. Cuando un rayo láser con estas características es enfocado en una muestra procesos multifotónicos pueden ocurrir en el punto de enfoque, donde la intensidad de radiación es máxima y alcanza varios  $\text{TW}/\text{cm}^2$  ( $1\text{TW}=10^{12}\text{W}$ ). La Fig. 1(b) muestra la fluorescencia resultante de absorciones de uno y dos fotones en una solución de fluoresceína. Nótese que en el caso de dos fotones, la fluorescencia está restringida al punto de enfoque, el cual se señala con una flecha en la figura. Esta propiedad es aprovechada en la microscopía de fluorescencia dos fotones (TPFM, *two-photon fluorescence microscopy*).



**Fig. 1.** Excitación electrónica de dos fotones en un sistema fluorescente. (a) Diagrama de energía para excitaciones electrónicas de uno (azul) y dos fotones (rojo). El sistema es llevado del nivel fundamental  $S_0$  a un nivel excitado  $S_1$  mediante la absorción de un fotón de

energía  $E_1+E_2$  o mediante la absorción simultánea de dos fotones de energías  $E_1$  y  $E_2$ , respectivamente. La flecha verde representa la fluorescencia emitida. (b) Fluorescencia resultante de excitaciones de uno y dos fotones en una solución de fluoresceína. Se utilizaron pulsos de 200 fs centrados en 380 y 760 nm, respectivamente. Nótese que en el caso de dos fotones, la excitación y por tanto la emisión de fluorescencia sólo ocurren en el punto de enfoque del rayo láser, donde la intensidad pico de radiación es máxima. La fotografía fue cortesía del Prof. Kevin D. Belfield de la Universidad Central de Florida (<http://belfield.cos.ucf.edu/>).

La TPFM fue demostrada por primera vez en 1991 por W. Denk y W. W. Webb<sup>3</sup> y es actualmente muy utilizada en ciencias biológicas. En esta técnica la muestra se ilumina con pulsos láser infrarrojos (IR) de femtosegundo enfocados y los fluoróforos presentes en el volumen de enfoque emiten fluorescencia luego de experimentar una absorción de dos fotones. La fluorescencia emitida es utilizada para construir la imagen de la muestra. Conocer el espectro de dos fotones (TPS, *two-photon spectrum*) de los fluoróforos empleados en TPFM es esencial, de ahí la importancia de la espectroscopía de dos fotones.

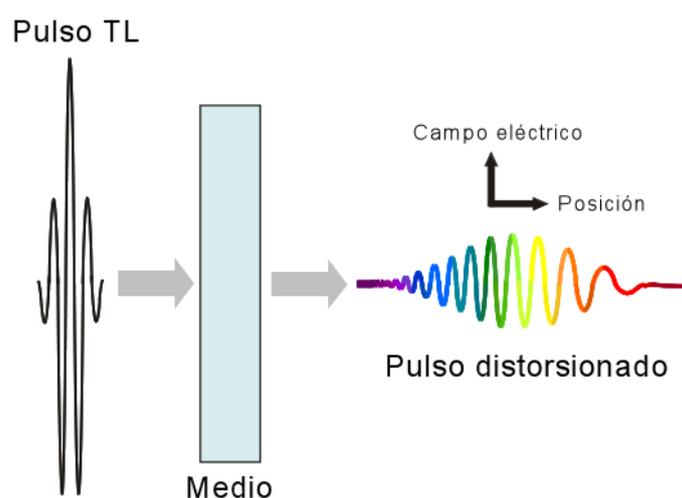
A diferencia del enfoque usado convencionalmente que emplea pulsos láser de  $\sim 100$ fs,<sup>3,4</sup> aquí describimos la aplicación de pulsos láser ultracortos ( $\leq 10$ fs) en espectroscopía y microscopía de dos fotones. Su utilización posee varias ventajas que se describirán en las secciones 4 y 5, pero involucra también más dificultades, como se explica en la sección siguiente.

## 2. Los Pulsos Láser de Femtosegundo y la Dispersión Cromática

Los pulsos láser de femtosegundo, a diferencia de los rayos láser cuasi-monocromáticos más comunes, poseen un ancho de banda espectral (*i.e.*, el conjunto de longitudes de onda que conforman el pulso) particularmente grande (usualmente  $>5$  nm). Nótese que mientras mayor sea el ancho de banda espectral  $\Delta\nu$ , menor será la mínima duración posible del pulso, tal como indica el principio de incertidumbre  $\Delta\nu\Delta t \geq K$ , donde  $\Delta t$  es la duración del pulso y  $K$  una constante que depende de la distribución del espectro (gaussiana, sech, cuadrada, etc.). La desigualdad indica que la duración de un pulso no queda definida con su espectro. Esto se debe a que el perfil temporal de un pulso depende también de la fase relativa de las diferentes frecuencias que lo componen, o sea de su fase espectral  $\phi(\omega)$ . Cuando todas las frecuencias que conforman un pulso están en fase ( $\phi(\omega)$  constante), la igualdad se satisface ( $\Delta\nu\Delta t = K$ ) y el pulso tiene su mínima duración posible<sup>5</sup>. Tal pulso se denomina limitado por transformación (TL, *transform-limited*), ya que su perfil temporal corresponde simplemente a la transformación de Fourier del espectro del pulso. Para tener una idea de las magnitudes de  $\Delta\nu$  y  $\Delta t$ , nótese que pulsos gaussianos centrados en 800 nm y con ancho espectral de 10 y 100 nm tendrían una duración TL de 100 y 10 fs, respectivamente.

Desafortunadamente los pulsos TL, especialmente aquellos de duración  $<50$ fs, se distorsionan fácilmente al atravesar cualquier medio (lentes, objetivos, cubetas, e incluso aire) debido a la dispersión cromática<sup>6</sup>. Este fenómeno es consecuencia de que el índice de refracción de la luz varía con la longitud de onda. Cuando pulsos TL se propagan en un medio, diferentes longitudes de onda viajan a diferentes velocidades produciéndose un desfase entre las frecuencias que componen el pulso. Esta distorsión origina un ensanchamiento temporal y una disminución de la intensidad pico del pulso, tal como se ilustra en la Fig. 2. El efecto de la dispersión cromática es más severo mientras más breves sean los pulsos. Por ejemplo, si pulsos TL de 50 y 10 fs centrados a 800 nm viajan a través de 1 cm de cuarzo su duración se incrementará hasta 54 y 100 fs, respectivamente. La Fig. 2 muestra el tipo más sencillo de distorsión posible, una distorsión cuadrática de fase espectral, que corresponde a una variación lineal de la frecuencia instantánea con el tiempo (*linear chirp*). Las distorsiones sufridas por un pulso se tornan mucho más complejas que la distorsión cuadrática mostrada en la Fig. 2 a medida que el pulso atraviesa más material y mientras más breve sea el pulso TL inicial. Estas distorsiones más complejas se denominan de orden superior (cúbica, cuártica, etc.) y conllevan, por ejemplo, la formación de subpulsos y una variación compleja de la frecuencia con el tiempo<sup>5</sup>.

El ensanchamiento temporal causado por la dispersión cromática ha sido un impedimento para la utilización de pulsos de duración  $<50$  fs en muchas aplicaciones. En particular, la intensidad pico de pulsos ensanchados temporalmente es menor a la de los pulsos TL y en consecuencia son menos eficientes para producir una excitación multifotónica. En la sección siguiente se describe el manipulador de pulsos y cómo este instrumento permite corregir distorsiones en los pulsos de femtosegundo.



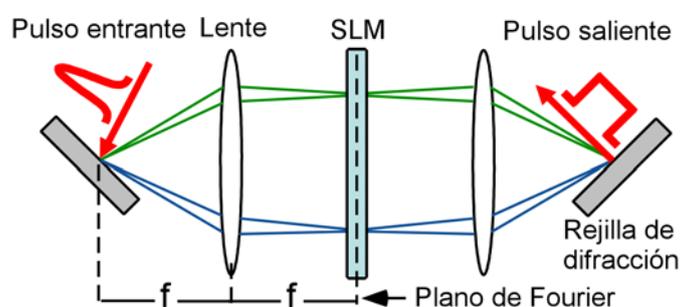
**Fig. 2.** Efecto de la dispersión cromática en los pulsos láser de femtosegundo. Al atravesar un medio óptico, un pulso inicialmente TL se ensancha temporalmente produciéndose una disminución de su intensidad máxima. El pulso distorsionado mostrado muestra una variación lineal de la frecuencia con el tiempo (los colores representan diferentes frecuencias).

### 3. El Manipulador de Pulsos y la Corrección de la Dispersión Cromática

Para corregir las distorsiones en un láser de femtosegundo se requiere de un manipulador de pulsos (*pulse shaper*), dispositivo capaz de avanzar o retardar frecuencias individuales del láser, en otras palabras, de modificar  $\varphi(\omega)$ . Los manipuladores de pulsos más sencillos, propuestos hace varias décadas, constan de prismas o rejillas de difracción en un arreglo especial<sup>5</sup>, pero sólo permiten corregir distorsiones cuadráticas de fase. Actualmente existen manipuladores de pulsos que modifican la fase espectral mediante espejos deformables, dispositivos acusto-ópticos o moduladores espaciales de luz programables de cristal líquido (SLM, *spatial light modulator*) y son capaces de corregir distorsiones de fase complejas (de orden superior)<sup>7</sup>. Los manipuladores que funcionan en base a los SLM son los más populares y se describirán aquí.

La Fig. 3 muestra un manipulador de pulsos basado en un SLM<sup>8</sup>. Las frecuencias del pulso entrante son dispersadas mediante una rejilla de difracción (o un prisma). A continuación la luz dispersada se colima y se enfoca con un lente o con un espejo cóncavo en el plano de Fourier, donde las frecuencias se encuentran separadas y pueden manipularse individualmente. El resto del manipulador, el segundo lente y la segunda rejilla de difracción, combinan las diferentes frecuencias nuevamente. En el plano de Fourier se coloca el SLM, el dispositivo responsable de modificar  $\varphi(\omega)$ .

El SLM está formado por un arreglo de compartimientos o píxeles de cristal líquido birrefringente de unos pocos micrómetros de ancho, cuyo índice de refracción puede alterarse al aplicárseles un voltaje. Por consiguiente, es posible retardar frecuencias determinadas controlando el voltaje aplicado y modificar  $\varphi(\omega)$  como se desee, siempre que el SLM se haya calibrado previamente. Existen también SLM's capaces de controlar el espectro de los pulsos, además de su fase. Éstos requieren la utilización de dos máscaras de cristal líquido y de un polarizador. El lector interesado en conocer en más detalle el funcionamiento de los manipuladores de pulso en base a SLM's puede consultar la referencia <sup>8</sup>.



**Fig. 3. Manipulador de pulsos basado en un SLM.** El pulso entrante es dispersado mediante una rejilla de difracción y las frecuencias resultantes son enfocadas en el SLM, ubicado en el plano de Fourier. Los rayos verde y azul representan las frecuencias extremas del pulso. El SLM introduce la fase deseada, mientras que mitad derecha del manipulador

reconstruye el pulso. Nótese que el pulso saliente difiere del entrante debido a la fase introducida por el SLM. El diseño mostrado se denomina 4f, siendo f la distancia focal del lente.

La corrección las distorsiones de un láser es directa si se conoce su fase  $\varphi(\omega)$ , pues basta añadir  $-\varphi(\omega)$  utilizando el manipulador para obtener pulsos TL. Sin embargo, la mayor dificultad radica en medir  $\varphi(\omega)$ . Existen algunos métodos que caracterizan la fase espectral con diferentes grados de éxito. Nuestro grupo ha desarrollado un método capaz de medir las distorsiones de fase de los pulsos con gran exactitud. El método, denominado barrido de fase de interferencia intrapulso multifotónica<sup>9</sup> (MIIPS, *multiphoton intrapulse interference phase scan*), mide  $\varphi(\omega)$  aprovechando su efecto en los procesos no-lineales, tales como la generación de segundo armónico (SGH, *second harmonic generation*) o doblado de frecuencia. La SGH es un proceso en el cual pares de fotones interactúan en un cristal no-lineal y generan fotones con energía igual a la suma de los dos fotones iniciales. El espectro resultante de este proceso, SHG(2 $\omega$ ), depende de la fase  $\varphi(\omega)$  según la ecuación

$$SHG(2\omega) \propto \left| \int_{-\infty}^{\infty} |E(\omega + \Omega)| |E(\omega - \Omega)| \exp[i\{\varphi(\omega + \Omega) + \varphi(\omega - \Omega)\}] d\Omega \right|^2, \quad (1)$$

donde  $E$  representa el campo eléctrico en dominio de la frecuencia. MIIPS mide  $\varphi(\omega)$  a través del comportamiento de SHG(2 $\omega$ ) al variar  $\varphi(\omega)$  introduciendo fases de referencia mediante un manipulador de pulsos. El lector interesado en una explicación detallada de este método y de sus aplicaciones puede consultar la referencia<sup>9</sup>.

Cabe mencionarse que los manipuladores de pulso no sólo se utilizan para corregir distorsiones de fase de pulsos láser, sino también para generar pulsos especialmente diseñados (con espectro y fase específicos) útiles en aplicaciones tales como control coherente<sup>7</sup>, espectroscopía y microscopía multifotónicas (secciones 4 y 5).

#### 4. Espectroscopía de Dos Fotones

El creciente empleo de la TPFM ha incrementado el interés en técnicas capaces de medir el TPS de un fluoróforo. Para determinar qué fluoróforo es útil en una determinada región del espectro electromagnético, cuál absorbe y emite fluorescencia de modo más eficiente, o para cuantificar su presencia en la muestra es necesario conocer su TPS.

Podría pensarse que conociendo el espectro de absorción (de un fotón) de un fluoróforo, que es sencillo de obtener, el espectro de absorción de dos fotones podría calcularse. Sin embargo, éste no es el caso debido a que las absorciones de uno y dos fotones tienen diferentes reglas de selección<sup>4</sup>. Como consecuencia, el TPS de una molécula puede mostrar absorciones no presentes (prohibidas) en el espectro de absorción de un fotón. Por tal razón, el TPS debe medirse directamente.

Existen dos maneras de determinar el TPS de un fluoróforo. Una es determinar la sección transversal de absorción de dos fotones  $\sigma_{\text{TPA}}(\omega)$  (*two-photon absorption cross-section*) directamente midiendo la cantidad de luz absorbida al atravesar la muestra como función de la frecuencia. Debido a que se requiere una gran potencia incidente para obtener una absorción medible, este enfoque es complicado de poner en práctica. La otra manera es medir la fluorescencia generada como consecuencia de la excitación de dos fotones. A partir de la señal fluorescente se determina la correspondiente sección transversal  $\sigma_{\text{TPE}}(\omega)$  (*two-photon excitation action cross-section*). Dado que la cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de radiación absorbida, ambas secciones transversales se relacionan según  $\sigma_{\text{TPE}} = \eta \times \sigma_{\text{TPA}}$ , donde  $\eta$  es la eficiencia cuántica de fluorescencia<sup>10</sup>.

Como se mencionó antes, la probabilidad de ocurrencia de un evento multifotónico aumenta con la intensidad pico de la radiación excitante, o equivalentemente, aumenta a medida que la duración de los pulsos disminuya. En efecto, el número de fotones absorbidos en un proceso de dos fotones  $N^{(2)}$  es

$$N^{(2)} = \sigma^{(2)} \int_{-\infty}^{\infty} \left( \frac{I(t)}{\hbar\omega} \right)^2 dt \approx \sigma^{(2)} \int_{-\infty}^{\infty} \left( \frac{N}{A\tau} \right)^2 dt \quad (2)$$

donde  $\sigma^{(2)}$  representa la sección transversal de absorción de dos fotones del fluoróforo,  $I(t)$  la intensidad del pulso,  $N$  el número de fotones en el pulso,  $A$  el área iluminada y  $\tau$  la duración del pulso. Entonces, la probabilidad de absorción  $p$  es

$$p = \frac{N^{(2)}}{N} = \frac{\sigma^{(2)} N}{A^2 \tau}. \quad (3)$$

Por tanto la probabilidad de una absorción de dos fotones es inversamente proporcional a la duración del pulso. En una absorción de un fotón,

$$N^{(1)} = \sigma^{(1)} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{I(t)}{\hbar\omega} dt \approx \sigma^{(1)} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{N}{A\tau} dt \quad \text{y} \quad p = \frac{N^{(1)}}{N} = \frac{\sigma^{(1)}}{A}, \quad (4)$$

donde  $\sigma^{(1)}$  representa la correspondiente sección transversal de absorción de un fotón y  $N^{(1)}$  el número de fotones absorbidos en el proceso. En consecuencia la probabilidad de absorción de un fotón no depende de la duración del pulso.

Nótese que según (4),  $\sigma^{(1)}$  tiene dimensiones de área y típicamente varía en el rango  $10^{-15}$ - $10^{-17}$  cm<sup>2</sup>, que corresponde a áreas comparables con las de las moléculas. De acuerdo a (3), las dimensiones de  $\sigma^{(2)}$  corresponden a las de  $A^2\tau/N$ . Tradicionalmente  $\sigma^{(2)}$  se reporta en unidades Göppert-Mayer (GM), siendo 1 GM= $10^{-50}$  cm<sup>4</sup>s/fotón.

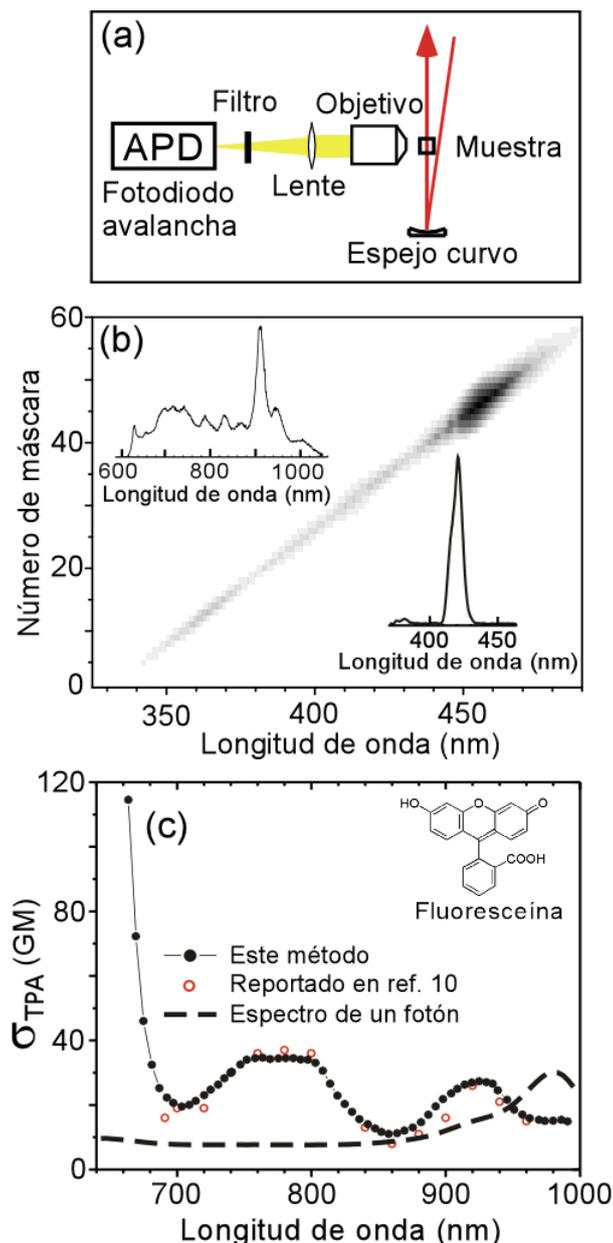
El método para medir espectros de dos fotones que describimos aquí se basa en la utilización de un oscilador láser Ti:zafiro capaz de generar pulsos de 4.3 fs con un ancho de banda espectral que se extiende ~400 nm (el espectro se muestra en el inserto superior izquierdo de la Fig. 4(b)). Debido a su duración tan breve, dichos pulsos sufren severas distorsiones de fase al propagarse en medios ópticos tal como se explicó en la Sección 1. Por esta razón pulsos <5fs son aún pocas veces usados en aplicaciones prácticas. Mediante el uso de MIIPS hemos logrado corregir las distorsiones de fase del láser y obtenido pulsos TL de 4.3fs, que corresponde a una de las duraciones más breves que se hayan reportado para pulsos en el espectro IR. También hemos demostrado la utilidad de dichos pulsos para lograr excitación selectiva en aplicaciones espectroscópicas<sup>11</sup>.

Para medir el TPS de un fluoróforo se requiere excitar la muestra sucesivamente con pulsos láser a varias longitudes de onda. Nuestro método<sup>12</sup> incluye un manipulador de pulsos capaz de modular el espectro de los pulsos con este fin. La Fig. 4(a) muestra el diseño experimental. Los pulsos láser modulados se enfocan en la muestra. La fluorescencia emitida se colecta con un objetivo y se enfoca en el detector, un fotodiodo avalancha (APD, *avalanche photodiode*). La Fig. 4(b) ilustra la excitación selectiva lograda gracias al manipulador de pulsos. La línea diagonal corresponde a los espectros SHG de los pulsos modulados ordenados según su longitud de onda. El espectro SHG se da al doble de la frecuencia (o a la mitad de la longitud de onda) del espectro de radiación que lo generó (ecuación 1). Por ejemplo, el espectro SHG a 425 nm mostrado en la parte inferior derecha de la Fig. 4(b) fue generado por un pulso modulado a 850 nm. El espectro SHG es directamente proporcional al espectro efectivo de radiación que “siente” la molécula en el proceso de absorción de dos fotones. Así, el pulso modulado a 850 nm excita a la molécula en una absorción de dos fotones tal como lo haría un pulso con el espectro a 425 nm mostrado en la Fig. 4(b) en una absorción de un fotón. Cada máscara (función de modulación) aplicada por el manipulador de pulsos genera un pulso con espectro centrado a una longitud de onda particular, de modo que la aplicación sucesiva de las máscaras genera un barrido de longitudes de onda.

La sección transversal  $\sigma_{TP}(\omega)$  es directamente proporcional a  $E_F(\omega)/E_{SHG}(\omega)$ , donde  $E_F(\omega)$  es la energía de la fluorescencia emitida y  $E_{SHG}(\omega)$  la energía del correspondiente espectro SHG. La constante de proporcionalidad se obtiene con ayuda de un fluoróforo de referencia<sup>10</sup>.

La Fig. 4(c) muestra el TPS de un fluoróforo común, la fluoresceína. También se muestra el espectro de absorción de un fotón graficado al doble de la longitud de onda. Nótese que el TPS muestra una transición a ~780nm ausente (prohibida) en el espectro de absorción de un fotón. La transición a ~920nm se encuentra desplazada hacia el azul con respecto a el doble de la longitud de onda correspondiente a la transición de un fotón. Este desplazamiento hacia el azul ha sido observado en varios casos<sup>4,10</sup>. La figura 4(c) también muestra el TPS reportado por W. W. Webb *et al.* El método que emplearon se basa en un láser de longitud de onda variable (*tunable femtosecond laser*) con ~10nm de ancho de banda FWHM. El

método aquí presentado, basado en un láser con un ancho de banda que abarca ~400 nm y un manipulador de pulsos, tiene varias ventajas. La longitud de onda del generador láser no requiere ser variada. El espectro es modificado mediante el manipulador de pulsos, por lo que el método es fácilmente automatizable. Además, la resolución que proporciona este método es mayor y puede alcanzar hasta ~1nm si se implementa manipulación de fase espectral en vez de manipulación de amplitud espectral<sup>12,13</sup>.



**Fig. 4. Espectroscopía de dos fotones.** (a) Diseño del experimento. Los pulsos manipulados son enfocados en la muestra con un espejo curvo. La fluorescencia es colectada con un objetivo y enfocada con un lente en el detector (fotodiodo avalancha). El filtro se utiliza para bloquear la radiación del láser. (b) Excitación selectiva con pulsos manipulados. El gráfico de contorno (línea diagonal) muestra los espectros SHG generados

por los pulsos modulados espectralmente en orden de longitud de onda creciente. El espectro inferior derecho (unidades arbitrarias) muestra un ejemplo de espectro SHG. El gráfico superior izquierdo (unidades arbitrarias) corresponde al espectro de los pulsos no modulados. (c) Espectro de absorción de dos fotones de la fluoresceína. El espectro de absorción de un fotón graficado al doble de la longitud de onda de muestra como comparación. Los círculos rojos corresponden a los valores reportados en referencia 10<sup>10</sup>.

## 5. Microscopía de Dos Fotones

En la microscopía de fluorescencia dos fotones<sup>3</sup> la muestra se excita sucesivamente en diferentes posiciones con pulsos láser IR de femtosegundo enfocados y la fluorescencia emitida es detectada con un tubo fotomultiplicador (PMT, *photomultiplier tube*). La imagen se construye graficando la intensidad de la fluorescencia emitida como función de la posición para uno o varios fluoróforos. La TPFM tiene varias ventajas respecto de otras técnicas de microscopía de fluorescencia, las cuales se basan en excitación con radiación ultravioleta (UV). Por ejemplo, la radiación IR utilizada en TPFM penetra tejidos biológicos más eficientemente que la radiación UV. Además, cuando se analizan células vivas con TPFM éstas no se exponen a la radiación UV, que resulta más dañina para las células.

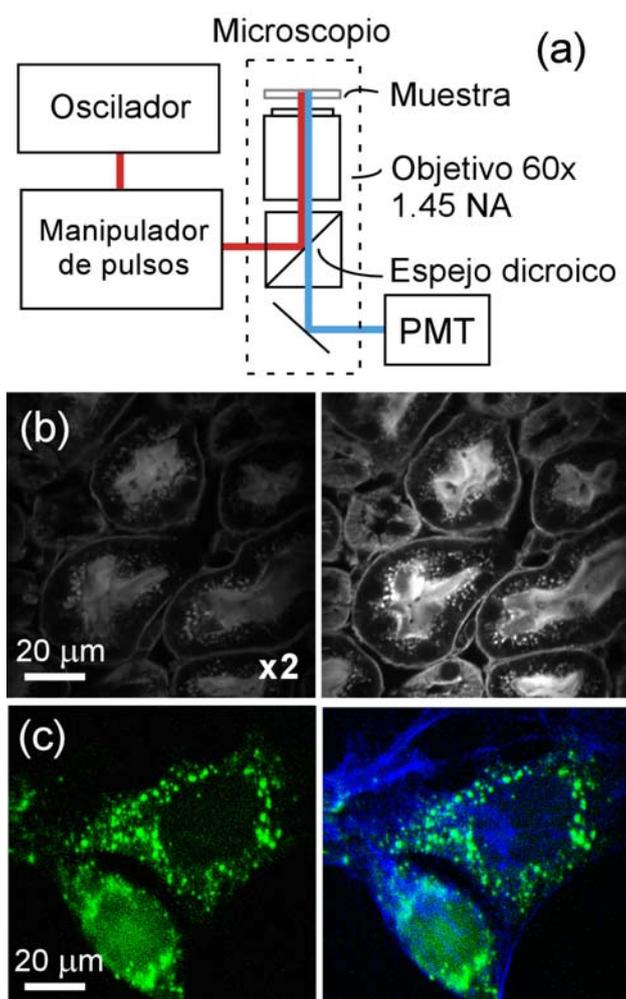
Como se desprende de la ecuación (3), la magnitud de la fluorescencia inducida por una absorción de dos fotones es inversamente proporcional a la duración del pulso si se mantiene la energía del pulso constante. Actualmente son comunes osciladores láser comerciales capaces de generar pulsos de 10fs. No obstante, en TPFM aún se utilizan pulsos de 100fs, tal como hace más de quince años, porque el incremento esperado en la señal (10x) no se ha observado experimentalmente. Esto se debe a que el efecto de la dispersión cromática en los pulsos de 10fs es severo y éstos llegan ensanchados temporalmente a la muestra.

La principal fuente de dispersión cromática en TPFM es el objetivo utilizado para enfocar el láser y colectar la fluorescencia (Fig. 5(a)). Tradicionalmente los pulsos sólo se comprimen parcialmente utilizando un precompresor de prismas o rejillas de difracción, que sólo corrige las distorsiones cuadráticas de fase espectral (Sección 2). Sin embargo, esto no es suficiente para observar las ventajas esperadas de la utilización de pulsos de duración  $\leq 10$ fs. Es pues, la falta de un método de caracterización y corrección de distorsiones de fase en TPFM, incluidas aquellas de orden superior, la que ha impedido que las ventajas que conlleva la utilización de pulsos más breves se concreten.

Nuestro grupo de investigación ha empleado MIIPS (Sección 3) para corregir completamente estas distorsiones de fase y obtener pulsos de 10fs en la muestra. Las ventajas de la utilización estos pulsos incluyen mayor intensidad de fluorescencia, mayor penetración en la muestra, mejor relación señal-ruido y menor daño inducido por radiación a los fluoróforos (*photobleaching*).<sup>14</sup>

La Fig. 5(a) muestra un esquema simplificado del microscopio de fluorescencia de dos fotones. La Fig. 5(b) muestra una comparación de imágenes obtenidas con pulsos corregidos sólo con un precompresor (izquierda) y corregidos con MIIPS (derecha). La diferencia en las imágenes se debe a que un precompresor corrige las distorsiones de fase parcialmente (sólo aquellas de segundo orden) mientras que MIIPS las corrige completamente. En consecuencia los pulsos corregidos con MIIPS sí llegan a la muestra con la duración TL de 10fs y la intensidad de fluorescencia es óptima.

Otra ventaja que conlleva la utilización de pulsos más breves es la posibilidad de lograr excitación selectiva de fluoróforos<sup>14</sup>. Esta capacidad es útil cuando la muestra contiene fluoróforos localizados en la misma región. En el experimento mostrado en la Fig. 5(c) se utilizó una muestra biológica tratada con tintes que absorben a diferentes longitudes de onda. Cada tinte es afin a una estructura subcelular. Para lograr la excitación selectiva se utilizó manipulación de amplitud espectral, de modo similar al procedimiento explicado en la sección anterior. En este caso es suficiente dividir el espectro de los pulsos en dos regiones (<800 nm y >800 nm) para excitar a un sólo fluoróforo en cada caso, tal como ilustra la Fig. 5(c).



**Fig. 5.** Microscopía de fluorescencia de dos fotones. (a) Esquema del microscopio. Los pulsos provenientes del manipulador de pulsos (rayo rojo) se enfocan en la muestra

mediante un objetivo. La fluorescencia resultante (rayo azul) se colecta con el objetivo y se dirige al detector, un tubo fotomultiplicador (PMT). (b) Óptima señal fluorescente con pulsos corregidos por MIIPS. Imágenes de una muestra de riñón de ratón cuando se emplean pulsos corregidos con un precompresor (izquierda) y pulsos corregidos con MIIPS (derecha). Nótese que intensidad de la imagen izquierda se ha incrementado dos veces para que las estructuras celulares sean visibles. (c) Excitación selectiva de fluoróforos. La muestra corresponde a células HeLa. Los filamentos de actina fueron teñidos con Phalloidin-350 y las mitocondrias con MitoTracker-488. Estos tintes pueden ser excitados selectivamente con radiación de longitud de onda menor o mayor que 800 nm, respectivamente. El panel izquierdo ilustra el segundo caso, en el que se visualizan las mitocondrias exclusivamente. El panel derecho combina las dos imágenes obtenidas mediante excitación selectiva.

## 6. Conclusiones

La utilización de pulsos láser más breves ( $\leq 10$  fs) ofrece varias ventajas en las áreas de espectroscopía y microscopía de dos fotones. Estas ventajas sólo se llevan a cabo si se dispone de un método capaz de medir y corregir las distorsiones de fase espectral a las que estos pulsos están sujetos. La disponibilidad de un manipulador de pulsos no sólo es importante para corregir las distorsiones de fase del láser, sino también para generar pulsos especialmente diseñados para un objetivo particular, como por ejemplo la excitación selectiva a cierta longitud de onda.

## 7. Referencias

1. Goppert-Mayer, M. *Elementary file with two quantum fissures. Annalen Der Physik* **1931**, 9, 273-294.
2. Keller, U. *Recent developments in compact ultrafast lasers. Nature* **2003**, 424, 831-838.
3. Denk, W.; Strickler, J.; Webb, W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **1990**, 248, 73-76.
4. Xu, C.; Webb, W. W. *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* **1996**, 13, 481-491.
5. Wollenhaupt, M.; Assion, A.; Baumert, T. in *Springer Handbook of Lasers and Optics*, ed. Träger, F.: Springer, New York, 2007, pp 937-983.
6. Walmsley, I.; Waxer, L.; Dorrer, C. *The role of dispersion in ultrafast optics. Review of Scientific Instruments* **2001**, 72, 1-29.
7. Dantus, M.; Lozovoy, V. V. *Experimental coherent laser control of physicochemical processes. Chemical Reviews* **2004**, 104, 1813-1859.
8. Weiner, A. M. Femtosecond pulse shaping using spatial light modulators. *Rev. Sci. Instrum.* **2000**, 71, 1929-1960.

9. Coello, Y. et al. *Interference without an interferometer: a different approach to measuring, compressing, and shaping ultrashort laser pulses*. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* **2008**, *25*, A140-A150.
10. Albota, M. A.; Xu, C.; Webb, W. W. *Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm*. *Applied Optics* **1998**, *37*, 7352-7356.
11. Xu, B. W.; Coello, Y.; Lozovoy, V. V.; Harris, D. A.; Dantus, M. *Pulse shaping of octave spanning femtosecond laser pulses*. *Optics Express* **2006**, *14*, 10939-10944.
12. Xu, B.; Coello, Y.; Lozovoy, V. V.; Dantus, M. *High resolution two photon excitation spectroscopy by pulse shaping an ultrabroad bandwidth femtosecond laser* (en preparación).
13. De la Cruz, J. M.; Pastirk, I.; Comstock, M.; Lozovoy, V. V.; Dantus, M. *Use of coherent control methods through scattering biological tissue to achieve functional imaging*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 16996-17001.
14. Xi, P.; Andegeko, Y.; Weisel, L. R.; Lozovoy, V. V.; Dantus, M. *Greater signal, increased depth, and less photobleaching in two-photon microscopy with 10 fs pulses*. *Opt. Commun.* **2008**, *281*, 1841-1849.