UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA

**Técnicas de Microscopia Holográfica
Digital aplicadas à análise de sistemas
biológicos.**

Isis Vasconcelos de Brito

Orientador: Prof. Dr. Mikiya Muramatsu

SÃO PAULO - SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA

Técnicas de Microscopia Holográfica Digital aplicadas à análise de sistemas biológicos.

Isis Vasconcelos de Brito

Orientador: Prof. Dr. Mikiya Muramatsu

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Física
para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Mikiya Muramatsu (IFUSP)

Prof. Dr. Walter Maigon Pontuschka (IFUSP)

Prof. Dr. Antônio Domingues dos Santos (IFUSP)

Prof. Dr. Marcos Roberto da Rocha Gesualdi (UFABC)

Prof^o Dr. Niklaus Ursus Wetter (IPEN)

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Brito, Isis Vasconcelos de

Técnicas de microscopia holográfica digital aplicadas à análise de sistemas biológicos. São Paulo, 2015.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física.
Depto. de Física Geral

Orientador: Prof. Dr. Mikiya Muramatsu

Área de Concentração: Óptica

Unitermos: 1.Holografia digital; 2. Microscopia; 3. Interferometria;
4. Polarização.

USP/IF/SBI-126/2015

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus por ser meu guia e por me fornecer a força necessária para terminar essa fase difícil, mas que me trouxe imenso aprendizado em diversos níveis.

Agradeço a meus pais, Áurea e Alfredo, por seu amor incondicional, pela presença mesmo distante, pelos conselhos e pela fé que depositam em mim. Ao meu amado esposo Alan por sempre ser meu porto seguro, por sua imensa compreensão e por toda a ajuda que sempre me deu.

Aos meus irmãos, os melhores e mais especiais desse mundo. E agradeço a meus amigos, que me apoiaram de forma mais que intensa. Espalhados pelo país inteiro, nunca deixaram de estar presentes, em especial, a Miriela, minha companheira de luta e amiga mais que fiel.

Agradeço a meu orientador, o professor Mikiya Muramatsu, por me aceitar nessa jornada. Por sua paciência e sua dedicação à divulgação da ciência. Por ser uma fonte de inspiração, tanto como pessoa, como profissional. A Diogo pela companhia, pelo apoio, e pelo socorro em vários momentos. Seria tudo mais difícil sem ele. Agradeço a Lígia, nossa querida infiltrada, por tudo. As nossas conversas, discussões e ideias tornaram esse trabalho possível. Aos professores da *Univerisdad de Oriente* em Cuba, Palacios e Ricardo, pela divisão dos conhecimentos. Ao professor Adriano Alencar por me estender a mão em momentos difíceis e por seu grupo pela maravilhosa acolhida. Agradeço também a Sidney, pela conversa franca por ser sempre um bom amigo e colega de trabalho.

Agradeço à equipe do Departamento de Física Geral: membros da secretaria (Dirce, Fátima e Silvana), membros da oficina (Marcelino, sempre doce e prestativo), aos porteiros (Seu Roberto em especial), a Valdir, aos colegas de outros grupos (em especial aos alunos do Grupo de Micro Reologia do DFGE). Todos foram essenciais, de formas diversas, para cada etapa do trabalho.

Agradeço também o suporte financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Universidade de São Paulo, principalmente, ao Instituto de Física.

A todos, meu muito obrigada!

Resumo

A Microscopia Holográfica Digital (MHD) é uma poderosa ferramenta para análise não destrutiva de superfícies e caracterização morfológica e estrutural de materiais. Várias técnicas microscópicas têm sido utilizadas com esses objetivos, mas, em todas elas, a visualização de campo completo não é permitida em uma única aquisição da informação do sistema analisado, além disso, a necessidade de uso de corantes, o processo de varredura, entre outros fatores, dificulta a aquisição das imagens. A Microscopia Holográfica Digital permite contornar essas dificuldades através de um método simples e rápido. Com uma modificação em seu arranjo original, é possível revelar as diferenças na absorção e nos índices de refração experimentados por um campo transmitido por um material anisotrópico. Este método, neste trabalho, foi nomeado como Microscopia Holográfica de Polarização, o qual permite medir as diferenças de fase e de intensidade relacionadas com a birrefringência e com o dicroísmo do material, respectivamente. Dessa forma, A MHD se mostra uma ferramenta promissora na análise de problemas em diversas áreas, pois possibilita, através de uma única captura, obter informações sobre as propriedades ópticas e estruturais dos sistemas de interesse. O objetivo desse trabalho foi, além do desenvolvimento instrumental, analisar variações nas propriedades ópticas e morfológicas de eritrócitos através da quantificação dos índices de refração e perfis topográficos destes quando submetidos aos principais agentes de fixação de amostras. Essas variações são determinantes na escolha do método de análise, já que estes podem alterar significativamente os resultados, assim como a sua interpretação. Também foi descrito um novo método, baseado na técnica holográfica, de análise do dicroísmo linear através de uma varredura executada sobre os padrões de difração das componentes ortogonais do campo transmitido pela amostra. A aplicação da MHD ao estudo de processos dinâmicos também foi realizada, utilizando células cardíacas vivas e proteínas em solução. Somados, estes resultados demonstraram a possibilidade de se utilizar as técnicas holográficas como métodos de estudo amplo de microssistemas biológicos.

Palavras-chave: Holografia Digital, Microscopia, polarização, interferometria.

Abstract

The Digital Holographic Microscopy (DHM) is a powerful tool for nondestructive analysis of surfaces and for morphological and structural characterization of materials. Several microscopic techniques have been used with these purposes, but in all cases, the complete field reconstruction is not allowed in a single acquisition of information of the analyzed system, moreover, the requirements of staining and scanning procedures, among other factors, difficult the image acquisition. Digital Holographic Microscopy allows to overcome these difficulties through a simple and quick method. With a modification in its original setup, is possible to reveal the differences in absorption and refractive index experienced by a wavefield transmitted by an anisotropic material. This method, in this thesis, is named Polarization Holographic Microscopy, which allows to measure differences in phase and intensity related to the birefringence and the dichroism of the material, respectively. Thereby, the DHM is shown as a promising tool for the study of problems in several fields, because it allows, through a single capture, to obtain information related to optical and morphological properties of the systems of interest. The objective of this work was, besides instrumental development, to evaluate changes in optical and morphological properties of erythrocytes through quantification of their refractive index and topographic profiles when submitted to the main fixating agents. These changes are crucial once the method of analysis is chosen, as they can significantly alter the results, as well as their interpretation. A new method was also described based on the holographic technique, for analysis of linear dichroism, through scans performed on the diffraction patterns of the orthogonal components of the field transmitted by the sample. The application of the DHM to the study of dynamic processes was also performed, using live cardiac cells and proteins in solution. Together, these results demonstrate the possibility of using holographic techniques such as extensive methods for studying biological microsystems.

Key-words: Digital Holography, Microscopy, polarization, interferometry.

Lista de Figuras

Figura 1.1: (a) Registro de um holograma em configuração fora de eixo (<i>off-axis</i>) e (b) reconstrução.....	11
Figura 2.1: Retardo de fase gerado em uma frente de onda devido à transmissão por um objeto.	19
Figura 2.2: Esquema experimental de um Microscópio Holográfico Digital. O feixe proveniente da fonte de luz (LASER) é dividido em duas porções, sendo uma parte desviada pelo divisor de feixes DF1, o feixe referência (E_R), e a outra transmitida pelo objeto, chamada de feixe objeto (E_O). Os campos são recombinados pelo divisor de feixes DF2 interferindo na superfície do sensor CCD e formando o holograma digital.....	20
Figura 2.3: Esquema experimental de um Microscópio Holográfico Digital Invertido. O feixe proveniente da fonte de luz (LASER) é direcionado pelo espelho E1 até o espelho E2. Este feixe é dividido em duas porções pelo divisor DF1: o feixe referência (E_R), e a outra transmitida pelo objeto, chamada de feixe objeto (E_O). Nesta configuração, a lente objetiva é posicionada após o objeto, permitindo-se trabalhar com amostras em meio líquido, como células em meio de cultura. Os campos são recombinados pelo divisor de feixes DF2 interferindo na superfície do sensor CCD formando o holograma digital.....	21
Figura 2.4: Exemplo de um holograma digital obtido a partir de uma amostra de células sanguíneas depositadas sobre lâmina de vidro. A área selecionada pelo quadrado vermelho foi ampliada para melhor visualização do padrão de franjas formado.....	22
Figura 2.5: Representação da difração de uma onda em uma abertura Σ	23
Figura 2.6: Sistema de coordenadas adotado no processo de simulação da difração da luz por um holograma digital.....	25
Figura 2.7: Representação do vetor de onda k e de seus cossenos direcionais.....	30
Figura 2.8: (a) Exemplo de um holograma de células sanguíneas gerado a partir de um sistema de MHD (aumento de 40x e $\lambda = 532 \text{ nm}$). (b) Imagem correspondente ao Espectro Angular da distribuição do holograma. O retângulo vermelho em (b) destaca a região do espectro que corresponde à ordem de difração que gera a imagem virtual.	31

Figura 2.9: Exemplos de imagens de fase (a) e de intensidade (b) reconstruídas numericamente a partir do holograma da Figura 2.8, utilizando o método do Espectro Angular. O mapa de fase é representado em tons de cinza os quais correspondem ao intervalo $(-\pi: \pi)$	32
Figura 2.10: Primeira etapa do processo de reconstrução da frente de onda transmitida pelo objeto. Nesta etapa, a distribuição complexa no plano da transformada de Fourier da função que representa o holograma é determinada. Para tanto, uma propagação desde o plano do holograma (x, y) até o plano da transformada (u, v) , distantes D um do outro é realizada.	33
Figura 2.11: Determinação da distância z através do método do Espectro Angular.	34
Figura 2.12: Transformação da fase da frente de onda transmitida por uma lente convergente. L representa a distância entre objeto e a lente e f representa a distância focal da mesma.	36
Figura 2.13: Compensação da curvatura de fase introduzida por lente objetiva presente em um dos braços do interferômetro que compõe um Microscópio Holográfico Digital. (a) holograma digital de uma rede hexagonal de difração, (b) mapa de fase reconstruído sem correção da curvatura, (c) mapa de fase reconstruído através do método do Espectro Angular com curvatura compensada e (d) mapa de fase reconstruído através do método de Dupla Propagação com curvatura compensada.	38
Figura 2.14: (a) Mapa de fase da Figura 2.12c após remoção da descontinuidade (<i>unwrapping</i>) e (b) após ajuste de fundo. Em (c) é apresentado o perfil de fase correspondente à linha vermelha desenhada sobre o mapa de fase antes do ajuste e em (d) o mesmo procedimento considerando o ajuste de fundo.	40
Figura 3.1: Projeções do campo elétrico no plano xy . (a) Sentido do campo para intervalo de fase $0 \leq \varphi \leq \pi$. (b) Sentido do campo para intervalo de fase $-\pi \leq \varphi \leq 0$	44
Figura 3.2: Elipse de polarização gerada pela projeção do campo elétrico no plano xy	47
Figura 3.3: Demonstração do fenômeno de Dupla-Refração em um cristal anisotrópico. A seta preta indica a direção do eixo óptico do cristal.	51
Figura 3.4: Diagrama esquemático de um Microscópio Holográfico de Polarização. A simbologia utilizada na imagem é descrita no texto.	54
Figura 3.5: Exemplo de holograma digital de polarização. Uma parte do holograma (destacada pelo quadrado vermelho) foi ampliada para melhor visualização do padrão de franjas formado.	55
Figura 3.6: Imagem de intensidade obtida em processo de reconstrução numérica do holograma apresentado na Figura 1.5. $E_{R1}^* E_o$ e $E_{R2}^* E_o$ são as imagens virtuais correspondentes aos	

estados de polarização horizontal e vertical, respectivamente. A posição desses dois termos é fixada pela geometria fora de eixo.....	57
Figura 3.7: Exemplo de padrão de difração de Fraunhofer (b) obtido a partir de um holograma (a) de uma grade de calibração (aumento de 20x).....	60
Figura 4.1: Diagrama esquemático do aparato experimental desenvolvido neste trabalho. Trata-se de um Microscópio Holográfico Digital associado a um Microscópio Holográfico de Polarização. Em um mesmo sistema, é possível obter informações acerca da intensidade, fase e estado de polarização do campo transmitido por um objeto.....	63
Figura 4.2: Foto referente ao aparato experimental utilizado neste trabalho. O esquema da Figura 4.1 descreve a disposição dos componentes.....	64
Figura 4.3: Imagem do retículo utilizado para calibração. Em (a) a imagem está ampliada 20 vezes e em (b) 40 vezes.....	65
Figura 4.4: Imagem de MEV obtida a partir de uma rede de difração utilizada como padrão de calibração do sistema desenvolvido. Esta é formada por um arranjo periódico de hexágonos de altura $2\ \mu\text{m}$ e índice de refração 1.4225. Objeto e imagem cedidos pelo LFF - IFUSP.....	65
Figura 4.5: Imagem de contraste de fase obtida por MHD utilizando o arranjo desenvolvido neste trabalho (ampliação de 40x). A calibração das dimensões laterais foi realizada utilizando o método de equiparação do número de pixels com as dimensões reais de um padrão conhecido.....	66
Figura 4.6: Comparação da dimensão de uma das estruturas hexagonais da rede. Em (a) a imagem de MEV mostra a dimensão como sendo $9,70\ \mu\text{m}$. Em (b) tem-se o mapa de fase correspondente. Neste, a linha vermelha mede a distância entre dois lados de um dos hexágonos e um valor praticamente igual ao obtido pela técnica padrão foi obtido, demonstrando a confiabilidade do processo de calibração das imagens.	66
Figura 4.7: Perfil lateral de uma região do mapa de fase da figura 4.5. Em destaque, a altura de uma das estruturas hexagonais obtida através da equação 2.2. A altura mostrada na figura é de $2\ \mu\text{m}$, valor compatível com o valor obtido por meio de outras técnicas.....	67
Figura 4.8: Esquema experimental utilizado para obtenção das diferenças de fase entre os componentes ortogonais da onda transmitida por uma lâmina de quarto de onda. Nesta figura, é mostrado um trecho do microscópio da figura 4.1 (sem a lente objetiva e condensadora). P1 representa o polarizador direcionado a 0° em relação ao eixo x e $\lambda/4$ representa a lâmina de quarto de onda orientada a um ângulo δ em relação ao eixo x. A parte A atua como região de referência para medir o parâmetro $\Delta\phi_R$	69

Figura 4.9: (a) Holograma de polarização de uma lâmina de quarto de onda orientada a 20° em relação à direção de polarização de P1 (Figura 4.8), (b) mapa de fase da amostra obtida através do método do Espectro Angular, (c) mapa de fase sem amostra e (d) mapa de fase resultante da subtração dos mapas (b) e (c). Vê-se que, em (d), a curvatura de fase devido a problemas no alinhamento do sistema é compensada..... 70

Figura 4.10: (a) Amplitude do Espectro Angular do holograma apresentado na Figura 4.8a. Os retângulos vermelhos indicam as frequências correspondentes às imagens virtuais. (b) Mapa de fase para a componente horizontal de polarização, (c) mapa de fase para a componente vertical de polarização e (d) mapa de fase resultante da diferença entre (b) e (c). Em (d), A representa a região tomada como referência (sem objeto) para estimar o termo $\Delta\phi_R$. B representa a região correspondente à lâmina. Para captura das imagens, não foi utilizada lente objetiva, devido às dimensões da ordem de centímetros do objeto..... 70

Figura 4.11: Valores teóricos (linha contínua) e experimentais (pontos vermelhos) relativos às diferenças de fase entre os componentes vertical e horizontal da onda transmitida por uma lâmina de quarto de onda orientada a um ângulo δ e iluminada por uma onda linearmente polarizada a 0° de um eixo de referência tomado como a direção horizontal. Neste gráfico foram utilizados os valores de diferença de fase obtidos para o intervalo de δ : 45° a 225° 71

Figura 4.12: Esquema experimental utilizado para obtenção das intensidades referentes aos componentes ortogonais da onda transmitida por um polarizador. P1 representa o polarizador direcionado a 0° em relação ao eixo x e $\lambda/4$ representa a lâmina de quarto de onda orientada a um ângulo 45° em relação ao eixo de P1..... 72

Figura 4.13: Valores (normalizados) teóricos (linha contínua) e experimentais (pontos vermelhos para componentes horizontais e azuis para verticais) relativos às intensidades dos componentes vertical e horizontal da onda transmitida por um polarizador orientado em posições que variam em graus em relação à direção de polarização do feixe incidente no polarizador (onda objeto). Intervalo considerado: entre 90° e 270° 72

Figura 4.14: Detalhe do arranjo mostrado na Figura 4.1. Os caminhos percorridos pelos feixes referência 1, referência 2 e objeto são mostrados em cores (azul, verde e vermelho, respectivamente). Entre o feixe objeto e os dois feixes referência é adicionado um ângulo de separação, de forma a afastar o centro de interferência em direção às bordas da superfície da CCD (configuração *off-axis*). As setas coloridas indicam as direções de polarização de cada um dos campos..... 76

Figura 4.15: Adaptação do aparato experimental de Microscopia Holográfica Digital utilizado para análise do dicroísmo linear através do método de Microscopia Diferencial de Polarização.

Em destaque, o plano da CCD e as direções de orientação do polarizador P1 utilizadas para gravação das imagens.....	78
Figura 4.16: Imagens de transmissão de uma amostra de seiva de <i>Sansevieria trifasciata</i> contendo ráfides de Oxalato de Cálcio. As setas vermelhas indicam a direção de polarização do campo incidente na amostra. Em (a) a direção é paralela ao eixo horizontal e em (b) a direção é perpendicular a esse eixo.....	79
Figura 5.1: Lâminas de vidro com material da membrana sinovial de equino com osteocondrite dissecante (OCD) coradas com HE e picroscirius (<i>Sirius Red</i>) analisadas por Microscopia de Campo Claro e MHD (foram obtidas imagens de contraste de fase e de intensidade) com aumento de 10x em ambas. Amostras gentilmente fornecidas por Aline Ambrogi Franco Prado (FMVZ-USP Protocolo do Comitê de Ética: 2771/2012).....	82
Figura 5.2: Resultados obtidos da análise via MHD de uma extensão de sangue periférico humano antes e após fixação por vapor de formaldeído. As imagens (a), (b) e (c) mostram, respectivamente, o mapa de fase de obtido a partir de uma região da amostra antes dessa ser fixada, seção ampliada desse mapa e o perfil transversal de uma das células do campo em (b). As imagens (d), (e) e (f) mostram a sequência correspondente à mesma região após a fixação. Barras nas imagens (a) e (d) correspondem a 20 μ m.	85
Figura 5.3: (a) Imagem da perspectiva tridimensional da região da figura 5.2b (não fixada). (b) Imagem da perspectiva tridimensional da região da figura 5.2e.....	85
Figura 5.4: Resultados obtidos da análise via MHD de uma extensão de sangue periférico humano antes e após fixação por metanol. As imagens (a), (b) e (c) mostram, respectivamente, o mapa de fase de obtido a partir de uma região da amostra antes dessa ser fixada, seção ampliada desse mapa e o perfil transversal de uma das células do campo em (b). As imagens (d), (e) e (f) mostram a sequência correspondente à mesma região após a fixação.....	87
Figura 5.5: Imagem da perspectiva tridimensional da região da figura 5.4b (não fixada). (b) Imagem referente à região da figura 5.4e.....	88
Figura 5.6: Resultados obtidos da análise via MHD de uma extensão de sangue periférico humano antes e após fixação por etanol. As imagens (a), (b) e (c) mostram, respectivamente, o mapa de fase de obtido a partir de uma região da amostra antes dessa ser fixada, seção ampliada desse mapa e o perfil transversal de uma das células do campo em (b). As imagens (d), (e) e (f) mostram a sequência correspondente à mesma região após a fixação.....	89
Figura 5.7: Imagem da perspectiva tridimensional da região da figura 5.6b (não fixada). (b) Imagem referente à região da figura 5.6e (fixação por etanol).....	90

Figura 5.8: (a) Mapa de fase de amostra de extensão de sangue periférico sobre lâmina. Foi feito um risco lâmina após a deposição da extensão de modo a expor o vidro do substrato. (b) Perfil topográfico correspondente à linha vermelha traçada sobre o mapa em (a).	92
Figura 5.9: Holograma de Polarização referente a uma amostra de ráfides de Oxalato de Cálcio. A imagem ao lado corresponde à porção do holograma ampliada. Aumento de 20x.	94
Figura 5.10: Imagens de intensidade com o polarizador P1 (Figura 4.1) orientado a 0° (a,c) e a 90° (b,d). Imagens de intensidade (a,b) são de microscopia ótica convencional. As imagens (c,d) são as amplitudes dos componentes ortogonais do campo reconstruídas com a técnica de MHP.	94
Figura 5.11: (a) Imagem de dicróismo obtida com a técnica de polarização diferencial utilizando a equação 4.13, (b) Imagem de dicróismo obtida através da técnica de MHP. Imagens (c) e (d) da Figura 5.10 foram utilizadas para obter o resultado apresentado em (b) nesta Figura.	95
Figura 5.12: (a) Distribuição de intensidades do holograma de polarização e (b) detalhe que mostra o padrão de franjas da região delimitada pelo retângulo vermelho.	96
Figura 5.13: Imagens de intensidade reconstruídas para as duas componentes ortogonais do feixe objeto; (a) I_{oh} e (b) I_{ov} . As setas vermelhas indicam a direção dos eixos de polarização do feixe iluminador E_o e dos feixes referência.	96
Figura 5.14: Imagem representativa da razão de amplitude.	96
Figura 5.15: Distribuição de intensidades dos padrões de difração de Fraunhofer para as componentes (a) vertical e (b) horizontal do campo de onda do objeto.	97
Figura 5.16: Curvas de intensidade para $I_v(\rho)$ (azul) e $I_h(\rho)$ (verde) obtidas por varredura radial de 90° a 270° nos padrões de difração PDF_h e PDF_v	98
Figura 5.17: Curva normalizada representadora do dicróismo linear da amostra de ráfides de oxalato de cálcio.	99
Figura 5.18: Mapa de fase que representa a estrutura de um cardiomiócito vivo em meio de cultura. A escala na imagem corresponde a $10\ \mu m$. A imagem foi obtida a partir de uma montagem invertida de MHD e a ampliação foi de 10x.	100
Figura 5.19: Perfil pseudo-3D referente ao cardiomiócito da Fig. 5.19. O eixo z refere-se aos valores de fase em radianos e não o valor de espessura, pois o índice de refração da célula é não uniforme.	100
Figura 5.20: Mapa de fase de uma amostra de solução de β_2GPI (conformação monomérica) após secagem em lâmina de vidro (ampliação de 20x). Escala corresponde a $20\ \mu m$	101

Figura 5.21: Sequência de capturas de imagens referentes à formação de agregados de β_2 GPI em conformação monomérica referentes à área representada na figura 5.20. Escala na primeira imagem corresponde a 20 μm	102
Figura 5.22: Perfil de fase de região demarcada com linha vermelha nº 1 (a) na Figura 5.21 e perfil para a linha nº 2 (b).	102
Figura 5.23: Monômero – sequência secagem sobre gota de água em lamina de vidro com a superfície modificada para aumentar a hidrofobicidade. Perfil de fase obtido para a borda da gota.	103
Figura 5.24: Imagens para cálculo do mapa de fase por Microscopia de Desfocalização. As imagens foram obtidas a partir de extensão de sangue periférico. (a) Imagem para $\Delta f < 0$, (b) $\Delta f = 0$ e (c) $\Delta f > 0$. Em (d) temos a imagem relacionada com o perfil de fase e em (e) perfil tridimensional da seção destacada pelo retângulo vermelho. As imagens foram capturadas utilizando objetiva de 100x, sem óleo de imersão.	104

Sumário

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Introdução	1
1. Fundamentos e Modelo.....	8
1.1. Holografia Clássica	8
1.1.1. Registro do holograma	9
1.1.2. Reconstrução da frente de onda original	10
1.2. Técnicas tradicionais de Microscopia.....	12
1.3. Modelos de microssistemas biológicos.....	12
1.3.1. Eritrócitos.....	12
1.3.2. β 2-glicoproteína I.....	15
2. Microscopia Holográfica Digital.....	17
2.1. Microscopia Holográfica Digital: estado da arte	17
2.2. Princípios de funcionamento.....	19
2.3. Reconstrução Numérica de Hologramas Digitais	22
2.3.1. Reconstrução por Simplex Transformada de Fourier	24
2.3.2. Reconstrução através do Método de Convolução	28
2.3.3. Método do Espectro Angular	29
2.3.4. Método de Dupla Propagação.....	32
2.3.5. Compensação da Curvatura de Fase	35
2.3.6. Remoção da Ambiguidade do mapa de fase.....	38
3. Microscopia Holográfica de Polarização	42

3.1. Polarização e o Formalismo de Jones.....	42
3.1.1. Estados de Polarização.....	43
3.1.2. O Formalismo de Jones.....	46
3.2. Interpretação dos Parâmetros de Polarização.....	48
3.2.1. Birrefringência.....	49
3.2.2. Dicroísmo.....	51
3.3. Imagens de Polarização.....	53
3.4. MHP: princípio de funcionamento.....	54
3.4.1. Gravação dos hologramas de polarização.....	54
3.4.2. Formação do holograma de polarização.....	56
3.4.3. Reconstrução dos Hologramas de Polarização.....	57
3.4.4. Determinação dos Parâmetros de Polarização.....	58
3.5. Método alternativo para Análise do Estado de Polarização.....	59
3.5.1. Padrão de Difração de Fraunhofer.....	59
3.5.2. Varredura Radial sobre o padrão.....	60
4. Metodologia Experimental.....	62
4.1. Aparato Experimental.....	62
4.2. Calibração do Sistema.....	64
4.3. Metodologia experimental: MHD aplicada ao estudo de sistemas biológicos.....	73
4.3.1. Preparação das amostras.....	73
4.3.2. Cálculo do Índice de refração.....	74
4.4. Metodologia experimental: Novo Método de análise do estado de polarização.....	75
4.4.1. Metodologia: MHP aplicada à detecção do dicroísmo linear.....	77
5. Resultados e Discussão.....	80
5.1. Efeitos da Preparação de amostras em informações obtidas via MHD.....	80
5.1.1. Análise Qualitativa: coloração e fixação.....	80

5.1.2. Análise Quantitativa: Processo de fixação	83
5.2. MHP aplicada ao estudo de sistemas anisotrópicos	92
5.2.1. Determinação do dicroísmo linear através das imagens de intensidade.	93
5.2.2. Determinação do dicroísmo linear através dos planos de difração.....	95
5.3. Microscopia Holográfica Digital aplicada à análise de eventos dinâmicos	99
5.3.1. Estudo de Propriedades Mecânicas de Cardiomiócitos através da MHD	99
5.3.2. Dinâmica da formação de agregados de β_2 GPI em solução.....	100
5.4. Primeiros resultados: Microscopia de Desfocalização	103
6. Considerações Finais e Perspectivas	106
Anexos	122

Introdução

A holografia constitui um poderoso método capaz de gerar uma imagem tridimensional de um objeto mantendo as características e a perspectiva original através da reconstrução da frente de onda transmitida ou refletida pelo objeto. O método permite o registro de imagens das quais podem ser obtidas as informações de fase e intensidade do objeto a ser analisado. Foi primeiramente descrita por Dennis Gabor [1] em 1948 em seu trabalho chamado "*A new microscopic principle*" com o propósito de desenvolver um método que reduzisse a perda de resolução de imagens de um Microscópio Eletrônico devido às aberrações geradas por suas lentes. Gabor percebeu que o padrão de difração do feixe de elétrons continha a informação de fase da onda eletrônica e logo depois aplicou seu estudo à luz visível, formulando o chamado "*princípio holográfico*" [2]. Apesar da sua ideia visionária, Gabor teve que esperar um desenvolvimento crítico antes de todo o potencial da sua técnica ser utilizado: uma fonte de luz potente e coerente, ou seja, o *Laser* [3].

A holografia também pode ser definida como uma técnica de registro e posterior análise de informações do objeto de estudo através da reconstrução da frente de onda proveniente deste. Após a reconstrução, é possível obter as mesmas características da frente de onda original além de somente o registro de intensidade, como ocorre em outras técnicas de registro convencionais, como a fotografia. Até onde se conhece, a forma mais eficiente de se registrar a fase de uma frente de onda é por uso da interferência entre duas ou mais ondas coerentes. A onda que transmite a informação do objeto é dita onda objeto e a outra, uma onda de fase conhecida, é chamada onda referência. A interferência entre a onda objeto e a onda referência gera um padrão de franjas que, quando registrado, é chamado de *holograma*, o qual contém as informações de fase e amplitude da onda objeto [4].

Os hologramas tradicionais são gravados em filmes fotossensíveis. Apesar de suas diversas aplicabilidades, requerem o uso de métodos químicos e físicos para a revelação das informações, além de não permitirem a captura de processos dinâmicos e em tempo real. Para solucionar esses problemas, a gravação dos hologramas passou a ser realizada por sensores eletrônicos digitais de captura em uma conformação que foi chamada *Holografia Digital* (HD). Os sensores mais utilizados nesta técnica são as câmeras CCD (*Charge-Coupled Devide*) ou CMOS (*Complementary metal-oxide-semiconductor*).

Os trabalhos de Schnars e Juptner em 1994 [5] e o de Cuhe et. al. em 1999 [6] foram os pioneiros na geração de hologramas com uso de sensores digitais de captura. Para a gravação, o sensor digital utilizado é conectado diretamente a um computador, o que possibilita a captura de diversos hologramas em sequência e, inclusive, a gravação de filmes. O holograma capturado é digitalizado pelo sensor e é armazenado no computador como uma matriz bidimensional de inteiros ou resoluções maiores em escala de cinza. A principal tarefa do computador é processar a imagem capturada, simulando a difração numérica de forma a realizar a reconstrução do holograma digital. Além disso, a Holografia Digital permite a execução de outras tarefas como armazenamento e controle temporal das imagens, aplicação de métodos de processamento digital e, inclusive, a compensação da curvatura da fase da onda objeto introduzida pela lente objetiva. O holograma é reconstruído numericamente e o resultado obtido pode ser corrigido e analisado de forma eficiente com reduzida possibilidade de erros, o que é difícil de realizar no processo analógico.

A associação da Holografia Digital com a microscopia foi um passo importante à medida que a microscopia expandiu as capacidades da holografia digital de um modo similar à evolução que a HD permitiu de aspectos limitados da microscopia, como, por exemplo, a profundidade de foco. Por seu princípio interferométrico, diferentes configurações podem ser utilizadas para montar um aparato de Microscopia Holográfica Digital: Mach-Zehnder, Michelson e Twyman-Green são alguns exemplos propostos para esse fim, sendo o arranjo baseado em um interferômetro Mach-Zehnder o mais utilizado para aplicação da técnica, por permitir maior flexibilidade ao processo de alinhamento. A montagem de Microscopia Holográfica Digital pode ser realizada em duas configurações: fora de eixo (*off-axis*), proposta por Leith e Upatnieks [7], na qual é

adicionado um pequeno ângulo entre as ondas objeto e referência; e em eixo (in-line), na qual os dois feixes estão alinhados em uma mesma direção. Na configuração fora de eixo, os termos contidos na função do holograma se propagam em diferentes direções, tornando possível isolar a frente de onda objeto. A separação das ordens de difração constituiu um avanço da holografia para análise quantitativa tridimensional, sendo importante à medida que permite a extração de parâmetros numéricos úteis para metrologia [8].

O limite de resolução lateral de um Microscópio Holográfico Digital é determinado pela resolução do sistema de captura, pela fonte de luz (comprimento de onda) e pela abertura numérica da lente objetiva utilizada. A resolução lateral padrão está limitada a ordens micrométricas, mas valores consideravelmente mais satisfatórios foram obtidos quando utilizadas fontes de luz de comprimentos de onda menores, como lasers na faixa do UV (193 nm) [9]. A resolução axial, no entanto, é muito maior e pode alcançar ordens nanométricas, mesmo para comprimentos de onda maiores, o que é essencial para determinação do perfil topográfico do objeto sob análise.

Desde os anos 70, técnicas holográficas têm sido aplicadas em campos interdisciplinares, como biomedicina e biofotônica. O grande interesse de outras áreas surgiu, pois as técnicas podem ser aplicadas de forma não destrutiva, livre de corantes, sem necessidade de processos de varredura e em tempo real. A partir dessas aplicações, grandes avanços foram alcançados no desenvolvimento das técnicas, como, por exemplo, a aplicação no estudo de células vivas. A primeira imagem de células vivas obtida por MHD foi publicada em 2003 por Yu e colaboradores [10] e em 2005, Marquet e colaboradores [11] apresentaram imagens de células vivas em cultura obtidas a partir de um arranjo holográfico. A partir desse período, novos trabalhos apresentaram outras possibilidades: a técnica foi aplicada por Rapaz e colaboradores [12] ao monitoramento da dinâmica de neurônios em cultura, Kemper e Von Bally [8] fizeram uma análise de células tumorais vivas de pâncreas, de forma a demonstrar a possibilidade da aplicação da MHD ao estudo de mudanças morfológicas induzidas por drogas nessas células. Além desses exemplos, outras aplicações ao estudo de processos celulares foram apresentadas como: proliferação, movimento e alteração da morfologia [13, 14], monitoramento de processos de apoptose [15] e de divisão celular [16]. No trabalho de Yu e colaboradores [14], a MHD foi utilizada para monitorar uma microcirurgia a laser

em células e no trabalho de Rappaz e colaboradores [17], flutuações nas membranas de eritrócitos vivos foram medidas. Inclusive filmes obtidos com a reconstrução das imagens de fase e intensidade de células vivas, como micróbios e fibroblastos em processo de migração, foram criados a partir de uma série de hologramas reconstruídos numericamente [18].

A MHD tem sido aplicada também para obtenção de imagens de polarização utilizando dois feixes de referência ortogonalmente polarizados [19]. Essa modificação do microscópio holográfico digital permite revelar as diferenças na intensidade e fase da luz ao atravessar sistemas anisotrópicos. As vantagens da MHD em relação a outras técnicas de polarimetria são seu sistema óptico que não necessita de componentes rotativos nem de uma série de captura de imagens, além da sua adaptabilidade a objetos tridimensionais devido à possibilidade de ajustar o foco numericamente [20].

A Microscopia Holográfica de Polarização (MHP), assim chamada nesta tese, permite revelar detalhes sobre a estrutura interna de células sem a necessidade de agentes de contraste, além de possibilitar o acesso à informação intrínseca relacionada com sua morfologia e dinâmica. Uma técnica associada, a qual utiliza a informação de fase para o estudo do estado de polarização de neurônios vivos em cultura, foi desenvolvida por Wang [21]. De acordo com as publicações mais recentes, a Microscopia Holográfica de Polarização (MHP) tem sido pouco aplicada à análise de sistemas biológicos, mais frequentemente ao estudo de fibras ópticas [22], polímeros [19] e outros materiais inorgânicos [23]. Esse fato sugere a necessidade de aplicações desse método visando o campo biomédico. Além disso, a literatura é omissa sobre a aplicação da MHP a medidas de dicroísmo. Pesquisadores relatam a possibilidade teórica dessa aplicação, mas ainda não se encontram relatos dessa utilização [24].

No Brasil, há poucos registros na literatura acerca da evolução e aplicação das ferramentas de Microscopia Holográfica Digital, portanto desenvolver um estudo que demonstre as possibilidades de aplicação das técnicas relacionadas se faz necessário de forma a divulgar e inserir o tema no âmbito da pesquisa nacional: uma importante motivação desse trabalho. Pretendeu-se descrever as técnicas, os aparatos instrumentais, os métodos de reconstrução, as principais aplicações e como a preparação de amostras de sistemas biológicos, principalmente a fixação de sistemas celulares, pode influenciar os resultados obtidos.

Neste trabalho foi abordada a relação entre as propriedades ópticas e morfológicas de células sanguíneas, especificamente, eritrócitos. Esses são o tipo celular dominante no sangue, possuem estrutura simples, sem compartimentos internos, têm constituição homogênea e são coloridos porque contém hemoglobina, seu principal componente, dissolvido numa solução concentrada que ocupa todo o volume celular. Eritrócitos são utilizados como indicadores da condição fisiopatológica característica de diversas doenças [25]. A análise da morfologia celular pode revelar influências por diferentes fatores e a detecção quantitativa de mudanças morfológicas se torna importante na pesquisa biomédica. Sob condições normais, os eritrócitos são discos bicôncavos, mas uma variedade de agentes pode modificar o formato dessas células, reversível ou irreversivelmente. Já foram observadas pequenas variações no formato de eritrócitos devido à ação de diferentes agentes fixadores, indicando um efeito do processo de fixação dependente do tipo de fixador e do doador [26]. No entanto, não foram encontrados estudos acerca dessa influência de forma quantitativa, provavelmente porque qualquer variação devida aos agentes fixadores é a menor possível tecnicamente, indetectável no caso ideal. Entretanto, considerando a observação de efeitos sobre a fase da luz, é possível que diferentes técnicas utilizadas para o preparo de amostras para microscopia de campo claro, apresentem particularidades. Correções de efeitos de fase são obtidas com a utilização de meios de montagem, na etapa final de preparações histológicas e citológicas.

O objetivo geral desse trabalho foi estudar aplicações quantitativas de Microscopia Holográfica Digital para o estudo de estruturas celulares. A técnica foi aplicada ao modelo dos eritrócitos visando o estudo de alterações das propriedades ópticas e morfológicas determinadas pela anemia falciforme neste tipo de célula.

Portanto, o primeiro objetivo específico do trabalho foi analisar variações nas propriedades dos eritrócitos através da quantificação dos índices de refração e perfis topográficos das células quando submetidas aos principais agentes fixadores. Esse estudo foi base para compreender a forma como o processo de preparação pode influenciar as informações de fase obtidas via MHD. A anemia falciforme é uma doença altamente debilitante causada pelo bloqueio da circulação e por anemia hemolítica, ambos gerados pela polimerização da hemoglobina S (Hb S) quando esta é desoxigenada [27], causando uma deformação na estrutura dos eritrócitos, levando a célula do

formato bicôncavo tradicional para a forma de foice. É conhecido que a polimerização da Hb S, além da alteração morfológica, altera as propriedades ópticas da célula gerando um efeito de anisotropia óptica de absorção (dicroísmo linear). A concentração da Hb S e a conformação desoxigenada da proteína favorecem a polimerização, um fenômeno autoamplificado pela organização dos agregados iniciais em estruturas cada vez maiores e mais insolúveis, mesmo nos indivíduos heterozigotos. A concentração de Hb S é bastante variável nos eritrócitos dos indivíduos portadores do gene da anemia falciforme e ela ocorre em mistura com outros tipos de hemoglobina normais ou patológicos, com diferentes afinidades pelo oxigênio. Desenvolver uma técnica microscópica que permita quantificar a variação morfológica e o dicroísmo linear nos eritrócitos falciformes pode ser útil para o controle laboratorial da presença de estruturas poliméricas nos eritrócitos de indivíduos sintomáticos e assintomáticos e estudo de correlações com diversas características clínicas da patologia.

Com esse propósito, foi desenvolvido um método alternativo para detecção do dicroísmo linear em amostras que apresentam forma alongada através dos mapas de fase e intensidade obtidos por MHP. Não foi possível a aplicação do método ao objeto de estudo por questões instrumentais que serão discutidas no texto, mas como modelo, foram utilizados cristais que apresentam uma forma semelhante e os mesmos efeitos de anisotropia óptica, demonstrando a possibilidade de aplicação em eritrócitos falciformes.

A representação da informação de dicroísmo é tradicionalmente feita através da técnica de Microscopia Diferencial de Polarização [27], através da qual é possível obter a razão entre as intensidades referentes a dois campos de onda transmitidos por uma amostra anisotrópica. Cada imagem capturada com um estado de polarização ortogonal do campo é utilizada para produzir a imagem de dicroísmo dos elementos em análise. No entanto, as incertezas devido a possíveis alterações na amostra durante o processo de captura em sequência ou mudanças nas posições dos pixels podem introduzir artefatos às imagens resultantes. Diferentemente, a MHP constitui uma ferramenta adequada para o mapeamento do comportamento dicroico desses elementos, permitindo reduzir a análise de polarização bidimensional a unidimensional, simplificando o processo de estudo.

Buscou-se, adicionalmente, demonstrar a possibilidade de aplicação da MHD à análise de eventos dinâmicos envolvendo estruturas mais complexas: a formação de agregados de β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) em solução e o movimento de células cardíacas (cardiomiócitos) vivas em cultura.

Como uma abordagem introdutória, o primeiro capítulo tem como tema a Holografia, seus princípios básicos e a descrição dos modelos de sistemas biológicos de interesse no trabalho. No segundo capítulo, a técnica de Microscopia Holográfica Digital é abordada de forma a demonstrar como é realizado o processo de gravação e os métodos de reconstrução dos hologramas digitais, assim como os métodos de processamento das imagens obtidas. No terceiro capítulo, a técnica de Microscopia Holográfica de Polarização é abordada, assim como é apresentado o método alternativo para detecção do dicróismo em estruturas alongadas. No quarto capítulo, a metodologia utilizada na aplicação e desenvolvimento das técnicas de MHD e MHP é discutida. No quinto capítulo, são apresentados os principais resultados obtidos durante o trabalho, assim como resultados obtidos por projetos adicionais relacionados à aplicação das técnicas a eventos dinâmicos. Por fim, no sexto e último capítulo, são apresentadas as conclusões e as perspectivas. Nos anexos, foram adicionados os códigos desenvolvidos para o processo de reconstrução numérica e processamento digital das imagens.

Capítulo 1

Fundamentos e Modelo

Vários livros apresentam uma descrição das diferentes formas e aplicações da Holografia Clássica [4] [28, 29, 30, 31] além destes, alguns artigos, como o de Leith e colaboradores [31], apresentam um resumo dos principais avanços da Holografia desde o seu desenvolvimento inicial. Com base nos trabalhos citados, nesta seção, será apresentada a teoria básica e o histórico da evolução dessa técnica, permitindo introduzir a fundamentação teórica do tema apresentado nesta tese. Quando associada à Microscopia, a holografia torna-se uma poderosa ferramenta para análise de microssistemas biológicos. Nos próximos tópicos deste capítulo, serão apresentadas as principais técnicas microscópicas e os modelos de sistemas biológicos utilizados neste trabalho, de forma a introduzir conceitos básicos relacionados com as principais áreas de interesse do trabalho.

1.1. Holografia Clássica

A Holografia (“*holos*” é um termo grego que significa todo e “*graphein*” registrar) é uma técnica proposta por Dennis Gabor em 1948 em seu trabalho intitulado “*A new microscopic principle*” [1]. Gabor reconheceu que quando uma onda de referência interfere com outra onda difratada por um objeto, as informações acerca da amplitude e da fase da onda difratada poderiam ser gravadas, mesmo que o meio de gravação fosse sensível somente à intensidade luminosa.

Sendo uma técnica de dois passos, a holografia é definida como uma técnica de registro e posterior reconstrução de uma frente de onda com as mesmas características da frente de onda original. O padrão de interferência entre essas duas ondas chamado de *holograma*, possibilita visualizar uma imagem verdadeiramente tridimensional do

objeto, a qual exibe todos os efeitos de perspectiva e profundidade de foco. O holograma pode ser registrado em diversos tipos de materiais, sendo os precursores os filmes de haletos de prata [32] e os foto-polímeros [33]. Os primeiros apresentam necessidade de revelação, além de não permitirem análise de processos em tempo real. Para isso, a gravação em materiais fotorrefrativos (PRMs) [34] se tornou uma opção. Mas o maior avanço se deu após o desenvolvimento de matrizes de sensores optoeletrônicos (câmeras CCD ou CMOS), oferecendo as possibilidades de registro de processos dinâmicos e de processamento numérico das imagens reconstruídas.

1.1.1. Registro do holograma

Uma frente de onda ao ser espalhada ou transmitida por um objeto apresenta mudanças não só na sua intensidade, mas também na sua fase. Uma forma de registrar essas mudanças é através do registro de um padrão interferométrico. Considerando uma onda plana monocromática, proveniente de uma fonte coerente, de amplitude complexa E_R que incide em um meio de registro distribuído no plano (x, y) , e outra onda, também plana e monocromática E_O , proveniente da mesma fonte, (serão nomeadas de onda referência e onda objeto, respectivamente) que incide no mesmo plano, estas geram um padrão de interferência chamado *holograma* [4]. No plano do holograma, a amplitude complexa total resultante da interferência entre as ondas é dada por:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_R + \mathbf{E}_O = \sqrt{I_R} \exp[i(\mathbf{k}\mathbf{r}_R + \varphi_R)] + \sqrt{I_O} \exp[i(\mathbf{k}\mathbf{r}_O + \varphi_O)], \quad (1.1)$$

onde $\mathbf{k}$ representa o vetor de onda ($|\mathbf{k}| = 2\pi/\lambda$, onde λ corresponde ao comprimento de onda), $\mathbf{r}_i$ representa os caminhos ópticos dos feixes e φ_i a fase de cada onda.

O padrão de interferência registrado em um meio fotossensível pode ser representado por uma função transmitância complexa $t(x, y)$:

$$t(x, y) = aI(x, y), \quad (1.2)$$

onde a é uma constante relativa ao meio de registro e I é a intensidade total de luz que chega ao holograma, ou seja, a amplitude do campo incidente, a qual é dada pelo módulo quadrado da soma das amplitudes de campo de cada onda:

$$I(x, y) = |\mathbf{E}_R + \mathbf{E}_O|^2. \quad (1.3)$$

Desenvolvendo a equação 1.3:

$$I(x, y) = |E_R|^2 + |E_O|^2 + E_R^* E_O + E_R E_O^*, \quad (1.4)$$

$$I(x, y) = I_R(x, y) + I_O(x, y) + \sqrt{I_R I_O} \{ e^{i[k(r_R - r_O) + (\varphi_R - \varphi_O)]} + e^{-i[k(r_R - r_O) + (\varphi_R - \varphi_O)]} \}, \quad (1.5)$$

$$I(x, y) = I_R(x, y) + I_O(x, y) + \sqrt{I_R I_O} \{ 2 \cos [k(r_R - r_O) + (\varphi_R - \varphi_O)] \}, \quad (1.6)$$

onde $I_R = |E_R|^2$ e $I_O = |E_O|^2$ são as intensidades das ondas referência e objeto, respectivamente, $E_R^* E_O$ e $E_R E_O^*$ são os termos de interferência, sendo E_R^* e E_O^* os complexos conjugados de cada onda. Considerando os caminhos ópticos iguais ($r_R = r_O$) e a diferença relativa de fase ($\varphi_R - \varphi_O$) sendo Φ , pode-se reescrever a equação 1.6:

$$I(x, y) = I_R(x, y) + I_O(x, y) + \sqrt{I_R I_O} (2 \cos \Phi). \quad (1.7)$$

O holograma terá, portanto a função transmitância representada por:

$$t(x, y) = a [I_R(x, y) + I_O(x, y) + \sqrt{I_R I_O} (2 \cos \Phi)]. \quad (1.8)$$

Na equação 1.7, vê-se que os primeiros termos dependem somente das intensidades das ondas de forma individual, mas através do último termo vê-se que o holograma também carrega informação de fase da onda difratada pelo objeto.

1.1.2. Reconstrução da frente de onda original

Como segunda etapa da Holografia, a reconstrução da onda objeto pode ser realizada de formas distintas, através de técnicas específicas relacionadas com o método utilizado para a gravação do holograma. Por exemplo, para hologramas gravados de forma digital, a reconstrução se dá por algoritmos numéricos [35] ou através de técnicas de deslocamento de fase [36], para o caso de hologramas gravados em filmes holográficos, a reconstrução é realizada em tempo real através da iluminação desse holograma pela onda referência E_R . Em todos os casos, se segue um princípio básico para a reconstrução e este é mostrada a seguir.

Para realizar a reconstrução da onda proveniente do objeto, o holograma é iluminado com o feixe referência utilizado para realizar a gravação, o qual passa a atuar como onda de reconstrução [37]. Como resultado, tem-se a onda transmitida:

$$E = t(x, y)E_R. \quad (1.9)$$

Relacionando as equações 1.4 e 1.9, a amplitude complexa da onda transmitida é dada por:

$$E = aE_R[|E_o|^2 + |E_R|^2 + E_R^*E_o + E_RE_o^*], \quad (1.10)$$

$$E = aE_R(I_R + I_o) + aE_R^*E_o + aE_RE_o^*. \quad (1.11)$$

Como resultado, três componentes são geradas na equação. O primeiro termo da equação 1.11 carrega apenas informação de parte do feixe não difratado pelo objeto, correspondendo ao termo de ordem zero; o segundo termo está relacionado à parte real da onda objeto e contém informação de fase negativa do feixe objeto e sua intensidade, correspondendo ao termo de ordem -1; o último termo está relacionado diretamente à onda original do objeto, sendo complementado por constantes, o que mostra que é possível executar a reconstrução dessa onda através da incidência de uma onda no holograma [38].

A consequência é que olhando pelo holograma na direção do objeto observa-se a imagem do objeto em sua natureza tridimensional embora o mesmo tenha sido removido. Essa imagem é chamada de imagem virtual.

Figura 1.1: (a) Registro de um holograma em configuração fora de eixo (*off-axis*) e (b) reconstrução.

No arranjo original proposto por Gabor, as ondas referência e objeto estavam alinhadas em uma direção perpendicular ao plano da placa fotográfica. Desta forma, os componentes da equação 1.11 se propagavam na mesma direção e não poderiam ser observados separadamente. Nos trabalhos de Leith e Upatnieks [39, 40] foi adicionado um ângulo ϑ entre as ondas referência e objeto, a qual permitiu a separação das ordens de difração (Figura 1.1), facilitando o processo de reconstrução.

1.2. Técnicas tradicionais de Microscopia

A caracterização de superfícies e estrutura interna de diversos objetos é de extrema importância em várias áreas da ciência e tecnologia [41]. O desenvolvimento de novos métodos para este fim tem levado ao surgimento de novas técnicas, mais eficientes práticas que minimizem os erros e os custos para que possam ser aplicadas a uma maior diversidade de objetos. Dentre essas técnicas se destacam aquelas que possibilitam a visualização de objetos em escala micro e/ou nanométrica. Dentre as técnicas microscópicas que veem sendo estudadas e desenvolvidas nos últimos anos, destacam-se algumas como: a Microscopia de Força Atômica (AFM) [42], Microscopia Confocal (CM) [43], Microscopia de Contraste de Fase (PCM) [44], Microscopia de Fluorescência (FM) [45], a Tomografia de Coerência Óptica (OCT) [46], entre outras. As técnicas de PCM e FM, assim como a microscopia óptica convencional, permitem somente a obtenção de imagens bidimensionais dos objetos analisados. As técnicas de AFM e CM permitem a visualização tridimensional das imagens, mas com algumas limitações. Na Microscopia de Força Atômica [42], alguns modos de operação podem danificar a amostra, e outros, quando não danificam, podem fornecer imagens com resolução limitada, além de ser uma técnica cara e extremamente sensível a ruídos. Na Microscopia Confocal [43], um elevado custo e tempo são exigidos para a geração de imagens tridimensionais. A técnica de OCT [47] apesar de apresentar inúmeras vantagens na análise tridimensional de sistemas biológicos, mas pode apresentar limitações na velocidade de captura das imagens. O surgimento de novas técnicas na área de Microscopia Holográfica pode levar a solução desses problemas, além de diversificar as formas de obtenção das imagens de micro e nanoestruturas.

1.3. Modelos de microssistemas biológicos

1.3.1. Eritrócitos

Do ponto de vista óptico, o sangue é um meio altamente concentrado, construído de plasma em sua maioria e células. Os eritrócitos, ou hemácias, são o tipo celular dominante e constituem a ferramenta de distribuição de oxigênio aos tecidos do corpo humano através do sistema circulatório. Sob condições fisiológicas normais, os eritrócitos humanos são discos bicôncavos, de diâmetro que pode variar entre 5,7 e 9,3 μm , espessuras entre 1,7 e 2,4 μm e volume que varia entre 70 e 100 μm^3 [48],

mas uma grande variedade de agentes pode modificar esses parâmetros [26]. A morfologia dessas células pode revelar como estas foram influenciadas por diferentes fatores ou tratamentos médicos, sendo um importante modelo para indicação da condição fisiológica de um paciente [25].

Em relação à sua composição, os eritrócitos são constituídos basicamente de hemoglobina (índice de refração $n = 1,615$), água ($n = 1,333$) e em uma pequena parte de componentes da membrana ($n = 1,6$), além de não conter núcleo. O índice de refração da célula é um importante parâmetro para interpretação da dependência das suas propriedades ópticas e os parâmetros fisiológicos do sangue. O índice depende principalmente, da concentração de hemoglobina (Hb) dentro da célula, parâmetro que pode ser alterado por diversas doenças, sendo, como consequência, um importante indicador clínico, variando normalmente entre 30 e 36 g/dl [49]. Um exemplo de como essa relação pode ser indicadora de alterações no sangue, Mazarevica e colaboradores [50] mostraram que o aumento da concentração de glicose no plasma sanguíneo leva a o aumento do índice de refração dos eritrócitos em pacientes diabéticos. Portanto, relacionar as propriedades ópticas com níveis de concentração desse elemento pode ser um fator sensível para disfunções e patologias diversas.

Barer e colaboradores [51] demonstraram que a relação entre o índice de refração de uma solução de hemoglobina e a sua concentração é linear e pode ser dada pela expressão:

$$n_{Hb} = n_{sol} + \omega C, \quad (1.12)$$

onde n_{sol} é o índice de refração do solvente e ω , o incremento de refração específico, dependente do comprimento de onda, é definido como o aumento do índice de refração da solução para cada aumento de 1% da concentração C da solução. Para a hemoglobina humana e para comprimentos de onda na faixa do verde, $\omega = 0,001942 \text{ dl/g}$ [52]. Utilizando a expressão de Barer, é possível determinar o índice de refração de um eritrócito (que pode variar entre 1,37 e 1,42), já que grande parte do seu conteúdo é solução de hemoglobina [53].

Além das propriedades ópticas, as variações morfológicas sofridas pelas células podem contribuir para interpretação das alterações geradas no sangue por fatores diversos. Um exemplo da de aplicação da interpretação desses parâmetros é o estudo da

anemia falciforme, uma doença altamente debilitante causada pelo bloqueio da circulação e por anemia hemolítica, ambos gerados pela polimerização da hemoglobina S (Hb S) quando esta é desoxigenada [27], causando uma deformação na estrutura dos eritrócitos, gerando deformações na célula, alterando seu formato bicôncavo tradicional para a forma de foice. É fundamental para o estudo da doença, conhecer a quantidade, distribuição e alinhamento da proteína polimerizada no interior dos eritrócitos falcifomes. O alinhamento da Hb S gera efeitos de anisotropia de absorção (dicroísmo linear) nos eritrócitos, podendo ser detectado através de técnicas de Microscopia Diferencial de Polarização.

A forma tradicional de análise de eritrócitos é a observação direta por Microscopia de Campo Claro. O sangue é distribuído sobre uma superfície de vidro em forma de extensão, é fixado e corado, para permitir a visualização da sua estrutura semitransparente. O processo de preparação tradicional segue essa sequência e muitas vezes os seus efeitos são ignorados na análise clínica. É inevitável que a morfologia celular seja alterada durante o processo de fixação e modificações podem ocorrer mesmo com aqueles fixadores considerados ideais. Evidências experimentais indicam que quantidades variadas de carboidratos, proteínas, lipoproteínas e lipídeos são perdidas durante a fixação [54].

Embora mantenha certa semelhança com as células vivas, eritrócitos secos e fixados sofrem transformações bioquímicas consideráveis e conhecer os efeitos morfológicos e estruturais desses processos pode ter importantes aplicações no desenvolvimento de métodos que possam monitorar alterações nas células do sangue. Por esses fatores, o espécime fresco é o mais aconselhável para avaliação, no entanto, processos de degeneração celular e contaminação levam à necessidade de sua fixação. A fixação permite tornar as membranas celulares permeáveis aos corantes, preserva a morfologia celular, facilitar a adesão à lâmina de vidro, é bactericida e permite o registro permanente da amostra. O processo pode ser úmido, sendo os álcoois metílico e etílico os agentes de fixação mais utilizados, e a seco, por fixação da célula ao substrato sem agente de fixação ou por exposição a vapor de formol ou formalina. O princípio deste fixador é penetrar no tecido e estabilizar temporariamente estruturas que serão fixadas de forma mais permanente por outros agentes. O Metanol é um agente fixador comumente utilizado em preparações citológicas. Atua removendo os lipídios e leva à

desidratação gerando a precipitação das proteínas do conteúdo celular. O Etanol atua de forma similar, desnaturando as proteínas e os ácidos nucleicos, desidratando e gerando retração celular. Esses dois agentes são mais invasivos, por isso a exposição a vapor de formol gera melhor preservação celular e pode reduzir a tendência de partes do filme de ser lavado da lâmina [55].

1.3.2. β_2 -glicoproteína I

A β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) é uma proteína produzida principalmente pelo fígado e em eritrócitos, sendo atuante de forma sistemática no controle da resposta inflamatória, além de estar envolvida em mecanismos de sobrevivência e proliferação celular [56]. Foi proposto que a β_2 GPI pode ser utilizada como sinalizador do processo de apoptose de macrófagos, tendo esse fator relevância clínica. Especula-se também sobre a participação da β_2 GPI na regulação do processamento de antígenos com reduzida produção de mediadores químicos, sendo fundamental ao equilíbrio geral do sistema imune [57]. Além dessas características, a β_2 GPI também apresenta efeitos sobre os mecanismos de controle da coagulação e agregação plaquetária.

Nos trabalhos anteriores realizados pelo Grupo de Óptica do IFUSP em colaboração com a prof.^a Dr.^a Lígia Ferreira Gomes e profissionais da *Universidad de Oriente* (Cuba), foi iniciado o estudo da morfologia de complexos de interação proteína-proteína para a formação de agregados em soluções de β_2 GPI. A observação dos agregados de β_2 GPI sobre superfície de vidro de lâminas de microscopia estabeleceu uma técnica útil para estudar a proteína depositada sobre superfícies de diferentes topografias e composições. A presença de dímeros resultou em mudança na organização dos agregados que pode relacionar-se ao efeito pró-coagulante e pró-imunogênico da proteína.

Foram também estudados indicadores morfológicos de diferenças de proliferação celular e organização espacial das células endoteliais cultivadas em culturas 3D dependendo das formas de agregação da proteína e da concentração de β_2 GPI utilizada, capazes de descrever resultados avaliados por técnicas de biologia celular. Para isto foi padronizada metodologia automatizada para descrever o fenômeno a partir de imagens de microscopia de campo claro. Com esta técnica, foi possível discriminar o efeito diferencial de dímeros e monômeros de β_2 GPI sobre as células endoteliais e também observar o efeito de misturas contendo dímeros e monômeros, mostrando domínios

morfológicos distintos nas imagens dos cultivos celulares. A aplicação desta metodologia é geral para ensaios de angiogênese em culturas celulares 3D.

Capítulo 2

Microscopia Holográfica Digital

Os trabalhos de Schnars e Juptner em 1994 [5] e o de Cuhe et. al. em 1999 [6] foram pioneiros na geração de hologramas com uso de sensores digitais de captura. A técnica de gravação e reconstrução de hologramas nesse tipo de sensor é chamada Holografia Digital (HD) e a aplicação dessa técnica à análise de sistemas microscópicos é chamada Microscopia Holográfica Digital (MHD). Neste capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica acerca das recentes aplicações e avanços da técnica, a descrição analítica do processo de gravação e dos principais métodos de reconstrução.

2.1. Microscopia Holográfica Digital: estado da arte

Informações adicionais e uma revisão completa da técnica de Microscopia Holográfica Digital (MHD) podem ser encontradas na referência [35].

A ideia de substituir a chapa fotográfica pelo sensor digital foi proposta por Goodman e Laurence [58] e a reconstrução numérica foi iniciada, na década de 70, por Yaroslavsky e colaboradores [59, 60, 61]. Haddad e colaboradores [62] descreveram um microscópio holográfico baseado na reconstrução numérica de hologramas de Fresnel, mas somente no trabalho de U. Schnars e W. Jüptner [5], foi apresentado um método completo no que se refere à gravação e reconstrução de hologramas em um dispositivo digital de captura (CCD). O trabalho de Cuhe e colaboradores [63] mostrou que a fase pode ser reconstruída a partir de um único holograma, superando os métodos de deslocamento de fase.

Desde então, a Microscopia Holográfica Digital tem sido modificada, melhorada e aplicada à solução de diversos problemas. Trabalhos diversos foram realizados,

principalmente visando o campo biomédico através do estudo celular. A técnica mais aplicada ao estudo dos sistemas celulares é a Microscopia de Campo Claro [64], no entanto, a maioria das células é transparente, o que torna difícil promover o contraste entre a amostra e seu meio. Uma forma de resolver esse problema é o uso de corantes, mas esses podem ser citotóxicos em longo prazo, além de poderem influenciar o comportamento celular. A informação de fase está diretamente relacionada com seu perfil de espessura, de forma a ser possível determinar, através da fase, a estrutura tridimensional do objeto [65]. Algumas técnicas microscópicas para o estudo da fase foram desenvolvidas, como a Microscopia de Contraste de Fase [44] e a Microscopia Interferencial de Contraste Diferencial desenvolvida por Nomarski [66]. Apesar das possibilidades que essas técnicas oferecem a informação quantitativa acerca da amostra não pode ser obtida, sendo esta útil em citologia e diagnóstico. Um método que oferece a possibilidade de obter a informação quantitativa é a Microscopia de Desfocalização [67], mas para reconstrução do perfil de fase do objeto é necessário capturar três imagens em sequência, o que inviabiliza a análise de eventos dinâmicos. Dessa forma, a Microscopia Holográfica Digital se torna uma técnica completa, à medida que permite a obtenção da informação qualitativa e quantitativa de objetos, sem a necessidade do uso de corantes ou marcadores, de forma não-invasiva e não-destrutiva (sem necessidade de contato com a amostra).

Por suas vantagens, diversos trabalhos foram desenvolvidos nos últimos anos através da aplicação da técnica holográfica ao estudo de problemas relacionados às células, como por exemplo, trabalho de monitoramento da dinâmica de neurônios em cultura [68]. Trabalhos como o de Marquet e colaboradores [11] também apresentaram imagens de células vivas em cultura através da técnica. Foi realizada a análise de células tumorais vivas de pâncreas, de forma a demonstrar mudanças morfológicas induzidas por drogas nessas células [13]. Outras aplicações podem ser citadas: identificação e análise quantitativa de células [69, 65], medidas de deformação e alterações da membrana de células [70, 17, 47], monitoramento da divisão celular [71], entre outros. Das aplicações mais recentes (entre 2011 e 2015) da MHD na área biomédica, podemos citar: análise das alterações nas propriedades mecânicas de eritrócitos devido à ação da malária [72], detecção de parasitas [73], alterações celulares durante o processo de apoptose [74], acompanhamento da evolução de feridas intestinais [75], entre outras [76]. Além dos que permitiram desenvolver a técnica e os métodos de reconstrução [77,

78], outros trabalhos foram propostos, como a tomografia utilizando hologramas digitais [79, 10].

2.2. Princípios de funcionamento

O microscópio holográfico pode ser configurado em modo transmissão, utilizado para o estudo de amostras transparentes ou semitransparentes, ou em modo reflexão, utilizado para análise de materiais reflexivos e opacos. Para o aparato em modo transmissão, as variações presentes no holograma são causadas pelo incremento de fase adicionado à onda transmitida pelo objeto [80]:

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \int_0^{h_o} \Delta n(x, y, z) dz, \quad (2.1)$$

Figura 2.1: Retardo de fase gerado em uma frente de onda devido à transmissão por um objeto.

onde $\Delta n(x, y, z)$ é a diferença de índices de refração entre o objeto $n_o(x, y, z)$ e o meio n_m onde está imerso. Para objetos que possuem índice de refração praticamente constante em toda a sua estrutura a variação de fase (φ) é dada por:

$$\varphi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} e(x, y) \Delta n, \quad (2.2)$$

onde $e(x, y)$ representa a espessura do objeto no ponto (x, y) . Dessa forma, através do método holográfico é possível obter o perfil topográfico e o valor de espessura em cada ponto da amostra a ser analisada através do seu perfil de fase. Diferentemente, para estruturas com diferentes índices de refração, não é possível determinar diretamente a

sua espessura. Para isso, é necessário executar um processo de desacoplamento das informações de espessura e índice de refração [65].

Uma versão da montagem experimental de um Microscópio Holográfico Digital é apresentada na Figura 2.2. Baseado em um interferômetro de Mach-Zehnder apresentando geometria *off-axis* em modo transmissão, este arranjo é próprio para estudo de amostras transparentes, como células e tecidos biológicos. Uma versão invertida do aparato é mostrada na Figura 2.3, adequada para análise de células em cultura.

Para realizar a gravação da distribuição de intensidade do holograma um dispositivo, que pode ser uma câmera CCD ou um sensor CMOS, é utilizado¹. Para realizar a reconstrução, o holograma digital é multiplicado por um campo de onda no plano do holograma e o campo difratado no plano imagem é determinado pela integral de Fresnel-Kirchoff [78]. Todo o processo é realizado de forma numérica, através de algoritmos específicos.

Figura 2.2: Esquema experimental de um Microscópio Holográfico Digital. O feixe proveniente da fonte de luz (LASER) é dividido em duas porções, sendo uma parte desviada pelo divisor de feixes DF1, o feixe referência (E_R), e a outra transmitida pelo objeto, chamada de feixe objeto (E_o). Os campos são recombinados pelo divisor de feixes DF2 interferindo na superfície do sensor CCD e formando o holograma digital.

Nessa montagem, a luz coerente proveniente de uma fonte coerente (LASER) é filtrada e expandida através do uso de um filtro espacial (FE) sendo, então, dividida em duas porções por um divisor de feixes (DF1): uma porção atua com feixe referência e a

¹ Neste trabalho, foi utilizado como sensor de captura, um *Charge Coupled Device* (CCD). Por isso, os esquemas apresentados são mostrados com esse tipo de sensor.

outra é transmitida pela amostra e ampliada por uma lente objetiva (**MO**) tornando-se o feixe objeto. Os feixes são recombinados por um segundo divisor de feixes (**DF2**) e, separados por um pequeno ângulo θ , (detalhe na Figura 2.2) são direcionados à superfície do sensor digital (CCD). O ângulo entre os feixes se faz necessário já que a configuração fora de eixo (*off-axis*) é utilizada, mas este deve ser escolhido de forma a satisfazer o teorema da amostragem. O valor máximo, sob condições paraxiais, é dado por [81]:

$$\theta_{max} \approx \frac{\lambda}{2\Delta x}, \quad (2.3)$$

onde Δx corresponde à dimensão do pixel do sensor digital.

Figura 2.3: Esquema experimental de um Microscópio Holográfico Digital Invertido. O feixe proveniente da fonte de luz (LASER) é direcionado pelo espelho E1 até o espelho E2. Este feixe é dividido em duas porções pelo divisor DF1: o feixe referência (E_R), e a outra transmitida pelo objeto, chamada de feixe objeto (E_O). Nesta configuração, a lente objetiva é posicionada após o objeto, permitindo-se trabalhar com amostras em meio líquido, como células em meio de cultura. Os campos são recombinados pelo divisor de feixes DF2 interferindo na superfície do sensor CCD formando o holograma digital.

Através da combinação de lâminas de meia onda e polarizadores ($\lambda/2$, **P1** e **P2**), localizados em cada braço do interferômetro, é possível ajustar as intensidades e estados de polarização de cada feixe ampliando o contraste da imagem de interferência. Antes de o feixe de luz atingir o objeto, este é focado por uma lente condensadora (**C**) de forma a permitir que todo o feixe transmitido seja compatível com o tamanho da abertura numérica da lente objetiva. A condensadora utilizada tinha posição ajustável e distância focal de aproximadamente 1 mm. O ajuste da condensadora com a abertura numérica da lente objetiva é importante para maximizar o potencial do sistema de ampliação. Um diafragma foi posicionado antes da condensadora para redução dos

problemas de espalhamento gerados no sistema. O padrão de interferência produzido pela soma das ondas referência e objeto é o holograma digital, e um exemplo deste pode ser visto na Figura 2.4:

Figura 2.4: Exemplo de um holograma digital obtido a partir de uma amostra de células sanguíneas depositadas sobre lâmina de vidro. A área selecionada pelo quadrado vermelho foi ampliada para melhor visualização do padrão de franjas formado.

2.3. Reconstrução Numérica de Hologramas Digitais

A holografia digital, assim como a clássica é dividida em duas etapas: gravação e reconstrução da frente de onda proveniente do objeto. Na holografia tradicional, é comum o uso de filmes fotográficos de alta resolução para captura dos hologramas e a etapa de reconstrução é realizada através da difração de uma frente de onda similar à de referência pelo holograma analógico. Diferentemente, a etapa de gravação na holografia digital é realizada através da captura da imagem do objeto por um dispositivo eletrônico fotossensível e a informação obtida é processada através de métodos numéricos que simulam a difração de uma onda de referência digital pelo holograma. Vários desses métodos foram propostos para a determinação das informações de fase e intensidade do objeto. Um exemplo foi o método proposto por Cuche e colaboradores em 1999 [6]: estes introduziram o conceito de onda de referência digital e o conceito de máscara de fase [63], a qual foi utilizada como meio de compensar a deformação da frente de onda associada ao uso de uma lente objetiva. Apesar de o método permitir a obtenção da informação de fase através do uso de um só holograma, este exigia o conhecimento prévio de parâmetros digitais relacionados à onda referência e à máscara para que a reconstrução fosse realizada de forma correta. Em 2003, Ferraro [82] propôs outro método de reconstrução através da tomada de um holograma de uma parte plana do objeto em associação a um processo de subtração de imagens. Esta técnica, apesar de

funcional para seu propósito, apresentou falhas na precisão de suas medições. Os métodos mais utilizados para a reconstrução de hologramas se baseiam na utilização de algoritmos que permitem a manipulação da informação no plano da Transformada de Fourier² da imagem do holograma. Estes algoritmos realizam a multiplicação do holograma por uma frente de onda digital, sendo esta a descrição numérica da onda de referência e o campo difratado no plano imagem é determinado pela integral de Fresnel – Kirchoff, permitindo a determinação da distribuição de fase e intensidade da imagem reconstruída [83].

Entre os métodos já desenvolvidos, destacam-se os estatísticos e os métodos baseados na propagação do campo óptico, sendo estes últimos os mais utilizados. Os métodos de propagação utilizam o princípio de Huygens-Fresnel o qual considera que cada ponto de uma frente de onda atua como uma fonte de onda esférica, ou seja, a somatória das ondas secundárias provenientes dessas fontes determina a forma da frente de onda em um tempo subsequente. O princípio pode ser escrito sobre a forma [4]:

$$U(P_1) = \frac{1}{\lambda i} \iint_{\Sigma} U(P_0) \frac{\exp(ikr_{01})}{r_{01}} \cos \vartheta \, dS, \quad (2.4)$$

onde ϑ é o ângulo entre os vetores $\vec{n}$ e $\vec{r}_{01}$ e Σ a superfície onde a onda é difratada. $U(P_0)$ e $U(P_1)$ são as amplitudes complexas em P_0 e P_1 (Figura 2.5).

Figura 2.5: Representação da difração de uma onda em uma abertura.

² A Transformada de Fourier permite expandir uma função arbitrária em forma de uma superposição de funções harmônicas de diferentes frequências.

Implementar numericamente esse princípio pode ser complexo e demandar tempo. A partir dessa integral é possível utilizar métodos numéricos de reconstrução, divididos em dois grupos principais: aqueles baseados na Simples Transformada de Fourier [84], adequados para objetos localizados a grandes distâncias do sensor digital. Estes geram variações no tamanho da imagem reconstruída, que se torna um inconveniente em determinadas aplicações, como para a obtenção do tamanho de objetos. O segundo grupo é formado pelos métodos de Convolução [85], calculados utilizando duas ou mais Transformadas de Fourier. Estes são adequados para reconstrução de hologramas de pequenas dimensões laterais, gravados próximos ao sensor digital e apresentam a vantagem de manter as dimensões da imagem reconstruída.

Outros métodos podem ser citados, como o método do Espectro Angular e o método de Dupla Propagação, ambos utilizados para realização das reconstruções dos hologramas neste trabalho. A descrição de cada método é dada nos tópicos a seguir.

2.3.1. Reconstrução por Simples Transformada de Fourier

A difração de uma onda de referência que atravessa uma abertura (nesse caso, o holograma) perpendicularmente ao plano dessa abertura, pode ser descrita pela Integral de Fresnel-Kirchhoff [35]:

$$\Gamma(\xi, \eta) = \frac{1}{\lambda i} \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) E_R(x, y) \frac{\exp(i2\pi r/\lambda)}{r} \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos \vartheta \right) dx dy, \quad (2.5)$$

onde $r = \sqrt{(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2 + d^2}$ representa a distância entre um ponto no plano do holograma (x, y) e um ponto no plano de reconstrução (ξ, η) distantes d entre si, $h(x, y)$ representa a função do holograma, $E_R(x, y)$ uma frente de onda plana no mesmo plano e ϑ o ângulo entre r e o eixo z (Figura 2.6).

Lembrando que a função do holograma é dada pela equação 1.4:

$$h(x, y) = I(x, y) = |E_R|^2 + |E_O|^2 + E_R^* E_O + E_R E_O^*, \quad (2.6)$$

onde os dois primeiros termos correspondem à ordem zero (também chamado de termo de autocorrelação). O terceiro e o quarto termo são chamados de imagem virtual e

imagem real, respectivamente. Para realizar a reconstrução da função complexa que caracteriza o objeto, o termo correspondente à imagem virtual deve ser isolado dos outros termos. Esse processo pode ser realizado através de procedimentos de filtragem espacial.

Figura 2.6: Sistema de coordenadas adotado no processo de simulação da difração da luz por um holograma digital.

A Integral de Fresnel-Kirchhoff descreve o campo no plano (ξ, η) como formado pela superposição de um número infinito de fontes pontuais secundárias localizadas na própria abertura, aqui sendo considerada o holograma. O padrão de difração resultante da transmissão da frente de onda $E_R(x, y)$ através do holograma $h(x, y)$ é calculado a uma distância d do plano do sensor de captura. Como $\Gamma(\xi, \eta)$ é dada por uma função complexa, tanto fase como intensidade podem ser calculadas.

Considerando $(\xi - x)$ e $(\eta - y)$ pequenos em relação a d (utilizando o desenvolvimento em expansão binominal), pode-se considerar a formulação apresentada utilizando a aproximação de Fresnel:

$$r \cong d + \frac{(\xi - x)^2}{2d} + \frac{(\eta - y)^2}{2d}, \quad (2.7)$$

e utilizando $\cos \vartheta \approx 1$ e substituindo o denominador por d :

$$\Gamma(\xi, \eta) = \frac{1}{i\lambda d} \iint_{-\infty}^{+\infty} \exp\left(\frac{i2\pi d}{\lambda}\right) h(x, y) E_R(x, y) \quad (2.8)$$

$$\times \exp\left\{\frac{i\pi}{\lambda d} [(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2]\right\} dx dy.$$

Desenvolvendo os termos da equação:

$$\Gamma_{\text{real}}(\xi, \eta) = \frac{1}{i\lambda d} \exp\left(\frac{i2\pi d}{\lambda}\right) \exp\left[\frac{i\pi}{\lambda d}(\xi^2 + \eta^2)\right] \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) E_R(x, y) \times \exp\left[\frac{i\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right] \exp\left[-\frac{i2\pi}{\lambda d}(x\xi + y\eta)\right] dx dy. \quad (2.9)$$

Essa equação é a chamada Integral de Difração de Fresnel. Da função complexa resultante, pode-se reconstruir a imagem real.

A imagem virtual também pode ser reconstruída inserindo no cálculo do campo difratado as propriedades de uma lente convergente. Considerando, então, o campo difratado logo após o holograma como resultado de $h(x, y)E_R(x, y)$, a distribuição de amplitude logo atrás da lente de distância focal f será dada por [4]:

$$U(x, y) = h(x, y)E_R(x, y) \exp\left[-i\frac{\pi}{\lambda f}(x^2 + y^2)\right]. \quad (2.10)$$

Substituindo na Integral de Difração de Fresnel (equação 2.9) o termo correspondente à amplitude transmitida logo após o holograma pelo termo apresentado acima, teremos o campo difratado no plano da imagem virtual:

$$\Gamma_{\text{virt}}(\xi, \eta) = \frac{1}{i\lambda d} \exp\left(\frac{i2\pi d}{\lambda}\right) \exp\left[\frac{i\pi}{\lambda d}(\xi^2 + \eta^2)\right] \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) E_R(x, y) \times \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda f}(x^2 + y^2)\right] \exp\left[\frac{i\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right] \exp\left[-\frac{i2\pi}{\lambda d}(x\xi + y\eta)\right] dx dy. \quad (2.11)$$

Para uma lente de aumento unitário, considera-se a distância focal igual à metade da distância entre o plano do holograma e o plano imagem ($f = d/2$):

$$\Gamma_{\text{vir}}(\xi, \eta) = \frac{1}{i\lambda d} \exp\left(\frac{i2\pi d}{\lambda}\right) \exp\left[\frac{i\pi}{\lambda d}(\xi^2 + \eta^2)\right] \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) E_R(x, y) \times \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right] \exp\left[-\frac{i2\pi}{\lambda d}(x\xi + y\eta)\right] dx dy. \quad (2.12)$$

A única diferença entre as expressões 2.9 e 2.12 está no sinal do argumento na primeira exponencial da integral. Em ambos os casos, a intensidade é dada pelo módulo ao quadrado do campo:

$$I(\xi, \eta) = |\Gamma(\xi, \eta)|^2 \quad (2.13)$$

e a fase é dada pela razão entre as partes imaginária e real do campo complexo:

$$\varphi(\xi, \eta) = \arctan \frac{\text{Im}[\Gamma(\xi, \eta)]}{\text{Re}[\Gamma(\xi, \eta)]}. \quad (2.14)$$

Observando a equação 2.12, pode-se notar que realizando a substituição $u = \xi/\lambda d$ e $v = \eta/\lambda d$:

$$\Gamma_{\text{vir}}(u, v) = \frac{1}{i\lambda d} \exp\left(\frac{i2\pi d}{\lambda}\right) \exp[i\pi\lambda d(u^2 + v^2)] \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) E_R(x, y) \quad (2.15)$$

$$\times \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right] \exp[-i2\pi(xu + yv)] dx dy.$$

Reconhecemos que, fora o termo que multiplica a integral, a expressão 2.15 representa a transformada de Fourier (aqui denotada pelo símbolo $\mathcal{F}$) da função $h(x, y) E_R(x, y) \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right]$:

$$\Gamma(\xi, \eta) = \frac{1}{i\lambda d} \exp[-i\lambda\pi d(\xi^2 + \eta^2)] \mathcal{F}\left\{h(x, y) E_R(x, y) \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right]\right\}. \quad (2.16)$$

O termo $\exp\left(\frac{-i2\pi d}{\lambda}\right)$ foi omitido por afetar a fase global, não interferindo no processo de obtenção da fase do objeto a ser analisado.

O holograma gravado, por ser digital, refere-se a uma matriz de $M \times N$ pontos de dimensões Δx e Δy (correspondem às dimensões dos pixels da CCD). Se considerarmos o holograma como uma grade de difração de dimensões laterais $M\Delta x$ e $N\Delta y$, podemos relacionar as coordenadas do plano do holograma com as recíprocas no plano imagem:

$$\Delta\xi = \frac{\lambda d}{M\Delta x} \text{ e } \Delta\eta = \frac{\lambda d}{N\Delta y}. \quad (2.17)$$

Como é conhecida a relação entre as frequências (u, v) e as coordenadas (ξ, η) , obtemos os intervalos de frequência:

$$\Delta u = \frac{1}{M\Delta x} \text{ e } \Delta v = \frac{1}{N\Delta y}. \quad (2.18)$$

Aplicando a formulação discreta à Integral de Difração de Fresnel:

$$\begin{aligned} \Gamma(m, n) = & \frac{i}{\lambda d} \exp \left[-i\lambda\pi d \left(\frac{m^2}{(M\Delta x)^2} + \frac{n^2}{(N\Delta y)^2} \right) \right] \sum_{j=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} h(x, y) E_R(x, y) \\ & \times \exp \left[-\frac{i\pi}{\lambda d} (j^2\Delta x^2 + l^2\Delta y^2) \right] \exp \left[i2\pi \left(\frac{jm}{M} + \frac{ln}{N} \right) \right], \end{aligned} \quad (2.19)$$

onde $m = 0, 1, \dots, M-1$; $n = 0, 1, \dots, N-1$.

Portanto, para executar a reconstrução por Simples Transformada de Fourier, o campo complexo no plano de reconstrução é obtido multiplicando uma onda de referência $E_R(x, y)$ pelo holograma $h(x, y)$ e pelo termo $\exp \left[-\frac{i\pi}{\lambda d} (j^2\Delta x^2 + l^2\Delta y^2) \right]$ e aplicando uma transformada discreta de Fourier ao resultado.

2.3.2. Reconstrução através do Método de Convolução

Reescrevendo a Integral de Difração de Fresnel:

$$\Gamma(\xi, \eta) = \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) E_R(x, y) H(\xi, \eta, x, y), \quad (2.20)$$

onde: $H(\xi, \eta, x, y) = \frac{1}{i\lambda d} \exp \left(\frac{i2\pi d}{\lambda} \right) \exp \left\{ \frac{i\pi}{\lambda d} [(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2] \right\}$ e $\cos \vartheta \approx 1$.

Por ser considerado um sistema linear ($H(\xi, \eta, x, y) = H\{(\xi - x), (\eta - y)\}$) a reconstrução holográfica pode ser realizada através de métodos baseados no Teorema da Convolução, o qual afirma que a transformada de Fourier da convolução do produto $h(x, y)E_R(x, y)$ com a função $H(\xi, \eta, x, y)$, resulta no produto das transformadas de Fourier de cada um desses dois termos [35]:

$$\mathcal{F}\{h(x, y)E_R(x, y) \cdot H(\xi, \eta, x, y)\} = \mathcal{F}\{h(x, y)E_R(x, y)\} \cdot \mathcal{F}\{H(\xi, \eta, x, y)\}. \quad (2.21)$$

A partir desse princípio, a função $\Gamma(\xi, \eta)$ pode ser calculada através do método resumido na equação:

$$\Gamma(\xi, \eta) = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{h(x, y)E_R(x, y)\} \cdot \mathcal{F}\{H(\xi, \eta, x, y)\}\}. \quad (2.22)$$

Ao todo são necessárias três transformadas de Fourier para o cálculo do campo $\Gamma(\xi, \eta)$.

Diferentemente do método baseado na Simples Transformada de Fourier, as dimensões dos pixels da imagem reconstruída pelo Método de Convolução são iguais às do holograma, ou seja: $\Delta\xi = \Delta x$ e $\Delta\eta = \Delta y$.

2.3.3. Método do Espectro Angular

Esse método baseia-se na propagação do Espectro Angular do holograma desde o plano de gravação até o plano de reconstrução. O Espectro Angular de uma distribuição complexa, como o holograma, é o resultado da decomposição de Fourier dessa distribuição [4]. As respectivas componentes de Fourier no plano considerado são analisadas como ondas planas se propagando em diferentes direções a partir desse plano. A amplitude resultante é resultado da superposição dessas ondas planas acrescido de um incremento de fase devido à diferença nas direções de propagação:

$$U(x, y, z) = \sum_{n=1}^{+\infty} E_n e^{i(k_{xn}x + k_{yn}y + k_{zn}z)}, \quad (2.23)$$

onde k_{xn} , k_{yn} e k_{zn} correspondem às componentes dos vetores de onda de cada onda plana e E_n corresponde às amplitudes. O módulo do vetor de onda correspondente a $U(x, y, z)$ pode ser escrito como $|\mathbf{k}| = k = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2}$. Ao longo do plano $z = 0$, a função $U(x, y, 0)$ terá a forma:

$$U(x, y, 0) = \sum_{n=1}^{+\infty} E_n e^{i(k_{xn}x + k_{yn}y)}, \quad (2.24)$$

As componentes de $\mathbf{k}$ ao longo dos eixos principais são os cossenos direcionais (α , β e γ), definidos como (Figura 2.7):

$$\begin{aligned} \alpha &= \frac{k_x}{k}, \\ \beta &= \frac{k_y}{k}, \end{aligned} \quad (2.25)$$

$$\gamma = \frac{k_z}{k}.$$

Figura 2.7: Representação do vetor de onda $\mathbf{k}$ e de seus cossenos direcionais.

O Espectro Angular da distribuição $U(x, y, 0)$ é determinado através da sua Transformada de Fourier:

$$A(f_x, f_y, 0) = \iint_{-\infty}^{+\infty} U(x, y, 0) \exp[-i2\pi(xf_x + yf_y)] dx dy. \quad (2.26)$$

De forma análoga, a Transformada Inversa de Fourier pode ser dada pela equação:

$$U(x, y, 0) = \iint_{-\infty}^{+\infty} A(f_x, f_y, 0) \exp[i2\pi(xf_x + yf_y)] dx dy. \quad (2.27)$$

Para esse caso: $\alpha = \lambda f_x$, $\beta = \lambda f_y$ e $\gamma = \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2}$. Considerando um plano paralelo ($z = d$), a função nesse plano $U(x, y, d)$ é determinada através da relação:

$$U(x, y, d) = \mathcal{F}^{-1}\{A(f_x, f_y, d)\}. \quad (2.28)$$

Como consequência, conhecendo a relação entre os espectros angulares em cada plano, é possível calcular a relação entre os campos complexos em cada plano. Ou seja, ao saber que [4]:

$$A(f_x, f_y, z) = A(f_x, f_y, 0) \exp\left[z \frac{i2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2}\right], \quad (2.29)$$

a função $U(x, y, d)$ pode ser determinada através da expressão:

$$U(x, y, d) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \mathcal{F}\{U(x, y, 0)\} \cdot \exp \left[d \frac{i2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2} \right] \right\}. \quad (2.30)$$

Figura 2.8: (a) Exemplo de um holograma de células sanguíneas gerado a partir de um sistema de MHD (aumento de 40x e $\lambda = 532 \text{ nm}$). (b) Imagem correspondente ao Espectro Angular da distribuição do holograma. O retângulo vermelho em (b) destaca a região do espectro que corresponde à ordem de difração que gera a imagem virtual.

Na Microscopia Holográfica Digital, é considerada como onda objeto a onda emergente da imagem ampliada e não do objeto em si, ou seja, a onda proveniente da lente objetiva. Portanto, quando a imagem produzida pela lente objetiva é formada no plano do sensor digital, a distância de reconstrução pode ser um valor muito pequeno ou até zero. Para o Método do Espectro Angular, essa configuração é adequada, pois este método é próprio para hologramas gravados próximos ao objeto. Diferentemente, os métodos que utilizam a aproximação de Fresnel (apesar de serem frequentemente utilizados por apresentarem grande qualidade de reconstrução), apresentam uma limitação em relação à distância de reconstrução utilizada, ou seja, esta precisa ser maior que uma distância mínima entre o objeto e o holograma, dada por [86]:

$$z_{min} = \frac{M\Delta x^2}{\lambda}. \quad (2.31)$$

Além da vantagem de não exigir distância de reconstrução mínima, no método do Espectro Angular, a imagem reconstruída apresenta resolução igual àquela do plano do holograma. Outra vantagem deste método é a facilidade de se realizar a filtragem das ordens de difração indesejadas. Por esses fatores, este método foi utilizado como método de reconstrução em algumas etapas do trabalho (exemplo de um holograma e seu respectivo espectro Angular na Figura 2.8). O algoritmo desenvolvido para essa função é apresentado no Anexo A e a Figura 2.9 apresenta exemplos de imagens de

intensidade e fase reconstruídas através do método do Espectro Angular (EA) utilizando o algoritmo desenvolvido.

Figura 2.9: Exemplos de imagens de fase (a) e de intensidade (b) reconstruídas numericamente a partir do holograma da Figura 2.8, utilizando o método do Espectro Angular. O mapa de fase é representado em tons de cinza os quais correspondem ao intervalo $(-\pi; \pi)$.

Assim como apresentado nas equações 2.13 e 2.14, as imagens de intensidade e fase são dadas pelo módulo quadrado do campo complexo reconstruído e pelo arcotangente da razão entre as partes imaginária e real desse campo, respectivamente. O mapa de fase resultante é dado em forma de imagem de tons de cinza que variam entre $-\pi$ a $+\pi$.

2.3.4. Método de Dupla Propagação

O método de Dupla Propagação é um método de reconstrução proposto por Palacios e colaboradores [78], no qual o processo de reconstrução da frente de onda transmitida pelo objeto é dividido em duas etapas: na primeira, o plano da Transformada de Fourier do objeto é calculado. Na segunda etapa, é executada uma propagação do plano de Transformada de Fourier ao plano imagem.

Nesta seção, é considerada a distribuição espacial dos planos como apresentado na Figura 2.6. A função do holograma nesta seção será simbolizada por $I_H(x, y)$. Para a obtenção da distribuição de onda complexa no plano imagem $o(\xi, \eta) \equiv \psi(\xi, \eta, z = d)$ dois passos são executados: No primeiro (Figura 2.10), o campo complexo $\psi(x, y)$ no plano do holograma é propagado até o plano (u, v) (plano da Transformada de Fourier) o qual se encontra a uma distância $z = D$ do plano de (x, y) . A distância D representa a distância física do holograma ao ponto focal posterior da lente objetiva, sendo constante para cada configuração da instalação experimental. Para o cálculo dessa distância, o algoritmo baseado no método do Espectro Angular é utilizado.

Figura 2.10: Primeira etapa do processo de reconstrução da frente de onda transmitida pelo objeto. Nesta etapa, a distribuição complexa no plano da transformada de Fourier da função que representa o holograma é determinada. Para tanto, uma propagação desde o plano do holograma (x, y) até o plano da transformada (u, v) , distantes D um do outro é realizada.

Primeiramente, o espectro angular $A(k_x, k_y, z = 0)$ do holograma $I_H(x, y)$ em $z = 0$ é obtido executando-se a transformada de Fourier desse padrão. Nesta relação, k_x e k_y são as frequências espaciais no plano do holograma. Após a sua determinação, o espectro angular é filtrado de forma a suprimir a ordem zero e a imagem real. Nesse passo, o espectro angular modificado $\tilde{A}(k_x, k_y, z = 0)$ representa o espectro do objeto. Para encontrar o espectro angular modificado em um ponto z , utiliza-se a relação apresentada na equação 2.30.

O campo complexo reconstruído no plano (u, v) pode ser dado, então, por:

$$\psi_{ASA}(u, v, z) = \iint \tilde{A}(k_x, k_y, z = 0) \exp[i(k_x u + k_y v)] dk_x dk_y. \quad (2.32)$$

A reconstrução da imagem de amplitude $I_{ASA}(u, v, z) = |\psi_{ASA}(u, v, z)|^2$ é executada variando z de 0 a uma distância determinada em intervalos de 10 ou 20 mm. Uma curva construída pelos pontos referentes ao valor pontual máximo $P(z) = [I_{ASA}(u, v, z)]_{MAX}$ para cada ponto de z é construída representando a intensidade máxima no plano transversal a z . Na Figura 2.11 tem-se um exemplo da curva obtida para um determinado holograma. Neste caso, a variação da distância z foi de 0 a 300 mm com passos de 20 mm.

Figura 2.11: Determinação da distância z através do método do Espectro Angular.

A distância D é dada, finalmente, pelo valor de z para o qual $P(z)$ é máximo. No caso do exemplo da Figura 2.11, o valor encontrado foi de 173 mm.

Após a determinação da distância D , a primeira propagação é executada utilizando o método da Simples Transformada de Fourier. Assim, a distribuição de onda no plano (u, v) , para uma distância z pode ser dada por:

$$\psi(u, v, z) = A \cdot \exp[i\pi\lambda z(u^2 + v^2)] \mathcal{F} \left\{ I_H^f(x, y) \exp \left[-\frac{i\pi}{\lambda z} (x^2 + y^2) \right] \right\}, \quad (2.33)$$

onde z é a distância de reconstrução, $\mathcal{F}$ é o operador que denota a Transformada de Fourier, $A = \exp \left(\frac{i2\pi z}{\lambda} \right) / (iz\lambda)$ pode ser considerado uma onda plana de referência e I_H^f representa o holograma filtrado. O campo complexo filtrado $\psi^f(u, v, z = D)$ é equivalente à distribuição do campo complexo $\tilde{o}(u, v)$ no plano focal posterior da lente objetiva.

Na segunda etapa do método, o campo complexo $\psi(\xi, \eta, d')$ a uma distância arbitrária d' é obtido através da propagação do campo $\tilde{o}(u, v)$ por essa distância d' , ou seja, executando-se uma transformada inversa de Fourier:

$$\psi(\xi, \eta, d') = \mathcal{F}^{-1} [\psi^f(u, v, z = D)] \cdot \exp \left(id' \sqrt{k^2 + k_u^2 + k_v^2} \right), \quad (2.34)$$

onde $\mathcal{F}^{-1}$ simboliza a transformada inversa de Fourier, k , k_u , k_v são as frequências espaciais correspondentes a u e v , respectivamente. A implementação numérica da equação 2.34 é chamada de Algoritmo de Dupla Propagação (ADP) e pode ser dada por:

$$\psi_{ADP}(m, n, d') = FFT^{-1} \left\{ \psi^f(l, j, D) \cdot \exp \left(2\pi i d' \sqrt{\left(\frac{1}{\lambda}\right)^2 + \left(\frac{l}{N\Delta\xi}\right)^2 + \left(\frac{j}{M\Delta\eta}\right)^2} \right) \right\}, \quad (2.35)$$

onde l, j, m e n são inteiros e $\psi^f(l, j, z = D)$. A partir da equação 2.35 é possível obter a imagem de intensidade $I_{ADP}(\xi, \eta, d')$ calculando $|\psi_{ADP}(m, n, d')|^2$, assim como é possível obter a imagem de fase $\Phi_{ADP}(\xi, \eta, d')$ determinando $arg[\psi_{ADP}(m, n, d')]$.

Como principais vantagens desse método, podemos citar a capacidade de manter a dimensão da imagem reconstruída, independente da distância de reconstrução e comprimento de onda para objetos maiores que o sensor, e a compensação da curvatura de fase introduzida pela lente objetiva sem necessitar de hologramas de referência ou parâmetros de ajuste. Por essas razões e devido à colaboração existente entre os desenvolvedores do método e o Grupo de Óptica do IFUSP, o método de Dupla Propagação foi utilizado em algumas etapas iniciais deste trabalho.

2.3.5. Compensação da Curvatura de Fase

A lente objetiva presente em um aparato de Microscopia Holográfica Digital pode gerar aberrações na onda objeto. A principal aberração refere-se a uma curvatura devido a um fator de fase quadrático presente na função de onda complexa reconstruída. Esse fator é gerado pela lente e removê-lo é essencial quando se trabalha com análise quantitativa de fase.

Vários métodos foram propostos para remoção da curvatura introduzida pela lente [82] assim como para remoção de aberrações esféricas [87] entre outros problemas apresentados pelo *setup*. Alguns trabalhos, como os de Colomb e colaboradores [77] sugeriram a aplicação da função de uma lente numérica no plano do holograma para realizar as correções.

Neste trabalho, os métodos de reconstrução numérica utilizados foram o método de Dupla Propagação e o método do Espectro Angular. No primeiro, a remoção da curvatura de fase introduzida pela lente objetiva é realizada no primeiro passo, diretamente no plano de difração. No segundo método, a correção dessa curvatura é realizada multiplicando um fator de correção à função de onda reconstruída.

Para determinação do fator de correção, foram tomadas as seguintes aproximações: a lente é considerada delgada e suas dimensões finitas foram desconsideradas, assim como outros tipos de aberrações.

Figura 2.12: Transformação da fase da frente de onda transmitida por uma lente convergente. L representa a distância entre objeto e a lente e f representa a distância focal da mesma.

Considerando um objeto de caracterizado pela função de transmitância $t_0(x, y)$ e localizado a uma distância L de uma lente convergente de distância focal f (Figura 2.12). Goodman [4] demonstrou que a distribuição de amplitude de um campo de onda que atravessa uma lente (considerando as aproximações descritas) está relacionada com a distribuição de amplitude do campo incidente nessa lente, de acordo com a relação:

$$U'_L(x', y') = U_L(x', y') \exp \left[\frac{-ik}{2f} (x'^2 + y'^2) \right]. \quad (2.36)$$

O vetor de onda $\mathbf{k}$ (neste caso) possui direção quase paralela à direção de propagação, já que a aproximação paraxial está sendo considerada.

Utilizando a Integral de Difração de Fresnel (equação 2.10), podemos determinar a distribuição de campo no plano focal da lente, ou seja, quando $d = f$.

$$U_f(u, v) = \frac{1}{i\lambda f} \exp \left(\frac{i2\pi f}{\lambda} \right) \exp \left[\frac{i\pi}{\lambda d} (u^2 + v^2) \right] \iint_{-\infty}^{+\infty} U'_L(x', y') \times \exp \left[\frac{i\pi}{\lambda f} (x'^2 + y'^2) \right] \exp \left[-\frac{i2\pi}{\lambda f} (x'u + y'v) \right] dx' dy'. \quad (2.37)$$

Substituindo a expressão 2.36 na equação acima:

$$U_f(u, v) = \frac{1}{i\lambda f} \exp \left(\frac{i2\pi f}{\lambda} \right) \exp \left[\frac{i\pi}{\lambda f} (u^2 + v^2) \right] \iint_{-\infty}^{+\infty} U_L(x', y') \quad (2.38)$$

$$\times \exp \left[-\frac{i2\pi}{\lambda f} (x'u + y'v) \right] dx' dy'.$$

Esta pode, então, ser simplificada:

$$U_f(u, v) = \frac{1}{i\lambda f} \exp(ikf) \exp \left[\frac{ik}{2f} (u^2 + v^2) \right] \mathcal{F}\{U_L(x', y')\}. \quad (2.39)$$

Esse é o campo no plano focal posterior da lente objetiva e representa o Padrão de Difração de Fraunhofer do campo que incide na lente.

Até este ponto, não foram consideradas distâncias de propagação anteriores à posição da lente. No entanto, existe uma distância L entre a lente e o objeto, chamada de “*working distance*” (distância de trabalho), que pode variar de acordo com o aumento e tipo de lente utilizada. Nesta seção, esta distância está representada pela letra L . O espectro angular da distribuição de amplitude do campo proveniente do objeto e propagado pela distância L , pode ser dado por:

$$A(f_x, f_y, L) = A(f_x, f_y, 0) \exp[ikL] \exp[-i\pi\lambda L(f_x^2 + f_y^2)], \quad (2.40)$$

Como $A(f_x, f_y, L) \cong \mathcal{F}\{U_L(x', y')\}$:

$$U_f(u, v) = \frac{\exp[ik(f+L)]}{i\lambda f} \exp \left[\frac{ik}{2f} (u^2 + v^2) \right] A(f_x, f_y, 0) \exp[-i\pi\lambda L(f_x^2 + f_y^2)]. \quad (2.41)$$

A amplitude e a fase da luz no plano focal estão relacionadas com a amplitude e a fase das componentes de Fourier do campo incidente da seguinte forma: $f_x = u/\lambda f$ e $f_y = v/\lambda f$. Portanto:

$$U_f(u, v) = \frac{\exp[ik(f+L)]}{i\lambda f} \exp \left[\frac{ik}{2f} (u^2 + v^2) \left(1 - \frac{L}{f} \right) \right] A \left(\frac{u}{\lambda f}, \frac{v}{\lambda f}, 0 \right). \quad (2.42)$$

Os termos que multiplicam o espectro angular na equação 2.42 são os responsáveis por gerar a curvatura fase do campo reconstruído. Para eliminá-los, no processo de reconstrução pelo método do Espectro Angular, é realizada uma multiplicação de um fator de correção, relacionado com esses termos, ao campo reconstruído (Anexo A):

$$S(\xi, \eta) = i\lambda f \exp[ik(f + L)] \exp \left[-\frac{ik}{2f} (\xi^2 + \eta^2) \left(1 - \frac{L}{f} \right) \right]. \quad (2.43)$$

Figura 2.13: Compensação da curvatura de fase introduzida por lente objetiva presente em um dos braços do interferômetro que compõe um Microscópio Holográfico Digital. (a) holograma digital de uma rede hexagonal de difração, (b) mapa de fase reconstruído sem correção da curvatura, (c) mapa de fase reconstruído através do método do Espectro Angular com curvatura compensada e (d) mapa de fase reconstruído através do método de Dupla Propagação com curvatura compensada.

Diferentemente, no método de Dupla Propagação, a correção da curvatura é realizada multiplicando o fator de correção na distribuição de campo do plano focal da lente. Mesmo com essa diferença, é possível notar pela Figura 2.13 a correspondência entre os dois métodos. A figura mostra o holograma de uma rede de difração, os mapas de fase reconstruídos sem correção (Fig. 2.13b) e corrigidos através dos dois métodos utilizados neste trabalho (Fig. 2.13c – Método do Espectro Angular e Fig. 2.13d – Método de Dupla Propagação).

2.3.6. Remoção da Ambiguidade do mapa de fase

O Mapa de Fase carrega consigo a descontinuidade da função arco tangente e é representado como um gráfico bidimensional limitado ao intervalo de valores de fase de $-\pi$ a π . O mapa gerado apresenta saltos do branco ao preto ou do preto ao branco, os quais correspondem à variação de π a $-\pi$ ou de $-\pi$ a π , respectivamente. A remoção dessa descontinuidade é de extrema importância para a real representação da microestrutura analisada, portanto vários métodos foram desenvolvidos com esse fim. O

mapa de fase que carrega a ambiguidade é chamado *wrapped phase map* e o mapa sem ambiguidade é chamado *unwrapped phase map*. O processo de remoção da ambiguidade é chamado *unwrapping*.

O processo de *unwrapping* refere-se ao processo pelo qual o valor absoluto do ângulo de fase de uma função contínua que se estende por um intervalo maior que 2π é recuperado. Os métodos mais utilizados se baseiam na integração da fase ao longo de um determinado caminho contando as descontinuidades e adicionando ou subtraindo 2π a cada salto de fase. A cada pixel, a diferença de fase é dada por:

$$\Delta\Phi = \Phi_n - \Phi_{n-1}, \quad (2.44)$$

onde n representa o número do pixel. Assumindo $|\Delta\Phi| = 2\pi$, tem-se um salto de fase. Esse salto é corrigido adicionando ou subtraindo 2π à fase do mapa com ambiguidade Φ_{wp} . Uma função de ordem de franjas local $N(\mathbf{r})$ é adicionada e a fase pode ser recuperada através da expressão:

$$\Phi = \Phi_{wp} + 2\pi N(\mathbf{r}), \text{ onde } N \in \mathbb{Z}. \quad (2.45)$$

O método utilizado para remoção da descontinuidade de fase utilizado neste trabalho foi descrito por Volkov e Zhu em [88]. Este é um método de passo único que utiliza um operador Laplaciano para estimar o valor real da fase: Aplicando uma Transformada de Fourier para calcular o operador Laplaciano, este método permite estimar a função $N(\mathbf{r})$.

Primeiro, foram utilizadas duas propriedades que são válidas para a Transformada de Fourier ($\mathcal{F}$) de uma função escalar $\Psi(\mathbf{r})$ e para sua transformada inversa ($\mathcal{F}^{-1}$), sendo $\mathbf{r}$ e $\mathbf{q}$ os vetores operando no espaço real e recíproco, respectivamente:

$$\nabla[\exp(2\pi i \mathbf{q} \cdot \mathbf{r})] = 2\pi i \mathbf{q} [\exp(2\pi i \mathbf{q} \cdot \mathbf{r})], \quad (2.46a)$$

$$\nabla\Psi(\mathbf{r}) = 2\pi i \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}[\Psi(\mathbf{r})]\mathbf{q}\}. \quad (2.46b)$$

Aplicando o operador $\mathcal{F}$ na equação 2.46b e calculando o produto escalar desta com os componentes do vetor $\mathbf{q}(q_x, q_y, q_z)$:

$$\Psi(\mathbf{r}) = \text{Re} \left\{ \frac{1}{2\pi i} \mathcal{F}^{-1} \left[\frac{\mathcal{F}(\partial_x \Psi) q_x + \mathcal{F}(\partial_y \Psi) q_y}{q^2} \right] \right\}, \quad (2.47)$$

onde q_x e q_y são as projeções espaciais do vetor de onda $\mathbf{q}$ definido pelo módulo como $q^2 = q_x^2 + q_y^2$.

Para recuperar o valor de fase real utilizando a equação 2.47, é necessário conhecer apenas as componentes $\partial_x \Psi$ e $\partial_y \Psi$ da função $\Psi(\mathbf{r})$. Para realizar o *unwrapping*, a função $\Psi(\mathbf{r})$ é relacionada com a função $N(\mathbf{r})$ para a qual as mesmas propriedades são válidas. Considerando as coordenadas da fase real e da fase modulada como idênticas, se torna possível relacionar as componentes de $\Phi_{wp}(\mathbf{r})$: $\partial_x \Psi(\mathbf{r}) \cong \partial_x \Phi_{wp}(\mathbf{r})$ e $\partial_y \Psi(\mathbf{r}) \cong \partial_y \Phi_{wp}(\mathbf{r})$.

Calculando o gradiente da equação 2.45: $2\pi \nabla N(\mathbf{r}) = \nabla \Phi - \nabla \Phi_{wp}$, onde a função $\nabla \Phi$ é desconhecida, mas pode ser reescrita como:

$$Z(\mathbf{r}) = \exp\{i[\Phi_{wp} + 2\pi N(\mathbf{r})]\} = \exp i[\Phi_{wp}(\mathbf{r})]. \quad (2.48)$$

Considerando válida a relação $\nabla N(\mathbf{r}) = \text{Re}[\nabla Z(\mathbf{r})/iZ(\mathbf{r})]$:

$$2\pi \nabla N(\mathbf{r}) = \text{Re}[\nabla Z(\mathbf{r})/iZ(\mathbf{r})] - \nabla \Phi_{wp}(\mathbf{r}). \quad (2.49)$$

Pode-se obter em um único passo todo o campo de números inteiros $N(\mathbf{r})$, permitindo a recuperação da fase real.

Figura 2.14: (a) Mapa de fase da Figura 2.12c após remoção da descontinuidade (*unwrapping*) e (b) após ajuste de fundo. Em (c) é apresentado o perfil de fase correspondente à linha vermelha desenhada sobre o mapa de fase antes do ajuste e em (d) o mesmo procedimento considerando o ajuste de fundo.

Uma consequência do processo de *unwrapping* é a evidente inclinação no mapa de fase resultante, como pode ser visto na Figura 2.14a. Para realizar o alinhamento da superfície da imagem, é necessário realizar procedimentos de ajuste de fundo, como a aplicação de um ajuste polinomial ao mapa de fase. No anexo A, é apresentado o procedimento em forma de algoritmo baseado em *Matlab*®. A Figura 2.14b apresenta o resultado do processamento realizado sobre o mapa de fase da rede de difração. Observando as duas figuras da sequência que mostram o perfil de fase definido pelas linhas vermelhas desenhadas sobre as figuras Figura 2.14a e Figura 2.14b é possível notar a inclinação no mapa de fase e como o processo de ajuste permite corrigir o problema.

Capítulo 3

Microscopia Holográfica de Polarização

Este capítulo apresenta uma introdução teórica e métodos aplicados ao estudo dos parâmetros de polarização de amostras que apresentam anisotropia óptica. Para o estudo do estado de polarização de uma amostra através da Microscopia Holográfica de Polarização (MHP), o uso do formalismo de Jones é o mais adequado e por esta razão, o este formalismo é apresentado na primeira seção do capítulo. Na segunda parte, são apresentadas as técnicas de microscopia de polarização tradicionalmente utilizadas ao estudo dos parâmetros de polarização de espécimes anisotrópicos e em seguida, os princípios de funcionamento da técnica de MHP são abordados.

3.1. Polarização e o Formalismo de Jones

A luz pode ser tratada com uma onda eletromagnética transversal, ou seja, como uma combinação de um campo elétrico e um campo magnético com direções de vibração perpendiculares à direção de propagação da onda. Uma importante propriedade da luz é seu estado de polarização, o qual é determinado pela direção e modo de vibração do seu campo elétrico.

O vetor campo elétrico no plano (x, y) de uma onda plana monocromática de frequência ν e frequência angular $\omega = 2\pi\nu$ que se propaga na direção z é dado por [37]:

$$\mathbf{E}(z, t) = \text{Re} \left\{ \mathcal{E} \exp \left[i\omega \left(t - \frac{z}{c} \right) \right] \right\}, \quad (3.1)$$

onde $\mathcal{E} = \mathcal{E}_x \hat{\mathbf{x}} + \mathcal{E}_y \hat{\mathbf{y}}$ e c representa a velocidade da luz no vácuo. Expressando $\mathcal{E}_x$ e $\mathcal{E}_y$ em termos de suas magnitudes $\mathcal{E}_x = \mathcal{E}_{x0} \exp(i\varphi_x)$ e $\mathcal{E}_y = \mathcal{E}_{y0} \exp(i\varphi_y)$, pode-se escrever:

$$\mathbf{E}_x(z, t) = \mathcal{E}_{x0} \cos(\omega t - kz + \varphi_x) \hat{\mathbf{x}}, \quad (3.2a)$$

$$\mathbf{E}_y(z, t) = \mathcal{E}_{y0} \cos(\omega t - kz + \varphi_y) \hat{\mathbf{y}}. \quad (3.2b)$$

onde φ_x e φ_y são as fases de cada componente do vetor, $\mathcal{E}_{x0}$ e $\mathcal{E}_{y0}$ são as respectivas amplitudes e z é a direção de propagação da onda.

Para descrever o estado de polarização da onda, determina-se o ponto final do vetor $\mathbf{E}(z, t)$ em cada posição z como função do tempo [37]. O caso mais geral, o qual pode ser utilizado para descrever os demais, é aquele em que a figura de projeção do vetor campo elétrico no plano perpendicular à direção de propagação (considerado aqui o plano (x, y)) é uma elipse.

3.1.1. Estados de Polarização

- **Polarização Elíptica:**

Considerando a diferença de fase relativa entre componentes do campo elétrico como sendo $\varphi = \varphi_x - \varphi_y$ [89, 37], tem-se que as suas componentes podem ser dadas por:

$$E_x(z, t) = \mathcal{E}_{x0} \cos(\omega t - kz + \varphi_x), \quad (3.3a)$$

$$E_y(z, t) = \mathcal{E}_{y0} \cos(\omega t - kz + \varphi_x - \varphi). \quad (3.3b)$$

As equações 3.3a e 3.3b são as equações paramétricas da elipse de polarização. Utilizando identidades trigonométricas, pode-se escrever a expressão:

$$\left(\frac{E_x}{\mathcal{E}_{x0}} \right)^2 + \left(\frac{E_y}{\mathcal{E}_{y0}} \right)^2 - 2 \left(\frac{E_x}{\mathcal{E}_{x0}} \right) \left(\frac{E_y}{\mathcal{E}_{y0}} \right) \cos \varphi = \sin^2 \varphi, \quad (3.4)$$

a qual representa a equação de uma elipse, na qual o eixo maior forma um ângulo relativo ao eixo x :

$$\Psi_E = \frac{1}{2} \tan^{-1} \left[\frac{2\mathcal{E}_{x0}\mathcal{E}_{y0} \cos \varphi}{\mathcal{E}_{x0}^2 - \mathcal{E}_{y0}^2} \right], \quad (3.5)$$

sendo o sentido de rotação dependente da diferença de fase φ . Caso $0 \leq \varphi \leq \pi$, o sentido considerado é o anti-horário, e caso $-\pi \leq \varphi \leq 0$, o sentido é o horário (Figura 3.1).

Figura 3.1: Projeções do campo elétrico no plano xy . (a) Sentido do campo para intervalo de fase $0 \leq \varphi \leq \pi$. (b) Sentido do campo para intervalo de fase $-\pi \leq \varphi \leq 0$.

- **Polarização Linear:**

O estado de polarização linear da luz pode ser obtido de duas formas: caso uma das componentes do vetor campo elétrico seja nula ou caso a diferença de fase entre essas seja nula. Para o primeiro caso (por exemplo, caso $\mathcal{E}_{y0} = 0$) e desconsiderando a dependência do vetor com a direção de propagação:

$$E_x(t) = \mathcal{E}_{x0} \cos(\omega t + \varphi_x), \quad (3.6a)$$

$$E_y(t) = 0. \quad (3.6b)$$

Neste caso o campo elétrico é representado por um segmento de reta no eixo x , o que caracteriza o estado linear de polarização da luz. Um resultado similar pode ser obtido caso a componente nula seja E_x . Neste caso, o campo elétrico no plano (x, y) será dado por um segmento de reta no eixo y .

Para o segundo caso, ou seja, para $\varphi = \varphi_x = \varphi_y$:

$$E_x(t) = \mathcal{E}_{x0} \cos(\omega t + \varphi), \quad (3.7a)$$

$$E_y(t) = \mathcal{E}_{y0} \cos(\omega t + \varphi). \quad (3.7b)$$

O que leva a:

$$E_y(t) = \frac{\mathcal{E}_{y0}}{\mathcal{E}_{x0}} E_x(t). \quad (3.8)$$

Ou seja, as componentes do campo são proporcionais entre si. A representação do vetor campo elétrico no eixo (x, y) será uma reta que passa pela origem e forma um ângulo com o eixo x dado por:

$$\Psi_L = \tan^{-1} \left(\frac{\mathcal{E}_{y0}}{\mathcal{E}_{x0}} \right). \quad (3.9)$$

Um resultado semelhante pode ser obtido se $\varphi_x = \varphi_y + \pi$, mas nesse caso, o ângulo formado com o eixo x será negativo.

- **Polarização Circular:**

Para o caso das componentes do vetor campo elétrico possuírem mesma amplitude ($\mathcal{E}_{x0} = \mathcal{E}_{y0} = \mathcal{E}_0$) e diferença de fase $\varphi = \varphi_x - \varphi_y = \pm\pi/2$. Tomando como exemplo $\varphi = \pi/2$, a partir das equações 3.3a e 3.3b:

$$E_x(t) = \mathcal{E}_0 \cos(\omega t + \varphi_x), \quad (3.10a)$$

$$E_y(t) = \mathcal{E}_0 \cos \left(\omega t + \varphi_x - \frac{\pi}{2} \right) = \mathcal{E}_0 \sin(\omega t + \varphi_x). \quad (3.10b)$$

Relacionando as equações 3.10a e 3.10b:

$$E(t) = \sqrt{E_x^2 + E_y^2} = \mathcal{E}_0, \quad (3.11a)$$

$$\Psi_c(t) = \tan^{-1} \left(\frac{E_y(t)}{E_x(t)} \right) = \tan^{-1} [\tan(\omega t + \varphi_x)] = \omega t + \varphi_x. \quad (3.11b)$$

A partir das equações 3.11a e 3.11b, é possível notar que o módulo do campo elétrico é constante em relação ao tempo, mas o ângulo que forma com o eixo x é variante com o tempo. Ou seja, quando $\varphi = \pi/2$, o vetor campo elétrico executa uma rotação em relação ao eixo x no sentido horário (luz polarizada circularmente à direita). Caso a diferença de fase seja de $\varphi = -\pi/2$:

$$\Psi_c(t) = -\omega t + \varphi_x, \quad (3.12)$$

O vetor campo elétrico executa uma rotação no sentido anti-horário em relação ao eixo x (luz circularmente polarizada à esquerda).

3.1.2. O Formalismo de Jones

Devido à natureza vetorial do campo elétrico, um tratamento vetorial é adequado para caracterizar o estado de polarização de uma onda eletromagnética. Os principais formalismos vetoriais desenvolvidos para representar o estado de polarização de uma onda são o de Stokes-Muller e o de Jones [90], sendo o primeiro baseado em análise por intensidade e o segundo utilizado para expressar o estado de polarização em termos da intensidade e fase.

Neste trabalho, foi utilizado o formalismo de Jones como base para descrição do estado de polarização dos campos de onda. Este permite descrever o estado de polarização de um material em termos do comportamento complexo (amplitude e fase) da onda que o atravessa [21], sendo adequado à técnica holográfica.

Considerando que as amplitudes complexas $\mathcal{E}_x = \mathcal{E}_{x0} \exp(i\varphi_x)$ e $\mathcal{E}_y = \mathcal{E}_{y0} \exp(i\varphi_y)$ caracterizam o campo elétrico da onda, Jones considerou que estas podem ser escritas em forma de uma matriz coluna a qual foi chamada de *Vetor de Jones*:

$$\mathbf{J} = \begin{bmatrix} \mathcal{E}_x \\ \mathcal{E}_y \end{bmatrix}. \quad (3.13)$$

O vetor de Jones pode ser utilizado para determinar a intensidade da onda, sua orientação e forma da elipse de polarização. Considerando que a diferença entre as fases é o fator que se espera obter nas técnicas holográficas, pode-se considerar somente essa diferença, dada por φ . Assim, o vetor de Jones pode ser reescrito como [38]:

$$\mathbf{J} = \begin{bmatrix} \mathcal{E}_{x0} \\ \mathcal{E}_{y0} e^{i\varphi} \end{bmatrix} = \mathcal{E}_{x0} \begin{bmatrix} 1 \\ \frac{\mathcal{E}_{y0}}{\mathcal{E}_{x0}} e^{i\varphi} \end{bmatrix}. \quad (3.14)$$

Como visto, a polarização elíptica representa o caso mais geral entre os estados de polarização, podendo ser utilizada para a determinação dos parâmetros de polarização de qualquer outro estado. Para determinar as características da elipse de polarização são determinados os ângulos χ e Ψ :

Figura 3.2: Elipse de polarização gerada pela projeção do campo elétrico no plano xy .

onde $\Psi = \tan^{-1} \left(\frac{\varepsilon_{y0}}{\varepsilon_{x0}} \right)$ representa a inclinação da elipse no sistema xy e χ o ângulo de elipsidade, o qual relaciona a diferença de fase entre as componentes do campo. Dessa forma, é possível caracterizar a elipse de polarização somente por seu ângulo de inclinação do vetor campo elétrico e pela diferença de fase entre suas componentes. Substituindo na equação 3.14 e normalizando as intensidades de modo a simplificar o desenvolvimento:

$$\mathcal{J} = \begin{bmatrix} 1 \\ \tan \Psi e^{i\varphi} \end{bmatrix}. \quad (3.15)$$

Alguns exemplos de vetores de Jones:

$$\mathcal{J} = \begin{bmatrix} \cos \theta \\ -\sin \theta \end{bmatrix} \quad \text{Polarização linear com direção } \theta \text{ em relação ao eixo } x.$$

$$\mathcal{J} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ -i \end{bmatrix} \quad \text{Polarização circular à esquerda.}$$

$$\mathcal{J} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ i \end{bmatrix} \quad \text{Polarização circular à direita.}$$

O vetor de Jones caracteriza o estado de polarização de uma onda, mas tão importante quanto caracterizar o estado de polarização, é caracterizar as alterações que esse sofre à medida que essa onda atravessa um dispositivo, como um polarizador ou uma lâmina retardadora. O formalismo de Jones propõe a representação desses dispositivos através de uma matriz M (matriz de Jones) que representa um operador linear no espaço de estados de polarização:

$$\mathbf{P}_f = M \mathbf{P}_{in}, \quad (3.16)$$

onde P_f representa o estado de polarização na saída do dispositivo e P_{in} o estado na entrada do dispositivo. Assim podemos determinar o estado de polarização da luz após atravessar um ou mais meios. O acoplamento entre os vetores de entrada e saída pode ser representado por:

$$\begin{bmatrix} P_{fx} \\ P_{fy} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a & b \\ c & d \end{bmatrix} \begin{bmatrix} P_{inx} \\ P_{iny} \end{bmatrix}, \quad (3.17)$$

Onde $M = \begin{bmatrix} a & b \\ c & d \end{bmatrix}$. Alguns exemplos de matrizes referentes a dispositivos ópticos são descritos a seguir [37]:

$$M = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Polarizador linear com eixo de transmissão ao longo do eixo x.

$$M = \begin{bmatrix} \cos^2 \theta & \sin \theta \cos \theta \\ \sin \theta \cos \theta & \sin^2 \theta \end{bmatrix}$$

Polarizador linear com eixo de transmissão ao longo da direção θ .

$$M = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & e^{i\Gamma} \end{bmatrix}$$

Lâmina retardadora (eixo rápido paralelo ao eixo x), a qual adiciona incremento de fase Γ ao componente y da onda incidente.

Para o caso da última matriz, quando $\Gamma = \pm \pi/2$, a lâmina retardadora é chamada de lâmina de quarto de onda e converte a luz linearmente polarizada incidente em uma onda circularmente polarizada, assim como pode executar a conversão inversa (circular em linear).

Quando $\Gamma = \pm \pi$, a lâmina é chamada de lâmina de meia onda e converte a onda linearmente polarizada em outra onda linearmente polarizada com seu plano de polarização rotacionado 90° . Este tipo de lâmina também permite transformar onda circularmente polarizada à direita em luz circularmente polarizada à esquerda e vice versa.

3.2. Interpretação dos Parâmetros de Polarização

Através da técnica de Microscopia Holográfica de Polarização, é possível obter a informação acerca do estado de polarização de uma amostra que apresenta certo grau de anisotropia óptica a partir das imagens de intensidade e fase reconstruídas de

hologramas digitais. A questão principal acerca dessa informação é como ela pode ser interpretada, ou seja, o que a alteração no estado de polarização da luz que atravessa um espécime anisotrópico permite revelar sobre sua estrutura, composição ou propriedades ópticas. Sabe-se [37] que os dois fenômenos principais relacionados com a modificação do estado de polarização da luz que interage com um material são: o dicroísmo e a birrefringência. Estes fenômenos serão abordados nessa seção de forma a permitir uma interpretação dos resultados obtidos com a técnica de MHP.

3.2.1. Birrefringência

A birrefringência pode ser definida como o processo de dupla refração da luz ao passar por um material molecularmente ordenado e se manifesta pela existência de diferenças no índice de refração dependentes do estado de polarização da onda que atravessa esse material.

Por se tratar de um efeito óptico, as leis do eletromagnetismo são utilizadas para a devida interpretação matemática desse efeito. A partir do estudo dessas leis, foi determinado que a velocidade v de uma onda eletromagnética, pode ser dada por [91]:

$$v = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}}, \quad (3.17)$$

onde ϵ é a permissividade elétrica e μ a permeabilidade magnética do meio. A relação do índice de refração do meio (n) com a velocidade da onda eletromagnética que o atravessa é dada por $v = c/n$, onde c representa a velocidade da onda no vácuo. Assim:

$$\frac{c}{n} = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}}. \quad (3.18)$$

Como a velocidade da luz no vácuo está relacionada com a permissividade elétrica e com a permeabilidade magnética no vácuo através da relação $c = 1/\sqrt{\epsilon_0\mu_0}$ [91], a equação 3.18 pode ser dada por:

$$n = \sqrt{\frac{\epsilon\mu}{\epsilon_0\mu_0}}. \quad (3.19)$$

Considerando que para a maioria dos meios $\mu = \mu_0$, podemos reescrever a equação acima como:

$$n = \sqrt{\epsilon_r}, \quad (3.20)$$

onde ϵ_r é permissividade relativa do meio ou constante dielétrica. Ou seja, o índice de refração experimentado por uma onda eletromagnética ao atravessar um material está diretamente relacionado com a interação dessa onda com os vetores de campo elétrico desse material. Como a velocidade da onda está diretamente relacionada com o índice de refração do meio, pode-se afirmar que a velocidade da onda também se relaciona com a estrutura do meio.

O fenômeno de dupla refração refere-se à interação da luz com o meio anisotrópico por onde essa se propaga: quando uma onda incide em um meio anisotrópico, como um cristal de quartzo, por exemplo, esta pode ser refratada gerando dois raios polarizados em direções ortogonais e viajando a diferentes velocidades. Um desses raios obedece às leis tradicionais da refração e viaja com a mesma velocidade em toda a extensão do cristal, sendo chamado de *raio ordinário*. O segundo raio atravessa o cristal com uma velocidade dependente da sua direção de propagação pelo cristal e é denominado *raio extraordinário*. Portanto, cada raio que incide no material anisotrópico é dividido em um raio ordinário e outro extraordinário, estando estes linearmente polarizados em direções de vibração de campo elétrico perpendiculares entre si [89].

Como dito, o fenômeno de dupla refração está diretamente relacionado com a direção de propagação da onda dentro, mas é importante ressaltar que a direção de propagação a qual esta afirmação se refere está relacionada com o eixo óptico do material (Figura 3.33). Se os feixes de luz incidirem de forma perpendicular ao eixo óptico do material, os feixes gerados não serão diferentemente refratados, ou seja, seguirão trajetórias equivalentes, mas apresentarão uma diferença de fase, como é mostrado na Figura 3.33b. Caso os feixes de luz incidam de forma oblíqua ao eixo óptico, os feixes serão duplamente refratados e possuirão fases diferentes (Figura 3.33a). O último caso refere-se à incidência dos feixes de luz de forma paralela ao eixo óptico do material: neste caso, os feixes seguem trajetórias equivalentes e não sofrem desvio em suas fases (Figura 3.33c).

Figura 3.3: Demonstração do fenômeno de Dupla-Refração em um cristal anisotrópico. A seta preta indica a direção do eixo óptico do cristal.

A birrefringência consiste, por fim, na variação do índice de refração dependente da direção de propagação da luz incidente em um material geometricamente ordenado com relação a seu eixo óptico e pode ser matematicamente expressa como:

$$B = |n_e - n_o|, \quad (3.21)$$

onde n_e representa o índice de refração extraordinário e n_o representa o índice de refração ordinário. A birrefringência pode ser natural ou induzida como, por exemplo, por aplicação de tensão (foto elasticidade) ou induzida por fluxo.

Como a fase da onda que atravessa um material de espessura $e(x, y)$ pode ser dada pela equação 2.2, pode-se considerar que para cada índice de refração experimentado pela onda, uma diferença mudança de fase ocorrerá. Para o índice extraordinário $\varphi_e(x, y) = 2\pi \cdot e(x, y) \cdot n_e/\lambda$ e para o ordinário $\varphi_o(x, y) = 2\pi \cdot e(x, y) \cdot n_o/\lambda$. Portanto:

$$\Delta\varphi(x, y) = \frac{2\pi \cdot e(x, y)}{\lambda} \cdot |n_e - n_o|. \quad (3.22)$$

Ou seja, através da medida da diferença de fase entre os componentes ortogonais da onda transmitida por um material anisotrópico, é possível determinar a birrefringência desse material.

3.2.2. Dicroísmo

O dicroísmo linear refere-se ao fenômeno de interação entre radiação linearmente polarizada e espécies químicas. Esta se baseia na probabilidade de induzir uma transição eletrônica com radiação eletromagnética. Essa probabilidade é proporcional ao

quadrado do cosseno do ângulo entre o momento de dipolo de transição e a direção de polarização da radiação. Ou seja, se uma radiação linearmente polarizada é aplicada, a probabilidade de uma transição ocorrer é máxima quando o momento de dipolo correspondente é paralelo à direção de polarização, enquanto é nula quando é perpendicular [92].

Para que seja possível observar o efeito, as moléculas da amostra analisada devem estar orientadas (todas ou em parte) ao longo de certa direção. Isso pode acontecer em cristais, polímeros, filmes finos, géis e cristais líquidos. Um exemplo típico de material que apresenta esse tipo de anisotropia é o Polaroid onde a componente do vetor campo elétrico da onda incidente paralela ao eixo óptico do material é fortemente absorvida, enquanto a componente perpendicular é transmitida [38].

Alguns materiais são naturalmente dicroicos devido a sua estrutura cristalina, como a turmalina, e outros podem se tornar se algum alinhamento for induzido em sua estrutura. Podem ser considerados o dicroísmo linear (diferença entre a absorção para ondas incidentes linearmente polarizadas) e o dicroísmo circular (diferença de absorção para ondas circularmente polarizadas).

Uma forma de medir esse efeito é através da diferença entre as absorbâncias da amostra como, por exemplo, para o caso do dicroísmo linear (DL): $A_{\parallel} - A_{\perp}$, onde $A_{\parallel}$ representa a absorbância de um material para uma onda incidente polarizada paralelamente a um eixo determinado e $A_{\perp}$ representa a absorbância para a onda polarizada perpendicularmente a esse eixo. Uma das técnicas que permite medir essa diferença é a Espectroscopia de Dicroísmo Linear. O espectro de dicroísmo linear é um diagrama que reporta a diferença entre a absorção da radiação com polarização paralela e a radiação com polarização perpendicular em relação à orientação preferencial das moléculas, como função do comprimento de onda.

Um fator importante é o fato de a absorbância estar diretamente relacionada com a intensidade da onda transmitida pelo material [27]:

$$A = \log \left(\frac{I_2}{I_1} \right), \quad (3.22)$$

onde I_2 é a intensidade total da onda transmitida pelo material e I_1 é a intensidade da onda incidente nesse. Dessa forma, o dicroísmo pode ser representado também pela

diferença entre as intensidades transmitidas por ondas incidentes ortogonalmente polarizadas:

$$I_D = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} = \frac{10^{-A_{\parallel}} - 10^{-A_{\perp}}}{10^{-A_{\parallel}} + 10^{-A_{\perp}}} = \tanh \left[\frac{2,303}{2} (A_{\perp} - A_{\parallel}) \right] \cong \frac{2,303}{2} (A_{\perp} - A_{\parallel}), \quad (3.23a)$$

$$DL \propto \left(\frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \right), \quad (3.23b)$$

para o caso do dicroísmo linear (DL). Para a expressão que representa o dicroísmo circular, $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$ são substituídos por I_d e I_e , ou seja, intensidades da onda transmitida circularmente polarizada à direita e à esquerda, respectivamente.

3.3. Imagens de Polarização

Existem diversas técnicas utilizadas para medir qualitativamente ou quantitativamente a anisotropia interna ou a tensão aplicada a materiais birrefringentes e dicroicos. Algumas dessas técnicas, como a microscopia de luz polarizada [93] e a microscopia diferencial de polarização [27] permitem a análise do estado de polarização de materiais através da análise das imagens de intensidade da onda transmitida por esses materiais. Outros métodos podem ser citados, como a tomografia de coerência óptica (OCT) [94], polarimetria por deslocamento de fase [95], entre outros. Essas técnicas geralmente exigem a captura de diversas imagens para obter os parâmetros de polarização das amostras, muitas vezes capturadas após a rotação de componentes como polarizadores ou lâminas retardadoras, tornando a medida suscetível a erros.

Baseado no esquema proposto por Lohmann [96], Oka e Ohtsuka [97] propuseram um polarímetro interferométrico com dois feixes referência ortogonalmente polarizados. Outros trabalhos surgiram, destacando-se aqueles realizados por Beghuin [98] e Colomb *et al* [90] [99], os quais utilizaram holografia digital como técnica de determinação do estado de polarização. Wang *et al.* [21] propôs uma dupla captura de imagens, mas através de um dispositivo automático que permitia a alteração da direção de polarização dos feixes referência.

As vantagens da holografia digital neste tipo de medida são o esquema de captura sem necessidade de rotacionar componentes, a captura de uma única imagem e a adaptabilidade a objetos tridimensionais por conta do enfoque numérico [100]. A partir de um único holograma, é possível reconstruir quatro imagens, sendo duas de

amplitude e duas de fase para cada feixe referência. A ideia básica consiste de produzir um holograma a partir da interferência entre um feixe objeto e dois feixes referência perpendicularmente polarizados e realizar a reconstrução de forma numérica, como é realizada na holografia digital tradicional. Este método permite a revelar características das estruturas internas de sistemas anisotrópicos sem necessidade de agentes corantes, fixadores, sem exigir preparações complexas e de modo não destrutivo.

3.4. MHP: princípio de funcionamento

3.4.1. Gravação dos hologramas de polarização

A configuração experimental para a gravação dos hologramas digitais de polarização está mostrada na Figura 3.44. É um Microscópio Holográfico de Polarização (MHP) para o estudo do dicroísmo linear e birrefringência de amostras transparentes.

Figura 3.4: Diagrama esquemático de um Microscópio Holográfico de Polarização. A simbologia utilizada na imagem é descrita no texto.

A montagem experimental é composta por dois interferômetros de Mach-Zehnder, os quais geram dois feixes referência E_{R1} e E_{R2} com direções ortogonais de polarização (a 0° e a 90° do eixo x , respectivamente), os quais interferem no plano da CCD com uma onda objeto E_o em uma geometria fora de eixo. Essa geometria é importante, pois permite a separação das ordens de difração de cada padrão interferométrico no momento da reconstrução numérica.

Para amostras que apresentam algum tipo de anisotropia óptica, o estado de polarização do campo elétrico E_o transmitido pela amostra é diferente do estado de

polarização do campo elétrico incidente E_{oin} nesta. Para estudos de dicroísmo linear e birrefringência, o polarizador **P1** impõe uma polarização de 45° em relação às polarizações das ondas referência à frente de onda E_{oin} que ilumina o objeto **OBJ**.

A polarização linear do feixe que passa pelo objeto é utilizada para análise das diferenças de fase entre as componentes ortogonais da onda objeto. Quando o objetivo é analisar as diferenças de intensidade, o alinhamento da estrutura analisada em relação ao eixo de polarização da onda incidente pode alterar o resultado. Dessa forma, é necessário utilizar luz circularmente polarizada. Para garantir essa condição, uma lâmina de quarto de onda ($\lambda/4$) é utilizada após o polarizador **P1**. As duas ondas referências com polarizações ortogonais são transmitidas através dos polarizadores **P2** e **P3**. As duas ondas referência são direcionadas pelo divisor de feixes **DF4** à superfície da câmera **CCD**. A luz transmitida pelo objeto é ampliada pela lente objetiva de microscópio **MO** produzindo uma onda objeto E_o com componentes ortogonais E_{oh} e E_{ov} . A interferência entre as ondas objeto e referência produz o holograma de polarização, o qual apresenta um padrão misto de franjas de interferência, como o mostrado na Figura 3.5.

Figura 3.5: Exemplo de holograma digital de polarização. Uma parte do holograma (destacada pelo quadrado vermelho) foi ampliada para melhor visualização do padrão de franjas formado.

Com os hologramas de polarização reconstruídos, o estado de polarização da onda objeto E_o pode ser calculado, permitindo a análise quantitativa do dicroísmo e da birrefringência através das imagens reconstruídas.

3.4.2. Formação do holograma de polarização.

A distribuição de intensidade do holograma é descrita pela interferência entre $\mathbf{E}_o$, $\mathbf{E}_{R1}$ e $\mathbf{E}_{R2}$. A partir do formalismo de Jones, sabe-se que a onda objeto $\mathbf{E}_o$ pode ser definida por uma superposição de dois campos $\mathbf{E}_{oh}$ e $\mathbf{E}_{ov}$ os quais possuem a mesma frequência e o mesmo vetor de onda $\boldsymbol{\kappa}$ ao longo da direção z , mas com planos de vibração ortogonais:

$$\mathbf{E}_o = \begin{pmatrix} E_{oh} \\ E_{ov} \\ 0 \end{pmatrix} \exp[i(k_o \hat{l} + \phi_o - \omega t)] = \begin{pmatrix} |E_o| \exp(i\phi_o) \\ |E_o| \exp(i\phi_o + \Delta\phi_o) \\ 0 \end{pmatrix} \exp[i(k_o \hat{l} - \omega t)] \quad (3.24)$$

onde $\hat{l} = (x, y)$ é o vetor posição no plano da CCD, ϕ_o é o atraso de fase introduzido pelo objeto experimentado onda horizontalmente polarizada e $\Delta\phi_o$ é a diferença de fase entre os componentes ortogonais da onda objeto.

Similarmente, as ondas referências podem ser descritas pelas relações:

$$\mathbf{E}_{R1} = \begin{pmatrix} E_{R1} \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \exp[i(k_1 \hat{l} - \omega t)], \quad (3.25a)$$

$$\mathbf{E}_{R2} = \begin{pmatrix} E_{R2} \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \exp[i(k_2 \hat{l} - \omega t)], \quad (3.25b)$$

onde k_o , k_1 e k_2 são os vetores de onda:

$$\mathbf{k}_0 = \frac{2\pi}{\lambda} \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix}, \mathbf{k}_1 = \frac{2\pi}{\lambda} \begin{pmatrix} 0 \\ \sin\vartheta_1 \\ \cos\vartheta_1 \end{pmatrix}, \mathbf{k}_2 = \frac{2\pi}{\lambda} \begin{pmatrix} -\sin\vartheta_2 \\ 0 \\ \cos\vartheta_2 \end{pmatrix}. \quad (3.26)$$

Nestas expressões, ϑ_1 e ϑ_2 representam os ângulos de desvio dos feixes referência em relação ao feixe objeto. Na saída do interferômetro, a interferência entre $\mathbf{E}_o$, $\mathbf{E}_{R1}$ e $\mathbf{E}_{R2}$ gera uma distribuição de intensidade do holograma digital, expressada pela equação:

$$\begin{aligned} h_{pol}(x, y) &= (\mathbf{E}_{R1} + \mathbf{E}_{R2} + \mathbf{E}_o)(\mathbf{E}_{R1} + \mathbf{E}_{R2} + \mathbf{E}_o)^* \\ &= |\mathbf{E}_{R1}|^2 + |\mathbf{E}_{R2}|^2 + |\mathbf{E}_o|^2 + \mathbf{E}_{R1}\mathbf{E}_o^* + \mathbf{E}_{R2}\mathbf{E}_o^* + \mathbf{E}_{R1}^*\mathbf{E}_o + \mathbf{E}_{R2}^*\mathbf{E}_o. \end{aligned} \quad (3.27)$$

Os primeiros três termos na equação 3.27 formam a ordem zero de difração, o quarto e o quinto termo produzem duas imagens reais, correspondentes à componente vertical do vetor de Jones. Os dois últimos termos produzem as imagens virtuais. Como $\mathbf{E}_{R1}$ e $\mathbf{E}_{R2}$ possuem polarizações ortogonais, estes não interferem ($\mathbf{E}_{R1}\mathbf{E}_{R2}^* = \mathbf{E}_{R1}^*\mathbf{E}_{R2}$).

3.4.3. Reconstrução dos Hogramas de Polarização.

A reconstrução numérica é realizada com uso do método do Espectro Angular descrito na seção 2.33 do Capítulo 2.

Aplicando dois filtros espaciais no espectro do holograma de polarização, as componentes das frequências espaciais da imagem virtual são selecionadas. Um exemplo de como esse filtro é aplicado pode ser mostrado na Figura 3.6:

Figura 3.6: Imagem de intensidade obtida em processo de reconstrução numérica do holograma apresentado na Figura 3.5. $E_{R1}^* E_o$ e $E_{R2}^* E_o$ são as imagens virtuais correspondentes aos estados de polarização horizontal e vertical, respectivamente. A posição desses dois termos é fixada pela geometria fora de eixo.

Calculando a Transformada inversa de Fourier das componentes selecionadas, os dois hologramas complexos filtrados, $h_h^f(x, y) = E_{R1}^* E_o$ e $h_v^f(x, y) = E_{R2}^* E_o$ podem ser obtidos, correspondendo, respectivamente, às componentes horizontal e vertical do vetor de Jones. Aplicando o método numérico de reconstrução aos hologramas h_h^f e h_v^f , as distribuições de amplitudes complexas $\psi_h(\xi, \eta)$ e $\psi_v(\xi, \eta)$ no plano de reconstrução podem ser obtidas:

$$\psi_h(\xi, \eta) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \mathcal{F} \{ h_h^f(x, y) \} \exp \left(d \frac{i2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2} \right) \right\} \quad (3.28a)$$

$$\psi_v(\xi, \eta) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \mathcal{F} \{ h_v^f(x, y) \} \exp \left(d \frac{i2\pi}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2} \right) \right\} \quad (3.28b)$$

Os campos $\psi_h(\xi, \eta)$ e $\psi_v(\xi, \eta)$ correspondem às componentes ortogonais da onda objeto (E_{oh} e E_{ov}) respectivamente, podendo ser representados por:

$$\psi_h(\xi, \eta) = \left(I_{R1}(\xi, \eta) I_{oh}(\xi, \eta) \exp(i[\phi_h(\xi, \eta) - \phi_{R1}(\xi, \eta)]) \right) \quad (3.29)$$

e

$$\psi_v(\xi, \eta) = \begin{pmatrix} 0 \\ I_{R2}(\xi, \eta) I_{ov}(\xi, \eta) \exp(i[\phi_v(\xi, \eta) - \phi_{R2}(\xi, \eta)]) \end{pmatrix}. \quad (3.30)$$

onde I_{R1} e I_{R2} são as intensidades das ondas referência; I_{ov} e I_{oh} são as intensidades das componentes ortogonais do feixe objeto E_o .

Na técnica holográfica de análise de polarização, não é necessário realizar procedimentos de compensação de curvatura de fase (curvatura introduzida pela lente objetiva), pois a análise da fase é feita pela diferença entre as fases das componentes ortogonais da onda transmitida pelo objeto. Como cada componente apresenta a mesma aberração, no momento da subtração dessas fases, a aberração é eliminada.

3.4.4. Determinação dos Parâmetros de Polarização

Igualando as intensidades dos feixes referência $I_{R1}(\xi, \eta) = I_{R2}(\xi, \eta)$, (isso é possível se forem ajustadas as posições das lâminas de meia onda ($\lambda/2$ na Figura 3.44), a razão de amplitude β é calculada como:

$$\beta = \tan[\varepsilon(\xi, \eta)] = \frac{I_{oh}(\xi, \eta)}{I_{ov}(\xi, \eta)} = \frac{|\psi_h(\xi, \eta)|}{|\psi_v(\xi, \eta)|}. \quad (3.31)$$

Também, a diferença de fase $\Delta\phi(\xi, \eta)$ entre as componentes ortogonais do feixe objeto pode ser calculada por:

$$\begin{aligned} \Delta\phi(\xi, \eta) &= \arg[\psi_h(\xi, \eta)] - \arg[\psi_v(\xi, \eta)] \\ &= \phi_h - \phi_v + \Delta\phi_R, \end{aligned} \quad (3.32)$$

onde $\Delta\phi_R$ representa a diferença de fase entre as duas ondas de referência. Experimentalmente, esse termo é dependente do tempo por conta de vibrações externas e correntes de ar no ambiente, mas esse pode ser suprimido na imagem de contraste de fase por uma diferença de fase compensatória $-\Delta\phi_R$ (o método para obter essa compensação é descrito no próximo capítulo como método de calibração da técnica de MHP).

O valor corrigido da diferença de fase $\Delta\phi_C(x', y')$ é obtido a partir de:

$$\Delta\phi_C(x', y') = \Delta\phi(x', y') - \Delta\phi_R. \quad (3.33)$$

Se os parâmetros β e $\Delta\phi$ são medidos experimentalmente, então a modificação do estado de polarização da onda transmitida pelo espécime revela sua estrutura,

composição e propriedades ópticas, podendo, então, serem medidos e detectados o dicroísmo e a birrefringência do espécime.

3.5. Método alternativo para Análise do Estado de Polarização

A análise espectral de microssistemas é uma ferramenta importante em diversas áreas. Para partículas maiores que o comprimento de onda e com valores de índice de refração diferentes do meio no qual estas estão imersas, a luz que estas espalham pode ser modelada pela Teoria de Difração de Fraunhofer. O padrão de difração carrega informações acerca das propriedades estruturais e morfológicas de microssistemas [101].

Perez e colaboradores demonstraram [102] que o padrão de difração obtido no processo de reconstrução numérica de hologramas digitais pode ser utilizado para extrair informações quantitativas acerca de micro-objetos, como o diâmetro médio de uma amostra de células sanguíneas, assim como era possível quantificá-las. As dimensões lineares reais de estruturas também podem ser relacionadas com as dimensões correspondentes em seu espectro. No interesse de associar as possibilidades da técnica de MHP à análise do padrão de difração de microssistemas, um novo método de análise do estado de polarização de estruturas alongadas é apresentado neste trabalho. Diferentemente dos métodos tradicionais, o dicroísmo linear de um sistema anisotrópico pode ser medido a partir de uma varredura executada sobre o padrão de difração de Fraunhofer do campo difratado pelo objeto. São traçadas curvas resultantes da varredura radial sobre o padrão, as quais caracterizam as diferenças em termos de transmitância entre as componentes ortogonais desse campo. O método converte a análise bidimensional em unidimensional tornando o processo simplificado.

3.5.1. Padrão de Difração de Fraunhofer

É possível, a partir do processo de reconstrução numérica de um holograma, obter o padrão de difração de Fraunhofer de um campo complexo difratado por um objeto, como apresentado na seção 2.3.5. do Capítulo 2. A distribuição de campo no plano focal da lente é dada pela equação 2.42, mas esta também apresenta o termo de fase quadrático introduzido pela lente objetiva. O campo calculado no plano focal pode ser multiplicado

pelo fator de correção apresentado na equação 2.43 e a intensidade do campo resultante representa o Padrão de Difração de Fraunhofer:

$$I_{PDF}(u, v) = |U_f(u, v)S(u, v)|^2. \quad (3.34)$$

A Figura 3.7 apresenta um exemplo de padrão de difração de Fraunhofer obtido a partir do holograma de um padrão de calibração para microscopia óptica. Como previsto, a imagem apresenta um padrão de interferência com máximo em seu centro.

Figura 3.7: Exemplo de padrão de difração de Fraunhofer (b) obtido a partir de um holograma (a) de uma grade de calibração (aumento de 20x).

3.5.2. Varredura Radial sobre o padrão

A distribuição de intensidade radial $I_r(r)$ é dada pela média das intensidades de cada ponto ao longo do raio da circunferência que limita o padrão. Para cada ângulo dessa circunferência, um valor de $I_r(r)$ é calculado, resultando em uma curva que está relacionada com a transmitância do objeto para cada direção deste. A operação matemática que permite calcular $I_r(r)$ pode ser expressa por (algoritmo utilizado para realizar a varredura é apresentado no Anexo A):

$$\bar{I}_r(r, \rho) = \frac{\sum_{\rho} I(C_x(r, \rho), C_y(r, \rho), d=f)}{r}, \quad (3.34)$$

onde $C_x(r, \rho) = \frac{N}{2} + r \cos \rho$, $C_y(r, \rho) = \frac{M}{2} - r \sin \rho$, considerando $0^\circ < \rho \leq 360^\circ$.

Quando o padrão de difração de Fraunhofer é calculado a partir da reconstrução de um holograma de polarização, duas componentes virtuais são obtidas: uma referente a cada componente ortogonal do campo transmitido pelo objeto. Cada componente carrega informações acerca da transmitância do objeto quando este apresenta anisotropia óptica de absorção (dicroísmo). A construção da curva que relaciona a

intensidade transmitida com a direção da estrutura alongada permite comparar e quantificar o dicroísmo da estrutura.

Capítulo 4

Metodologia Experimental

Neste capítulo, a metodologia experimental do trabalho é apresentada de forma a descrever as etapas de instrumentação e realização das análises, além da descrição dos materiais utilizados para a obtenção dos resultados. São demonstrados os métodos de aquisição das imagens, a descrição dos aparatos experimentais de cada método desenvolvido, assim como o processo de calibração destes métodos. Numa primeira etapa, é apresentada a metodologia de aquisição de imagens através da técnica de Microscopia Holográfica Digital para estudo da influência do processo de fixação em amostras de células sanguíneas. Em uma segunda etapa, a metodologia utilizada para a técnica de Microscopia Holográfica de Polarização é descrita, assim como é realizada a descrição de um método alternativo para detecção do dicroísmo em amostras que apresentam esse tipo de anisotropia óptica.

4.1. Aparato Experimental

O aparato experimental foi projetado de forma a apresentar uma versatilidade que tornasse possível utilizá-lo tanto para obtenção de imagens por Microscopia Holográfica Digital (MHD) como por Microscopia Holográfica de Polarização (MHP). O esquema do arranjo completo é mostrado na Figura 4.1. Este foi montado sobre uma mesa óptica com sistema pneumático de estabilização de vibrações. Sobre a mesa, os componentes foram posicionados de forma a se manter um perfeito alinhamento do sistema. Foram utilizadas duas fontes de luz: um Laser de Estado Sólido (Excelsior Diode-Pumped Solid State Laser - Newport) de comprimento de onda 532 nm e 150 mW de potência. Um

filtro espacial (FE) foi utilizado de forma a filtrar o feixe, eliminando imperfeições e uma colimadora associada permitiu a obtenção de uma frente de onda quase plana³. Como componentes, foram utilizados quatro divisores de feixes (DF1, DF2, DF3 e DF4) 50/50 não polarizantes, quatro espelhos planos dielétricos (E1, E2, E3 e E4), três polarizadores lineares (P1, P2 e P3), duas lâminas retardadoras de meia onda ($\lambda/2$), duas lâminas retardadoras quarto de onda ($\lambda/4$) e componentes mecânicos diversos de suporte e posicionamento. Lentes objetivas (MO) com aumentos de 10x, 20x e 40x foram utilizadas para ampliação da onda transmitida pelo objeto (OBJ). Uma condensadora (CO) posicionada antes do objeto completa o sistema. Para registro das imagens foi utilizada uma câmera CCD *Imaging Source* BMK41BU02.H com 1280 x 960 pixels de tamanho $4,65 \mu\text{m}$ cada, e os dados capturados foram transmitidos ao computador por meio de uma interface USB 2.0. Portanto, o holograma digital $I_H(i,j)$ resultante da gravação por este sensor (equação 2.4) é uma matriz de $M \times N = 1280 \times 960$ codificada em 8-bits.

Figura 4.1: Diagrama esquemático do aparato experimental desenvolvido neste trabalho. Trata-se de um Microscópio Holográfico Digital associado a um Microscópio Holográfico de Polarização. Em um mesmo sistema, é possível obter informações acerca da intensidade, fase e estado de polarização do campo transmitido por um objeto.

O aparato descrito na Figura 4.1 é um protótipo de Microscópio Holográfico Digital baseado em um interferômetro Mach-Zehnder. Primeiramente foi realizado o processo de posicionamento dos componentes e alinhamento do equipamento e

³ O conceito de onda plana pode ser equivocado nestes termos, pois, na prática, não existe onda perfeitamente plana. Portanto, considera-se que a onda em questão é aproximadamente plana.

posterior calibração do sistema. A Figura 4.2 mostra a foto do aparato utilizado neste trabalho.

Figura 4.2: Foto referente ao aparato experimental utilizado neste trabalho. O esquema da Figura 4.1 descreve a disposição dos componentes.

4.2. Calibração do Sistema

No protótipo desenvolvido, a lente objetiva foi posicionada de forma a se manter uma distância fixa da câmera CCD e o tamanho real da amostra a ser analisada pôde ser determinado através da relação entre um retículo micrométrico de dimensão conhecida e o tamanho em pixels da imagem obtida do retículo, como mostra a figura 4.2. Assim, as reais dimensões laterais das amostras puderam ser obtidas por processamento digital de imagens via Matlab® (versão 2009).

Na imagem do retículo (Figura 4.2) é possível notar divisões correspondentes a 10 μm . A medida da relação entre o número de pixels correspondentes ao intervalo entre as divisões e permite a realização da calibração lateral dos eixos do sistema de coordenadas. Para cada aumento utilizado para análise, uma nova calibração teve que ser realizada. Como exemplo, as figuras 4.3a e 4.3b mostram a calibração referente aos aumentos de 20x e 40x.

Figura 4.3: Imagem do retículo utilizado para calibração. Em (a) a imagem está ampliada 20 vezes e em (b) 40 vezes.

Outro método utilizado para a calibração do sistema foi determinar mapas de fase de uma figura conhecida e comparar os resultados com aqueles obtidos por uma técnica tradicional desse mesmo objeto. O objetivo desta etapa é verificar se os resultados obtidos através do arranjo correspondem às informações reais do objeto analisado. Uma rede de difração composta por elementos hexagonais gentilmente fornecida pelo Laboratório de Filmes Finos (LFF) do Instituto de Física da Universidade de São Paulo foi utilizada para este fim. Este objeto consiste de uma rede periódica com elementos de altura $2\ \mu\text{m}$ e índice de refração 1.4225 para a faixa do vermelho (632,8 nm). A Figura 4.4 mostra a imagem do arranjo periódico obtida através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A Figura 4.5 mostra a imagem de fase deste mesmo objeto obtida através de Microscopia Holográfica Digital utilizando o arranjo proposto neste trabalho. Esta imagem foi processada de forma a se corrigir a curvatura de fase introduzida pela objetiva e a inclinação gerada pelo processo de *unwrapping*.

Figura 4.4: Imagem de MEV obtida a partir de uma rede de difração utilizada como padrão de calibração do sistema desenvolvido. Esta é formada por um arranjo periódico de hexágonos de altura $2\ \mu\text{m}$ e índice de refração 1.4225. Objeto e imagem cedidos pelo LFF - IFUSP.

Figura 4.5: Imagem de contraste de fase obtida por MHD utilizando o arranjo desenvolvido neste trabalho (ampliação de 40x). A calibração das dimensões laterais foi realizada utilizando o método de equiparação do número de pixels com as dimensões reais de um padrão conhecido.

A Figura 4.6a mostra as dimensões da rede hexagonal. A Figura 4.6b mostra uma imagem de fase e o resultado obtido através do processo de calibração lateral do aparato experimental de MHD utilizado neste trabalho. A Figura 4.7 mostra o perfil da rede de difração, sendo este resultado da calibração axial, a qual é realizada através da determinação da relação entre índice de refração, comprimento de onda e fase da frente de onda transmitida pelo objeto (equação 2.2).

Figura 4.6: Comparação da dimensão de uma das estruturas hexagonais da rede. Em (a) a imagem de MEV mostra a dimensão como sendo 9,70 μm. Em (b) tem-se o mapa de fase correspondente. Neste, a linha vermelha mede a distância entre dois lados de um dos hexágonos e um valor praticamente igual ao obtido pela técnica padrão foi obtido, demonstrando a confiabilidade do processo de calibração das imagens.

Figura 4.7: Perfil lateral de uma região do mapa de fase da figura 4.5. Em destaque, a altura de uma das estruturas hexagonais obtida através da equação 2.2. A altura mostrada na figura é de $2 \mu m$, valor compatível com o valor obtido por meio de outras técnicas.

A calibração do aparato utilizando dois feixes referência foi necessária, pois se tornou necessário conhecer os erros introduzidos no sistema. A principal informação obtida através do sistema MHP refere-se à diferença de fase entre cada componente ortogonal da onda transmitida pelo objeto. Essa diferença de fase foi dada no capítulo 3, através da equação 3.34. Nesta equação, o termo $\Delta\phi_C(x',y')$ representa a diferença de fase corrigida, $\Delta\phi_R$ a diferença de fase entre os feixes referência e $\Delta\phi(x',y')$ representa a diferença de fase calculada. O termo $\Delta\phi_R$ é pelo resultado entre todos os processos que podem interferir no estado de polarização dos feixes referência, como fluxo de ar, vibrações, variações de temperatura, entre outros.

Como teste, foi realizada a captura em sequência de diversos hologramas de uma lâmina de vidro de microscopia. Como resultado, já que a amostra permaneceu a mesma e não apresenta birrefringência ou dicroísmo, esperava-se encontrar sempre a mesma diferença de fase (aproximadamente zero) entre os componentes ortogonais da onda transmitida pelo objeto. No entanto, diferentes valores de diferença de fase foram obtidos ao longo do processo, o que comprovou a influência dos fatores externos nos resultados, como fluxo de ar, vibrações, variações de temperatura, entre outros. Como solução para o problema, foi necessário capturar imagens onde deveria haver, tanto a amostra a ser analisada, como uma região sem amostra, tomada como referência.

Como forma de avaliar a confiabilidade dos resultados, foi utilizada como amostra uma lâmina de quarto de onda. Esse tipo de componente apresenta birrefringência e é produzido de forma a gerar uma diferença de fase de $\pi / 2 rad$

quando orientada a 45° da direção de polarização do campo incidente. Ao variar essa orientação, valores intermediários de diferença de fase são introduzidos no campo de onda que atravessa a lâmina.

Primeiramente, foi realizada a dedução do vetor de Jones ($\mathbf{E}_{OT}$) referente à onda transmitida por uma lâmina de quarto de onda orientada a δ° em relação à direção de polarização (tomada como 0° em relação ao eixo x) da onda incidente na lâmina:

$$\mathbf{E}_{OT} = \begin{bmatrix} E_{OTv} \\ E_{OTh} \end{bmatrix} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 + i(\cos 2\delta + \sin 2\delta) \\ 1 - i(\cos 2\delta - \sin 2\delta) \end{bmatrix}. \quad (4.1)$$

Na equação acima, E_{OTv} e E_{OTh} representam os componentes vertical e horizontal da onda transmitida pela lâmina. Como segundo passo, foi necessário determinar a relação teórica entre a diferença de fase entre esses componentes e a direção δ da lâmina. O desenvolvimento dessa relação é dado a seguir:

Analisando o vetor de Jones da onda transmitida pela lâmina:

$$\begin{bmatrix} E_{OTv}(x', y') \\ E_{OTh}(x', y') \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_{OTv}(x', y') e^{i\varphi_v(x', y')} \\ \varepsilon_{OTv}(x', y') e^{i\varphi_h(x', y')} \end{bmatrix} = \varepsilon_{OTv} e^{i\varphi_v(x', y')} \begin{bmatrix} 1 \\ e^{i\Delta\varphi(x', y')} \end{bmatrix}. \quad (4.2)$$

Nessa dedução, as coordenadas dos planos foram suprimidas de forma a simplificar a demonstração. Multiplicando os componentes 1 e $e^{i\Delta\varphi}$, normalizando o vetor, e utilizando a equação 4.1, teremos:

$$\frac{1}{2} [1 + 2i(\sin 2\delta) + \cos^2 2\delta - \sin^2 2\delta]. \quad (4.3)$$

Utilizando a relação trigonométrica:

$$\cos^2 2\delta - \sin^2 2\delta = 2(\cos^2 2\delta) - 1, \quad (4.4)$$

podemos encontrar:

$$\begin{aligned} \frac{1}{2} [1 + 2i(\sin 2\delta) + 2(\cos^2 2\delta) - 1] = \\ [(\cos^2 2\delta) + i(\sin 2\delta)] = e^{i\Delta\varphi} = \cos \Delta\varphi + i \sin \Delta\varphi. \end{aligned} \quad (4.5)$$

Ou seja:

$$\frac{\sin \Delta\varphi}{\cos \Delta\varphi} = \tan \Delta\varphi = \frac{\sin 2\delta}{\cos^2 2\delta}. \quad (4.6)$$

Finalmente:

$$\Delta\phi(x', y') = \tan^{-1} \frac{\sin 2\delta}{\cos^2 2\delta} \quad (4.7)$$

A equação 4.7 foi utilizada como base para comparação entre os valores teóricos de diferença de fase e os experimentais.

O esquema⁴ utilizado para realização da calibração do MHP utilizando a lâmina de quarto de onda é apresentado na Figura 4.8:

Figura 4.8: Esquema experimental utilizado para obtenção das diferenças de fase entre os componentes ortogonais da onda transmitida por uma lâmina de quarto de onda. Nesta figura, é mostrado um trecho do microscópio da figura 4.1 (sem a lente objetiva e condensadora). P1 representa o polarizador direcionado a 0° em relação ao eixo x e $\lambda/4$ representa a lâmina de quarto de onda orientada a um ângulo δ em relação ao eixo x. A parte A atua como região de referência para medir o parâmetro $\Delta\phi_R$.

O processamento consistiu em calcular os mapas de fase a partir do método do Espectro Angular. Para compensação das aberrações, foi necessário utilizar um procedimento diferente daquele apresentado no capítulo 2: não foi utilizada lente objetiva, já que a amostra apresenta dimensões da ordem de centímetros. Portanto, o mapa de fase obtido não apresenta curvatura de fase. Apesar disso, diferenças de fase devido ao alinhamento complexo desse sistema geram grande influência nos resultados. Para solucionar este problema, para cada sequência de capturas de hologramas (um para cada deslocamento (δ) da lâmina de quarto de onda, variando sua posição de 5 em 5 graus no intervalo de 45° a 225°), um holograma sem amostra (considerada como holograma de referência) foi capturado. O mapa de fase resultante era obtido a partir da

⁴ Para considerar P1 a 0° do eixo x, os polarizadores responsáveis por determinar os estados de polarização dos feixes referência (P2 e P3), foram ajustados de modo a estarem a -45° e 45° , respectivamente, do eixo x.

subtração do mapa de fase correspondente ao objeto do mapa de fase sem o objeto. Um exemplo do procedimento é dado na Figura 4.9:

Figura 4.9: (a) Holograma de polarização de uma lâmina de quarto de onda orientada a 20° em relação à direção de polarização de P1 (Figura 4.8), (b) mapa de fase da amostra obtida através do método do Espectro Angular, (c) mapa de fase sem amostra e (d) mapa de fase resultante da subtração dos mapas (b) e (c). Vê-se que, em (d), a curvatura de fase devido a problemas no alinhamento do sistema é compensada.

O mapa de fase que representa a diferença de fase entre as componentes ortogonais do campo transmitido pelo objeto é obtido através da subtração dos mapas referentes a cada componente, como mostra a Figura 4.10:

Figura 4.10: (a) Amplitude do Espectro Angular do holograma apresentado na Figura 4.8a. Os retângulos vermelhos indicam as frequências correspondentes às imagens virtuais. (b) Mapa de fase para a componente horizontal de polarização, (c) mapa de fase para a componente vertical de polarização e (d) mapa de fase resultante da diferença entre (b) e (c). Em (d), **A** representa a região tomada como referência (sem objeto) para estimar o termo $\Delta\phi_R$. **B** representa a região correspondente à lâmina. Para captura das imagens, não foi utilizada lente objetiva, devido às dimensões da ordem de centímetros do objeto.

Foi extraída a média dos valores de fase da região **A** (Figura 4.10d), o que permitiu obter o valor de $\Delta\phi_R(x', y')$. Utilizando o mesmo procedimento, o valor de fase médio da região **B** foi obtido. Subtraindo ambos os resultados, foi possível determinar o termo $\Delta\phi_C(x', y')$ da equação 3.34, ou seja, o valor de diferença de fase corrigido. A

função que relaciona a diferença de fase com a direção da lâmina de quarto de onda descrita na equação 4.7 é apresentada no gráfico da Figura 4.11, o qual também apresenta os dados experimentais.

Figura 4.11: Valores teóricos (linha contínua) e experimentais (pontos vermelhos) relativos às diferenças de fase entre os componentes vertical e horizontal da onda transmitida por uma lâmina de quarto de onda orientada a um ângulo δ e iluminada por uma onda linearmente polarizada a 0° de um eixo de referência tomado como a direção horizontal. Neste gráfico foram utilizados os valores de diferença de fase obtidos para o intervalo de δ : 45° a 225° .

Para obter os resultados apresentados na Figura 4.11, os polarizadores e as lâminas de quarto de onda deveriam ser cuidadosamente ajustados, mas os componentes mecânicos utilizados como suporte para esses itens possuíam precisão de 2° , o que impediu um ajuste mais preciso.

Para a calibração dos valores de intensidade, foi utilizado um polarizador linear como amostra padrão. Esse componente foi rotacionado e um holograma foi capturado para cada posição parcial (foram capturados hologramas a cada 5 graus em um intervalo de 90° a 270°). A diferença principal (Figura 4.12), neste caso, foi o uso de uma lâmina de quarto de onda após o polarizador P1 que antecede o objeto. Essa lâmina (ajustada a 45° do eixo d transmissão do polarizador P1) gera um feixe circularmente polarizado. Este feixe, ao atravessar o componente, não tem sua intensidade alterada à medida que o polarizador é rotacionado, o que permite avaliar as variações de intensidade devido somente à interação do feixe objeto com os feixes de referência.

Figura 4.12: Esquema experimental utilizado para obtenção das intensidades referentes aos componentes ortogonais da onda transmitida por um polarizador. P1 representa o polarizador direcionado a 0° em relação ao eixo x e $\lambda/4$ representa a lâmina de quarto de onda orientada a um ângulo 45° em relação ao eixo de P1.

Após a reconstrução dos mapas de intensidade, as intensidades médias foram calculadas e uma curva que representa a função que relaciona a intensidade de cada componente ortogonal da onda transmitida com a direção do polarizador foi criada. A curva contínua representa os dados teóricos. A função é descrita como $\cos(\delta)$ para a componente horizontal e $\sin(\delta)$ para a componente vertical, sendo apresentada no gráfico da Figura 4.13, o qual também apresenta os dados experimentais.

Figura 4.13: Valores (normalizados) teóricos (linha contínua) e experimentais (pontos vermelhos para componentes horizontais e azuis para verticais) relativos às intensidades dos componentes vertical e horizontal da onda transmitida por um polarizador orientado em posições que variam em graus em relação à direção de polarização do feixe incidente no polarizador (onda objeto). Intervalo considerado: entre 90° e 270° .

No gráfico apresentado na Figura 4.13, podemos notar pequenos desvios dos dados experimentais em relação aos dados teóricos. Isso se deve, principalmente, à incerteza gerada por vibrações e variações de temperatura. Em relação ao sistema de rotação, este se mostrou uma fonte de erros significativa, pois a incerteza de 2° desse sistema estava presente em todos os componentes rotativos do microscópio, como polarizadores e lâminas retardadoras.

Apesar dos erros, as curvas apresentaram compatibilidade entre os valores experimentais e teóricos, o que demonstra confiabilidade nas medidas realizadas com o aparato proposto.

4.3. Metodologia experimental: MHD aplicada ao estudo de sistemas biológicos

- *Processo de Registro do Holograma:* Como se pode ver na Figura 4.1, a luz proveniente do LASER propaga-se em direção ao espelho **E1** e é refletida em direção ao divisor de feixes **DF1** que divide a luz em dois feixes. A porção de luz refletida, chamada de onda referência **E_R**, é direcionada ao espelho **E2** tendo seu eixo de polarização alterado pelo polarizador **P2**. A lâmina retardadora ($\lambda/2$) tem o papel de ajustar a intensidade dessa onda de forma a ampliar o contraste do holograma a ser formado. A porção refletida pelo **DF1**, chamada de onda objeto **E_O**, é colimada pela lente **CO** magnificando a intensidade na região do objeto a ser analisado. Após sua transmissão pela amostra, o feixe é ampliado pela objetiva (**MO**), sendo combinado com o feixe de referência formando, no plano da CCD, o holograma digital.
- *Processo de Reconstrução do Holograma Digital:* O processo de reconstrução foi realizado através do método do Espectro Angular, apresentado no Capítulo 3 deste trabalho. O algoritmo desenvolvido permite a reconstrução dos hologramas, obtenção dos mapas de fase e intensidade e remoção das descontinuidades de fase, bem como realizar a calibração dos eixos de coordenadas utilizados como referência.

4.3.1. Preparação das amostras

- *Eritrócitos (hemácias):* Foi realizada a coleta de sangue periférico humano (doador foi o autor do trabalho) e extensões sanguíneas em lâminas foram preparadas e fixadas de formas distintas:

1. Vapor de formaldeído: as lâminas foram inseridas em câmara fechada e expostas a vapor de formaldeído por 10 minutos.

2. Álcool Metílico: as lâminas foram postas em banho de álcool metílico por 2 minutos e postas a secar naturalmente.

3. Álcool Etílico: as lâminas foram postas em banho de álcool etílico por 2 minutos e postas a secar naturalmente.

o *β_2 glicoproteína I*: A obtenção das amostras de β_2 glicoproteína I foi realizada através da colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, através da Prof.^a Dr.^a Lígia Ferreira Gomes. As amostras de solução de β_2 GPI purificadas foram separadas em conformações de dímeros e monômeros.

As soluções de β_2 GPI foram depositadas em lâminas de vidro e separadas por conformação. Gotas de aproximadamente 6 μ l de solução foram depositadas nas lâminas com uso de uma pipeta graduada. Foi aguardada a secagem das amostras e áreas específicas de cada conformação foram escolhidas. Sobre cada área foi depositada uma gota de 1,5 μ l de água destilada e o processo de secagem foi monitorado através do método holográfico. Sequências de imagens foram capturadas de forma a mapear a formação dos agregados depositados na superfície da lâmina de vidro. Uma objetiva que permite uma ampliação de 20 vezes foi utilizada para obtenção das imagens.

4.3.2. Cálculo do Índice de refração

Para o cálculo do índice de refração, foi utilizado o método de desacoplamento proposto por Rappaz [53], o qual utiliza dois meios de índices de refração distintos para obter mapas de fase da mesma amostra. Primeiramente, um holograma é tomado, considerando ao ar como meio $n_m = 1,000$. Uma camada de material de índice diferente $n_m + \Delta n$ é depositada sobre a amostra e esta é coberta com uma lamínula para uniformizar a camada. Para os cálculos desta tese, foi utilizado óleo de calibração para refratômetros ($n_{\text{óleo}} = 1,4025 \pm 0,0001$) como meio adicional.

A imagem da mesma região foi capturada após a deposição do óleo e as diferenças de fase para cada meio (ar e óleo) foram calculadas e comparadas. As mesmas células foram utilizadas para que a comparação fosse confiável. A relação de desacoplamento segue:

$$\Delta\varphi_{ar}(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} (n_c - n_{ar})e(x, y). \quad (4.8)$$

Nesta equação, $e(x, y)$ representa a altura, n_c o índice de refração da célula, n_{ar} o índice do ar e $\Delta\varphi_{ar}$ a diferença de fase entre a extremidade da membrana da célula e o fundo.

$$\Delta\varphi_{óleo}(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} (n_c - n_{ar} - \Delta n)e(x, y). \quad (4.9)$$

Relacionando as duas equações:

$$n_c = \frac{\Delta\varphi_{ar}(x, y)\Delta n}{\Delta\varphi_{óleo} - \Delta\varphi_{ar}} + n_{ar}. \quad (4.10)$$

$$\Delta n \cdot e_c = \Delta\varphi_{óleo} - \Delta\varphi_{ar}. \quad (4.11)$$

4.4. Metodologia experimental: Novo Método de análise do estado de polarização

Os hologramas na Microscopia Holográfica de Polarização foram gravados diretamente na câmera CCD e reconstruídos através do método do Espectro Angular, assim como realizado na técnica de MHD. Mas, neste caso o holograma digital é composto por dois padrões de franjas relativos às interferências da onda objeto com cada uma das duas ondas de referência. A configuração experimental para a gravação de hologramas de polarização é mostrada na Figura 4.1.

- *Processo de Registro do Holograma:* O laser ($\lambda = 532$ nm) foi empregado como fonte de luz. Um divisor de feixes (**DF1**) não polarizado foi utilizado para dividir o feixe em duas porções, os quais representam os braços do interferômetro *Mach-Zehnder*: referência e objeto. Um segundo divisor de feixes (**DF2**) divide o feixe referência em dois feixes e a esses foi determinada uma polarização através dos polarizadores **P2** e **P3**. Essas direções de polarização, ortogonais entre si, anulam a interferência entre os feixes referência. O polarizador **P1** define a direção de polarização da onda incidente na amostra. Esta é escolhida de forma a estar simétrica em relação às direções dos polarizadores **P2** e **P3**. Neste caso, foi utilizada uma direção de 45° em relação às direções de polarização dos feixes referência.

Um dos maiores problemas ao se trabalhar com esse sistema é a diferença de fase que os espelhos e divisores de feixe podem gerar em uma das componentes do vetor campo elétrico incidente nesses componentes. Essa diferença pode alterar o estado linear de polarização dos feixes. Por conta disso, lâminas de quarto de onda ($\lambda/4$) foram utilizadas de forma a compensar qualquer retardo de fase que gerasse esse problema.

Para os estudos de birrefringência, o polarizador **P1** impõe uma polarização de 45° em relação à direção de polarização da onda referência, à frente de onda E_{oin} que ilumina o objeto **OBJ**. A luz transmitida pelo objeto é ampliada pela lente objetiva MO produzindo uma onda objeto E_o com componentes ortogonais E_{oh} e E_{ov} (Figura 4.14).

Figura 4.14: Detalhe do arranjo mostrado na Figura 4.1. Os caminhos percorridos pelos feixes referência 1, referência 2 e objeto são mostrados em cores (azul, verde e vermelho, respectivamente). Entre o feixe objeto e os dois feixes referência é adicionado um ângulo de separação, de forma a afastar o centro de interferência em direção às bordas da superfície da CCD (configuração *off-axis*). As setas coloridas indicam as direções de polarização de cada um dos campos.

Para análise do dicroísmo linear, uma lâmina retardadora ($\lambda/4$) impõe uma diferença de fase de $\pi/2$ entre as componentes de E_{oin} , gerando uma onda incidente no objeto circularmente polarizada.

A interferência entre as ondas de referência e objeto produz o holograma de polarização. O holograma é gravado em uma geometria fora do eixo com as três ondas se propagando ao longo de diferentes direções. Como mostrado em detalhe na Figura 4.9, a onda objeto E_o tem uma incidência normal (ao longo do eixo z) no plano (x, y) da CCD. As ondas de referência E_{R1} e E_{R2} se propagam simetricamente em relação ao plano (x, z) com ângulos de incidência semelhantes. Com a rotação das duas lâminas de meia

onda as intensidades das ondas de referência E_{R1} e E_{R2} são ajustadas. Um holograma contendo um padrão de franjas composto (um relativo à interferência entre E_{oh} e E_{R1} e outro relativo à interferência entre E_{ov} e E_{R2}) é capturado.

- *Reconstrução do holograma:* O método do Espectro Angular foi utilizado para a realização da reconstrução dos hologramas de polarização. As imagens de intensidade e fase foram relacionadas de forma a se obter informações da birrefringência e de dicroísmo linear das amostras analisadas.

4.4.1. Metodologia: MHP aplicada à detecção do dicroísmo linear

A técnica de MHP tem sido aplicada ao estudo dos parâmetros de polarização de amostras diversas, tendo como foco o estudo da birrefringência. Neste trabalho, um novo método de análise desses parâmetros é proposto de forma a simplificar e tornar mais eficientes as análises. Este método é baseado nos princípios da MHP e permite a detecção do dicroísmo linear através da análise do padrão de difração de Fraunhofer (PDF) gerado pela transmissão da luz pelo objeto analisado, podendo este ser obtido através do holograma digital de polarização. O processo de gravação deste holograma é descrito no capítulo 3. Como amostra, foram utilizados cristais de Oxalato de Cálcio (CaC_2O_4) em forma de agulhas, chamadas de ráfides, os quais apresentam os efeitos de dicroísmo e birrefringência linear. Um exemplar nativo de *Sansevieria trifasciata* foi utilizado como fonte dos cristais. Um pequeno corte transversal em um trecho de sua raiz foi executado e seiva resultante da área da raiz seccionada foi extraída e distribuída através de extensão em uma lâmina de vidro. Uma gota de água destilada foi adicionada de forma a diluir o conteúdo e remover matrizes de carboidratos presentes em volta dos cristais. Uma lamínula de microscopia foi posta sobre a solução para preservação da amostra completando o processo. Os passos seguidos no método desenvolvido neste trabalho são descritos a seguir:

- a. Os padrões de difração de Fraunhofer (PDF) provenientes da transmissão da luz pelo objeto foram obtidos. Para cada componente ortogonal E_{oh} e E_{ov} do objeto, a distribuição de intensidades do padrão foi calculada.
- b. Uma varredura radial foi executada sobre as imagens calculadas no passo **a**. A varredura é executada entre ângulos de 90° e 270° , com intervalos de 1° . Médias de intensidades no plano ao longo do raio (para cada ângulo) foram, então, calculadas e

curvas de intensidades foram traçadas. Estas curvas demonstram as diferenças na transmitância entre as duas componentes ortogonais da onda objeto.

c. Através da divisão das curvas de intensidades radiais médias de cada componente, uma curva normalizada foi obtida. Nesta curva picos de intensidades representam valores de dicroísmo positivo e negativo. Além da detecção do efeito de polarização, os ângulos dos objetos em relação ao eixo horizontal podem ser determinados pela curva.

Como método para comparação dos resultados, um método tradicional de detecção e medida do dicroísmo linear foi utilizado: a técnica de Microscopia Diferencial de Polarização. A mesma amostra utilizada na análise por MHP foi utilizada nesta etapa. Por sua versatilidade, o aparato experimental pode ser convertido em um Microscópio Diferencial de Polarização, somente desconsiderando alguns trechos do aparato e alterando a fonte de luz para uma luz branca.

Figura 4.15: Adaptação do aparato experimental de Microscopia Holográfica Digital utilizado para análise do dicroísmo linear através do método de Microscopia Diferencial de Polarização. Em destaque, o plano da CCD e as direções de orientação do polarizador P1 utilizadas para gravação das imagens.

Como eixo de referência é considerado o eixo x do plano da CCD. Ajustando a posição do eixo de transmissão do polarizador P1 de forma que este fique paralelo, ou seja, a 0° do eixo de referência (ver detalhe na Figura 4.16), uma primeira imagem representativa da transmissão da onda incidente polarizada pela amostra é capturada. Uma segunda imagem é capturada quando o eixo de transmissão do polarizador P1 é posicionado paralelo ao eixo y do plano da CCD, isto é, a 90° do eixo de referência. As

imagens mostradas nesta seção em forma de resultados foram obtidas com objetiva de 20 vezes de aumento.

Figura 4.16: Imagens de transmissão de uma amostra de seiva de *Sansevieria trifasciata* contendo ráfides de Oxalato de Cálcio. As setas vermelhas indicam a direção de polarização do campo incidente na amostra. Em (a) a direção é paralela ao eixo horizontal e em (b) a direção é perpendicular a esse eixo.

As duas imagens de intensidade capturadas são combinadas numericamente via MATLAB® a partir da equação 3.23a. Adaptando a equação ao caso:

$$I_D = \left(\frac{I_{0^\circ} - I_{90^\circ}}{I_{0^\circ} + I_{90^\circ}} \right). \quad (4.13)$$

Um mapa bidimensional que representa o dicroísmo linear é obtido sendo representado por uma matriz de cores distribuídas entre tons de azul e o vermelho, sendo os tons vermelhos referentes ao dicroísmo negativo e os tons azuis referentes ao dicroísmo positivo.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos através das técnicas de microscopia holográfica desenvolvidas e descritas nesse trabalho. Foram obtidas imagens de intensidade e mapas de fase que permitiram a análise dos perfis tridimensionais das amostras analisadas. Em “perfis tridimensionais” entende-se como visualização com perspectiva variável da imagem da superfície. Primeiramente, apresentamos os resultados obtidos para análise da influência do processo de fixação nas propriedades estruturais e morfológicas de eritrócitos. Na segunda seção, apresentamos o método de determinação e quantificação do dicroísmo linear através da Microscopia Holográfica de Polarização. Por último, demonstramos os resultados obtidos a partir do estudo de processos dinâmicos em sistemas biológicos mais complexos.

5.1. Efeitos da Preparação de amostras em informações obtidas via MHD

5.1.1. Análise Qualitativa: coloração e fixação

Os efeitos dos diversos tipos de preparação de amostras biológicas na qualidade das imagens de intensidade de fase obtidas via MHD foram analisados nesta seção. Foram utilizados os principais métodos convencionais de preparação: as amostras foram coradas, fixadas e montadas. Foram estudadas células sanguíneas obtidas de sangue periférico humano. Os mapas de fase e intensidade foram obtidos e comparadas com imagens obtidas por Microscopia de Campo Claro. Para obtenção das imagens via MHD,

foi utilizado o aparato apresentado na Figura 4.1 e o mesmo foi utilizado para obtenção dos resultados via Microscopia de Campo Claro, substituindo somente o Laser por uma fonte de luz branca.

A análise nesta etapa foi qualitativa, pois representa os primeiros resultados acerca da influência do processo de preparação de amostras biológicas nas informações de fase e intensidade obtidas via MHD.

O equipamento foi aplicado à análises de sistemas com diferentes dimensões, formas de preparo e complexidade, como células e tecidos. Os resultados apresentados na Figura 5.1 foram obtidos a partir de um trabalho de colaboração e foram publicados no livro *Holography - Basic Principles and Contemporary Applications* da editora InTech [24]. Esta imagem representa a comparação da análise de uma amostra de membrana sinovial utilizando duas técnicas diferentes de coloração: *HE* (*hematoxilina e eosina*) e *picrosirius*, sendo o primeiro o método padrão de referência utilizado para melhorar a visualização de imagens de intensidade de amostras histológicas em geral por microscopia de campo claro e o segundo um método especial, bastante empregado para melhorar a avaliação quantitativa de colágeno em microscopia de campo claro e microscopia de polarização.

É possível notar que as imagens obtidas por Microscopia de Campo Claro apresentam um alto contraste para ambos os métodos de coloração, já que este é o objetivo de processos que alteram as características da amostra como esses. Mas, ao utilizarmos a MHD, o corante *HE* intensificou somente o contraste da imagem de intensidade, enquanto o processamento da amostra, desde a fixação e a inclusão em parafina até a etapa de montagem do material para observação, diminuiu consideravelmente o contraste de fase. Um efeito oposto foi observado utilizando o corante sobre dois cortes histológicos do mesmo material, ou seja, que representam a mesma amostra desde a coleta até a etapa de corte para o preparo das lâminas. Os cortes sequenciais fornecem amostras que se consideram equivalentes para as técnicas de coloração. Neste caso, apenas na etapa, as amostras foram processadas de forma distinta, permitindo identificar efeitos do procedimento de coloração. A técnica do *picrosirius* resultou num contraste de fase observável, porque este corante associa-se extensivamente às fibras de colágeno segundo a geometria da fibra e orientado em

relação às cargas das moléculas que a compõe, o que produz grandes agregados anisotrópicos birrefringentes e efeitos de fase.

Classe	HE	Picrosirius
Microscopia de Campo Claro
Imagens de Intensidade
Imagens de Contraste de Fase

Figura 5.1: Lâminas de vidro com material da membrana sinovial de equino com osteocondrite dissecante (OCD) coradas com HE e picrosirius (*Sirius Red*) analisadas por Microscopia de Campo Claro e MHD (foram obtidas imagens de contraste de fase e de intensidade) com aumento de 10x em ambas. Amostras gentilmente fornecidas por Aline Ambrogi Franco Prado (FMVZ-USP Protocolo do Comitê de Ética: 2771/2012).

Este resultado preliminar demonstrou o efeito das diversas etapas do processo de preparação de um corte histológico sobre as imagens de fase e intensidade. Ao fixar e corar uma amostra pelo método convencional, os efeitos de fase, indesejáveis para técnicas de microscopia de campo claro, são diminuídos, e os efeitos na intensidade do campo transmitido são ampliados. Portanto, para aplicações em MHD, se torna necessário conhecer os efeitos do processo de preparação de amostras biológicas e utilizá-los adequadamente para permitir a observação de efeitos de fase associados às estruturas da amostra.

5.1.2. Análise Quantitativa: Processo de fixação

Nesta seção, é descrita a análise quantitativa da influência do processo de fixação sobre as informações de fase obtidas via MHD. Para esta etapa, foram utilizadas amostras de eritrócitos em extensão de sangue periférico– neste caso obtidas de sangue de polpa digital. Extensões de sangue correspondem a filmes finos preparados pelo método manual padrão utilizado em laboratórios de rotina de Hematologia Clínica a partir de amostras de sangue não coagulado sobre lâminas de vidro, apresentam boa reprodutibilidade para análises de morfologia celular qualitativa e quantitativa. Quatro extensões foram preparadas no mesmo período e utilizando material do mesmo indivíduo. Cada lâmina foi fixada de uma forma diferente e estas foram analisadas antes e após o processo de fixação (preparação descrita no Capítulo 4, seção 4.3.1.). As imagens referentes aos mapas de fase foram obtidas via MHD utilizando o aparato descrito na Figura 4.1. As lâminas foram numeradas de 1 a 4, sendo:

1. Lâmina nº1: Exposta a vapor de formaldeído.
2. Lâmina nº2: Amostra fixada com Álcool Metílico 99% (Metanol).
3. Lâmina nº3: Amostra fixada com Álcool Etílico 95% (Etanol).
4. Lâmina nº4: Amostra controle.

Os campos analisados das lâminas foram escolhidos de forma a corresponder, à região da extensão sanguínea em que os eritrócitos apresentam-se lado a lado, sem muita sobreposição nem grandes espaços vazios no campo. A lâmina 4 foi utilizada como controle e para determinar o índice de refração médio das células quando não fixadas com agentes externos. Foram calculadas diferenças entre as fases ($\Delta\varphi$) da borda da célula e do fundo sobre o qual esta se encontrava, assim como os volumes e diâmetros médios das células para o campo correspondente. Os resultados obtidos a partir da extensão não fixada foram comparados com os resultados obtidos a partir da mesma amostra após processo de fixação. Foram utilizadas duas regiões da lâmina e em cada região foram tomadas 35 medidas de células diferentes, foram calculadas as médias e os desvios, assim como os desvios das médias, tomados como incertezas ($\bar{\sigma}_{\Delta\varphi}$) destas:

$$\bar{\sigma}_{\Delta\varphi} = \sqrt{\frac{\sigma^2}{N}}, \quad (5.1)$$

onde σ representa o desvio padrão da distribuição e N o número total de medidas. Assim, as diferenças de fase foram representadas como $\Delta\varphi_{j,i} \pm \bar{\sigma}_{\Delta\varphi_{j,i}}$, onde j refere-se à lâmina e i se refere à região analisada dessa lâmina. Os resultados referentes à lâmina nº1 são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Diferenças de Fase para Eritrócitos da lâmina nº 1, referentes às regiões 1 e 2. As diferenças de fase foram calculadas medindo a diferença entre a fase da borda da célula e o fundo sobre o qual esta se encontra. As incertezas foram estimadas a partir de análise estatística.

Preparação	$\Delta\varphi_{1.1}(rad) \pm \bar{\sigma}_{\Delta\varphi_{1.1}}$	$\Delta\varphi_{1.2}(rad) \pm \bar{\sigma}_{\Delta\varphi_{1.2}}$
Extensão não fixada	$8,88 \pm 0,14$	$9,43 \pm 0,28$
Extensão fixada sob vapor de Formol	$8,96 \pm 0,21$	$9,56 \pm 0,22$

As diferenças foram sutis, o que demonstrou que o processo de exposição a vapor de formaldeído não afetou a informação de fase total das células de forma significativa. Para obter os valores de espessura correspondentes a cada valor de fase, o cálculo do índice de refração médio dos eritrócitos não fixados foi necessário ($\bar{n}_c$). A lâmina controle (nº4) foi utilizada para tal fim.

O valor de $\bar{n}_c$ foi dado pela média de 25 valores de n_c obtidos em um campo da amostra e a incerteza foi estimada a partir do desvio padrão da média da distribuição. O mesmo procedimento foi realizado para calcular o índice de refração médio das células correspondentes às outras lâminas. Uma camada de óleo foi depositada ($n_{\text{óleo}} = 1,4025 \pm 0,0001$) e os índices puderam ser calculados comparando as diferenças de fase para as mesmas células nos meios considerados. O valor encontrado a partir da lâmina controle foi de $\bar{n}_c = 1,556 \pm 0,003$, o que contradiz a maioria dos valores publicados na literatura, os quais variam entre 1,37 e 1,41 [68]. Por tratar-se de uma extensão e não de uma amostra em meio de cultura, em solução isosmótica adequada à manutenção da forma e tamanho das células ou mesmo de células imersas em suspensões em plasma sanguíneo, as células nos filmes depositados acabam por desidratar, por estarem em contato com o ar. Como consequência, sofrem um aumento de concentração de componentes com alto índice de refração, como proteínas. (A proposta ao se utilizar uma extensão e não células em meio de cultura foi o de reproduzir as condições de uma análise clínico-laboratorial de rotina).

As imagens de fase, assim como o perfil de espessura de células escolhidas entre os campos obtidos para a Lâmina 1 são apresentadas na Figura 5.2:

Figura 5.2: Resultados obtidos da análise via MHD de uma extensão de sangue periférico humano antes e após fixação por vapor de formaldeído. As imagens (a), (b) e (c) mostram, respectivamente, o mapa de fase de obtido a partir de uma região da amostra antes dessa ser fixada, seção ampliada desse mapa e o perfil transversal de uma das células do campo em (b). As imagens (d), (e) e (f) mostram a sequência correspondente à mesma região após a fixação. Barras nas imagens (a) e (d) correspondem a 20 μm .

O índice de refração médio calculado para essa amostra após a exposição ao formaldeído foi de $\bar{n}_1 = 1,561 \pm 0,003$. O índice utilizado como referência para a amostra não fixada foi aquele calculado a partir da lâmina controle, já que adicionar óleo sobre a lâmina antes de sua fixação poderia alterar a amostra e interferir na comparação.

Figura 5.3: (a) Imagem da perspectiva tridimensional da região da figura 5.2b (não fixada). (b) Imagem da perspectiva tridimensional da região da figura 5.2e.

A Figura 5.3 apresenta os perfis tridimensionais relativos às imagens das Figuras 5.2b e 5.2e. Os resultados demonstram que a exposição a vapor de formaldeído alterou de forma sutil o formato celular, principalmente a região central das células. Percebemos que o índice aumentou em 0,005 e o formato sofreu mínimas modificações, podendo ter sido alterada a proporção dos elementos da célula na sua estrutura. Ao utilizar um fixador menos invasivo, não se esperam modificações no seu formato ou na sua constituição, assim como não se esperariam alterações no seu índice de refração.

Além da variação nos valores de fase, foi calculada a diferença entre a fase da borda e a fase do centro da célula. Essas diferenças foram medidas nos mesmos eritrócitos (antes e após a fixação). Chamada nesta tese de H , as diferenças entre os pontos da borda e do centro variaram de acordo com o processo de fixação. Para a lâmina 1 corresponderam a $H_{Nat} = (0,106 \pm 0,010)\mu m$ e $H_{Vapor} = (0,149 \pm 0,013)\mu m$ respectivamente, ou seja, a diferença aumentou após a exposição ao vapor de formol. Para obter esses valores, foram utilizados os índices de refração calculados para a lâmina controle e para a lâmina nº1. Este resultado demonstra o poder de resolução da técnica de MHD, já que mudanças da ordem de dezenas de nanômetros podem ser detectadas.

O procedimento realizado foi repetido na lâmina nº2 (fixação por Metanol). A análise de dois campos da mesma lâmina foi realizada utilizando MHD (antes e após a fixação) e os resultados referentes à essa lâmina são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Diferenças de Fase para Eritrócitos da lâmina nº 2, referentes às regiões 1 e 2. As diferenças de fase foram calculadas medindo a diferença entre a fase da borda da célula e o fundo sobre o qual esta se encontra. As incertezas foram estimadas a partir de análise estatística.

Preparação	$\Delta\varphi_{2.1}(rad) \pm \bar{\sigma}_{\Delta\varphi_{2.1}}$	$\Delta\varphi_{2.2}(rad) \pm \bar{\sigma}_{\Delta\varphi_{2.2}}$
Extensão não fixada	$8,53 \pm 0,18$	$8,15 \pm 0,18$
Extensão fixada com Metanol	$10,10 \pm 0,12$	$9,45 \pm 0,12$

Notamos, para este caso, que os valores de fase diferem de forma mais significativa que quando a amostra é exposta ao vapor de formol. O metanol é o fixador padrão utilizado como base para as colorações hematológicas e atua na amostra provocando a rápida desidratação do material orgânico. Ao analisarmos as imagens de fase e os perfis lineares de algumas células dos campos capturados, foi possível observar

uma mudança no perfil topográfico das células, como mostra a Figura 5.4. Uma região do mapa de fase da Fig. 5.4a é mostrada em destaque na Fig. 5.4b. Através desta, é possível observar que a forma dos eritrócitos se apresenta com formato diferente do bicôncavo característico. Observando as Figuras 5.4e e 5.4f, percebe-se que o formato das células se aproxima mais ao bicôncavo esperado, diferindo desse formato devido a efeitos de difração (pequeno pico central).

Figura 5.4: Resultados obtidos da análise via MHD de uma extensão de sangue periférico humano antes e após fixação por metanol. As imagens (a), (b) e (c) mostram, respectivamente, o mapa de fase de obtido a partir de uma região da amostra antes dessa ser fixada, seção ampliada desse mapa e o perfil transversal de uma das células do campo em (b). As imagens (d), (e) e (f) mostram a sequência correspondente à mesma região após a fixação.

O índice de refração médio calculado para essa amostra após fixação por metanol foi de $\bar{n}_2 = 1,559 \pm 0,003$, maior que o índice encontrado para a lâmina controle, mas um pouco menor que aquele encontrado para a lâmina fixada no primeiro procedimento. O índice está diretamente relacionado com o volume de água presente na célula e o álcool acaba por desidratá-la, portanto, a contribuição do índice de refração da hemoglobina se torna maior, aumentando, como consequência, o índice do volume total da célula.

A Figura 5.5 apresenta os perfis tridimensionais relativos às imagens das Figuras 5.4b e 5.4e. As imagens demonstram a variação na morfologia celular gerada pela fixação por Metanol. Para essa lâmina, o parâmetro H correspondeu a: a $H_{Nat} = (0,094 \pm 0,010)\mu m$ e $H_{Metanol} = (0,184 \pm 0,014)\mu m$. A diferença praticamente

dobrou. Pode-se justificar esse resultado ao considerar que a célula desidratou e foi praticamente lavada pelo fixador, tendo depósitos de plasma e proteína removidos da sua superfície.

Figura 5.5: Imagem da perspectiva tridimensional da região da figura 5.4b (não fixada). (b) Imagem referente à região da figura 5.4e.

Na lâmina de nº3, o procedimento de análise foi repetido, alterando somente o agente fixador. Para esta amostra, foi utilizado álcool etílico absoluto e o valor de índice de refração médio calculado foi $\bar{n}_3 = 1,555 \pm 0,003$. Esse valor foi o menor encontrado entre as amostras analisadas e o que mais se aproximou do valor referente à amostra controle, no entanto, houve uma diminuição do diâmetro celular, apesar de ocorrer um aumento da espessura média. O álcool etílico também fixa os componentes da amostra precipitando as moléculas por desidratação, mas é menos eficiente do que o metanol. É bastante utilizado em diversas misturas com outros solventes orgânicos e também com ácidos para fixação de amostras de células e tecidos em laboratórios de Citopatologia e Anatomia Patológica.

Tabela 3: Diferenças de Fase para Eritrócitos da lâmina nº 3, referentes às regiões 1 e 2. As diferenças de fase foram calculadas medindo a diferença entre a fase da borda da célula e o fundo sobre o qual esta se encontra. As incertezas foram estimadas a partir de análise estatística.

Preparação	$\Delta\varphi_{3.1}(rad) \pm \bar{\sigma}_{\Delta\varphi_{3.1}}$	$\Delta\varphi_{3.2}(rad) \pm \bar{\sigma}_{\Delta\varphi_{3.2}}$
Extensão natural	$8,17 \pm 0,21$	$7,80 \pm 0,12$
Extensão fixada com Etanol	$10,16 \pm 0,22$	$9,07 \pm 0,16$

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam uma variação na estrutura da célula, pois a diferença de fase sofreu um aumento de aproximadamente 24% após a fixação por etanol, o que contradiz o resultado encontrado para o índice de refração. Se a fase aumenta, esta deve estar relacionada a um aumento desse índice ou a uma mudança

na espessura. Já que houve regressão do índice, foi esperado o aumento da espessura média. Aplicando a expressão do desacople (equação 4.11), pudemos medir as espessuras médias, as quais foram de 1,18 μm para a amostra fresca e 1,48 μm para a amostra fixada. As espessuras para os métodos anteriores são apresentadas na Tabela 4. As imagens da Figura 5.6 confirmam essa previsão. Ao compararmos as figuras 5.6c e 5.6f, notamos a variação na perfil tridimensional da célula. Os mapas de fase também demonstram uma mudança morfológica causada pelo agente fixador.

Figura 5.6: Resultados obtidos da análise via MHD de uma extensão de sangue periférico humano antes e após fixação por etanol. As imagens (a), (b) e (c) mostram, respectivamente, o mapa de fase de obtido a partir de uma região da amostra antes dessa ser fixada, seção ampliada desse mapa e o perfil transversal de uma das células do campo em (b). As imagens (d), (e) e (f) mostram a sequência correspondente à mesma região após a fixação.

As imagens da Figura 5.6 confirmam os resultados de mudança morfológica sofrida pelas células. Podemos notar uma diminuição no diâmetro e aumento da diferença entre a borda e o centro da célula. Assim como ocorreu com a fixação por metanol, o etanol gerou um incremento na espessura dos eritrócitos, como pode ser visto na Figura 5.7. O encolhimento células é típico desse fixador, mas não era esperado o aumento tão intenso da espessura média.

Figura 5.7: Imagem da perspectiva tridimensional da região da figura 5.6b (não fixada). (b) Imagem referente à região da figura 5.6e (fixação por etanol).

Os valores médios de H para a lâmina 3 corresponderam a $H_{Nat} = (0,073 \pm 0,004)\mu m$ e $H_{Etanol} = (0,147 \pm 0,006)\mu m$ respectivamente, o que, assim como para o caso do metanol, esse valor praticamente dobrou. Os parâmetros celulares foram calculados estão resumidos na tabela 4. Os valores foram aproximados para duas casas decimais, pois foram considerados erros experimentais que alteravam o limite de precisão dos valores de fase.

Tabela 4: Parâmetros calculados de eritrócitos distribuídos sobre lâmina de vidro através de extensão de sangue periférico humano. Foram calculadas as alturas médias e os índices de refração médios através do processo de desacople descrito no Capítulo 4. O parâmetro H indica a diferença entre a borda e o centro da célula. Além desses, o volume corpuscular médio foi obtido a partir das diferenças de fase e o diâmetro médio através da determinação da dimensão dos pixels da imagem.

	N = 70		N = 70		N = 70	
Parâmetro	Fixação: Vapor de Formol		Fixação: Metanol		Fixação: Etanol	
	Não fixada	Fixada	Não fixada	Metanol	Não fixada	Etanol
Índice de Refração	1,56 $\pm 0,01$	1,56 $\pm 0,01$	1,56 $\pm 0,01$	1,56 $\pm 0,01$	1,56 $\pm 0,01$	1,56 $\pm 0,01$
Espessura Média (μm)	1,35 $\pm 0,01$	1,37 $\pm 0,02$	1,29 $\pm 0,02$	1,44 $\pm 0,02$	1,18 $\pm 0,02$	1,48 $\pm 0,02$
H (μm)	0,11 $\pm 0,01$	0,15 $\pm 0,01$	0,09 $\pm 0,01$	0,18 $\pm 0,01$	0,07 $\pm 0,01$	0,15 $\pm 0,01$
Volume Médio (fl)	83,4 $\pm 2,1$	86,1 $\pm 1,3$	72,9 $\pm 2,0$	83,3 $\pm 1,4$	95,4 $\pm 2,4$	97,8 $\pm 2,1$
Diâmetro Médio (μm)	7,4 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 0,5	7,4 $\pm$ 1,2	7,4 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,6

A relação da espessura média das células antes e após a fixação indica que houve um aumento desse parâmetro em todos os casos. O vapor de formol mostrou

resultados muito semelhantes para o volume e o diâmetro celular antes e depois da fixação. A maior variação de volume celular foi observada com o metanol, embora o diâmetro não tenha sofrido modificações. No caso do etanol o efeito da espessura foi compensado por uma redução do diâmetro. Uma das possibilidades para os efeitos sobre a espessura seria a alteração no perfil do material depositado no fundo da lâmina, pois ao fixar a amostra com um álcool, parte do material pode ser removida.

Como visto na Tabela 4, as espessuras médias encontradas apresentaram baixo valor, considerando a média de espessura normal de um eritrócito ($2\ \mu\text{m}$). Ao realizar o cálculo da diferença de fase correspondente à célula, são tomados dois pontos: a borda e o fundo onde esta está depositada. Este resultado demonstra que, ao utilizar a extensão obtida diretamente do sangue, sem remoção de componentes do plasma, os eritrócitos acabam por ficar imersos em uma camada de conteúdo proteico, portanto, parte do seu volume pode estar encoberto por essa camada. Para verificar essa afirmação, fizemos um risco sobre a extensão e capturamos um holograma da região. Uma seção do mapa de fase correspondente é apresentada na Figura 5.8a e na Figura 5.8b o perfil topográfico de uma linha desse mapa (em vermelho). Os resultados confirmam nossa previsão, já que a partir da superfície da lâmina, a altura da borda da célula corresponde a valores mais próximos aos esperados.

(a)

(b)

Figura 5.8: (a) Mapa de fase de amostra de extensão de sangue periférico sobre lâmina. Foi feito um risco lâmina após a deposição da extensão de modo a expor o vidro do substrato. (b) Perfil topográfico correspondente à linha vermelha traçada sobre o mapa em (a).

A principal observação feita a partir dos dados da Tabela 4 foi a relação do índice de refração em cada caso com a composição celular. O índice de refração de um eritrócito pode ser dado pela concentração de hemoglobina em seu interior (equação 1.12), ao considerar que grande parte do conteúdo celular é solução dessa proteína. Ao utilizar a expressão que relaciona esses dois parâmetros (índice da célula e concentração da proteína), utilizando os valores de índice calculados nesta etapa, os valores de concentração ultrapassariam em quase três vezes o esperado. A uma concentração de aproximadamente 36 g/dl, a hemoglobina atinge seu limite de solubilidade, sofrendo cristalização e precipitação, deixando de constituir uma solução verdadeira. Nas amostras secas, a hemoglobina que contribui com o índice de refração total das células não está em solução. Portanto, como conclusão para esse resultado: para amostras depositadas em forma de extensão sanguínea e fixadas, esta relação linear não é válida.

5.2. MHP aplicada ao estudo de sistemas anisotrópicos

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos pela técnica de MHP aplicada ao estudo de sistemas anisotrópicos. Como já tratado nesta tese, a aplicação da técnica de MHP ao estudo de sistemas biológicos foi pouco explorada até o momento, assim como o estudo do dicroísmo linear como aplicação.

A hemoglobina S polimerizada apresenta pico de absorção na faixa da banda de Soret (435 nm) [103]. Ao escolher essa amostra, consideramos que o trabalho em uma outra região, em que também é possível verificar a absorção não alteraria de forma tão significativa o resultado, porém, não foi possível observar nenhum efeito de absorção seletiva nas diversas amostras que foram utilizadas. Tentamos utilizar luz branca e adicionamos um filtro adequado a essa faixa do espectro, porém o resultado também não foi satisfatório. Supomos que o problema possa estar relacionado não só ao comprimento de onda do laser, mas também aos componentes ópticos utilizados. Como visto nesta tese, a preparação da amostra pode ser um fator determinante para mudanças na estrutura celular, o que pode ter sido um agravante no nosso experimento. As amostras disponibilizadas tinham uma concentração provavelmente muito baixa de

Hemoglobina S, numa condição clínica em que não se manifesta a precipitação importante da hemoglobina. Nas condições de trabalho de um estudo piloto, não foi possível obter nenhum dado clínico ou laboratorial relacionado a este material, apenas tratar-se de material contendo a hemoglobina de interesse. Ou seja, a qualidade da precipitação da hemoglobina ao preparar a extensão de sangue de portadores de traço falciforme também pode ter sido um fator de interferência na medida das diferenças de fase.

Como forma de demonstrar a possibilidade de aplicação do método em amostras semelhantes às células sanguíneas deformadas pela presença de cristais de hemoglobina S, escolhemos um objeto que apresenta absorção seletiva na faixa do comprimento de onda que seria mais adequado às nossas possibilidades, alongada como os eritrócitos deformados pela hemoglobina polimerizada. O objeto utilizado foi uma amostra de ráfides de Oxalato de Cálcio extraídos da seiva de uma planta comum em arranjos ornamentais.

5.2.1. Determinação do dicroísmo linear através das imagens de intensidade.

O holograma de polarização após ser capturado, pode ser reconstruído de forma a se obter as imagens de intensidade e fase referentes à interferência entre o feixe objeto e cada um dos feixes referência. A Figura 5.10 mostra o resultado da reconstrução realizada através da separação das ordens de interferência no plano das frequências. O holograma de polarização correspondente é mostrado na Figura 5.9. Todas as imagens dessa seção foram obtidas utilizando a metodologia descrita no tópico 4.4. As ampliações estão discriminadas nas legendas das figuras.

Figura 5.9: Holograma de Polarização referente a uma amostra de ráfides de Oxalato de Cálcio. A imagem ao lado corresponde à porção do holograma ampliada. Aumento de 20x.

Na Figura 5.10 temos a visualização do dicroísmo linear no oxalato de cálcio utilizando Microscopia de Polarização Diferencial (MPD) e a técnica de Microscopia Holográfica de Polarização (MHP). Através da Figura 5.10, é possível comparar os resultados da reconstrução das imagens dos componentes ortogonais do campo. Segundo as orientações das estruturas alinhadas pode se notar que algumas destas estruturas quase desaparecem ou desaparecem totalmente na reconstrução dos componentes ortogonais. Um exemplo onde se destaca a alta especificidade da técnica de MHP respeito à técnica de MDP se apresenta na representação dessas mudanças nas estruturas. Ou seja, pode se apreciar melhor o efeito nas Figura 5.10(c) e Figura 5.10(d) nas estruturas sinalizadas com as setas vermelhas. Na Figura 5.11 são apresentadas as imagens de dicroísmo obtidas através das duas técnicas.

Figura 5.10: Imagens de intensidade com o polarizador P1 (Figura 4.1) orientado a 0° (a,c) e a 90° (b,d). Imagens de intensidade (a,b) são de microscopia ótica convencional. As imagens (c,d) são as amplitudes dos componentes ortogonais do campo reconstruídas com a técnica de MHP.

Figura 5.11: (a) Imagem de dicroísmo obtida com a técnica de polarização diferencial utilizando a equação 4.13, (b) Imagem de dicroísmo obtida através da técnica de MHP. Imagens (c) e (d) da Figura 5.10 foram utilizadas para obter o resultado apresentado em (b) nesta Figura.

Pela comparação das imagens de dicroísmo reconstruídas com as técnicas de MDP e MHP pode-se apreciar a equivalência dos resultados obtidos com ambas as técnicas. A imagem de dicroísmo obtida pela técnica de MDP foi representada por uma escala de cores onde o vermelho representa o dicroísmo negativo e o azul o dicroísmo positivo. No caso da reconstrução da imagem de dicroísmo com a técnica holográfica o valor do dicroísmo foi representado em tonalidades de cinza, onde as tonalidades brancas correspondem ao dicroísmo positivo e as pretas, ao dicroísmo negativo. Como apenas uma imagem é necessária para a obtenção da imagem de dicroísmo linear, diminui-se o tempo de aquisição e a possibilidade de erros e incoerências entre as imagens, possibilitando inclusive a obtenção dessa imagem em tempo real, o que se torna adequado para estudo de processos dinâmicos de alteração de propriedades ópticas de materiais que apresentem esse tipo de fenômeno.

5.2.2. Determinação do dicroísmo linear através dos planos de difração.

Conforme descrito na subseção 2.2.2, a fim de registrar o estado de polarização de uma amostra através da MHP, a onda objeto E_o interfere com duas ondas de referência E_{Rh} e E_{Rv} com estados ortogonais de polarização. O padrão de interferência foi registrado digitalmente para gerar a distribuição de intensidade do holograma polarização (Figura 5.12a). O holograma de polarização foi formado por dois padrões de franjas retas com diferentes orientações, conforme ilustrado pela ampliação do holograma mostrado na Figura 5.12b. Os portadores de frequência desses dois padrões foram fixados para os ângulos θ_1 e θ_2 .

Figura 5.12: (a) Distribuição de intensidades do holograma de polarização e (b) detalhe que mostra o padrão de franjas da região delimitada pelo retângulo vermelho.

A partir do holograma digital de polarização, foram reconstruídas as imagens de intensidade relacionadas com as duas componentes ortogonais: I_{oh} (Figura 5.13a) and I_{ov} (Figura 5.13b). Da mesma forma, para a técnica do DPM, foi obtida a diferença de intensidade entre as imagens obtidas com estados de polarização específicos do feixe objeto para cada componente. A relação da amplitude β foi calculada a partir das imagens de intensidade da Figura 5.14 através da aplicação da equação 3.31.

Figura 5.13: Imagens de intensidade reconstruídas para as duas componentes ortogonais do feixe objeto; (a) I_{oh} e (b) I_{ov} . As setas vermelhas indicam a direção dos eixos de polarização do feixe iluminador E_o e dos feixes referência.

Figura 5.14: Imagem representativa da razão de amplitude.

Diferentemente do método tradicional para medir os estados de polarização, no presente trabalho, baseado no formalismo de Jones, o dicroísmo linear da amostra é caracterizado como indicado nos passos seguintes:

1. A equação 3.34 foi utilizada para calcular a distribuição da intensidade no padrão de difração de Fraunhofer (FDP) para cada componente ortogonal do campo de onda do objeto E_o : PDF_h e PDF_v para E_{oh} e E_{ov} , respectivamente.

As expressões $1 + \log(PDF_h)$ e $1 + \log(PDF_v)$ foram utilizadas para melhorar a visualização das distribuições de intensidade dos planos de difração, respectivamente mostradas nas Figuras 5.15a e 5.15b. As reflexões nesse plano se apresentam perpendiculares ao alinhamento da estrutura no espaço real e as contribuições das componentes ortogonais correspondem no plano de difração à dimensão e intensidade das reflexões.

Figura 5.15: Distribuição de intensidades dos padrões de difração de Fraunhofer para as components (a) vertical e (b) horizontal do campo de onda do objeto.

Após aplicar a expressão 3.34, uma varredura radial foi executada entre os ângulos 90° e 270° nos planos PDF_h e PDF_v . As curvas de intensidade $I_h(\rho)$ e $I_v(\rho)$ foram obtidas através do cálculo da média das intensidades ao longo do raio da circunferência que limita o padrão para cada ângulo. O intervalo entre os ângulos foi tomado como 1° . Essas curvas demonstram as variações na transmitância entre as duas componentes ortogonais no espaço inverso do objeto.

Figura 5.16: Curvas de intensidade para $I_v(\rho)$ (azul) e $I_h(\rho)$ (verde) obtidas por varredura radial de 90° a 270° nos padrões de difração PDF_h e PDF_v .

Os picos presentes nas curvas $I_h(\rho)$ e $I_v(\rho)$ se apresentam nas posições angulares correspondentes às reflexões no padrão de difração. A amplitude em cada pico é proporcional à quantidade de informação que cada estrutura fornece relacionada com a intensidade da onda transmitida. Esta intensidade está diretamente relacionada com a orientação do objeto com respeito a um eixo principal, no caso, o eixo horizontal.

A curva normalizada (Figura 5.17) que representa o dicroísmo linear foi obtida aplicando a equação

$$D(\theta) = \frac{I_h(\rho) + \text{Max}_{I_h, I_v}}{I_v(\rho) + \text{Max}_{I_h, I_v}}. \quad (5.2)$$

O termo Max_{I_h, I_v} representa o valor máximo entre as curvas $I_h(\rho)$ e $I_v(\rho)$. Os picos acima e abaixo de zero, assinalados com os números 1-3 na Figura 5.17 caracterizam quantitativamente o dicroísmo linear dos elementos da imagem. Essa representação do dicroísmo coincide com os resultados obtidos através do formalismo de Jones e também concorda com os resultados obtidos com o método tradicional. A escala apresentada na abscissa do gráfico está distribuída entre os ângulos 0° e 180° , o que equivale a uma rotação de 90° na escala angular utilizada na varredura radial. Dessa forma, as posições angulares dos picos coincidem com os ângulos (orientação em relação ao eixo horizontal) das ráfides.

Figura 5.17: Curva normalizada representadora do dicroísmo linear da amostra de ráfides de oxalato de cálcio.

Este método reduz a análise da polarização de duas dimensões a só uma dimensão, fazendo a análise mais simples e rápida. Ou seja, da análise dos picos da curva de diferença de intensidade são reportados rapidamente o tipo de dicroísmo por estruturas, assim como suas correspondentes dimensões e ângulo de inclinação.

5.3. Microscopia Holográfica Digital aplicada à análise de eventos dinâmicos

5.3.1. Estudo de Propriedades Mecânicas de Cardiomiócitos através da MHD

Colaborações foram feitas durante o período e se apresentam como perspectivas para a continuação do trabalho. Um dos estudos iniciados e que pode ter grandes possibilidades de aplicação foi a análise da dinâmica de cardiomiócitos vivos em cultura. Aqui estão apresentados os primeiros testes desse estudo. O primeiro vídeo de uma célula cardíaca viva pulsando em um meio de cultura foi obtido e um dos mapas de fase utilizados para montagem do filme pode ser visto na Figura 5.18. Amostras e espaço gentilmente cedidos pelo Laboratório de Micro Reologia e Fisiologia Molecular do Instituto de Física e pelo InCor (Instituto do Coração). O aparato utilizado é descrito na Figura 2.3 e trata-se de um MHD em configuração invertida, adequado para amostras em meio líquido. O laser utilizado possui comprimento de onda 632,8 nm (laser He-Ne) e baixa potência (17 mW). As amostras foram retiradas da estufa e analisadas imediatamente, pois a variação da temperatura e das condições de saturação do meio não podiam ser controladas durante as medidas, com as condições técnicas disponíveis.

Figura 5.18: Mapa de fase que representa a estrutura de um cardiomiócito vivo em meio de cultura. A escala na imagem corresponde a $10 \mu\text{m}$. A imagem foi obtida a partir de uma montagem invertida de MHD e a ampliação foi de 10x.

A proposta é dar continuidade ao trabalho e adequar as condições para manutenção da integridade da célula. Medir quais os parâmetros que podem influenciar as alterações no perfil e frequência de batimento do cardiomiócito, além da análise da alteração morfológica e estrutural, associando os resultados obtidos via MHD com outras técnicas será o objetivo da continuação desse trabalho.

Figura 5.19: Perfil pseudo-3D referente ao cardiomiócito da Fig. 5.18. O eixo z refere-se aos valores de fase em radianos e não o valor de espessura, pois o índice de refração da célula é não uniforme.

A Figura 5.19 mostra o perfil tridimensional referente à célula da Fig. 5.18. Cada perfil foi reconstruído e posicionado com a mesma perspectiva para montagem do vídeo. Foram capturados 100 hologramas a 4 frames por segundo.

5.3.2. Dinâmica da formação de agregados de $\beta_2\text{GPI}$ em solução

Baseado nas potencialidades da Microscopia Holográfica Digital foi proposto medir a organização dos agregados de $\beta_2\text{GPI}$ em solução aquosa, assim como o conteúdo $\beta_2\text{GPI}$ nos agregados individuais. Este trabalho foi parte de um projeto de colaboração com a *Universidad de Oriente* (Santiago de Cuba, Cuba) financiado pela CAPES intitulado

“Microscopia Holográfica Digital aplicada ao estudo de agregados de Beta₂ – Glicoproteína em solução”, o qual tinha o objetivo de entender a interação proteína-proteína nos agregados de β_2 GPI em solução através da técnica. O trabalho foi realizado em cooperação com a professora Dr.^a Lígia Ferreira Gomes do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Foi possível determinar as alterações sofridas pelos agregados ao ser depositada a solução de β_2 GPI em lâmina de vidro, de forma a ser possível observar a reversibilidade do processo de cinética da formação dos agregados.

Amostras de dímeros e monômeros de β_2 GPI em solução, obtidas por purificação a partir de plasma humano e caracterizadas quanto à composição e concentração das soluções, foram cedidas para o ensaio. Gotas de aproximadamente 6 μ l de soluções contendo cerca de 50ug/mL da proteína foram depositadas nas lâminas de vidro limpas ou com a superfície modificada para efeito hidrofóbico, com uso de uma microseringa de vidro graduada. Foi aguardada a secagem das amostras e observada a disposição do material seco sobre as lâminas. Nas áreas específicas, recobertas com o material de cada subfração de purificação da proteína, foram escolhidas regiões para acompanhamento dinâmico. Sobre cada área foi depositada uma gota de 1,5 μ l de água destilada e o processo de secagem foi monitorado através do método holográfico. Sequências de imagens foram capturadas de forma a mapear a formação dos agregados depositados na superfície da lâmina de vidro. Uma objetiva que permite uma ampliação de 20 vezes foi utilizada para obtenção das imagens. Os mapas de fase foram obtidos e os resultados são mostrados a seguir.

Figura 5.20: Mapa de fase de uma amostra de solução de β_2 GPI (conformação monomérica) após secagem em lâmina de vidro (ampliação de 20x). Escala corresponde a 20 μ m.

As imagens a seguir representam capturas com intervalos de 3 segundos entre cada imagem mostrada na sequência.

Figura 5.21: Sequência de capturas de imagens referentes à formação de agregados de β_2 GPI em conformação monomérica referentes à área representada na figura 5.20. Escala na primeira imagem corresponde a 20 μm .

Na sequência de imagens acima, foi possível notar a formação de estruturas de agregados de proteínas. A estrutura de ramos é mantida, demonstrando a reversibilidade do processo, mas a imagem final quando comparada com a imagem inicial (figura 5.22) evidencia a reorganização das estruturas. As imagens da Figura 5.21.

Figura 5.22: Perfil de fase de região demarcada com linha vermelha n° 1 (a) na Figura 5.21 e perfil para a linha n° 2(b).

Ao traçar uma linha e medir o perfil de fase correspondente, pudemos notar que as estruturas mantêm a diferença de fase característica, mas parecem estar sobrepostas após a secagem imediata a uma camada de água. O mesmo resultado pode ser notado quando se observa a borda da gota em uma lamina modificada para superfície hidrofóbica, como mostra a Figura 5.23. Os agregados formam um filme sobre a gota de água à medida que se formam.

Figura 5.23: Monômero – sequência secagem sobre gota de água em lamina de vidro com a superfície modificada para aumentar a hidrofobicidade. Perfil de fase obtido para a borda da gota.

5.4. Primeiros resultados: Microscopia de Desfocalização

A Microscopia de Desfocalização é uma técnica que permite a obtenção da diferença de fase em um campo transmitido por um objeto transparente de forma não interferométrica e utilizando fonte de luz não coerente, sendo baseada modelo do transporte de intensidade [104], o qual descreve as mudanças na intensidade relacionadas com mudanças na distância axial a partir de um plano focal. Mais informações acerca do método podem ser encontradas nos trabalhos de Agero e colaboradores [67] [105]. O principal resultado do modelo adotado pelos autores pode ser expresso pela equação:

$$\frac{I(x, y) - I_0}{I_0} = \Delta f \cdot \Delta n \cdot \nabla^2 e(x, y), \quad (5.3)$$

onde $I(x, y)$ é a intensidade do campo no plano (x, y) , I_0 corresponde à intensidade do fundo, Δn é a diferença de índice de refração entre o objeto e o meio, $\nabla^2 e(x, y)$ corresponde ao operador Laplaciano do perfil topográfico do objeto e Δf à distância de desfocalização (o quanto o objeto se afastou da lente objetiva ou vice versa). Uma imagem de contraste é obtida para cada variação Δf (uma acima do plano focal e outra abaixo do plano focal) e a diferença entre as imagens permite obter a relação entre espessura e índice de refração [106].

$$\Delta n \cdot e(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \frac{1}{2\Delta f} \mathcal{F}^{-1} \left[\frac{\mathcal{F}(\langle C_2 \rangle - \langle C_1 \rangle)}{-(k_x^2 + k_y^2)} \right], \quad (5.4)$$

A Figura 5.24 mostra os primeiros resultados obtidos através da aplicação da técnica. As imagens (a), (b) e (c) desta figura correspondem às imagens de intensidade

obtidas por Microscopia de Campo Claro do mesmo campo de uma amostra de células sanguíneas. A imagem (b) foi capturada no plano focal e (a) e (c) foram capturadas após deslocar a amostra (deslocamento realizado no eixo axial) (d) apresenta o mapa de fase e (e) o perfil tridimensional da seção delimitada pelo quadrado vermelho na figura 5.24d.

Figura 5.24: Imagens para cálculo do mapa de fase por Microscopia de Desfocalização. As imagens foram obtidas a partir de extensão de sangue periférico. (a) Imagem para $\Delta f < 0$, (b) $\Delta f = 0$ e (c) $\Delta f > 0$. Em (d) temos a imagem relacionada com o perfil de fase e em (e) perfil tridimensional da seção destacada pelo retângulo vermelho. As imagens foram capturadas utilizando objetiva de 100x, sem óleo de imersão.

Realizamos a tentativa de calibração aplicando o método a um objeto conhecido: a mesma rede de difração utilizada para calibração do MHD. Uma sequência de três imagens foi capturada variando a posição do objeto em relação à lente objetiva. Foi obtida a relação entre a variação do parafuso micrométrico do microscópio e o valor de Δf correspondente. Ao repetir o procedimento com outros objetos de dimensões similares, os resultados não corresponderam. Percebemos variações na intensidade do campo ao mudar a posição do objeto. Por se tratar de um microscópio não invertido, a condensadora se move junto com a platina do microscópio, gerando a mudança do padrão de intensidade. Para campos pouco amplos, como o caso das imagens da Figura 5.24, o fator influenciou menos, mas para campos maiores, como com uso de objetiva de

40x, o efeito se tornou mais evidente. Com o avanço no conhecimento da técnica e adaptação do aparato experimental, pretendemos utilizar a Microscopia de Desfocalização em nossos trabalhos futuros como método de comparação dos resultados obtidos via MHD.

Capítulo 6

Considerações Finais e Perspectivas

O trabalho teve como proposta desenvolver um estudo que demonstre as possibilidades de aplicação da Microscopia Holográfica Digital (MHD), uma importante ferramenta para análise morfológica e estrutural de materiais de forma não destrutiva, na análise de estruturas celulares modificadas por processos específicos. Foram montados os aparatos experimentais, realizadas as devidas calibrações e métodos numéricos de reconstrução foram utilizados para obter as informações de fase e intensidade, assim como para realizar o processamento desses resultados. Foram escritos códigos numéricos utilizando Matlab® baseados no Método do Espectro Angular para reconstrução dos hologramas. Códigos para correção da curvatura da frente de onda introduzida pela lente objetiva, assim como para correções de fundo foram escritos e aplicados no processamento dos mapas de fase.

A técnica foi aplicada ao modelo dos eritrócitos visando o estudo de alterações ópticas e morfológicas determinadas pela anemia falciforme. Foram medidos índices de refração e perfis topográficos das células quando submetidas aos principais agentes fixadores. Entre os agentes para fixação, foram utilizados o formaldeído, álcool metílico e álcool etílico. O primeiro fixador foi aplicado de forma não invasiva, através da exposição ao seu vapor, contrastando com os álcoois que foram aplicados diretamente sobre a amostra: extensões de sangue periférico humano. Esse estudo foi desenvolvido

como base para compreender a forma como diferentes processos de preparação podem influenciar a interpretação das informações de fase obtidas via MHD.

Como teste preliminar, foi feita a comparação de imagens de uma amostra de membrana sinovial utilizando duas formas de coloração diferentes: *HE* (*hematoxilina e eosina*) e *picrosirius*, através de dois métodos: MHD e Microscopia de Campo Claro. As imagens obtidas por Microscopia de Campo Claro apresentaram um alto contraste para ambos os métodos de coloração, mas, ao utilizarmos a MHD, a metodologia padrão, com o corante *HE* intensificou somente o contraste da imagem de intensidade, diminuindo consideravelmente o contraste de fase. Um efeito oposto foi observado utilizando o corante *picrosirius*. Este resultado preliminar demonstrou que, ao fixar e corar uma amostra, os efeitos de fase e de intensidade do campo transmitido podem ser ampliados ou reduzidos a depender do método de preparo.

Para análise da influência do processo de fixação na análise dos eritrócitos, foram utilizadas quatro amostras tomadas como referência no trabalho: três extensões de sangue periférico fixados por métodos distintos e um adicional para controle. O primeiro parâmetro determinado foi o índice de refração. Para obter os resultados, o método de desacople foi utilizado, no qual, o objeto em estudo é imerso em dois meios com diferentes índices de refração diferentes. Para cada meio, um mapa de fase foi obtido e as informações de espessura e índice de refração do objeto puderam ser determinadas de forma independente. Foram utilizados como meios o ar e um óleo de calibração para refratômetros. Os resultados foram obtidos a partir da média de 20 dados coletados em cada campo e as incertezas foram obtidas pela dispersão média da distribuição: todos apresentaram (considerando as aproximações devido a erros experimentais) valor $\bar{n} = 1,56 \pm 0,01$. Estes indicaram uma diferença muito grande entre os valores encontrados na literatura, os quais estão na faixa entre 1,39 e 1,41. Essa discrepância surgiu como primeira evidência da influência do modo de preparo de amostras biológicas nas suas propriedades estruturais. Os valores tomados como padrão para eritrócitos se referem a células em meio de cultura ou solução isosmótica. Ao expor as células ao ambiente, estas tendem a fixar na lâmina de vidro e desidratar pelo contato com o ar, sofrendo uma alteração na proporção entre o conteúdo de água e hemoglobina que apresenta índice de aproximadamente 1,61 para a faixa de comprimento de onda utilizado (532,0 nm). O índice de refração de um eritrócito apresenta uma relação linear

com a concentração de hemoglobina em seu interior. Ao utilizar a expressão que relaciona esses dois parâmetros, utilizando os valores de índice calculados, os valores de concentração ultrapassam em quase três vezes o limite de solubilidade. Ao ultrapassar esse limite (36g/dl) a hemoglobina cristaliza e precipita, deixando de fazer parte da solução. Portanto, para amostras depositadas em forma de extensão sanguínea e fixadas, esta relação linear não é válida.

Para cada método, os mapas de fase, assim como os perfis topográficos foram obtidos via MHD utilizando a configuração por transmissão. A partir desses, parâmetros como o volume, espessura média, diâmetro e diferença entre pontos da célula foram calculados. Em todos os casos, percebeu-se um aumento na espessura média, com efeito mais significativo sobre o volume médio das células no caso do metanol, o que pode estar relacionado com o mecanismo de ação do agente fixador, assim como foram notadas mudanças no perfil morfológico dos eritrócitos. Tanto o metanol, como o etanol geraram variações mais intensas que o vapor de formaldeído, o que era esperado, já que este último constitui um método menos invasivo.

Através do desenvolvimento da técnica de Microscopia Holográfica de Polarização (MHP), foram desenvolvidas novas metodologias para a obtenção de um parâmetro de polarização: o dicróismo. O aparato experimental foi montado e calibrado para a realização do trabalho. Um dos métodos utilizou o holograma de polarização para obter as imagens de intensidade referentes a estados de polarização distintos da onda incidente no objeto. Essas imagens foram relacionadas e a imagem de dicróismo resultante se mostrou compatível com aquela obtida por meio de um método tradicional: a Microscopia de Polarização Diferencial. Também foi desenvolvido um método alternativo para detecção do dicróismo linear em amostras que apresentam forma alongada através dos mapas de fase e intensidade obtidos por MHP. A proposta desse método foi identificar células que apresentam Hemoglobina S (Hb S) polimerizada em amostras de sangue falciforme através dos efeitos de anisotropia óptica que a proteína alinhada apresenta. A concentração de Hb S é bastante variável nos eritrócitos dos indivíduos portadores do gene da anemia falciforme e ela ocorre em mistura com outros tipos de hemoglobina normais ou patológicos, com diferentes afinidades pelo oxigênio. Desenvolver uma técnica microscópica que permita quantificar a variação morfológica e o dicróismo linear nos eritrócitos falciformes pode ser útil para o controle

laboratorial da presença de estruturas poliméricas nos eritrócitos de indivíduos sintomáticos e assintomáticos e estudo de correlações com diversas características clínicas da patologia.

Não foi possível a aplicação do método ao objeto de estudo, pois a faixa de absorção da Hb S se encontra fora da faixa de trabalho dos componentes e do laser disponíveis. Por isso, o método foi aplicado em um modelo de cristais que apresentam uma forma semelhante e os mesmos efeitos de anisotropia óptica, demonstrando a possibilidade de aplicação em eritrócitos falciformes. Os cristais de Oxalato de Cálcio utilizados foram obtidos a partir do extrato da seiva de um exemplar de *Sansevieria trifasciata*. O método consistiu em executar uma varredura sobre as imagens de intensidade referentes ao padrão de difração de Fraunhofer obtido a partir da reconstrução de hologramas de polarização obtidos via MHP. Para cada componente ortogonal do campo transmitido pelo sistema anisotrópico, um padrão de difração foi obtido e a varredura foi executada. A análise das diferenças de absorção para cada componente foi reduzida a uma curva que representa o dicroísmo linear relacionado à orientação do sistema. O método se mostrou adequado para o mapeamento do comportamento dicroico desses sistemas permitindo reduzir a análise de polarização bidimensional a unidimensional, simplificando o processo de estudo, pois uma única aquisição de imagem é necessária para sua execução. Pretende-se modificar os parâmetros experimentais e aplicar a metodologia ao estudo das propriedades dos eritrócitos falciformes. Será desenvolvida uma técnica de análise quantitativa do estado de polarização através da Microscopia de Desfocalização, utilizando os princípios da Microscopia Diferencial, tornando este um método comparativo aos resultados obtidos via MHP, pois esta técnica, assim como a holográfica, permite a avaliação quantitativa dos parâmetros de fase de uma onda transmitida por um objeto.

Buscou-se, adicionalmente, demonstrar a possibilidade de aplicação da MHD à análise de eventos dinâmicos: a formação de agregados de β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) foi analisada a partir do aparato proposto no trabalho. A caracterização completa da β_2 GPI purificada e da natureza de eventuais contaminantes não protéicos é relevante tanto para a compreensão de seu papel biológico quanto para a obtenção de testes biológicos confiáveis para a proteína e para anticorpos antifosfolípido, para os quais ela é um co-

antígeno. Pretende-se ampliar esse estudo através da determinação do índice de refração dos agregados e, assim, obter informações dos constituintes dessas estruturas.

Como perspectivas do trabalho, pretende-se analisar os mecanismos que alteram as propriedades reológicas de células vivas comparando os resultados obtidos utilizando técnicas ópticas com aqueles obtidos por modelos existentes: Microscopia de Força de Tração (TFM), técnica de Speckle e Microscopia de Desfocalização. Diversos problemas podem ser considerados, quando se trata de estudar as propriedades reológicas de células vivas. Um problema a ser citado é a caracterização mecânica e a resposta das células do músculo cardíaco, ou cardiomiócitos, tema com forte apelo científico e poucos trabalhos encontrados na literatura. Cardiomiócitos constituem a estrutura fundamental e unidade funcional de um coração. Uma característica interessante é o fato dos cardiomiócitos pulsarem ciclicamente em meio de cultura, em uma forma similar ao que ocorre no coração. Todavia, o processo de cultura dessas células não é trivial e pouco se sabe sobre sua dinâmica e o padrão de forças dessas células. As primeiras imagens de cardiomiócitos vivos em cultura foram obtidas e um vídeo que demonstra a célula em movimento foi construído a partir da captura em sequência de hologramas digitais.

Referências

- [1] D. Gabor, "A new microscopic principle," *Nature*, **161**, pp. 777-778, 1948.
- [2] D. Gabor, "Microscopy by reconstructed wavefronts," *Proceedings of the Royal Society*, **A197**, pp. 454-487, 1949.
- [3] R. G. Gould, "The LASER, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation," *The Ann Arbor Conference on Optical Pumping*, p. 128, 1959.
- [4] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, Roberts & Company, 2005.
- [5] U. Schnars e W. Jueptner, "Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction," *Applied Optics*, **33**, pp. 179-181, 1994.
- [6] E. Cuhe, F. Bevilacqua e C. Depeursinge, "Digital holography for quantitative phase-contrast imaging," *Optics Letters*, **24**, pp. 291-293, 1999.
- [7] E. N. Leith e J. Upatnieks, "Reconstructed wavefronts and communication theory," *Journal of the Optical Society of America*, **52**, p. 1123-1130, 1962.
- [8] B. Kemper e G. Von Bally, "Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection," *Applied Optics*, **47** (4), pp. A52-A61, 2008.
- [9] A. Faridian, D. Hopp, G. Pedrini, U. Eigenthaler, M. Hirscher e W. Osten, "Nanoscale imaging using deep ultraviolet digital holographic microscopy," *Optics Express*, **18**, pp. 14159-14164, 2010.
- [10] P. Yu, M. Mustafa, J. J. Turek, P. M. W. French, M. R. Melloch e D. D. Nolte, "Holographic optical coherence imaging of tumor spheroids," *Applied Physics Letters*, **83**, pp. 575-577, 2003.
- [11] P. Marquet, B. Rappaz e P. J. Magistretti, "Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy," *Optics Letters*, **30**, pp. 468-470, 2005.

- [12] B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuche, Y. Emery, C. Depeursinge e p. J. Magistretti, "Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy," *Optics Express*, **13**, pp. 9361-9373, 2005.
- [13] B. Kemper, D. Carl, J. Schnekenburger, I. Bredebusch, M. Schafer, W. Domschke e G. von Bally, "Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, **11**, 2006.
- [14] L. Yu, S. Mohanty, J. Zhang, S. Genc, M. M. Kim, M. W. Berns e Z. Chen, "Digital holographic microscopy for quantitative cell dynamic evaluation during laser microsurgery," *Optics Express*, **17** (14), pp. 12031-12038, 2009.
- [15] A. Khmaladze, R. L. Matz, T. Epstein, J. Jasensky, H. M. Banaszak e Z. Chen, "Cell volume changes during apoptosis monitored in real time using digital holographic microscopy," *Journal of Structural Biology*, **178** (3), pp. 270-278, 2012.
- [16] B. Kemper, A. Bauwens, A. Vollmer, J. Müthing, G. von Bally, H. Karch, S. Ketelhut e P. Langehanenberg, "Label-free quantitative cell division monitoring of endothelial cells by digital holographic microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, **15**, pp. 425-431, 2010.
- [17] B. Rappaz, A. Barbul, A. Hoffman, D. Boss, R. Korenstein, C. Depeursinge, P. J. Magistretti e P. Marquet, "Spatial analysis of erythrocyte membrane fluctuations by digital holographic microscopy," *Blood Cells Molecules and Diseases*, **42**, pp. 228-232, 2009.
- [18] M. K. Kim, "Principles and Techniques of digital holographic microscopy," *SPIE Reviews*, **1**, pp. 1-50, 2010.
- [19] T. Colomb, P. Dahlgren, D. Beghuin, E. Cuche, P. Marquet e C. Depeursinge, "Polarization Imaging by Use of Digital Holography," *Applied Optics*, **41**, n. 1, pp. 27-37, 2002.
- [20] T. Nomura, B. Javidi, S. Murata, E. Nitani e T. Numata, "Polarization imaging of a 3D object by use of on-axis phase-shifting digital holography," *Optics Letters*, **32** (5), pp. 481 - 483, 2007.

- [21] Z. Wang, L. J. Millet, M. U. Gillette e G. Popescu, "Jones phase microscopy of transparent and anisotropic samples," *Optics Letters*, **33**(11), pp. 1270-1272, 2008.
- [22] T. Colomb, F. Dürr, E. Cuhe, P. Marquet, H. G. Limberger, R.-P. Salathé e C. Depeursinge, "Polarization microscopy by use of digital holography: application to optical-fiber birefringence measurements," *Applied Optics*, **44**, n. 21, pp. 4461-4469, 2005.
- [23] T. V. Tishko, D. N. Tishko e V. P. Titov, "Combining the polarization-contrast and interference-contrast methods for three-dimensional visualization of anisotropic microobjects," *Journal of Optical Technology*, **79**(6), pp. 340-343, 2012.
- [24] F. Palacios, O. Font, G. Palacios, J. Ricardo, M. Escobedo, L. F. Gomes, I. V. Brito, M. Muramatsu, D. Soga e J. Valin, "Phase and Polarization Contrast Methods by Use of Digital Holographic Microscopy: Applications to Different Types of Biological Samples," em *Holography - Basic Principles and Contemporary Applications*, E. Mihaylova, Ed., InTech, 2013.
- [25] F. Charrière, A. Marian, T. Colomb, P. Marquet e C. Depeursinge, "Amplitude point-spread function measurement of high-NA microscope objectives by digital holographic microscopy," *Optics Letters*, **32**(16), pp. 2456-8, 2007.
- [26] S. V. Rudenko e M. K. Saeid, "Reconstruction of erythrocyte shape during modified morphological response," *Biochemistry (Moscow)*, **75**, pp. 1025-1031, 2010.
- [27] W. Mickols, M. F. Maestre, I. Tinoco e S. H. Embury, "Visualization of oriented hemoglobin S in individual erythrocytes by differential extinction of polarized light," *Biophysics*, **82**, pp. 6527-6531, 1985.
- [28] R. J. Collier, C. B. Burckhardt e L. H. Lin, *Optical Holography*, Nova Iorque: Academic Press, 1971.
- [29] H. J. Caulfield (Ed.), *Handbook of Optical Holography*, Nova Iorque: Academic Press, 1979.
- [30] H. Smith, *Principles of Holography*, Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1969.
- [31] E. N. Leith, "Overview of the developments of holography," *Journal of imaging*

science and technology, **41** (3), pp. 201-204, 1997.

- [32] J. M. Kim, B. S. Choi, S. I. Kim, J. M. Kim, H. I. Bjelkhagen e N. J. Phillips, "Holographic Optical Elements Recorded in Silver Halide Sensitized Gelatin Emulsions. Part I. Transmission Holographic Optical Elements," *Applied Optics*, **40**, pp. 622-632, 2001.
- [33] J. E. Boyd, T. J. Trentler, R. K. Wahi, Y. I. Vega-Cantu e V. L. Colvin, "Effect of film thickness on the performance of photopolymers as holographic recording materials," *Applied Optics*, **39**, pp. 2353-2358, 2000.
- [34] N. V. Kukhtarev, V. B. Markov, S. G. Odulov, M. S. Soskin e V. L. Vinetskii, "Holographic Storage in Eletro-optic crystals, I. Steady State," *Ferroelectrics*, **22**, p. 949, 1979.
- [35] U. Schnars e W. Jueptner, "Digital recording and numerical reconstruction of holograms," *Measurement Science and Technology*, **13**, p. R85-R101, 2002.
- [36] T. Zhang e I. Yamaguchi, "Phase-shifting digital holography," *Optics Letters*, **22** (16), 1997.
- [37] B. E. A. Saleh e M. C. Teich, *Fundamentals of Photonics*, John Wiley & Sons, Inc., 1991.
- [38] E. Hetch, *Optics*, 1987.
- [39] E. N. Leith e J. Upatnieks, "Reconstructed wavefronts and communication theory," *Journal of the Optical Society of America*, **52**, p. 1123-1130, 1962.
- [40] E. N. Leith e J. Upatnieks, "Wavefront reconstruction with diffused illumination and three-dimensional objects," *Journal of the Optical Society of America*, **54**, p. 1295-1301, 1964.
- [41] Y. Emery, E. Cucho, T. Colomb, C. Depeursinge, B. Rappaz, P. Marquet e P. Magistretti, "DHM (Digital Holography Microscope) for imaging cells," *Journal of Physics: Conference Series*, **61**, p. 1317-1321, 2007.
- [42] F. J. Giessibl, "Advances in atomic force microscopy," *Reviews of Modern Physics*, **75**, pp. 949-983, 2003.

- [43] S. W. Hell, E. H. Stelzer, S. Lindek e C. Cre, "Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy," *Optics Letters*, **19**, p. 222–224, 1994.
- [44] F. Zernike, "Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects," *Physica*, **9**, pp. 686-698, 1942.
- [45] M. Hausmann, B. Schneider, J. Bradl e C. Cremer, "High-precision distance microscopy of 3D-nanostructures by a spatially modulated excitation fluorescence microscope," *Optical Biopsies and Microscopic Techniques II*, **3197**, pp. 217-222, 1997.
- [46] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee e T. Flotte, "Optical coherence tomography," *Science*, **254**, p. 1178–1181, 1991.
- [47] M. K. Kim, "Applications of Digital Holography in Biomedical Microscopy," *Journal of the Optical Society of Korea*, **14**, pp. 77-89, 2010.
- [48] D. M. Zhestkov e V. V. Tuchin, "Optical immersion of erythrocytes in blood: a theoretical modeling," em *Proc. SPIE 5068, Saratov Fall Meeting 2002: Optical Technologies in Biophysics and Medicine IV*, 2003.
- [49] N. Mohandas e E. Evans, "Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects.," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **23**, pp. 787-818, 1994.
- [50] G. Mazarevica, T. Freivalds e A. Jurka, "Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients," *Journal of Biomedical Optics*, **7**(2), pp. 244-247, 2002.
- [51] R. Barer, "Refractometry and interferometry of living cells," *Journal of the Optical Society of America*, **47**, p. 545–556, 1957.
- [52] A. W. Pollister, *Cells and Tissues*, Academic Press, 2013, pp. 16-17.
- [53] B. Rappaz, A. Barbul, F. Charrière, J. Kühn, P. Marquet e R. Korenstein, "Erythrocytes volume and refractive index measurement with a Digital Holographic Microscope," *Proceedings of SPIE*, pp. 1-5, 2007.
- [54] F. G. Hayhoe e D. Quaglino, *Haematological Cytochemistry*, Churchill Livingstone,

1994.

- [55] C. Queiroz e D. Lima, O laboratório de citopatologia: Aspectos técnicos e operacionais, EDUFBA, 2000.
- [56] S. K. Moestrup, I. Schousboe, C. Jacobsen, J. R. Lehesté, E. I. Christensen e T. E. Willnow, "β2-glycoprotein I (apolipoprotein H) and β2-glycoprotein I-phospholipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin," *Journal of Clinical Investigation*, **102** (5), pp. 902-909, 1998.
- [57] A. Chonn, S. C. Semple e P. R. Cullis, "β2-glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of non-self particles," *Journal of Biological Chemistry*, **270**, pp. 25845-25849, 1995.
- [58] J. W. Goodman e R. W. Lawrence, "Digital Image Formation from electronically detected holograms," *Applied Physics Letters*, **11**, pp. 77-79, 1967.
- [59] M. A. Kronrod, N. S. Merzlyakov e L. P. Yaroslavski, "Reconstruction of holograms with a computer," *Soviet Physics – Technical Physics*, **17**, p. 333–334, 1972.
- [60] M. A. Kronrod, N. S. Merzlyakov e L. P. Yaroslavski, "Computer synthesis of transparency holograms," *Sov.Phys.– Tech. Physics*, **13**, pp. 414 - 418, 1972.
- [61] L. P. Yaroslavskii e N. S. Merzlyakov, *Methods of Digital Holography*, New York: Consultants Bureau, 1980.
- [62] W. Haddad, D. Cullen, J. C. Solem, J. M. Longworth, A. McPherson, K. Boyer e C. K. Rhodes, "Fourier-transform holographic microscope," *Applied Optics*, **31**, p. 4973–4978, 1992.
- [63] E. Cuhe, P. Marquet e C. Depeursinge, "Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms," *Applied Optics*, **38** (34), pp. 6994-7001, 1999.
- [64] F. P. Miller, A. F. Vandome e M. John, *Bright Field Microscopy*, VDM Publishing, 2010.
- [65] N. T. Shaked, L. L. Satterwhite, M. T. Rinehart e A. Wax, "Quantitative Analysis of Biological Cells Using Digital Holographic Microscopy," em *Holography, Research*

and Technologies, J. Rosen, Ed., InTech, 2011.

- [66] G. Nomarski, "Differential microinterferometer with polarized light," *Journal of Physics Radium*, **16**, pp. 9-13, 1955.
- [67] U. Agero, L. G. Mesquita, B. R. Neves, R. T. Gazzinelli e O. N. Mesquita, "Defocusing Microscopy," *Microscopy Research and Technique*, **65**, p. 159-165, 2004.
- [68] B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuhe e Y. Emery, "Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy," *Optics Express*, **13**, pp. 9361-9373, 2005.
- [69] I. Moon e B. Javidi, "Three-dimensional identification of stem cells by computational holographic imaging," *Journal of the Royal Society Interface*, **4** (13), pp. 305-313, 2007.
- [70] S. Schedin, G. Pedrini e H. J. Tizian, "Pulsed digital holography for deformation measurements on biological tissues," *Applied Optics*, **39**, pp. 2853-2857, 2000.
- [71] B. Kemper, A. Bauwens, A. Vollmer, J. Müthing, G. von Bally, H. Karch, S. Ketelhut e P. Langehanenberg, "Label-free quantitative cell division monitoring of endothelial cells by digital holographic microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, **15**, pp. 425-431, 2010.
- [72] Y. Kim, H. Byun e Y. Park, "Optical Measurement of Biomechanical Properties of Human Red Blood Cell using Digital Holographic Microscopy: Malaria and Sick Cell Diseases," *Biophysical Journal*, **106** (2), p. 575a, 2014.
- [73] G. G. Romero, A. C. Monaldi e E. E. Alanis, "Digital holographic microscopy for detection of Trypanosoma cruzi parasites in fresh blood mounts," *Optics Communications*, **285** (6), pp. 1613-1618, 2012.
- [74] A. Khmaladze, R. Matz, T. Epstein, J. Jasensky, M. M. Banaszak Holl e Z. Chen, "Cell volume changes during apoptosis monitored in real time using digital holographic microscopy," *Journal of Structural Biology*, **178** (3), pp. 270-278, 2012.
- [75] D. Bettenworth, P. Lenz, P. Krausewitz, M. Brückner, D. Domagk e B. Kemper, "Towards Stain-Free and Automatized Analysis of Experimental Colitis and Intestinal Wound Healing In Vitro by Digital Holographic Microscopy,"

- Gastroenterology*, **144** (5), pp. S-419-S-420, 2013.
- [76] K. Alm, H. Cirenajwis, L. Gisselsson, A. G. Wingren, B. Janicke, A. Mölder, S. Oredsson e J. Persson, "Digital Holography and Cell Studies," em *Holography, Research and Technologies*, J. Rosen, Ed., InTech, 2011.
 - [77] T. Colomb, E. Cuche, F. Charrière, J. Kühn, N. Aspert, F. Montfort, P. Marquet e C. Depeursinge, "Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation," *Applied Optics*, **45**(5), p. 851–863, 2006.
 - [78] F. Palacios, O. Font, J. Ricardo, G. Palacios, M. Muramatsu, D. Soga, D. Palacios, J. Valin e F. Monroy, "Alternative Reconstruction Method and Object Analysis in Digital Holographic Microscopy," em *Advanced Holography – Metrology and Imaging*, I. Naydenova, Ed., InTech, 2011, pp. 182-206.
 - [79] P. Massatsch, F. Charrière, E. Cuche, P. Marquet e C. Depeursinge, "Time-domain optical coherence tomography with digital holographic microscopy," *Applied Optics*, **44** (10), p. 1806–1812, 2005.
 - [80] T. V. Tishko, D. N. Tishko e V. P. Titov, "Holographic methods for phase microscopic objects study," em *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, A. Méndez-Vilas e J. Díaz, Eds., Formatex, 2010, pp. 2117-2128.
 - [81] N. Verrier e M. Atlan, "Off-axis Digital Hologram Reconstruction: some practical considerations," *Applied Optics*, **50**, pp. 1-14, 2011.
 - [82] P. Ferraro, S. D. Nicola, A. Finizio, G. Coppola, S. Grilli, C. Magro e G. Pierattini, "Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging," *Applied Optics*, **42** (11), pp. 1938-1946, 2003.
 - [83] F. Palacios, J. Ricardo, D. Palacios, E. Gonçalves, J. L. Valin e R. Souza, "3D image reconstruction of transparent microscopic objects using digital holography," *Optics Communications*, **248**, pp. 41-50, 2005.
 - [84] U. Schnars, "Direct phase determination in hologram interferometry with use of digitally recorded holograms," *Journal of Optical Society of America A*, **11** (7), pp.

2011-2015, 1994.

- [85] L. Yu e M. K. Kim, "Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method," **30** (16), pp. 2092-2094, 2005.
- [86] M. K. Kim, L. F. Yu e C. J. Mann, "Digital holography and multi-wavelength interference techniques," in *Digital Holography and Three Dimensional Display: Principles and Applications*, T. C. Poon, Ed., Springer, 2006, pp. 51-72.
- [87] G. Pedrini, S. Schedin e T. Z. Tiziani, "Aberration compensation in digital holographic reconstruction of microscopic objects," *Journal of Modern Optics*, **48**, p. 1035-1041, 2001.
- [88] V. V. Volkov e Y. Zhu, "Deterministic phase unwrapping in the presence of noise," *Optics Letters*, **28** (22), pp. 2156-2158, 2003.
- [89] I. Hodgkinson e Q. W. Wu, *Birefringent Thin Films and Polarizing Elements*, World Scientific, 1998, pp. 35-45.
- [90] T. Colomb, E. Cuche, Montfort, P. Marquet e C. Depeursinge, "Jones vector imaging by use of digital holography: simulation and experimentation," *Optics Communications*, **231**, pp. 137-147, 2004.
- [91] D. J. Griffiths, *Introduction to electrodynamics*, 3rd ed., Prentice Hall, 1999.
- [92] A. Credi e M. Montalti, "Absorption and Emission Spectroscopy with Polarized Light," em *The Exploration of Supramolecular Systems and Nanostructures by Photochemical Techniques*, P. Ceroni, Ed., Springer, 2012.
- [93] R. Haynes, "Polarized light microscopy," em *Optical Microscopy of Materials*, Springer, 1984.
- [94] J. F. de Boer, T. E. Milner, M. J. C. van Gemert e J. S. Nelson, "Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarization-sensitive optical coherence tomography," *Optics Letters*, **22**, p. 934-936, 1997.
- [95] Q. Kemaoy, M. Hong e W. Xiaoping, "Real-time polarization phase shifting technique for dynamic deformation measurement," *Optics and Lasers in Engineering*, p. 289-

295, 1999.

- [96] A. W. Lohmann, "Reconstruction of vectorial wavefronts," *Applied Optics*, **4**, p. 1667-1668, 1965.
- [97] Y. Ohtsuka e K. Oka, "Contour mapping of the spatiotemporal state of polarization of light," *Applied Optics*, **33** (13), pp. 2633-2636, 1994.
- [98] D. Beghuin, E. Cuhe, P. Dahlgren, C. Depeursinge, G. Delacretaz e R. P. Salathé, "Single acquisition polarization imaging with digital holography," *Electronics Letters*, **35**, p. 2053-2055, 1999.
- [99] T. Colomb, P. Dahlgren, D. Beghuin, E. Cuhe, P. Marquet e C. Depeursinge, "Polarization imaging by use of digital holography," *Applied Optics*, **41** (1), pp. 27-37, 2002.
- [100] M. Yokota, Y. Terui e I. Yamaguchi, "Analysis of Polarization State by Digital Holography with Polarization Modulation," *Optical Review*, **13** (6), pp. 405-409, 2006 .
- [101] M. Mihailescu e J. Costescu, "Diffraction pattern study for cell type identification," *Optics Express*, **20** (2), pp. 1465-1474, 2012.
- [102] J. O. Ricardo, M. Muramatsu, F. Palacios, M. R. R. Gesualdi, O. Font, J. L. Valin, M. M. Escobedo, S. Herold, D. F. Palacios e G. F. Palacios, "Potentialities of the digital holography in the study of the Fraunhofer diffraction pattern of microscopic objects," *Journal of Physics: Conference Series*, **274** (1), pp. 1-9, 2011.
- [103] D. A. Beach, C. Bustamante, K. S. Wells e K. M. Foucar, "Differential Polarization Imaging III: Theory Confirmation. Patterns of Polymerization of Hemoglobin S in Red Blood Sickle Cells," *Biophysics Journal*, **52**, pp. 947-954, 1987.
- [104] N. Streibl, "Phase imaging by the transport equation of intensity," *Optics communications*, **49** (1), 1984.
- [105] U. Agero, C. H. Monken, C. Ropert, R. T. Gazzinelli e O. N. Mesquita, "Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy," *Physical Review E*, **67**, pp. 1-9, 2003.

- [106] P. M. Roma, L. Siman, F. T. Amaral, U. Agero e O. N. Mesquita, "Total three-dimensional imaging of phase objects using defocusing microscopy: Application to red blood cells," *Applied Physics Letters*, **104**, pp. 1-5, 2014.

Anexos

A.1. Código em Matlab® para reconstrução de hologramas digitais a partir do método do Espectro Angular.

O trecho representado neste código apresenta o método do Espectro Angular como método de reconstrução de hologramas digitais.

```
% Função: Reconstrução de hologramas através do Método do Espectro Angular (EA).
% Procedimento: Considerar um arquivo de imagem como a distribuição de amplitude complexa em um plano (x,y) e calcular a amplitude complexa em um plano (ξ,η), distante zo do plano (x,y).

%-----
%% Abrir o arquivo do Holograma
A = imread('Holograma');
A1 = double(A);
[M,N] = size(A1);
%% Calcular o EA do Holograma e selecionar imagem virtual
F = fftshift(fft2(fftshift(A1)));
B = log(abs(F));
[~,u] = imcrop(B,[]);
close
y(1) = round(u(1));
y(2) = round(u(2));
y(3) = round(u(3));
y(4) = round(u(4));
F = F(y(2):y(2)+y(4),y(1):y(1)+y(3));
%% Determinar as variáveis:
zo = 0; %distância de reconstrução em mm. Quando imagem é formada no plano do holograma zo = 0.
lambda = 5.320e-04; %comprimento de onda em mm
k = 2*pi/lambda; %número de onda
dx = 4.65e-03; %dimensão dos pixels da CCD em mm. dx = dy
%% Definir as frequências angulares e executar propagação
% formar uma matriz do tamanho original do holograma adicionando zeros e posicionar o recorte no centro da matriz.
[Y2,X2]=size(F);
dy2=(M-Y2)/2;
dx2=(N-X2)/2;
Cut = zeros(Y2+2*dy2,X2+2*dx2);
Cut(1+dy2:Y2+dy2,1+dx2:X2+dx2)= F(1:Y2,1:X2); %Cut é uma matriz de zeros com a porção recortada(F)em seu centro.
fex = 1/(dx);fey=fex;
fx=[-fex/2:fex/N:fex/2-fex/N];
fy=[-fey/2:fey/M:fey/2-fey/M];
[FX,FY]= meshgrid(fx,fy);
D = Cut; %Espectro Angular em z = 0; A(kx, ky;0) em z = 0;
E = exp(2.*pi.*1i.*zo.*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));% termo de propagação.
G = D.*E; % Novo espectro angular em z = zo
H = fftshift(iff2(fftshift(G)));
```

```

%% Cálculo das imagens de fase e intensidade
Intensity = abs(H);
Phase = angle(H);

```

A.2. Código em Matlab® para processamento dos mapas de fase.

O trecho representado neste código apresenta o processamento das imagens de fase essenciais para análise quantitativa: compensação da curvatura de fase introduzida pela lente objetiva, remoção das descontinuidades de fase (*unwrapping*) e ajuste de fundo.

```

% Função: Processamento das imagens de fase calculadas no processo de
reconstrução de hologramas digitais.
% Procedimento para remoção da curvatura: calcular o campo complexo no
plano focal posterior da lente objetiva (calcular a intensidade do campo em
vários pontos dentro de um intervalo e calcular o z para Intensidade
máxima) e multiplicar por um termo de fase quadrático (simula uma onda
esférica) S
% Procedimento para remoção da descontinuidade de fase: aplicação do método
Volkov. O processo de (unwrapping) gera inclinação no mapa de fase final,
então processo de ajuste de fundo é realizado.

%-----
%% Abrir o arquivo do Holograma
A = imread('Holograma');
A1 = double(A);
[M,N] = size(A1);
%% Calcular o EA do Holograma e selecionar imagem virtual
F = fftshift(fft2(fftshift(A1)));
B = log(abs(F));
[~,u] = imcrop(B,[]);
close
y(1) = round(u(1));
y(2) = round(u(2));
y(3) = round(u(3));
y(4) = round(u(4));
F = F(y(2):y(2)+y(4),y(1):y(1)+y(3));
%% Determinar as variáveis:
zo = 0; %distância de reconstrução em mm. Quando imagem é formada no plano
do holograma, zo = 0.
lambda = 5.320e-04; %comprimento de onda em mm
k = 2*pi/lambda; %número de onda
dx = 4.65e-03; %dimensão dos pixels da CCD em mm. dx = dy
%% Definir as frequências angulares e executar propagação
%formar uma matriz do tamanho original do holograma adicionando zeros e
posicionar o recorte no centro da matriz.
[Y2,X2]=size(F);
dy2=(M-Y2)/2;
dx2=(N-X2)/2;
Cut = zeros(Y2+2*dy2,X2+2*dx2);
Cut(1+dy2:Y2+dy2,1+dx2:X2+dx2)= F(1:Y2,1:X2); %Cut é uma matriz de zeros
com a porção recortada (F)em seu centro.
fex = 1/(dx);fey=fex;
fx=[-fex/2:fex/N:fex/2-fex/N];
fy=[-fey/2:fey/M:fey/2-fey/M];
[FX,FY]= meshgrid(fx,fy);
D = Cut; %Espectro Angular em z = 0; A(kx, ky;0) em z = 0;
%% Cálculo da distância do plano do holograma ao plano de difração

```



```

Ord = 0;
for d = 1:2:500; %intervalo de varredura
    I = D.*exp(2*pi.*li.*d.*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));
    I2 = ifft2(fftshift(I));
        I3 = abs(I2).^2;
        Ord = Ord + 1;
        I3_max(Ord) = max(I3(:));
        d_foco(Ord) = d;
        d_f(Ord) = max(max(abs(ifft2(fftshift(I))).^2));
    plot(d,max(d_f(Ord)),':.');
    xlabel('d' (mm));
    ylabel('[ |\psi^f(d')|^2 ]_m_a_x');
end
II = find(I3_max == max(I3_max(:)));
zo = II; %distância do plano do holograma ao plano focal posterior da lente
objetiva
%% Propagação do plano do holograma ao plano de difração
G = Cut.*exp(2*pi.*li.*zo.*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));
Ra = fftshift(ifft2(fftshift(G)));
    = abs(Ra); %Padrão de Difração de Fraunhofer
[y,x] = find((Ifra) == max(max((Ifra)))); %Posição do máximo do padrão de
difração
G2 = G.*exp(-2*pi.*li.*(zo).*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));
%propagação do plano focal ao plano imagem
Rb = fftshift(ifft2(fftshift(G2)));
%% Compensação da Curvatura de Fase
[J,I] = meshgrid(-x+0.5:(N-x-0.5),-y+0.5:(M-y-0.5));
J = dx.*J;
I = dx.*I;
L =
li.*lambda.*zo.*exp(li*k*(d+zo)).*exp((li*k.*((J).^2+(I).^2)/(2*zo)).*(1-
(d/zo)));
C = Ra.*L;
Final_Field = abs(C).*exp(li*angle(C));
    %% Cálculo imagens de fase e intensidade
Intensity = abs(Final_Field); %imagem de intensidade
PhaseCorrected = angle(Final_Field); %imagem de fase com a curvatura da
frente de onda corrigida
% Executar unwrapping e remoção do background
PhaseUnw = volkov(PhaseCorrected); %procedimento de unwrapping pelo método
Volkov
SD = size(PhaseUnw)
for kk=1:SD(1) %remoção do fundo através de aproximação polinomial
    Profile = PhaseUnw(kk,:);
    xx = 1:SD(2);
    [CoefFit] = polyfit(xx,Profile,3);
    yfit = CoefFit(1).*xx.^3 + CoefFit(2).*xx.^2 + CoefFit(3).*xx.^1 +
    CoefFit(4);
    PhaseUnw2(kk,:) = yfit;
end
PhaseFinal = PhaseUnw - double(PhaseUnw2);

```

A.3. Código em Matlab® para reconstrução de hologramas digitais de polarização.

O trecho representado neste código apresenta o método do Espectro Angular como método de reconstrução de hologramas digitais de polarização.

Função: Reconstrução de hologramas digitais de polarização através do Método do Espectro Angular (EA).
% Procedimento: Considerar um arquivo de imagem como a distribuição de amplitude complexa em um plano (x,y) e calcular a amplitude complexa em um plano (ξ,η) , distante z_0 do plano (x,y) . Realizar o procedimento para cada componente virtual do campo complexo.

```
%-----  
%% Abrir o arquivo do Holograma #1  
A = imread('Hologramal');  
A1 = double(A);  
[M,N] = size(A1);  
%% Calcular o EA do Holograma e selecionar imagem virtual  
F = fftshift(fft2(fftshift(A1)));  
B = log(abs(F));  
[~,u] = imcrop(B,[]);  
close  
y(1) = round(u(1));  
y(2) = round(u(2));  
y(3) = round(u(3));  
y(4) = round(u(4));  
F = F(y(2):y(2)+y(4),y(1):y(1)+y(3));  
%% Determinar as variáveis:  
zo = 0; %distância de reconstrução em mm. Quando imagem é formada no plano  
do holograma zo = 0.  
lambda = 5.32e-04; %comprimento de onda em mm  
k = 2*pi/lambda; %número de onda  
dx = 4.65e-03; %dimensão dos pixels da CCD em mm. dx = dy  
%% Definir as frequências angulares e executar propagação  
% formar uma matriz do tamanho original do holograma adicionando zeros e  
posicionar o recorte no centro da matriz.  
[Y2,X2]=size(F);  
dy2=(M-Y2)/2;  
dx2=(N-X2)/2;  
Cut = zeros(Y2+2*dy2,X2+2*dx2);  
Cut(1+dy2:Y2+dy2,1+dx2:X2+dx2)= F(1:Y2,1:X2); %Cut é uma matriz de zeros  
com a porção recortada (F)em seu centro.  
fex = 1/(dx);fey=fex;  
fx=[-fex/2:fex/N:fex/2-fex/N];  
fy=[-fey/2:fey/M:fey/2-fey/M];  
[FX,FY]= meshgrid(fx,fy);  
D = Cut; %Espectro Angular em z = 0; A(kx, ky;0) em z = 0;  
E = exp(2.*pi.*1i.*zo.*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));% termo de  
propagação.  
G = D.*E; % Novo espectro angular em z = zo  
H1 = fftshift(iff2(fftshift(G)));  
%% Cálculo das imagens de fase e intensidade da primeira componente  
Intensity1 = abs(H1);  
Phase1 = angle(H1);  
%-----  
%% Abrir o arquivo do Holograma de referência #1  
A = imread('Referencial');  
A1 = double(A);
```

```

[M,N] = size(A1);
%% Calcular o EA do Holograma e selecionar imagem virtual
F = fftshift(fft2(fftshift(A1)));
F = F(y(2):y(2)+y(4),y(1):y(1)+y(3));
%% Definir as frequências angulares e executar propagação
% formar uma matriz do tamanho original do holograma adicionando zeros e
posicionar o recorte no centro da matriz.
[Y2,X2]=size(F);
dy2=(M-Y2)/2;
dx2=(N-X2)/2;
Cut = zeros(Y2+2*dy2,X2+2*dx2);
Cut(1+dy2:Y2+dy2,1+dx2:X2+dx2)= F(1:Y2,1:X2); %Cut é uma matriz de zeros
com a porção recortada (F)em seu centro.
fex = 1/(dx);fey=fex;
fx=[-fex/2:fex/N:fex/2-fex/N];
fy=[-fey/2:fey/M:fey/2-fey/M];
[FX,FY]= meshgrid(fx,fy);
D = Cut; %Espectro Angular em z = 0; A(kx, ky;0) em z = 0;
E = exp(2.*pi.*1i.*zo.*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));% termo de
propagação.
G = D.*E; % Novo espectro angular em z = zo
H1 = fftshift(iff2(fftshift(G)));
%% Cálculo das imagens de fase e intensidade da primeira componente
IntensityR = abs(H1);
PhaseR = angle(H1);
Phasel = Phase - PhaseR;
C1 = Phasel + (2*pi)*(Phasel < 0); %Mapa de fase com incrementos de fase
compensados.
%-----
%% Abrir o arquivo do Holograma #2
A = imread('Holograma2');
A2 = double(A);
[M,N] = size(A2);
%% Calcular o EA do Holograma e selecionar imagem virtual
F = fftshift(fft2(fftshift(A2)));
B = log(abs(F));
[~,u] = imcrop(B,[]);
close
y(1) = round(u(1));
y(2) = round(u(2));
y(3) = round(u(3));
y(4) = round(u(4));
F = F(y(2):y(2)+y(4),y(1):y(1)+y(3));
%% Determinar as variáveis:
zo = 0; %distância de reconstrução em mm. Quando imagem é formada no plano
do holograma zo = 0.
lambda = 5.32e-04; %comprimento de onda em mm
k = 2*pi/lambda; %número de onda
dx = 4.65e-03; %dimensão dos pixels da CCD em mm. dx = dy
%% Definir as frequências angulares e executar propagação
% formar uma matriz do tamanho original do holograma adicionando zeros e
posicionar o recorte no centro da matriz.
[Y2,X2]=size(F);
dy2=(M-Y2)/2;
dx2=(N-X2)/2;
Cut = zeros(Y2+2*dy2,X2+2*dx2);
Cut(1+dy2:Y2+dy2,1+dx2:X2+dx2)= F(1:Y2,1:X2); %Cut é uma matriz de zeros
com a porção recortada (F)em seu centro.
fex = 1/(dx);fey=fex;
fx=[-fex/2:fex/N:fex/2-fex/N];
fy=[-fey/2:fey/M:fey/2-fey/M];

```

```

[FX,FY]= meshgrid(fx,fy);
D = Cut; %Espectro Angular em z = 0; A(kx, ky;0) em z = 0;
E = exp(2.*pi.*1i.*zo.*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));% termo de
propagação.
G = D.*E; % Novo espectro angular em z = zo
H2 = fftshift(iff2(fftshift(G)));
%% Cálculo das imagens de fase e intensidade da primeira componente
Intensity2 = abs(H2);
Phase2 = angle(H2);
%-----
%% Abrir o arquivo do Holograma de referência #2
A = imread('Referência2');
A2 = double(A);
[M,N] = size(A2);
%% Calcular o EA do Holograma e selecionar imagem virtual
F = fftshift(fft2(fftshift(A2)));
F = F(y(2):y(2)+y(4),y(1):y(1)+y(3));
%% Definir as frequências angulares e executar propagação
% formar uma matriz do tamanho original do holograma adicionando zeros e
posicionar o recorte no centro da matriz.
[Y2,X2]=size(F);
dy2=(M-Y2)/2;
dx2=(N-X2)/2;
Cut = zeros(Y2+2*dy2,X2+2*dx2);
Cut(1+dy2:Y2+dy2,1+dx2:X2+dx2)= F(1:Y2,1:X2); %Cut é uma matriz de zeros
com a porção recortada (F)em seu centro.
fex = 1/(dx);fey=fex;
fx=[-fex/2:fex/N:fex/2-fex/N];
fy=[-fey/2:fey/M:fey/2-fey/M];
[FX,FY]= meshgrid(fx,fy);
D = Cut; %Espectro Angular em z = 0; A(kx, ky;0) em z = 0;
E = exp(2.*pi.*1i.*zo.*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));% termo de
propagação.
G = D.*E; % Novo espectro angular em z = zo
H2 = fftshift(iff2(fftshift(G)));
%% Cálculo das imagens de fase e intensidade da primeira componente
IntensityR2 = abs(H2);
PhaseR2 = angle(H2);
Phase2 = Phase2 - PhaseR2; %Mapa de fase com incrementos de fase
compensados.
C2 = Phase2 + (2*pi)*(Phase2 < 0);
%% Cálculo da diferença de fase Total
Phase3 = C1 - C2; %Mapa das diferenças de fase do campo complexo
S = imcrop(PhaseFinal,[]); %Seleção da região de referência: sem objeto (A)
S = mean2(S); %Média da fase da região A
T = imcrop(PhaseFinal,[]); %Seleção da região do objeto (B)
T = mean2(T); %Média da fase da região B
PhaseFinal = S - T; %Mapa das diferenças de fase entre as componentes
ortogonais do campo complexo transmitido pelo objeto.

```

A.4. Código em Matlab® para determinação do dicroísmo linear.

% Função: Cálculo das curvas de intensidade para determinação do dicroísmo linear
% Procedimento: calcular o campo complexo no plano focal posterior da lente objetiva, obter a imagem de intensidade desse campo para cada componente e executar uma varredura radial sobre essa imagem

```
%-----  
%% Abrir o arquivo do Holograma  
A = imread('Holograma');  
A1 = double(A);  
[M,N] = size(A1);  
%% Calcular o EA do Holograma e selecionar imagem virtual  
F = fftshift(fft2(fftshift(A1)));  
h = fspecial('gaussian', 960, 0.5); %Filtro gaussiano para suavização das  
bordas da abertura retangular  
MO = imfilter(F,h);  
F = MO;  
B = log(abs(F));  
[~,u] = imcrop(B,[]);  
close  
y(1) = round(u(1));  
y(2) = round(u(2));  
y(3) = round(u(3));  
y(4) = round(u(4));  
F = F(y(2):y(2)+y(4),y(1):y(1)+y(3));  
%% Determinar as variáveis:  
zo = 0; %distância de reconstrução em mm. Quando imagem é formada no plano  
do holograma zo = 0.  
lambda = 5.320e-04; %comprimento de onda em mm  
k = 2*pi/lambda; %número de onda  
dx = 4.65e-03; %dimensão dos pixels da CCD em mm. dx = dy  
%% Definir as frequências angulares e executar propagação  
%formar uma matriz do tamanho original do holograma adicionando zeros e  
posicionar o recorte no centro da matriz.  
[Y2,X2]=size(F);  
dy2=(M-Y2)/2;  
dx2=(N-X2)/2;  
Cut = zeros(Y2+2*dy2,X2+2*dx2);  
Cut(1+dy2:Y2+dy2,1+dx2:X2+dx2)= F(1:Y2,1:X2); % Cut é uma matriz de zeros  
com a porção recortada (F)em seu centro.  
fex = 1/(dx);fey=fex;  
fx=[-fex/2:fex/N:fex/2-fex/N];  
fy=[-fey/2:fey/M:fey/2-fey/M];  
[FX,FY]= meshgrid(fx,fy);  
D = Cut; %Espectro Angular em z = 0; A(kx, ky;0) em z = 0;  
%% Cálculo da distância do plano do holograma ao plano de difração  
Ord = 0;  
for d = 1:2:500; %intervalo de varredura  
I = D.*exp(2*pi.*i.*d.*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));  
I2 = ifft2(fftshift(I));  
I3 = abs(I2).^2;  
Ord = Ord + 1;  
I3_max(Ord) = max(I3(:));  
d_foco(Ord) = d;  
d_f(Ord) = max(max( abs(ifft2(fftshift(I))).^2));  
plot(d,max(max(d_f(Ord))),':.');  
xlabel('d' (mm));
```

```

        ylabel('|\psi^f(d')|^2 ]_m_a_x');
end
II = find(I3_max == max(I3_max(:)));
zo = II; %distância do plano do holograma ao plano focal posterior da lente
objetiva
%% Propagação do plano do holograma ao plano de difração
G = D.*exp(2*pi.*li.*zo.*sqrt((1./(lambda^2))-(FX).^2-(FY).^2));
H = fftshift(iff2(fftshift(G)));
Fraunhofer = abs(H); %Padrão de Difração de Fraunhofer
[y,x] = find((Fraunhofer) == max(max((Fraunhofer)))); %Posição do máximo do
padrão de difração
[M,N] = size(Fraunhofer);
deltay = abs((M/2)-y);
ci = [y, x, ((M/2)-deltay)] %centro e raio do círculo da máscara
imageSize = size(Fraunhofer);
[xx,yy] = ndgrid((1:imageSize(1))-ci(1),(1:imageSize(2))-ci(2));
mask = ((xx.^2 + yy.^2)<ci(3)^2);
cropped = (zeros(size(Fraunhofer)));
cropped (:,:,1) = Fraunhofer (:,:,1).*mask;
FFT = log(1+abs(cropped));
NN = min(size(FFT));
cont1 = 0;
for II = 0:1:(round(((M/2)-deltay)-1));
    cont = 0;
    cont1 = cont1 + 1;
    for JJ = 0:1:360;
        cont = cont + 1;
        Cx = round(x) + round(II .* cos(JJ.*pi/180));
        Cy = round(y) - round(II .* sin(JJ.*pi/180));
        Espectro(cont1,cont) = FFT(Cy,Cx);
    end
end
Curva = (mean(Espectro));
figure
subplot(1,1,1)
plot(0:1:360,(Curva)),axis([0 360 min(Curva) max(Curva)])

```