UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAMILA DE PAULA D'ALMEIDA

Desenvolvimento e caracterização de um microscópio óptico
holográfico sem lentes *in-line*

São Carlos

2018

CAMILA DE PAULA D'ALMEIDA

Desenvolvimento e caracterização de um microscópio óptico
holográfico sem lentes *in-line*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Física do Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Física Básica

Orientador: Sebastião Pratavieira

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

D'Almeida, Camila de Paula

Desenvolvimento e caracterização de um microscópio óptico holográfico sem lentes *in-line* / Camila de Paula

D'Almeida; orientador Sebastião Pratavieira - versão corrigida -- São Carlos, 2018.

76 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Básica) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Microscópio óptico. 2. Holografia. 3. Sem lentes. 4. Portátil. 5. Recuperação de fase. I. Pratavieira, Sebastião, orient. II. Título.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda (e tanta) graça concedida.

Aos meus pais, Milton e Maria, e aos meus irmãos, Marcos e Matheus, por todo amor; pelo incentivo aos meus estudos e carreira e pelo aconchego e conforto com que me acolhem todos os dias.

À toda minha família, que me ensina a todo momento como viver no amor.

Ao João Lucas, pela paciência, cuidado e amor.

Aos meus amigos, em especial aos que, pelo convívio e atenção, primeiro recebem e percebem minhas alegrias e angustias e cujos gestos diários me fazem agradecer todos os dias.

Sou grata à Amanda, Paulinha, Larissa, Didi, Shirley, Kate, por se fazerem presença, por todo carinho, convívio, risadas e consolos.

Aos pais que eu ganhei no laboratório: Hilde e Renan; que se tornaram lar. E por serem referências de profissionais para mim.

Aos amigos que me acolheram (e acolhem) no Ministério Universidades Renovadas.

Ao Ramon, pelos ensinamentos, discussões e amizade.

A meu orientador, Sebastião, que acolheu com entusiasmo essa orientação. Pela presença, confiança, discussões, ensinamentos e valiosa orientação.

À professora Cristina e ao professor Vanderlei, por serem, antes de tudo, exemplos de profissionais e também por acompanhar este trabalho e auxiliá-lo com toda a experiência profissional que trazem.

Ao Instituto de Física de São Carlos, ao Grupo de Óptica, ao CEPOF, aos funcionários da Secretaria, do LIEPO e do LAT. E também aos funcionários da biblioteca, por todo trabalho e cuidado.

E, por fim, ao importante auxílio das agências de fomento FAPESP e CNPq.

RESUMO

D'ALMEIDA, C. P. **Desenvolvimento e caracterização de um microscópio óptico holográfico sem lentes *in-line***. 2018. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

O microscópio é um instrumento de grande relevância para o contexto científico. Dentre as variadas montagens desse instrumento óptico, os microscópios sem lentes têm chamado atenção por serem robustos, reduzidos em tamanho e custo, e ainda possibilitarem imagens com amplo campo de visão (usualmente da ordem de algumas dezenas de mm^2). Dentro dessa categoria, existem os microscópios holográficos *in-line*, os quais obtêm a imagem da amostra a partir da reconstrução numérica de um holograma adquirido por um sensor digital de imagem. Este trabalho tem o objetivo de construir um desses microscópios para observar amostras semitransparentes. O microscópio desenvolvido ao longo deste trabalho tem sua iluminação baseada no uso de um LED associado a um *pinhole*, cuja finalidade é aumentar a coerência temporal da luz. Com isso, a iluminação proveniente do *pinhole* percorre uma distância de aproximadamente 10 cm até atingir a amostra, posicionada sobre uma lâmina de vidro. À uma distância mínima da amostra, está posicionado um sensor CMOS, responsável pela aquisição do padrão de interferência da parcela da luz que foi transmitida sem desvio pela amostra e da parte da luz que foi difratada por ela. Esse padrão de intensidade, chamado holograma, é reconstruído numericamente de modo a obter uma boa imagem do objeto-alvo. A reconstrução da imagem medida é feita considerando a propagação da luz de volta ao plano de do objeto e, depois, estimando a fase referente à luz incidente no sensor no instante da medida. Essa primeira etapa resulta na imagem da amostra com a influência de um artefato muito conhecido na holografia: a imagem gêmea. Enquanto a reconstrução de fase reconstrói a imagem de uma forma mais completa, reduzindo a influência de tais artefatos. A reconstrução de fase é feita com o método multialturas, o qual faz uso de mais de uma imagem medida, com distâncias diferentes entre a amostra e o sensor, como entrada para o algoritmo desenvolvido. Utilizando um sensor de 10 MP (3856×2764 pixels), com o pixel de $1,67 \mu\text{m}$, construímos um microscópio holográfico sem lentes com um campo de visão de quase 30 mm^2 e resolução de aproximadamente $3 \mu\text{m}$.

Palavras-chave: Microscópio óptico. Holografia. Sem lentes. Portátil. Recuperação de fase.

ABSTRACT

D'ALMEIDA, C. P. **Development and characterization of an in-line lensless holographic optical microscope.** 2018. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The microscope is an instrument of great relevance in the scientific context. Among various assembly of this optic instrument, the lensless microscope have had drawing attention by been robust, with small size and low cost and, in addition, enable imaging with a large field of view (usually about tens of mm^2). Inside this category, there is the in-line holographic microscopes, which achieve the sample image from the numerical reconstruction of a hologram acquired by an image digital sensor. This study have the objective of develop one of these microscopes to image semitransparent samples. The microscope developed over this study has its illumination based on the use of an LED associated with a pinhole, whose purpose is to increase the light temporal coherence. Therefore, illumination from the pinhole goes 10 cm until reach the sample, positioned over the glass slide. From a minimal distance of the sample, a CMOS sensor is positioned, which is responsible to acquire the interference pattern of the transmitted light with the diffracted light. This intensity pattern, called hologram, is numerically reconstructed in order to get a great image of target object. The reconstruction of the measured image is performed considering the back propagation of the light to the object plane and, then, estimating the phase related to the incident light over the sensor at the time of the measurement. This first step results in a sample image influenced by an artifact well-known in the holography: the twin-image. Whereas phase reconstruction reconstruct the image more fully, reducing the artifact influence. Phase reconstruction is performed using the multiheight method, which uses more than one measured image, with different distances between the sample and sensor, as input to the developed algorithm. Using a 10 MP (3856×2764 pixels) sensor, with a pixel size of $1.67 \mu\text{m}$, we built a lensless holographic microscope with a field of view near of 30 mm^2 and resolution of approximately $3 \mu\text{m}$.

Keywords: Optical microscope. Holography. Lensless. Portable. Phase recovery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação geométrica da reflexão e refração da luz.	19
Figura 2 - Representação do Princípio de Huygens.	20
Figura 3 - Propagação de uma componente planar da onda.....	23
Figura 4 - Ilustração do efeito da coerência temporal (a) e espacial (b) no padrão de interferência gerado pela fonte de luz.	25
Figura 5 - (a) Gravação de um holograma na configuração in-line e (b) Reconstrução do holograma gravado em (a), com a presença da imagem reconstruída do objeto e da imagem gêmea – real e virtual. Para o observador, as imagens real e virtual estão superpostas.	28
Figura 6 - (a) Gravação de um holograma na configuração off-axis e (b) Reconstrução do holograma gravado em (a), com a presença da imagem reconstruída do objeto e da imagem gêmea – real e virtual. Para o observador, as imagens real e virtual não estão superpostas.	29
Figura 7 - Representação da montagem do sistema com seus principais componentes: LED (1), pinhole (2), lâmina com amostra (3), sensor digital de imagem (4).....	40
Figura 8 - Espectro de emissão do LED usado na montagem do microscópio holográfico sem lentes.	41
Figura 9 - Foto (à esquerda) e representação da montagem (à direita) da primeira versão do microscópio apresentado neste trabalho.....	42
Figura 10 -Foto (à esquerda) e representação da montagem (à direita) da segunda versão do microscópio apresentado neste trabalho.....	43
Figura 11 -Foto da câmera da Thorlabs utilizada na primeira versão do microscópio (à esquerda) e da câmera baseada em Arduino, fabricada pela ArduCam, utilizada em nossa segunda versão (à direita).....	44
Figura 12- Foto da câmera e sua placa de controle utilizadas na segunda versão do microscópio construído neste trabalho.....	45
Figura 13- Representação da conexão da placa de controle com o módulo do sensor e o computador.....	45
Figura 14 -Etapas do processo de aquisição e reconstrução da imagem em um microscópio holográfico digital in-line.....	46
Figura 15 -Representação dos planos do holograma e das imagens do objeto: a imagem original e a imagem gêmea, causada pela perda da informação de fase na aquisição do holograma.....	47
Figura 16- Fluxograma da propagação de um campo complexo do plano em $z=z_1$ para $z=z_2$ pelo Método do Espectro Angular.	49

Figura 17 -ilustração do processo de aquisição das imagens em múltiplas alturas. A lâmina, sobre a qual está a amostra, permanece em uma posição fixa, enquanto o sensor digital tem seu posicionamento variado em altura (z).	50
Figura 18 -Representação dos planos de medida, correspondentes a diferentes alturas do sensor. Esses são igualmente espaçados (por uma distância Δz) e são representados por M_i , em que i é um índice que varia de 1 até a quantidade máxima de medidas feitas (n).	50
Figura 19 -Diagrama do processamento multialturas utilizado neste trabalho.	51
Figura 20 -Imagens do estudo de profundidade das informações codificadas em um holograma. Um holograma sintético foi criado a partir da imagem original, a qual contém objetos em diferentes profundidades. A reconstrução desse mesmo holograma foi feita de modo a encontrar cada um dos objetos em seu plano focal.	56
Figura 21 -Ilustração de um alvo USAF 1951 positivo.....	56
Figura 22 -Parte de uma imagem de um padrão USAF 1951 (a) utilizada como base para a construção do holograma sintético (b).....	57
Figura 23 -Ilustração dos planos para onde o holograma sintético foi propagado.	58
Figura 24 -Reconstrução do holograma sintético sem a informação de fase. E comparação do resultado da propagação desse holograma a uma distância z para frente (b) e (c) e para trás (d) e (e) do plano de referência.	59
Figura 25 -Reconstrução do holograma sintético com a informação de fase. E comparação do resultado da propagação desse holograma a uma distância z para frente (b) e (c) e para trás (d) e (e) do plano de referência.	59
Figura 26 -Holograma medido com o sensor MT9M001 e sua variação ao longo dos processamentos digitais realizados sobre ele.....	61
Figura 27 -Comparação dos perfis de intensidade do elemento segundo do grupo 6 da imagem do holograma original medido com o sensor MT9M001, da reconstrução natural feita a partir dele e do resultado do processamento multialturas com 10 iterações.....	62
Figura 28 -Holograma medido com o sensor MT9J001 e sua variação ao longo dos processamentos digitais realizados sobre ele.....	63
Figura 29 -Comparação dos perfis de intensidade do elemento 5 do grupo 6 da imagem do holograma original medido com o sensor MT9J001, da reconstrução natural feita a partir dele e do resultado do processamento multialturas com 10 iterações.....	64
Figura 30 -Comparação das imagens adquiridas com nosso microscópio, processadas pelo algoritmo de multi alturas, com a imagem da mesma amostra feita por um microscópio óptico tradicional de transmissão. Da direita para esquerda: Imagem feita por um microscópio óptico tradicional com objetiva de 10x e imagens processadas a partir de hologramas adquiridos pelo sensor MT9J001 e pelo sensor MT9M001.....	65

LISTA DE SIGLAS

CCD	Charge coupled device
CMOS	Complementary metal oxide semiconductor
LED	Light Emitting Diode
MP	Megapixel
NA	Numerical Aperture
USAF	United States Air Force

SUMÁRIO

1	Introdução	17
1.1	Teoria da difração	19
1.1.2	Método do Espectro Angular	22
1.2	Fontes de luz	24
1.2.1	Coerência de fontes luminosas	25
1.3	Holografia	26
1.3.1	Holografia in-line.....	27
1.3.2	Holografia digital.....	32
1.3.3	Microscopia sem lentes baseada na holografia digital	33
1.4	Sensores	34
1.5	Revisão da literatura	35
2	Objetivos	37
3	Material e métodos	39
3.1	Montagem do sistema.....	39
3.2	Recuperação de fase	46
3.3	Propagação da luz: Método do Espectro Angular	47
3.4	Reconstrução de fase: multialturas.....	49
3.5	Resolução do sistema.....	52
4	Resultados e Discussão	55
4.1	Hologramas sintéticos	55
4.2	Hologramas medidos.....	59
4.2.1	Resolução	64
4.2.2	Campo de visão.....	65
4.3	Discussão	66
5	Conclusão e perspectivas.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73

1 Introdução

A informação visual tem uma grande importância para a humanidade. De tal forma que, no cotidiano, quando buscamos mais detalhes sobre algum objeto, é comum que a primeira ação seja observá-lo mais de perto. No entanto, a visão humana é limitada, impedindo-nos de visualizar com clareza detalhes muito pequenos a olho nu.¹

Essa limitação, imposta naturalmente, foi um incentivo para o desenvolvimento de instrumentos capazes de aumentar a habilidade humana de observar o mundo ao redor. Historicamente, o elemento que tornou isso possível, com a ampliação de objetos, é a lente.

Não se sabe ao certo a partir de quando se teve conhecimento sobre as propriedades da magnificação de lentes convergentes, mas existem documentos que comprovam que os romanos já utilizavam esferas cristalinas para provocar queimaduras.²

No fim do século XVI foi descoberto um método que combinava lentes para obter uma imagem maior que a original. E foi, então, que o microscópio passou a se tornar conhecido por possibilitar a observação de pequenos objetos. Essa sua característica foi, portanto, expressa na própria palavra, que tem origem do grego *Mikros*, que significa pequeno e *Skopein*, ver.

A história da invenção do microscópio é rodeada por incertezas. Os créditos da invenção do primeiro microscópio composto (com duas ou mais lentes) é geralmente atribuído à Hans Janssen (1534-1592) e seu filho Zaccharias Janssen (1587-1638), dois holandeses fabricantes de lentes para óculos, e essa criação é datada por volta de 1595.

Um dos livros iniciais da microscopia, intitulado “Micrographia”, foi escrito por Robert Hooke (1635-1703) e publicado em 1665. Nele Hooke publicou seus resultados de estudos feitos com microscópios. Seu primeiro estudo foi observando um pedaço de cortiça cortado com uma lâmina de barbear. Foi com ele que Hooke nomeou a unidade básica da vida: a célula. Juntamente com os resultados, ele também reportou a construção dos microscópios usados.

Logo, é notável que esse instrumento óptico tem um papel importante para a biologia, possibilitando descobertas desde suas primeiras aplicações. Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) usou seu microscópio de uma única lente para observar células de bactéria e outros micro-organismos, além de outras observações de amostras biológicas.³

Desde então, o microscópio se fez ainda mais presente no contexto científico e suas aplicações se estenderam para o uso clínico, industrial e de ensino. Essa importância

estimulou um grande avanço na microscopia, de modo a fazê-la acompanhar o desenvolvimento tecnológico ao longo dos séculos.

A origem natural do método empregado para a observações das imagens por meio de microscópios teve base no funcionamento da nossa visão, por meio de transmissão e reflexão da luz incidida sobre as amostras. No entanto, ao longo dos anos a microscopia pode abranger outros métodos para a visualização das amostras ainda com luz, por meio de contraste de fase, difração, polarização e fluorescência, por exemplo. E também utilizando outras fontes, como feixes de elétrons no caso da microscopia eletrônica.⁴

Atualmente a microscopia tem se apresentado em numerosas configurações, abrangendo cada vez mais suas aplicações. Uma das possibilidades contemporâneas dessa técnica é sua apresentação em instrumentações simples e de tamanho reduzido, com a possibilidade de uso facilitado para além de laboratórios, como é o caso da microscopia sem lentes.

A microscopia sem lentes é uma técnica de imageamento de amostras em escala microscópica, caracterizada pela ausência de lentes entre a amostra e o sensor. Comparada às outras formas de microscopia tradicional, esse novo conceito de instrumentação para imagens microscópicas possui a vantagem de ser robusto, reduzido em tamanho e custo, além de possibilitar imagens com amplo campo de visão (da ordem de algumas dezenas de mm²), utilizando para isso sensores digitais de imagem.⁵

Podemos classificar os equipamentos que se enquadram nessa categoria em microscópios sem lentes baseados em imagens de sombras, fluorescência e difração.⁶

Os equipamentos que fazem imagens microscópicas baseadas em sombras são montados de modo a ter a amostra muito próxima ao sensor - a uma distância de aproximadamente 1 µm um do outro. Dessa forma, a intensidade da luz difratada não é predominante na imagem gravada por transmissão da luz.⁷⁻⁹

O modo de atuação dos microscópios sem lentes baseados em fluorescência é similar, no entanto esses necessitam de um filtro óptico antes do sensor, já que a fluorescência tem comprimento de onda maior que o de excitação e, portanto, deve ter sua informação armazenada separadamente.⁹⁻¹⁰

Já os microscópios sem lentes baseados em imagens de difração são construídos de maneira que privilegiem a intensidade da luz difratada sobre o sensor. Esses costumam ter a amostra um pouco mais distante do sensor de imagem - com uma distância mínima de aproximadamente 1 mm - e por isso possuem uma liberdade um pouco maior com relação à profundidade da amostra medida. Esses equipamentos têm seu funcionamento fundamentado

no processamento digital das imagens medidas, o qual é responsável por reconstruir as imagens do objeto usando cálculos que simulem a propagação inversa da luz para o plano da amostra.

Dentro dessa segunda categoria de microscópios é que se encontram os microscópios holográficos sem lentes. As imagens adquiridas por esses sistemas ópticos, na configuração *in-line*, são descritas como sendo o padrão de interferência entre luz difratada pela amostra e a luz transmitida por ela.

Por fazerem imagens de padrões de interferência, os microscópios holográficos sem lentes necessitam de uma fonte de luz com adequada coerência.

1.1 Teoria da difração

A refração, a reflexão e a difração são os fenômenos que descrevem os desvios da trajetória retilínea da luz. A refração acontece quando a luz tem sua velocidade e direção alterada ao passar por meios caracterizados com diferentes índices de refração. Enquanto a reflexão descreve a luz que, ao incidir sobre uma superfície desvia com o mesmo ângulo de incidência com relação à normal. E a difração, por fim, pode ser entendida como o fenômeno que descreve qualquer desvio da trajetória da luz que não é interpretado como refração ou reflexão.¹²

Figura 1 - Representação geométrica da reflexão e refração da luz.
Fonte: Elaborada pela autora.

O fenômeno da difração foi descrito primeiramente por Grimaldi, num trabalho publicado em 1665. Nessa publicação, ele descrevia, por meio de um experimento, detalhes da projeção da luz depois de atravessar uma pequena abertura, em que foi possível verificar uma transição gradual da área iluminada para a sombra - fato que não era esperado pela teoria corpuscular da luz, defendida até então.¹²

Huygens foi o primeiro a colaborar com a teoria da difração, introduzindo o conceito de ondas secundárias para explicar a propagação da luz, em 1678. O conhecido *princípio de Huygens*, considera que cada ponto de uma frente de onda primária corresponde a uma fonte de ondas secundárias e que, portanto, a sobreposição dessas inúmeras ondas secundárias descreve a onda primária no instante consecutivo.

Figura 2 - Representação do Princípio de Huygens.

Fonte: ZÍLIO¹³

O desenvolvimento da teoria ondulatória da luz foi mais vagaroso durante o século XVIII, porque Newton defendia a teoria corpuscular e exercia uma grande influência no meio científico, fundamentada por suas grandes contribuições, principalmente na área da óptica.

Em 1804, Thomas Young foi quem propôs o revolucionário conceito de interferência da luz, com a realização de um experimento em que pode verificar que a soma de luz com luz podia resultar em sombra!

Uma década mais tarde, Fresnel propôs uma formulação matemática para o princípio de Huygens e da interferência. Em 1860, o importante reconhecimento da luz como onda eletromagnética foi feito por Maxwell. Mas foi Gustav Kirchhoff, em 1882, que estabeleceu uma formulação matemática mais rigorosa para a difração, mostrando que o princípio de Huygens-Fresnel tinha origem na equação de onda. Dez anos depois, algumas inconsistências

foram encontradas na teoria de Kirchhoff por Poicaré e depois por Sommerfeld, que, por sua vez, fez pequenas modificações nessa teoria.

As formulações de Kirchhoff e Sommerfeld possuem algumas aproximações que tornam a teoria mais simples, como é o caso do tratamento escalar do campo elétrico.¹²

A equação de onda, decorrente das equações de Maxwell, descreve tanto a relação do campo elétrico $\vec{E}$ quanto do campo magnético $\vec{H}$ – que são generalizados aqui pelo campo $\vec{U}$ – é dada por:

$$\nabla^2 \vec{U} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{U} = 0 \quad (1)$$

Cada componente dos campos $\vec{E}$ e $\vec{H}$ segue a mesma relação, apresentada pela equação 1:

$$\nabla^2 U_x - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} U_x = 0 \quad (2)$$

Em que ∇^2 é o Laplaciano, n é o índice de refração, c é a velocidade da luz no vácuo e E_x é a componente x do campo elétrico $\vec{E}$.

Por isso, o comportamento de todas as componentes de $\vec{E}$ e $\vec{H}$ pode ser sumarizado em uma só equação.

O tratamento escalar descreve corretamente ondas eletromagnéticas em meios dielétricos uniformes. Portanto, para casos que fogem desse escopo, tal tratamento é tido como uma aproximação. No estudo da difração, a teoria escalar é válida para situações em que a abertura responsável por difratar a onda é grande comparada ao comprimento de onda. Isso porque, dentro dessas condições, os efeitos de acoplamento de $\vec{E}$ e $\vec{H}$, desconsiderados no caso escalar, serão pequenos.

Se considerarmos, portanto, uma onda monocromática, podemos escrever o campo escalar como ¹²:

$$u(x, y, z, t) = a(x, y, z) \cos[2\pi vt + \phi(x, y, z)] \quad (3)$$

Sendo x, y, z as variáveis referentes à posição, t a variável temporal e v a frequência da onda.

Ou reescrevê-lo como a parte real de um campo complexo:

$$u(x, y, z, t) = \text{Re}\{U(x, y, z)e^{-i2\pi vt}\} \quad (4)$$

Com $U(x, y, z)$ sendo uma função complexa da posição, dada por:

$$U(x, y, z) = a(x, y, z)e^{-i\phi(x, y, z)} \quad (5)$$

Logo, para que o campo $u(x, y, z, t)$ possa representar uma onda, ele deve satisfazer a equação 1. Assim, se substituirmos a expressão 4 em 1, obteremos a equação de Helmholtz:

$$(\nabla^2 + k^2)u(x, y, z, t) = 0 \quad (6)$$

Com $k = 2\pi n/\lambda$, em que λ é o comprimento de onda, cuja relação com a frequência ν é dada por $\lambda = c/\nu$.

1.1.2 Método do Espectro Angular

Como citado anteriormente, a teoria de Kirchhoff possuía algumas inconsistências devido às condições de contorno impostas, simultaneamente, ao campo e à sua derivada normal. Isso resultava em falhas da teoria em condições em que o ponto de observação era muito próximo à abertura responsável por difratar a luz. Apesar de suas limitações, essa mesma teoria, surpreendentemente, concordava muito bem com as observações experimentais.

As inconsistências presentes na descrição teórica da difração desenvolvida por Kirchhoff foram removidas com o desenvolvimento da teoria de Rayleigh-Sommerfeld.¹²

Além dessas formulações tradicionais, um outro método é também usado para descrever a difração: o método do espectro angular. Esse último é fundamentado por uma interpretação mais intuitiva e dispensa a imposição de condições de contorno sobre o campo a ser detalhado.

Apesar das diferentes abordagens teóricas, o método do espectro angular e a solução de Rayleigh-Sommerfeld apresentam os mesmos resultados para os campos difratados.¹⁴

Nessa seção, apresentaremos o método do espectro angular, no qual a teoria desse trabalho foi fundamentada.

A teoria considera a propagação perpendicular ao campo. Dessa forma, consideraremos o campo inicial no plano em $z=0$, portanto, a propagação será dada ao longo do eixo z , sem perda de generalidade.

Assim sendo, para um campo $E(x, y, z = 0)$, sua decomposição pode ser escrita como

$$A_0(k_x, k_y) = \mathcal{F}\{E(x_0, y_0)\} = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{+\infty} E(x_0, y_0) e^{-i(k_x x_0 + k_y y_0)} dx dy \quad (7)$$

Em que $A(k_x, k_y)$, chamado *espectro angular*, é a própria transformada de Fourier do campo elétrico E .

Para qualquer plano paralelo, ou seja, para diferentes valores de z , podemos fazer a decomposição em termos de ondas planas:

$$E(x, y, z) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{+\infty} A(k_x, k_y, z) e^{i(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (8)$$

Como a equação de Helmholtz é uma equação linear, podemos garantir que $E(x, y, z)$ satisfaça a equação de onda desde que cada componente a satisfaça. Dentro dessa condição, temos que, para cada componente:

$$\left[\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + k^2 \right] A(k_x, k_y, z) e^{i(k_x x + k_y y)} = 0 \quad (9)$$

Podemos confirmar, por meio de uma substituição de 8 em 9, que a expressão 10 é solução:

$$A(k_x, k_y, z) = A(k_x, k_y) e^{i(k_z z)} \quad (10)$$

Com

$$k_z = \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}$$

Figura 3 - Propagação de uma componente planar da onda.

Fonte: KIM¹⁴

Então, podemos reescrever o campo da luz propagada da seguinte forma:

$$E(x, y, z) = \mathcal{F}^{-1}\{A(k_x, k_y) \cdot e^{ik_z z}\} \quad (11)$$

Em que o termo $e^{ik_z z}$ pode ser entendido como a *função transferência* associada a cada componente planar da onda.

Considerando a igualdade 12:

$$E(x, y, z) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ A(k_x, k_y) \cdot \exp \left(i \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} z \right) \right\} \quad (12)$$

É interessante notar que, dependendo dos valores que os termos dentro de dentro da raiz quadrada da exponencial assumem, é possível que a exponencial complexa seja um termo oscilatório, ou então, que corresponda a um decaimento. O que resulta, respectivamente, em ondas propagantes e ondas evanescentes.

$$k_x^2 + k_y^2 \leq k^2 : \text{ondas propagantes}$$

$$k_x^2 + k_y^2 > k^2 : \text{ondas evanescentes}$$

A propagação das ondas dentro dessas condições pode ser entendida como a imposição de um filtro passa-baixa ao campo, devido à própria natureza da difração.

1.2 Fontes de luz

A fonte de luz é uma parte indispensável de sistemas de microscopia óptica. Suas características são de grande importância, pois definem propriedades do sistema óptico. Por isso, são as exigências de cada sistema que determinam as características da fonte de luz a ser usada.

Outros elementos ópticos podem ser somados ao sistema para suprir as necessidades relacionadas com as características da luz. Lentes podem ser usadas para ampliar ou focalizar um feixe de luz, filtros espaciais podem aumentar a coerência temporal e filtros ópticos podem selecionar faixas espectrais requeridas, por exemplo.

Para a microscopia holográfica *in-line* sem lentes, o sistema deve ter coerência suficiente para que luz incidente sobre o sensor digital de imagem possa gerar um padrão de interferência. Essa necessidade delimita, portanto, o modo com que o microscópio deve ser construído e as fontes de luz que podem ser usadas.

A seguir, o conceito de coerência será abordado, juntamente com sua aplicação no contexto da holografia.

1.2.1 Coerência de fontes luminosas

A capacidade de interferência de duas ondas provenientes de uma mesma fonte luminosa é quantificada pelo grau de coerência dessa fonte. Essa característica é usualmente avaliada por meio da coerência espacial e da coerência temporal. Enquanto esse primeiro fator é influenciado principalmente pela largura de banda espectral da fonte de luz, o segundo é delimitado especialmente pelas dimensões da fonte de luz e por sua distância de uso.¹⁵ A Figura 4 representa o efeito de cada um desses fatores na interferência de frentes de ondas de uma mesma fonte de luz, depois de passarem por um anteparo com uma fenda dupla.

Figura 4- Ilustração do efeito da coerência temporal (a) e espacial (b) no padrão de interferência gerado pela fonte de luz.

Fonte: Adaptada de DENG ¹⁵

Como a técnica da holografia se baseia no princípio de interferência, ela é diretamente influenciada pelas características de coerência da fonte de luz usada. Consequentemente, nesse cenário, é comum o uso de lasers por esses serem, usualmente, fontes de luz de alta coerência espacial e temporal.

Apesar de os lasers, em geral, conduzirem as características da fonte de luz de modo a aparentemente se aproximarem mais do caso ideal (de máxima coerência espacial e temporal), eles costumam apresentar, juntamente com seus benefícios, algumas desvantagens para os sistemas de holografia.

Os altos valores de coerência dessas fontes são responsáveis por gerar efeitos de interferência da luz proveniente de vários pontos da amostra iluminada, chamados de *speckle*, além de interferências causadas por múltiplas reflexões em superfícies pertencentes ao sistema. E esses fatores contribuem para o aumento do ruído no holograma e, por consequência, na imagem do objeto reconstruído.

Nesse contexto, o trabalho¹⁵ mostrou que a redução da coerência temporal pode reduzir o *speckle* nas imagens, enquanto o aumento da coerência espacial, proporcionados por filtros espaciais, como *pinholes*, é capaz de aumentar a nitidez das imagens produzidas pela técnica.

Dessa forma, o uso de LEDs convencionais, filtrados espacialmente por uma pequena abertura circular (o chamado *pinhole*) com diâmetro da ordem de uma centena de micrômetros, tem sido amplamente empregados na construção de microscópios holográficos sem lentes.¹⁶⁻¹⁸ A presença desses elementos permitem a coerência necessária para a iluminação do sistema, reduzindo efeitos indesejados nas imagens por ele produzidas.

No caso ainda de microscópios holográficos sem lentes, há uma grande diversidade de montagens. Além do uso de fontes de luz de baixa coerência com filtros espaciais, como citado anteriormente, alguns sistemas fazem o uso de luz coerente (de lasers) acoplada a uma fibra óptica.¹⁹⁻²⁰ Para a redução de artefatos, algumas publicações sugerem até mesmo o uso dessas fontes abaixo de seu limiar laser.²¹ É importante notar que dentre a variedade existente de lasers, existem diferentes valores de coerência, sendo cada um associado a um tipo de montagem.

A propriedade da coerência de fontes luminosas não se limita à formação do holograma em sistemas de microscopia sem lentes. Ela influencia também a resolução das imagens produzidas, de forma que pode até mesmo ser responsável pela limitação da resolução espacial. Mais detalhes sobre essa influência estão na seção 1.2.1.

1.3 Holografia

Em 1948, D. Gabor publicou um novo princípio microscópico para superar as limitações causadas pelas aberrações inerentes às lentes em microscópios de feixe de elétrons.²² Esse novo princípio, que dispensava o uso de tais lentes, foi apresentado depois de ser comprovado também em um sistema óptico. A nova técnica apresentada por Gabor foi posteriormente denominada holografia.

A holografia é constituída essencialmente por duas etapas: a gravação do holograma e a posterior reconstrução da imagem do objeto contido nele. O holograma consiste em um padrão de interferência da luz proveniente da fonte (feixe referência) e da luz que interagiu com a amostra (feixe do objeto).

A origem da palavra holografia vem do grego, *holos* (todo), e exprime uma das características mais marcantes da técnica: a gravação da informação completa da luz, em amplitude e fase.

No contexto da holografia tradicional, a gravação do holograma era feita em filmes fotográficos e, portanto, envolvia processos fotoquímicos e dependia do tempo de revelação. A reconstrução da imagem do objeto era, então, feita a partir da incidência do feixe referência sobre o holograma, de modo a obter a imagem da amostra.

O desenvolvimento de sensores digitais de imagens e o aprimoramento dos mesmos, permitiu avanços para a técnica. O uso de dispositivos como CCDs (do inglês *charge coupled device* – dispositivo de carga acoplada) ou CMOS (do inglês *complementary metal oxide semiconductor* – semicondutor complementar de óxido metálico) possibilitou a digitalização da técnica, facilitando o processo de gravação do padrão de interferência e permitindo com que essa informação fosse processada por métodos numéricos para fazer a reconstrução digital da informação gravada.

1.3.1 Holografia in-line

A holografia possui um artefato já verificado por Gabor: a presença de uma segunda imagem do objeto encontrada na posição centrossimétrica com relação ao plano focal. Essa imagem, nomeada imagem gêmea, é explicada pela perda de informação do sinal da diferença de fase entre as ondas cuja interferência foi registrada no holograma. Tal artefato está presente nas diversas configurações da holografia tradicional e também da holografia digital.¹⁴

Quando Gabor desenvolveu o primeiro sistema de holografia ele não tinha fontes de luz de alta coerência à sua disposição, o que o fez optar por uma montagem que permitisse a interferência de dois feixes luminosos que se propagavam na mesma direção. Mais tarde, essa configuração passou a ser denominada *in-line*. Tal montagem possui uma dificuldade: a sobreposição da imagem gêmea com a imagem reconstruída do objeto.²³

Com o objetivo de suprimir o artefato da imagem gêmea na imagem reconstruída, Leith e Upatnieks propuseram a configuração *off-axis*, caracterizada pela propagação da luz de referência e do objeto em eixos diferentes.²⁴

Ainda que essa nova configuração tenha retirado opticamente a sobreposição da imagem gêmea com a imagem do objeto, a configuração original possui diversas vantagens,

aliadas à atual possibilidade de remoção do indesejado artefato da imagem gêmea por métodos computacionais.

A configuração *in-line* está representada, com a gravação de um holograma de um objeto na Figura 5.a, a partir da interferência da luz transmitida por ele (luz de referência) e da luz que interagiu com ele (luz do objeto). Na Figura 5.b está desenhada a reconstrução desse holograma a partir da incidência da luz de referência (nomeada como luz de reconstrução na figura). As imagens virtual e real caracterizam o mesmo objeto e correspondem à imagem reconstruída e à imagem gêmea. No ponto de vista do observador da Figura 5.b, essas duas imagens estão sobrepostas e, caso uma delas estiver no foco desse mesmo observador, a outra não estará.

Figura 5 - (a) Gravação de um holograma na configuração *in-line* e (b) Reconstrução do holograma gravado em (a), com a presença da imagem reconstruída do objeto e da imagem gêmea – real e virtual. Para o observador, as imagens real e virtual estão superpostas.

Fonte: Adaptada de POON ²⁵

Na figura 6, está apresentado um exemplo de uma montagem de um sistema de holografia *off-axis*. O holograma gravado na Figura 6.a. É, da mesma forma que na Figura 5.a, gerado a partir da transmissão da luz pela amostra. No entanto, a luz de referência é incidida diretamente sobre o filme holográfico (ou sensor) com um deslocamento angular com relação ao eixo de propagação da luz do objeto, de forma que, na reconstrução, as duas imagens do

objeto também ficam angularmente espaçadas, permitindo que o observador veja somente uma dessas imagens.

Figura 6 - (a) Gravação de um holograma na configuração *off-axis* e (b) Reconstrução do holograma gravado em (a), com a presença da imagem reconstruída do objeto e da imagem gêmea – real e virtual. Para o observador, as imagens real e virtual não estão superpostas.

Fonte: Adaptada de POON²⁵

Como apresentado anteriormente, a imagem gêmea é um artefato existente nas diversas configurações dos sistemas de holografia. Sua presença é indesejada nos casos em que se sobrepõe à imagem reconstruída do objeto, como acontece nas montagens *in-line*.

A Figura 7 exemplifica a presença desse artefato na reconstrução (Figura 7.b) do holograma, para um caso em que o objeto é exemplificado por uma joaninha. Neste caso, a interferência registrada no holograma provem da soma das ondas E_R e E_O .

Figura 7- (a) Gravação de um holograma a partir da interferência das ondas E_R (referência) e (objeto) E_O (b) Reconstrução do holograma gravado em (a), com a presença da imagem reconstruída do objeto e da imagem gêmea – representada pelos termos E_O e E_O^* , respectivamente.

Fonte: KIM ¹⁴

A origem da imagem gêmea está na perda de informação de fase individual durante a gravação do holograma. Isso porque os sensores digitais de imagem medem a intensidade da luz incidente, que se caracteriza por ser uma grandeza real. E, no entanto, os campos eletromagnéticos das ondas luminosas, das quais a intensidade é medida, são descritos como grandezas complexas.

Utilizando a mesma nomenclatura da Figura 7, podemos chamar o campo elétrico da luz proveniente do objeto (amostra) de $E_O(x, y, z)$ e o campo da luz de referência de $E_R(x, y, z)$. De forma que podemos escrevê-los em termos de suas amplitudes e fases:

$$E_O = A_O e^{i\Phi_O} \quad (13)$$

$$E_R = A_R e^{i\Phi_R} \quad (14)$$

Sendo A_O e A_R as amplitudes e Φ_O e Φ_R as fases dos campos elétricos das ondas do objeto e de referência, nessa ordem. Como a intensidade medida por um microscópio holográfico resulta da composição desses dois campos, temos a intensidade I incidente sobre o sensor dada pela expressão 15, com E_O^* e E_R^* sendo o complexo conjugado do campo E_O e E_R , respectivamente:

$$\begin{aligned} I &= |E_R + E_O|^2 = |E_R|^2 + |E_O|^2 + E_R E_O^* + E_R^* E_O \\ &= |E_R|^2 + |E_O|^2 + E_O O_O e^{i(\Phi_R - \Phi_O)} + E_O O_O e^{-i(\Phi_R - \Phi_O)} \end{aligned} \quad (13)$$

Em que os dois primeiros termos à direita da igualdade 13 se originam da interferência entre os próprios feixes luminosos de uma mesma origem: o primeiro, da luz de referência, e, o segundo, da luz que interagiu com o objeto. Os últimos dois termos dessa equação são os que carregam a informação holográfica, uma vez que correspondem à interação entre os feixes de referência e do objeto. Ainda com relação a esses dois últimos, um é complexo conjugado do outro, de maneira que só se diferem pelo sinal da fase. Um deles se refere ao objeto a ser reconstruído, enquanto o outro é responsável pela imagem gêmea de tal objeto.

É interessante notar que, a informação de diferença das fases individuais, das ondas que se interferiram, é mantida na intensidade gravada no holograma. E é essa informação que possibilita a reconstrução da imagem do objeto de uma forma mais completa, quando comparado a outras técnicas ópticas.

A formação da imagem gêmea se encontra num plano igualmente distante do sensor, quando comparado com o objeto, como pode ser verificado na Figura 5. Por consequência, na montagem do microscópio holográfico sem lentes, caracterizada por uma distância objeto-sensor pequena (usualmente menor que 1 mm), a imagem do objeto é bastante afetada por este artefato, cujo plano focal é muito próximo ao plano do objeto observado.

Objetos maiores sofrem menos influência da imagem gêmea. Isso pode ser notado pelo grau de influência da imagem gêmea nos diferentes tamanhos de padrões espaciais (do alvo USAF 1951) presentes nas imagens apresentadas na seção de Resultados.

Diante da presença de tal artefato, a holografia digital apresenta como vantagem a possibilidade de atenuação desse artefato por meio de pós-processamentos digitais das imagens medidas.

Os microscópios holográficos *in-line* sem lentes requerem amostras semitransparentes, de modo que, trabalhando com esses sistemas, consideramos que a transmissão da luz incidente sobre o objeto imageado é descrita por ²⁶:

$$t(x_0, y_0) = 1 + \Delta t(x_0, y_0) \quad (16)$$

Em que t é a quantidade de luz transmitida na posição x, y e Δt corresponde a parcela da luz transmitida e desviada pela amostra. De maneira que $\Delta t(x, y) \ll 1$, ou seja, que o termo constante, referente à luz transmitida sem desvio pela amostra, é muito maior que o termo correspondente a parcela da luz desviada pela amostra. Dentro dessa condição, podemos reescrever a equação 14 em termos das componentes de propagação dessa luz transmitida pelo objeto. Considerando que $P[z_2]\{f(x, y)\}$ é o operador que propaga pelo espaço livre uma função $f(x, y)$ que descreve o campo da luz que provém do plano (x, y) e percorre uma distância z_2 , temos para o nosso caso:

$$\begin{aligned} P[z_2]\{R \cdot t(x_0, y_0)\} &= P[z_2]\{R\} + P[z_2]\{t(x_0, y_0)\} \\ &= A + a(x, y) \end{aligned} \quad (17)$$

A intensidade gravada no sensor pode, então, ser reescrita da seguinte forma:

$$I(x, y) = |A + a(x, y)|^2$$

$$= |A|^2 + |a(x, y)|^2 + A^* \cdot a(x, y) + a(x, y)^* \cdot A \quad (18)$$

Tendo em vista que $\Delta t(x, y) \ll 1$, o segundo termo da equação acima - que não contém informações relevantes para a análise do holograma - passa a ser irrelevante em comparação com os demais. Por consequência, desconsiderando a intensidade de fundo gerada pela componente A , é possível encontrar a imagem do objeto por meio da propagação direta do holograma gravado pelo sensor digital.

A componente relacionada à luz de referência, pode ser removida pela simples subtração das imagens medidas com o sistema com e sem amostra. No entanto, no caso do nosso microscópio, ela representa apenas um valor praticamente constante, que é somado à toda imagem, e, por essa razão, não tem a necessidade de ser removida.

Essa propagação do holograma é feita por meio de processamento digital da imagem adquirida pelo sensor do microscópio e é baseada nas descrições teóricas de propagação da luz.

1.3.2 Holografia digital

O conhecimento teórico da propagação de campos ópticos possibilitou o desenvolvimento de métodos numéricos para reconstrução de hologramas. Estes, aliados ao uso de sensores digitais de imagem, deram origem à holografia digital.²⁷

Comparada com a holografia tradicional, essa técnica substitui os filmes fotográficos pelos sensores digitais e, com isso, dispensa a construção de um experimento de interferência para a reconstrução da imagem do objeto, codificada nos padrões de intensidade do holograma.

Como a sensibilidade dos filmes fotográficos é muito pequena quando comparada à dos sensores digitais, o processo de gravação de um holograma se tornou muito mais rápido com a digitalização do padrão de interferência.¹⁴

Também na reconstrução do holograma, a holografia digital tem a vantagem de oferecer a informação de fase do objeto reconstruído, já que o campo é calculado como um número complexo.

Além de facilitar a gravação e reconstrução do holograma, a holografia digital viabilizou o uso de processamentos digitais da imagem resultante. Esses, por sua vez, possibilitaram o uso dessa técnica no contexto da microscopia,²⁸ permitindo além da observação da imagem de intensidade e de fase de alvos micrométricos, processamentos de aumento de resolução, de contagem e de análise de amostras, por exemplo.

Nessa área de microscopia aliada à holografia, dentro da qual se encontra este trabalho, o avanço da tecnologia de sensores digitais de imagem trouxe melhorias, possibilitando que os equipamentos se tornassem mais portáteis, com amplo campo de visão e com melhor resolução.

1.3.3 Microscopia sem lentes baseada na holografia digital

Dentre as possíveis configurações de microscópios digitais holográficos, existem versões compactas com lentes²⁹, mas a montagem sem lentes, escolhida para a construção do microscópio desse trabalho, é a mais simples e compacta.³⁰ Além de simplificar o sistema e reduzir seu custo, a ausência de lentes entre a amostra e o sensor digital possibilita um amplo campo de visão, usualmente por volta de uma ordem de grandeza maior que os microscópios ópticos tradicionais.

A configuração *in-line* permite uma descomplicação ainda maior, possibilitando o uso de uma iluminação de baixa coerência espacial e temporal, composta, por exemplo, por um LED associado a um filtro espacial, como usado na montagem apresentada neste trabalho. O uso de fonte de luz de baixa coerência proporciona algumas vantagens para o sistema: a redução da influência da imagem gêmea na imagem do objeto e da interferência entre as informações de intensidade de objetos pequenos em um mesmo campo de visão, adicionada ainda de uma grande estabilidade para o sistema, devido à falta de necessidade de um alinhamento muito preciso.³¹

Nos microscópios holográficos sem lentes *in-line*, os hologramas são gerados a partir da interferência da luz transmitida sem desvio pela amostra (luz de referência) com a que foi difratada pelos elementos da amostra (luz do objeto).

As vantagens da configuração *in-line* vêm acompanhadas do ruído no holograma causado pela superposição da imagem do objeto com a imagem gêmea. Todavia, com a facilidade proporcionada pela digitalização do holograma, esse artefato pode ser reduzido ou até mesmo suprimido pelo processamento digital de recuperação de fase.

Dessa forma, a montagem adotada para o microscópio desenvolvido ao longo desse trabalho constitui uma plataforma portátil, robusta e de baixo custo. Características essas que oferecem o sistema como uma potencial solução para diagnóstico e análises em ambientes com recursos limitados.

1.4 Sensores

Os sensores digitais de imagem são dispositivos cuja função é digitalizar a informação espacial de intensidade luminosa incidente sobre eles. Esses são de grande interesse no contexto atual, em que a digitalização de imagens se apresenta como uma ótima alternativa ou mesmo uma necessidade em diversos contextos, como para a fotografia e a instrumentação médica.

Neste cenário, os dispositivos mais comuns são CCDs e CMOS.

Ambos dispositivos são compostos por um conjunto de pixels de semicondutor de óxido metálico. Durante a exposição, cada pixel acumula uma carga proporcional à iluminação incidente. Ao fim desse período, os dispositivos CCDs transferem sequencialmente a carga de cada pixel para uma mesma estrutura de saída, que converte carga em voltagem. Enquanto nos sensores CMOS, essa mesma conversão é feita em cada pixel. Essa diferença de funcionamento implica nas diferentes montagens, capacidades e limitações desses dispositivos.³²

Comparativamente, CMOS tem uma menor uniformidade na imagem, mas também um menor consumo de energia, dentre outras características.

Sensores CMOS têm uma importante expressão na área comercial, sendo amplamente usados em câmeras de celulares, câmeras fotográficas e webcams, em virtude de seu tamanho reduzido.

Devido ao uso em grande escala de dispositivos CMOS, houve um grande avanço na tecnologia de desenvolvimento desses sensores nas últimas décadas, que por sua vez possibilitou uma redução em seu custo.

Na realidade que nós podemos vivenciar, é fácil observar as vantagens que a digitalização de imagens oferece. A transmissão e processamentos ficam muito facilitados com a informação digitalizada.

O processo de digitalização é feito de modo a tornar discreta a informação, no caso das imagens, a informação luminosa incidente sobre a área ativa do sensor será gravada com uma amostragem dependente do tamanho do pixel desse sensor. Isso faz com que, em geral, a informação digitalizada tenha uma resolução menor comparada à analógica. Entretanto, as possibilidades incluídas com o uso de dispositivos digitalizadores, aliadas à facilidade de uso dos mesmos, tornam o uso da digitalização muito mais favorável.

No caso da microscopia sem lentes, a digitalização da imagem é imprescindível. Isso porque, o processamento digital da imagem adquirida também é necessário para a obtenção da imagem final.

Para compor esses microscópios, uso de CCDs é possível³³ e pode contribuir para um grande aumento no campo de visão do sistema. Entretanto, os sensores CMOS têm um melhor custo-benefício, sendo facilmente encontrados com pixels bem pequenos (com pouco mais de 1 μm) e com um preço menor que os CCDs.

1.5 Revisão da literatura

A microscopia holográfica digital sem lentes tem ganhado espaço no cenário científico atual, devido a seu bom desempenho aliado a uma construção simples e versátil.²⁶ Um dos grandes atrativos dessa técnica é o desacoplamento da relação entre campo de visão e resolução existente nos microscópios tradicionais, que permite observar maiores áreas mantendo – ou, então, melhorando – a resolução do sistema. Tudo isso aliado a uma instrumentação simples e robusta.⁵

Dentro ainda dessa classificação, a configuração *in-line* é a mais usual. No entanto, a configuração *off-axis* é possível e também é mostrada em versões compactas – até mesmo em combinação com a configuração *in-line*³⁴ – fazendo imagens por transmissão³⁵ ou reflexão.³⁶

Os microscópios holográficos digitais sem lentes *in-line* têm sido usados dentro do contexto de laboratórios para contagem³⁷ e monitoramento de células,^{38–41} demonstrando sua versatilidade de atuação dentro e fora de estufas. E sua propriedade singular de armazenamento de informação tridimensional também tem sido explorada para observação de culturas de células 3D,⁴¹ bem como para o acompanhamento do movimento de espermatozoides,⁴² em um volume com duas ordens de grandeza maior que o permitido por outras técnicas.

Devido às suas características desenvolvidas para atuação em campo, esses instrumentos também encontraram aplicações em avaliação de partículas do ar,⁴³ análise de fluidos⁴⁴ e diagnósticos clínicos.^{18,45–48} Tendo também montagens desenvolvidas para o uso conjunto com aparelhos celulares.^{43–44}

As várias aplicações desses sistemas sugerem modificações na montagem dos mesmos, sem alterar o princípio de funcionamento. A necessidade de mudanças nesses microscópios está relacionada principalmente ao suporte da amostra, que pode ser uma lâmina de vidro, canal de fluidos, entre outros. No entanto, a heterogeneidade desses sistemas vai

além desses suportes. A forma de iluminação, aquisição e processamento das imagens também encontram diferenças para essa forma de microscopia.

Além disso, um outro fator que também influi na montagem desses microscópios holográficos sem lentes é a dependência da aquisição das imagens com os processamentos de aumento de resolução. Esses atuam no intuito de aprimorar a técnica, possibilitando imagens com maior qualidade. Logo, por possibilitar ótimos resultados dessa instrumentação simples, esses processamentos têm ganhado mais atenção ultimamente.

Em geral, a limitação de resolução dos microscópios sem lentes *in-line* se deve ao tamanho dos pixels do sensor digital utilizado. Para superar esse fator limitante é que foram desenvolvidos os algoritmos de super-resolução, os quais propiciam uma resolução abaixo das dimensões dos pixels do detector usado.^{20,51–53}

Recentemente, o aprendizado de máquinas (do inglês, *machine learning*) tem sido empregado no processamento das imagens adquiridas com esses microscópios sem lentes. Atuando no processo de focalização, recuperação de fase e super-resolução.⁵⁴

A iluminação da amostra pode ser feita com uma fonte de luz de alta ou baixa coerência, como é o caso de lasers e LEDs, respectivamente. O uso de LEDs, entretanto, costuma ser acompanhado de um filtro espacial – como o *pinhole* – para o aumento da coerência temporal. A presença de mais de uma fonte de luz ou mesmo da variação da posição de uma fonte única, pode ser usada para complementar as informações de entrada dos algoritmos que farão o processamento digital das imagens.

A aquisição das imagens, usualmente feita por um sensor CMOS, pode ser baseada em uma única imagem da amostra ou em uma série de múltiplas imagens, com alteração da posição da amostra, do sensor ou da iluminação.

O ponto em comum dos processamentos utilizados é a propagação da imagem adquirida para o plano focal do objeto. Todavia, os processamentos vão além da focalização do objeto, eles são usados para fazer a recuperação de fase e para melhorar a qualidade da amostra, podendo ser usado também para análises específicas, como a contagem de células.

2 Objetivos

Este trabalho tem o objetivo de construir e caracterizar um microscópio óptico holográfico sem lentes *in-line* para análise de amostras semitransparentes.

Para consolidar a proposta desse trabalho, a primeira etapa deste será a montagem de um microscópio óptico sem lentes holográfico, com base nas configurações mais simples encontradas na literatura. Em sequência, essa primeira versão será modificada de modo que resulte em imagens de maior qualidade.

Para o funcionamento dessas montagens instrumentais, serão desenvolvidos os algoritmos necessários para o processamento das imagens obtidas em cada versão. Para a primeira versão, será desenvolvido o processamento essencial da microscopia sem lentes: a propagação da imagem em planos paralelos, que será fundamentada pela teoria da difração descrita pelo método do espectro angular. Para verificar seu funcionamento, esse algoritmo será testado em imagens sintéticas: hologramas resultantes de cálculos numéricos. E, porfim, será adicionado a esse processamento o algoritmo de recuperação de fase, para atuar nas imagens obtidas na versão final deste microscópio, a fim de que possa reduzir a influência do artefato conhecido na holografia como imagem gêmea.

3 Material e métodos

3.1 Montagem do sistema

A configuração escolhida para o nosso microscópio holográfico foi a montagem *in-line* sem lentes. Essa construção é a mais simples entre as configurações existentes. A ausência de lentes, aliada com a necessidade de poucos dispositivos para a composição desse microscópio, permite que sua montagem seja leve e portátil.

Além disso, a inexistência de lentes possibilita também um dos fatores mais atraentes da técnica: o desacoplamento entre o campo de visão e a resolução do microscópio. Nessa montagem utilizada, devido à proximidade da amostra com o sensor, o campo de visão do nosso microscópio é determinado pela área ativa do sensor de imagem. Enquanto a resolução acaba dependendo da coerência da iluminação, do índice de refração do meio existente entre a amostra e o sensor, do tamanho do pixel do sensor digital e, por fim, do processamento das imagens adquiridas.

A escolha da fonte de iluminação, bem como do sensor digital de imagem pode ser feita de modo a manter a qualidade do sistema e reduzir o seu custo.

Nosso microscópio é composto por poucos componentes básicos, que são: um LED (M455L2 - Thorlabs) com emissão centrada em 455 nm, um *pinhole* (P150S - Thorlabs) com diâmetro de 150 μm , uma lâmina de vidro, sobre a qual fica a amostra, e um sensor digital de imagem (CMOS monocromático).

Conforme está ilustrado na Figura 8, parte da luz emitida pelo LED passa pela pequena abertura circular correspondente ao *pinhole*, e depois de percorrer uma distância z_2 (de aproximadamente 10 cm), atinge a amostra sobre a lâmina e, em seguida, é gravada, com suas modificações espaciais, pelo sensor de imagem digital, posicionado a uma distância z_1 (de cerca de 1 mm) da amostra. Para garantir que toda a área ativa do sensor possa ser usada para o imageamento das amostras, a montagem é feita com o cuidado de certificar que toda essa área fotossensível esteja sendo iluminada corretamente. Para tanto, é importante conferir se a luz que a atinge não é influenciada por fatores externos, como a iluminação ambiente.

Figura 8 - Representação da montagem do sistema com seus principais componentes: LED (1), *pinhole* (2), lâmina com amostra (3), sensor digital de imagem (4).

Fonte: Elaborada pela autora.

Alguns detalhes importantes para a técnica de microscopia empregada estão explicitados na Tabela 1, ao lado de seus respectivos componentes. E, logo em seguida, na Figura 9, está o espectro de emissão do LED azul utilizado, com uma largura à meia altura de aproximadamente 20 nm.

Tabela 1 - Detalhes dos principais componentes do microscópio holográfico sem lentes construído.

Componentes	Detalhes
LED	455 nm
<i>Pinhole</i>	150 μm (de diâmetro)
Sensor digital de imagem	CMOS monocromático

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 - Espectro de emissão do LED usado na montagem do microscópio holográfico sem lentes.
Fonte: Elaborada pela autora.

A configuração que escolhemos possibilita o uso de uma fonte luminosa de baixa coerência espacial e temporal, como é o caso do LED usado. Nela, o *pinhole* tem a função de aumentar a coerência espacial da iluminação do nosso sistema, que é importante para que haja interferência da luz - difratada e transmitida - no plano do sensor. Como citado anteriormente (na seção 1.2), a escolha de uma iluminação de baixa coerência traz algumas vantagens. Uma delas é a redução de artefatos referentes ao *speckle* e à interferência causada por múltiplas reflexões, muito comum em sistemas com iluminação a laser. Além disso, o conjunto LED e *pinhole* contribui para a robustez do sistema, por simplificar o acoplamento da luz.

A montagem é feita de modo que distância z_1 seja muito maior que z_2 , porque assim, como mostrado em ¹⁶, mesmo utilizando o LED e o *pinhole* como componentes da iluminação, podemos considerar que cada objeto de um tamanho correspondente a uma célula é iluminado por uma luz coerente. Dentro dessa configuração, podemos ainda considerar a luz incidente sobre cada um desses objetos como uma onda plana, devido às dimensões microscópicas dos mesmos objetos. E isso é uma consideração importante para ser usada no processamento dos hologramas adquiridos.

Com relação à distância z_2 , ela é escolhida de modo a ser a menor possível, contanto que não seja nula para que a luz difratada pela amostra esteja presente no plano do sensor. No nosso caso, z_2 é menor que 1mm. Com isso, a imagem registrada no sensor tem uma magnificação praticamente unitária, o que implica que a imagem do objeto terá um tamanho

praticamente igual ao tamanho do objeto original.⁴⁵ E, portanto, o campo de visão do equipamento é o máximo possível: correspondente à área do sensor.

Como a iluminação é feita por uma só cor de LED, utilizamos um sensor monocromático para que possamos aproveitar da melhor forma as informações gravadas em todos os pixels da área ativa. Juntamente com esse fator, o tamanho do pixel tem grande importância para esse sistema, porque também pode limitar a resolução do microscópio.

Além dos componentes essenciais dessa montagem, acrescentamos um tubo ao longo da distância z_1 para que a luz ambiente não interferisse na gravação de intensidade de luz do microscópio.

Ao longo deste trabalho, construímos duas versões do microscópio. A primeira delas, apresentada na Figura 10, foi feita de um modo mais simples, porque tinha o objetivo de provar o conceito que já havia sido demonstrado nos trabalhos estudados. Enquanto a segunda, mostrada na Figura 11, foi construída com o intuito de superar pequenas limitações impostas pela versão anterior.

As principais alterações entre as duas montagens estão relacionadas à distância entre a amostra e o sensor (z_2), a qual passou a ser variável, e à mudança do sensor, que foi trocado para outro com menor tamanho de pixel, mas permaneceu sendo um CMOS monocromático.

Dessa forma, a iluminação, estabelecida pela composição de um LED acrescentado de um *pinhole*, permaneceu inalterada ao longo dessas modificações, assim como o princípio de funcionamento do microscópio.

Figura 10 - Foto (à esquerda) e representação da montagem (à direita) da primeira versão do microscópio apresentado neste trabalho com seus principais componentes: LED (1), *pinhole* (2), lâmina com amostra (3), sensor digital de imagem (4).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tendo em vista que a existência do vidro de proteção do sensor impõe uma distância mínima entre a amostra e o sensor, modificamos a montagem do microscópio na segunda versão para que a distância mínima entre esses dois componentes pudesse ser reduzida. Sendo assim, a posição dos componentes ficou invertida quando comparada com Figura 6. A Figura 8 mostra a nova versão, cujo sentido alterado da montagem permitiu que a espessura da lâmina de vidro não fosse mais contabilizada como parte de z_2 .

Figura 11 - Foto (à esquerda) e representação da montagem (à direita) da segunda versão do microscópio apresentado neste trabalho com seus principais componentes: LED (1), *pinhole* (2), lâmina com amostra (3), sensor digital de imagem (4).

Fonte: Elaborada pela autora.

Um parafuso micrométrico (148-203 – Mitutoyo) foi, então, acrescentado ao sistema para controlar a altura do suporte da lâmina, de modo a variar a distância z_2 . Isso foi feito para que pudéssemos aplicar o processamento multialturas para a recuperação de fase, descrito na seção 2.4.

Em nossa primeira versão do microscópio, o sensor digital de imagem usado (MT9M001 – Aptina), de uma câmera científica (DCC1545M - Thorlabs), tem formato 1/1.88", e uma área ativa de 1280 x 1024 pixels quadrados de 5,2 μm , ou seja, com 6,656 mm x 5,325 mm, num total de 35,44 mm^2 . Ele foi substituído, na segunda montagem, por outro sensor CMOS monocromático (MT9J001 – Aptina), de uma câmera baseada em Arduino (ArduCam), com formato 1/2.3", com uma área ativa de 3856 x 2764 pixels quadrados de 1,67 μm , ou seja, uma área ativa de 6,440 mm x 4,616 mm, num total de 29,73 mm^2 .

Tabela 2 - Detalhes dos sensores usados para as montagens das duas versões de nosso microscópio sem lentes.

	Código	Quantidade de pixels	Tamanho dos pixels	Dimensões da área ativa	Área ativa do sensor
Sensor I	MT9M001	1280 x 1024	5 μm	6,66 mm x 5,33 mm	35,5 mm^2
Sensor II	MT9J001	3856 x 2764	1,67 μm	6,40 mm x 4,6 mm	29,4 mm^2

Fonte: Elaborada pela autora.

As duas câmeras tiveram suas lentes e/ou proteção removidas e foram usadas em nosso sistema com o sensor exposto, já que a proximidade da amostra com o sensor é um fator importante para esse nosso sistema.

Figura 12 - Foto da câmera da Thorlabs utilizada na primeira versão do microscópio (à esquerda) e da câmera baseada em Arduino, fabricada pela ArduCam, utilizada em nossa segunda versão (à direita).

Fonte: Adaptada de THORLABS;⁵⁹ ARDUCAM⁶⁰

Para fazer a aquisição das imagens nessa configuração mais recente, utilizamos, juntamente com a placa do módulo da câmera desenvolvida pela ArduCam, uma placa de controle (*ArduCAM USB camera shield*), que foi desenvolvida para uso em computador e sistemas embarcados, a qual funciona em diferentes sistemas operacionais, como Windows e Linux e Raspbian. Utilizamos esse conjunto conectado a um computador com Windows. A foto dele pode ser observada na Figura 13, com a placa de controle sob o módulo do sensor.

Figura 13 - Foto da câmera e sua placa de controle utilizadas na segunda versão do microscópio construído neste trabalho.

Fonte: Elaborada pela autora.

A placa de controle baseada em Arduino, conectada ao módulo do sensor, faz a conexão com o computador por meio de um cabo USB, assim como era a conexão feita pela câmera utilizada na versão anterior.

Figura 14 - Representação da conexão da placa de controle com o módulo do sensor e o computador.

Fonte: Elaborada pela autora.

É importante notar que, a mudança de câmera foi significativa não somente para o desempenho do sistema, como também para seu custo. A câmera da Thorlabs usada na primeira versão custa U\$365,65, enquanto a câmera desenvolvida pela ArduCam é comprada por U\$39,99 e sua placa de controle, que é vendida separadamente, custa U\$49,99.

3.2 Recuperação de fase

O uso de dispositivos como CCD e CMOS para a detecção da luz se baseia na medida do fluxo de fótons incidente sobre os sensores, que é proporcional ao quadrado da amplitude do campo eletromagnético da luz observada. Portanto, os sensores luminosos medem valores diretamente relacionados a amplitude da luz incidente e não permitem que a informação de fase seja registrada de forma direta.⁵⁵

Uma das possíveis maneiras de registrar a fase da luz é por meio da interferência, como acontece na técnica da holografia. Essa informação de fase, relativa aos feixes que sofrem a interferência, é registrada em um padrão de intensidades, de modo que deve ser recuperada posteriormente.

A recuperação de fase é um problema presente em diversos contextos, incluindo engenharia, microscopia eletrônica, cristalografia, astronomia e imagens ópticas⁵⁵, como é o caso tratado aqui.

Com a instrumentação característica do microscópio holográfico digital *in-line*, o fenômeno de interferência é usado para gravar informações mais completas do objeto imageado. Nesse caso, a interferência decorre da presença das ondas de referência – transmitidas pela amostra – e das ondas do objeto – aquelas que foram difratadas por ele. A imagem do padrão de interferência é registrada por um sensor digital e, por fim, reconstruída também digitalmente. Esse processo de aquisição e reconstrução está ilustrado em etapas na Figura 15.

Figura 15 - Etapas do processo de aquisição e reconstrução da imagem em um microscópio holográfico digital *in-line*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como vimos na introdução deste trabalho, se conhecermos bem os valores de campo elétrico, com suas informações de amplitude e fase, em um plano do espaço, conseguimos prever sua propagação por um espaço livre, por métodos numéricos, que nos dão os valores desse mesmo campo propagado a planos paralelos ao plano de origem.

Com a ausência da informação de fase na aquisição da intensidade do campo, há uma ambiguidade referente ao sentido da propagação, já que o objeto é entendido como duas imagens (a imagem original e a gêmea) em diferentes planos igualmente distantes do plano do holograma inicial. Dessa forma, todos esses planos paralelos terão influência das duas imagens. Essa influência é maior quando o plano do objeto é muito próximo ao plano do holograma, como é o caso do microscópio em apresentado neste trabalho.

Levando isso em conta, ainda que a fase de uma imagem não seja relevante para ser observada, a recuperação de fase traz vantagens à imagem do objeto processada. Isso porque, a estimativa de fase da imagem em algum dos planos paralelos ao plano de observação permite a redução da influência da imagem gêmea nos demais planos ao longo do mesmo eixo.

Figura 16 - Representação dos planos do holograma e das imagens do objeto: a imagem original e a imagem gêmea, causada pela perda da informação de fase na aquisição do holograma.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Propagação da luz: Método do Espectro Angular

A propagação da luz por métodos teóricos é parte fundamental do processamento digital de um holograma. O Método do Espectro Angular, utilizado nesse trabalho para a concretização dos algoritmos de propagação dos hologramas, é muito utilizado em aplicações semelhantes.

Dentro do contexto de microscopia holográfica *in-line* sem lentes, esse método é bastante adequado por descrever a propagação de um campo entre planos paralelos e não considerar ampliação ou redução da imagem propagada. Isso porque, nesses sistemas, as reconstruções dos hologramas se limitam a planos paralelos ao plano de aquisição e a distância amostra-sensor é pequena - a ponto de considerarmos que a magnitude da imagem gravada é unitária.

Nesse trabalho, esse método foi inserido em um algoritmo desenvolvido com base na teoria, o qual teve seu funcionamento verificado na aplicação de um holograma sintético (como mostrado na Figura 23 da seção Resultados).

Ao longo desse texto, continuaremos com a notação que considera que os hologramas são gravados pelo sensor digital de imagem em planos x, y , com z constante, e que a amostra está paralela ao sensor, a uma distância z_2 dele. Portanto, trataremos as propagações da luz ao longo do eixo z .

Seguindo esse padrão, a Figura 17 resume as etapas da propagação de um campo $E(x, y, z)$ de $z = z_1$ para $z = z_2$, descrevendo a sequência de cálculos que deve ser seguida, segundo o método do Espectro Angular.

Figura 17 - Etapas da propagação de um campo complexo do plano em $z=z_1$ para $z=z_2$ pelo Método do Espectro Angular.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Reconstrução de fase: multialturas

Um dos processamentos mais simples para a reconstrução da fase - e consequente eliminação da imagem gêmea - é feito com base na aplicação de máscaras espaciais, de forma a separar a parte correspondente à amostra do plano de fundo da imagem, fazendo considerações diferentes para cada uma dessas partes.

No contexto de reconstrução de imagens de microscópios holográficos *in-line*, esses métodos fundamentados no uso de máscaras espaciais são comumente utilizados para processar imagens de amostras dispersas. Eles apresentam dificuldades quando empregados na reconstrução de amostras mais densas, já que eles têm a necessidade de estimar a posição dos objetos (amostra) na imagem.

Considerando a limitação desses métodos, optamos por um método que dispensasse a máscara espacial que define a posição dos objetos. De forma que o processamento das nossas imagens foi baseado na primeira modificação de algoritmo sem o uso de máscaras espaciais.⁵²

Portanto, para a reconstrução de fase das imagens obtidas, utilizamos o método de multialturas. Esse método é baseado na presença de mais de uma imagem adquiridas pelo sistema com diferentes distâncias objeto-sensor, ou seja, diferentes alturas z_2 . A aquisição de tais imagens foi efetuada por meio da variação da posição do sensor, que por sua vez foi controlada por um parafuso micrométrico. Esse procedimento está ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Ilustração do processo de aquisição das imagens em múltiplas alturas. A lâmina, sobre a qual está a amostra, permanece em uma posição fixa, enquanto o sensor digital tem seu posicionamento variado em altura (z).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a reconstrução de cada imagem foram usados n hologramas, aos quais nos referiremos como M_i , sendo i o índice que vai de 1 a n . Todos distanciados por uma mesma altura Δz , como apresentado na Figura 19.

Figura 19 - Representação dos planos de medida, correspondentes a diferentes alturas do sensor. Esses são igualmente espaçados (por uma distância Δz) e são representados por M_i , em que i é um índice que varia de 1 até a quantidade máxima de medidas feitas (n).

Fonte: Elaborada pela autora.

O microscópio foi montado de forma a evitar variações na posição da lâmina observada além da mudança de altura (em z). Ainda assim, a aquisição das amostras em diferentes planos gera um deslocamento lateral entre as imagens devido à aproximação da amostra com o sensor.

Para superar essa diferença entre as posições das imagens gravadas, foi necessário um alinhamento digital delas anteriormente ao processamento de reconstrução de fase. Isso

porque o alinhamento dessas imagens é de fundamental importância para o bom funcionamento do processamento utilizado.

O processamento multialturas consiste em propagar digitalmente uma dessas imagens para o plano de aquisição da outra imagem mais próxima (separado desta de uma distância Δz), trocando, então, a amplitude da imagem resultante pela amplitude da imagem gravada no mesmo plano e mantendo a fase calculada, e então, repetir isso até que todas as imagens medidas sejam usadas.

Nosso processamento teve início com a imagem de menor distância amostra-sensor, passou por todos os planos de maior distância z_2 e voltou para imagem M_1 , como está mostrado no diagrama da Figura 20. Por fim, a imagem com fase calculada no mesmo plano da imagem M_1 é propagada para o plano da amostra para resultar na imagem final.

Foram realizados testes com diferentes números de iterações, considerando que temos uma iteração ao propagar a imagem calculada por todas as alturas medidas e fazer a volta dela até o plano em que o processamento teve início.

A Figura 20 apresenta a ilustração desse processamento usado.

Figura 20 - Diagrama do processamento multialturas utilizado neste trabalho.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por resultar em uma melhor aproximação para os valores de fase, esse método confere à imagem final uma melhor definição em seu valor absoluto. Isso é facilmente verificado nas

ampliações das imagens do padrão de resolução USAF 1951 mostradas na seção de Resultados, em que fica evidente o aumento de resolução da imagem após o processamento.

Entretanto, a necessidade de fazer aquisições de imagens em diversas alturas aumenta o tempo de medida e isso restringe as possibilidades de amostras observadas. Como o posicionamento do objeto em cada imagem deve ser mantido nas diversas imagens, tal processamento restringe seu sucesso a aplicações em amostras fixas.

O Método do Espectro Angular para propagação do campo que descreve os hologramas, juntamente com o método de recuperação de fase multialturas, foi inserido em algoritmos desenvolvidos especificamente para o funcionamento do microscópio desenvolvido ao longo desse trabalho. E para a consolidação e teste desses métodos, um padrão de resolução USAF 1951 positivo $2'' \times 2''$ (Edmund Scientific Corporation, Barrington, New Jersey, USA) foi utilizado como amostra. Os detalhes estão na seção de Resultados.

3.5 Resolução do sistema

O poder de resolução de microscópios é a distância mínima que dois pontos podem ser resolvidos/separados na imagem produzida por esse equipamento. Essa variável depende do comprimento de onda da fonte de luz utilizada e da abertura numérica, estabelecida pela escolha da lente objetiva nos microscópios tradicionais.

A resolução desses sistemas ópticos é definida pelo menor detalhe que o sistema de fato resolve. E, além da influência da fonte de luz e da abertura numérica, é também afetada por características como o contraste e o ruído presente na imagem.

No caso dos microscópios holográficos *in-line*, a resolução também sofre influência da coerência espacial e temporal, como é mostrado a seguir. Além disso, existe a influência do processamento digital, que está detalhada na seção de Resultados, para esse microscópio construído nesse trabalho.

Essa resolução pode ser estimada a partir de imagens de lâminas padrão de teste, como é o caso do alvo USAF 1951, o qual contém padrões retangulares em forma de linhas, com diferentes frequências espaciais. Esse alvo foi utilizado para caracterizar o sistema, como está mostrado em Resultados.

A resolução do nosso microscópio pode ser limitada tanto pela coerência temporal, quanto pela coerência espacial de forma independente. Tanto a coerência temporal quanto a espacial determinam o ângulo máximo ($\theta_{m\acute{a}x}$) de luz espalhada pelo objeto que é detectada

pelo sensor. Esse ângulo, por sua vez, caracteriza a abertura numérica (NA) do sistema óptico. E, então, a resolução é dada por ⁵:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin(\theta_{m\acute{a}x})} \quad (14)$$

Em que λ é o comprimento de onda da luz e n é o índice de refração do meio pelo qual ela propaga.

A coerência temporal é principalmente influenciada pela largura de banda de emissão da fonte de luz ($\Delta\lambda$), a qual determina o comprimento de coerência temporal (ΔL_c) – gerado a partir de um único ponto – dessa mesma fonte. Assim, ΔL_c é dado por:

$$\Delta L_c \approx \left(\frac{2 \ln 2}{\pi} \right) \cdot \frac{\lambda^2}{n \cdot \Delta\lambda} \quad (15)$$

E o ângulo de espalhamento máximo é:

$$\theta_{m\acute{a}x} \leq \arccos \left(\frac{z_2}{z_2 + \Delta L_c} \right) \quad (16)$$

Em que z_2 é a distância objeto-sensor.

O diâmetro da fonte de luz (D) e a distância fonte-objeto (z_1) são os fatores que mais contribuem para a determinação da coerência espacial. De modo que, considerando a condição presente na montagem de microscópios holográficos *in-line* sem lentes, em que $z_1 \gg z_2$, temos:

$$\theta_{m\acute{a}x} \leq \arctg \left(\frac{0,61 \cdot \lambda \cdot z_1 / D}{z_2 + \Delta L_c} \right) \quad (17)$$

A tabela 3 apresenta os valores dos parâmetros que delimitam a coerência das duas versões do microscópio apresentado nesse trabalho. A partir deles, a coerência espacial e temporal são calculadas, de modo a caracterizar o microscópio construído.

Tabela 3 - Parâmetros importantes da instrumentação das duas versões do microscópio construído ao longo deste trabalho.

Parâmetros	Símbolo	Valor
Comprimento de onda	λ	455 nm
Largura espectral da fonte de luz	$\Delta\lambda$	20 nm
Diâmetro do <i>pinhole</i>	D	150 μm
Distância fonte-objeto	z_1	9,5 cm
Distância objeto-sensor	z_2	1 mm
Índice de refração	n	1
Comprimento de coerência	L_{coh}	4,6 μm
Resolução devido à coerência temporal		2,39 μm
Resolução devido à coerência espacial		1,24 μm

Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, para assegurar que a coerência do microscópio não seja limitada pela iluminação da amostra, a fonte de luz desse sistema óptico deve ser escolhida de modo a ter os valores de coerência - espacial e temporal - abaixo das dimensões laterais dos pixels do sensor digital de imagem usado.

4 Resultados e Discussão

4.1 Hologramas sintéticos

A propagação numérica da luz é parte fundamental do processamento necessário das imagens adquiridas pelo sensor digital do microscópio. Então, para concretizar a propagação numérica das imagens obtidas, fizemos um algoritmo baseado no método do espectro angular. Assim como os demais processamentos de imagem realizados ao longo desse trabalho, esse algoritmo foi desenvolvido na plataforma Matlab R2015a (MathWorks, Natick, USA). Esta, por ser desenvolvida para trabalhar com matrizes, é uma ferramenta bastante conveniente para desenvolver programas que envolvam o processamento de imagens, tendo até mesmo funções que facilitam a elaboração dos mesmos.

Com o algoritmo de propagação, pudemos fazer simulações numéricas por meio da criação de hologramas a partir dos algoritmos desenvolvidos. Portanto, nesta primeira etapa dos resultados, não utilizamos a montagem experimental do microscópio para a obtenção das imagens.

Desse modo, pudemos criar um holograma para explicitar como a informação de profundidade é guardada em seus padrões de intensidade. Para isso, um holograma sintético foi construído a partir da imagem de duas siglas – USP e IFSC – de modo a considerar que as siglas estivessem em planos focais diferentes.

A composição dessa informação, gerada pela superposição da propagação separada de cada uma das siglas, está mostrada na Figura 21, ao lado da imagem original. Esse holograma foi, então, propagado para o plano focal de cada uma das siglas separadamente.

Dessa forma, podemos perceber que a informação de diferentes planos do objeto (ou da imagem original para este caso) é codificada em um mesmo holograma por meio da informação de fase guardada nos padrões de intensidade que o compõe. É por isso que um mesmo holograma pode ser propagado de modo a encontrar o foco de objetos posicionados em profundidades distintas.

Figura 21 - Imagens do estudo de profundidade das informações codificadas em um holograma. Um holograma sintético foi criado a partir da imagem original, a qual contém objetos em diferentes profundidades. A reconstrução desse mesmo holograma foi feita de modo a encontrar cada um dos objetos em seu plano focal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando ainda o mesmo algoritmo de propagação, pudemos também observar a influência da ausência da informação de fase na reconstrução de um holograma sintético. Para isso, foi utilizada uma imagem de um padrão de resolução USAF 1951.

Esse padrão USAF 1951 é um alvo comumente usado para a caracterização de sistemas de imagem, porque possui padrões bem definidos, em formato de barras, separados por elemento e grupo de acordo com suas frequências espaciais.

Para a construção desse holograma sintético, foi utilizada parte da imagem mostrada na Figura 22, a qual representa um desses alvos em sua versão positiva (fundo transparente, com elementos e numeração em material opaco).

Figura 22 - Ilustração de um alvo USAF 1951 positivo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a construção do holograma, foi simulada a situação em que uma iluminação com comprimento de onda de 455 nm foi incidida uniformemente sobre nosso objeto de interesse: o padrão espacial mostrado na Figura 22. Consideramos a aquisição feita por um sensor com pixels de 5 μm , imitando a realidade instrumental de nossa primeira versão do microscópio.

Essa frente de onda uniforme e monocromática somou-se, então, à propagação da luz que interagiu com nosso objeto, a 0,8 mm de distância dele. Isso, então, resultou em um padrão semelhante ao original, com uma definição espacial menor que a desse último. A Figura 23 mostra nosso holograma sintético ao lado da imagem do objeto da qual ele foi originado.

Figura 23 - Parte de uma imagem de um padrão USAF 1951 (a) utilizada como base para a construção do holograma sintético (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para esse estudo, chamamos de z a distância do plano onde está o objeto ao plano fictício de aquisição do holograma. Portanto, tomando o plano do holograma como referência, para reconstruir a imagem adquirida em nossa simulação, é necessário propagá-la a um plano paralelo à frente, a uma distância z .

Para ilustrar a influência da ausência da informação de fase no holograma, consideramos duas situações para a reconstrução da imagem: (I) a simulação da aquisição real do holograma, em que, devido ao uso do sensor digital, não conhecemos, a princípio, as informações de fase daquela imagem e (II) a situação possibilitada pela simulação, em que temos acesso a informação de intensidade e fase de toda imagem.

Em cada uma dessas situações, nosso holograma foi, então, propagado para dois planos distintos: para o plano do objeto, a uma distância z à frente do plano de referência, e para o plano da imagem gêmea, a uma distância z atrás desse mesmo plano, conforme mostrado na Figura 24.

Figura 24 - Ilustração dos planos para onde o holograma sintético foi propagado.
Fonte: Elaborada pela autora.

Sendo assim, na Figura 25, temos a representação da situação experimental da holografia (I), em que o holograma apresenta somente informação de intensidade. Nesse caso, como podemos perceber em nossa simulação, as imagens encontradas em z e em $-z$, ou seja, no plano do objeto e da imagem gêmea, são iguais e se influenciam mutuamente; a imagem do objeto no seu plano focal contém a imagem gêmea fora de foco e vice-versa.

Na Figura 26 apresentamos a situação ideal (II), em que a informação da luz é conhecida por completo, com amplitude e fase, em cada pixel da imagem. Como podemos verificar visualmente, a propagação desse holograma ideal para o plano em $-z$, na Figura 26.b, resulta na reconstrução exata do objeto. E a imagem apresentada na Figura 26.d representa a imagem do próprio objeto ainda mais fora de foco que as imagens reconstruídas apresentadas na situação (I), por estar propagada a uma distância ainda maior dele.

Os perfis de intensidade ao lado das imagens propagadas apresentam as intensidades dos pixels correspondentes às linhas vermelhas das respectivas imagens ao lado de cada um.

Figura 25 - Reconstrução do holograma sintético sem a informação de fase. E comparação do resultado da propagação desse holograma a uma distância z para frente (b) e (c) e para trás (d) e (e) do plano de referência.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 26 - Reconstrução do holograma sintético com a informação de fase. E comparação do resultado da propagação desse holograma a uma distância z para frente (b) e (c) e para trás (d) e (e) do plano de referência.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Hologramas medidos

Assim como os demais casos não-ideais, nossa realidade experimental corresponde à situação (I), em que a imagem original do objeto e a imagem gêmea aparecem no plano medido. Dessa forma, ainda que o holograma seja propagado para o plano focal do objeto original, ainda teremos a presença de artefatos na imagem que reduzem sua nitidez e contribuem para que sua resolução seja baixa.

A imagem de um holograma digitalmente propagada até o foco da amostra é chamada de reconstrução natural. Neste trabalho, a reconstrução natural corresponde à primeira parte de todo o processamento realizado sobre as imagens medidas. A segunda parte refere-se à recuperação de fase.

Os algoritmos de recuperação de fase foram desenvolvidos para reduzir a influência do artefato da imagem gêmea nas imagens propagadas para o plano do objeto. Com esse processamento, é possível chegar a uma estimativa dos valores de fase do campo elétrico da luz incidente sobre o sensor digital de imagem no instante da medida. E, conseqüentemente, reconstruir a imagem do objeto com mais precisão.

Nosso processamento de recuperação de fase, baseado no uso de múltiplos hologramas, foi executado por meio de algoritmos desenvolvidos na plataforma Matlab.

Para o funcionamento do processamento multialturas, o microscópio foi montado de maneira a ter a distância z_2 variável, controladamente, por meio de um parafuso micrométrico. O parafuso micrométrico usado tem um erro de 5 μm e permite uma amplitude máxima de 5 mm.

Foram feitos alguns testes com alterações na (i) quantidade n de imagens medidas consideradas no processamento e (ii) distância Δz entre essas imagens. Os melhores resultados foram obtidos utilizando 6 imagens, espaçadas de 50 μm , sendo a primeira adquirida com a menor distância possível entre a amostra e o sensor.

Para caracterizar o microscópio construído, bem como estimar sua resolução espacial, o padrão de resolução USAF 1951 positivo foi imageado e processado por meio do método multialturas, utilizando a combinação dos parâmetros otimizados: 6 hologramas foram medidos com uma distância de 50 μm entre cada um deles, sendo que o primeiro estava a menos de 1mm de distância do sensor.

Essa caracterização foi feita primeiramente com o uso do sensor MT9M001 (sensor I), com pixels de 5 μm , e posteriormente com o sensor MT9J001 (sensor II), com pixels de 1,67 μm . Para o primeiro caso, a menor distância z_2 foi 0,8 mm, enquanto que para a outra situação z_2 mínimo é 0,65 mm.

A montagem do sistema usado para esse processamento corresponde à segunda versão do nosso microscópio. No entanto, fizemos esse teste do processamento de multialturas com imagens adquiridas com o sensor I com o intuito de avaliar a influência do tamanho do pixel nos resultados obtidos.

Nas figuras 27 e 28 podemos observar primeiramente os resultados desse nosso teste com o processamento feito com os hologramas adquiridos pelo sensor de pixel maior (sensor I).

A Figura 27.a mostra a imagem do holograma, adquirida com maior proximidade do sensor. Os detalhes dos grupos 4-5 e 6-7 do alvo podem ser vistos nas ampliações mostradas na Figura 27.b e 27.c, respectivamente. Ao lado de cada ampliação estão as correspondentes imagens referentes à reconstrução natural (Figura 27.d e e) e ao resultado final do processamento multialturas (Figura 27.f e g).

Figura 27 - Holograma medido com o sensor MT9M001 e sua variação ao longo dos processamentos digitais realizados sobre ele. O campo de visão total do holograma medido é mostrado em (a) e com diferentes ampliações em (b) e (c). A imagem propagada até o plano focal, por meio do Método do Espectro Angular, é mostrada nos itens (d) e (e) e a imagem totalmente processada é mostrada em (f) e (g).

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 28 estão apresentados os perfis de intensidade correspondente ao segundo elemento do grupo 6 nas três diferentes etapas do processamento: antes – na imagem do holograma original medido; durante – na reconstrução natural do holograma original; e depois – na imagem resultante ao fim de 10 iterações do algoritmo multialturas.

Figura 28 - Comparação dos perfis de intensidade do elemento segundo do grupo 6 da imagem do holograma original medido com o sensor MT9M001, da reconstrução natural feita a partir dele e do resultado do processamento multialturas com 10 iterações.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nas figuras 29 e 30 estão os resultados de nosso processamento com os hologramas adquiridos pelo sensor de pixel menor (sensor II).

A Figura 29 apresenta a área total de um dos hologramas medidos (Figura 29.a), ao lado de duas ampliações com magnificações diferentes (Figura 29.b e Figura 29.c). Do lado direito de cada uma dessas ampliações, com magnificações respectivamente iguais, estão as imagens da reconstrução natural desse holograma (Figura 29.d e Figura 29.e), seguidas do resultado gerado por todo o processamento de recuperação de fase (Figura 29.f e Figura 29.g).

Figura 29 - Holograma medido com o sensor MT9J001 e sua variação ao longo dos processamentos digitais realizados sobre ele. O campo de visão total do holograma medido é mostrado em (a) e com diferentes ampliações em (b) e (c). A imagem propagada até o plano focal, por meio do Método do Espectro Angular, é mostrada nos itens (d) e (e) e a imagem totalmente processada é mostrada em (f) e (g).

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 30 mostra as ampliações com detalhes dos padrões referentes ao quinto elemento do grupo 6. Os perfis de intensidade desse elemento da imagem do holograma original, da reconstrução natural e do resultado de 10 iterações do processamento de multialturas podem ser observados, de cima para baixo, respectivamente, ao lado das correspondentes imagens.

Figura 30 - Comparação dos perfis de intensidade do elemento 5 do grupo 6 da imagem do holograma original medido com o sensor MT9J001, da reconstrução natural feita a partir dele e do resultado do processamento multialturas com 10 iterações.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1 Resolução

Conforme mostrado na seção de Material e Métodos, a iluminação desse nosso sistema impõe, para as imagens obtidas, um limite de resolução espacial de $2,39\ \mu\text{m}$, devido à coerência temporal, e $1,24\ \mu\text{m}$, devido à coerência espacial.

Em condições em que um microscópio holográfico sem lentes *in line* é construído de maneira a não ter a resolução da sua imagem limitada pela coerência da fonte de luz usada, é conhecido que a resolução do sistema é limitada pelas dimensões do pixel que compõe o sensor digital responsável pela aquisição da imagem da amostra.

No caso dos resultados apresentados pelas figuras 27 e 28, é possível verificar que o limite de resolução está acima dos $5\ \mu\text{m}$ até mesmo para a imagem totalmente processada. Como, para esse caso, a coerência espacial e temporal da iluminação definem resoluções teóricas maiores que as dimensões de cada pixel do sensor, temos que a resolução é determinada por esse fator de amostragem da imagem.

Já para as imagens feitas com o sensor II, o tamanho do pixel não é um fator limitante. Pelos valores de restrições à resolução apresentados pela coerência temporal e espacial da iluminação usada, vemos que muito provavelmente o fator limitante da resolução para esse

caso são as características da coerência temporal da luz. O que deixa a resolução atual do sistema por volta de $3\text{ }\mu\text{m}$.

4.2.2 Campo de visão

Na microscopia holográfica sem lentes *in-line*, o campo de visão do nosso microscópio é equivalente à área ativa do sensor de imagem. Isso significa que, com o uso do sensor I, as imagens das amostras têm dimensões de $6,66\text{ mm} \times 5,33\text{ mm}$, num total de $35,44\text{ mm}^2$, enquanto que com o sensor II, o campo de visão do nosso sistema é de $6,40\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$, aproximadamente 30 mm^2 .

Na Figura 31, comparamos as imagens nossas imagens processadas com a imagem feita por um microscópio óptico tradicional com uma objetiva de 10x.

Figura 31 - Comparação das imagens adquiridas com nosso microscópio, processadas pelo algoritmo de multi alturas, com a imagem da mesma amostra feita por um microscópio óptico tradicional de transmissão. Da esquerda para a direita: imagens processadas a partir de hologramas adquiridos pelo sensor MT9M00 (a, b), pelo sensor MT9J001 (c, d) e imagem feita por um microscópio óptico tradicional com objetiva de 10x (e, f).

Fonte: Elaborada pela autora.

O campo de visão dessa imagem feita no microscópio tradicional é de $3,45\text{ mm}^2$, o que significa que é cerca de dez vezes menor que a área observada em uma imagem com o nosso microscópio sem lentes.

4.3 Discussão

Conforme mostrado na Revisão da Literatura, existem entre os microscópios holográficos sem lentes uma grande variedade de montagens e processamentos, responsáveis por gerar uma importante heterogeneidade dentre os instrumentos classificados nessa mesma categoria. Considerando essa diversidade, alguns dos trabalhos mais recentes foram selecionados para serem detalhados a fim de que o instrumento apresentado neste trabalho pudesse ser melhor situado em comparação com os demais.

Os trabalhos escolhidos, estão brevemente descritos a seguir, com suas particularidades desenvolvidas para melhor atuação no contexto em que foram desenvolvidos.

O trabalho apresentado por Feizi et al.⁵⁶ apresenta um microscópio sem lentes associado ao uso de um algoritmo computacional voltado para a análise de viabilidade e concentração de células de leveduras. A instrumentação apresentada utiliza um LED com emissão centrada em 590 nm, acoplado a uma fibra óptica multimodo e associado a um filtro óptico passa-banda que estreita a banda espectral da luz incidente na amostra a 10 nm. No caso desse microscópio, a imagem medida por um sensor CMOS de 1,67 μm , é dividida em seis partes e cada uma é analisada separadamente. O processamento consiste primeiramente em verificar o plano focal da amostra observada e depois fazer a contagem das células vivas e mortas, a partir da coloração com azul de metileno.

No estudo feito Göring e colaboradores,²¹ é apresentado um microscópio holográfico digital com a configuração *in-line*, que utiliza um laser de diodo (com emissão centrada em 655 nm) para fazer a iluminação das amostras semitransparentes. Como a iluminação do laser usado já é divergente e suficientemente coerente, não há o acréscimo de filtro espacial. O laser é usado abaixo do limiar laser para que o ruído associado ao *speckle* possa ser reduzido. A captura do holograma é feita por um sensor CMOS monocromático, com pixel de 2,2 μm . O plano focal é determinado por um processamento de autofoco que se baseia em um cálculo de contraste da imagem. Diferentemente do processamento mais simples de focalização digital, em que se precisa saber previamente a distância entre a amostra e o sensor, o processamento de autofoco permite colocar a imagem no plano do objeto sem informações adicionais à imagem. Para a redução da influência da imagem gêmea, é utilizado um algoritmo de reconstrução de fase iterativo baseado no uso de uma máscara binária que diferencia áreas da imagem associada ao objeto do plano de fundo.

Sobieranski apresenta em seu estudo^{57,58} uma plataforma de microscopia holográfica *in-line* que garante um aumento na resolução dos hologramas a partir da composição de

diversas imagens de baixa resolução dos hologramas, deslocadas por dimensões menores que os pixels com as quais foram adquiridas. O microscópio proposto por eles é composto por um LED (385 nm), um *pinhole* e um sensor CMOS monocromático de 1,67 μm . Sendo que o *pinhole* é colocado numa plataforma com possibilidade de deslocamento em x e y. A propagação numérica é feita pelo Método do Espectro Angular e, apesar do aumento de resolução dos hologramas, nenhum processamento é feito para amenizar o efeito da imagem gêmea. Amostras de espermatozoides e células do sangue confirmaram a desenvoltura da plataforma proposta.

Zhang *et al.* demonstram²⁰ o uso de um processamento digital capaz de reduzir em 2,17 vezes a resolução do microscópio holográfico sem lentes, antes limitada pelo tamanho do pixel do sensor CMOS usado (1,67 μm). Utilizando uma fonte de luz laser, o sistema faz aquisições de imagens fora de foco com diferentes distâncias entre a amostra e o sensor. O sucesso do processamento se deve a consideração da presença de ruído e o deslocamento lateral causado pela movimentação axial do sistema.

Com base nessas publicações, pudemos verificar que o microscópio desenvolvido ao longo desse trabalho possui uma estrutura e funcionamento comparável aos equipamentos da mesma linha que têm sido produzidos ao redor do mundo.

Nas tabelas 4 e 5, respectivamente, comparamos os componentes e parâmetros do sistema de *hardware* e *software* do nosso microscópio com esses que foram abordados nas publicações citadas. Como pode ser observado pelas informações resumidas na tabela, as instrumentações utilizadas são bastante semelhantes entre si. Até mesmo o método utilizado para a propagação computacional dos hologramas é o mesmo. No entanto, as diferentes abordagens dos processamentos aplicados às medidas são os motivos de maior distanciamento dos trabalhos.

Os microscópios desenvolvidos por Zhang e Feizi são os que mais destoam dos outros, justamente por contarem com processamentos digitais mais elaborados, voltados, respectivamente, para atingir uma melhor resolução da imagem final e classificar leveduras.

Em aspectos gerais, o microscópio apresentado aqui está bem inserido no contexto internacional de sua área de desenvolvimento.

Tabela 4 - Comparação entre os parâmetros de hardware do microscópio apresentado por este trabalho e de outros de publicações recentes.

Parâmetros do hardware	Este trabalho (versão final)	Feizi⁵⁶ (2017)	Görling²¹ (2017)	Sobieranski^{57,58} (2015)	Zhang²⁰ (2017)
Iluminação	LED + <i>pinhole</i>	LED + fibra óptica + filtro óptico	Laser	LED + <i>pinhole</i>	Laser + fibra óptica
Sensor digital	CMOS (Aptina - MT9J001)	CMOS (Aptina - MT9J003STM)	CMOS (Aptina - MT9P031)	CMOS (Aptina - MT9J003STM)	CMOS (Aptina - MT9J003)
Tamanho do pixel	1,67 μm	1,67 μm	2,2 μm	1,67 μm	1,67 μm
Resolução	3 μm	—	2,2 μm	1,55 μm	770 nm
Distância iluminação-objeto (z_1)	~10 cm	~12 cm	5-15 cm	5 cm	~20 cm
Distância objeto-sensor (z_2)	Variável (~600–1000 μm)	(Espessura da lâmina sobre a qual a amostra é colocada)	~2,4mm	(Espessura da lâmina sobre a qual a amostra é colocada)	Variável (~400–900 μm)
Parte móvel	Sensor (Altura z)	Não tem	Não tem	Iluminação (plano x-y)	(Altura z)

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 5 - Comparação entre os processamentos aplicados às imagens referentes ao microscópio apresentado por este trabalho e outros de publicações recentes.

Processamentos - <i>software</i>	Este trabalho	Feizi⁵⁶ (2017)	Göring²¹ (2017)	Sobieranski (2015)	Zhang²⁰ (2017)
Método de propagação	Espectro Angular	Espectro Angular	Espectro Angular	Espectro Angular	Espectro Angular
Recuperação de fase	Multialturas	Não	Método iterativo com uso de máscara binária	Não	Junto com o processo de super-resolução
Processamento adicional	Não	Autofoco	Autofoco	Super-resolução	Autofoco, Super- resolução

Fonte: Elaborada pela autora.

5 Conclusão e perspectivas

Conforme a proposta inicial do trabalho, foi construído um microscópio holográfico sem lentes na configuração que possibilitava o maior campo de visão possível utilizando um sensor CMOS para a captura das imagens dos hologramas. Portanto, montado de acordo com a configuração *in-line*, esse microscópio conta com uma iluminação parcialmente coerente provinda de um LED acoplado a uma pequena abertura circular de 100 μm e tem seu funcionamento baseado no processamento digital das imagens adquiridas. Para reduzir artefatos inerentes aos hologramas capturados – como a imagem gêmea – e, conseqüentemente, aumentar a resolução das imagens dos objetos observados, foi utilizado um processamento de recuperação de fase com base em múltiplas aquisições de imagens feitas com diferentes distâncias entre a amostra e o sensor.

Essa plataforma propõe uma instrumentação óptica compacta, para observar amostras semitransparentes com resolução de aproximadamente 3 μm , tendo também a vantagem de ser robusta e de baixo custo comparada à microscopia tradicional.

Esse microscópio, portanto, se apresenta como uma ferramenta com grande potencial de uso para além de laboratórios. De forma que, em trabalhos futuros, pretendemos aperfeiçoar sua montagem com a construção de uma estrutura que contribua para seu fácil manuseio e o torne menor e mais leve que a montagem atual, e também desenvolver novos algoritmos com a finalidade de melhorar a qualidade das imagens, aumentando sua resolução, e também realizar processamentos de análise de amostras, tais quais contagem e avaliação de células.

REFERÊNCIAS

- 1 BRADBURY, S. **The microscope: past and present**. Oxford: Pergamon Press, 1968.
- 2 BRADBURY, S.; PHIL, D. **The evolution of the microscope**. Oxford: Pergamon Press, 1967.
- 3 HOGG, J. **The microscope: its history, construction, and applications**. London: The Illustrated London Library, 1854.
- 4 MURPHY, D. B. **Fundamentals of light microscopy and electronic imaging**. New York: John Wiley, 2001.
- 5 OZCAN, A.; McLEOD, E. Lensless imaging and sensing. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 18, n. 1, p. 77-102, 2016.
- 6 McLEOD, E.; OZCAN, A. Microscopy without lenses. **Physics Today**, v. 70, n. 9, p. 50, 2017.
- 7 ROY, M. et al. A simple and low-cost device performing blood cell counting based on lens-free shadow imaging technique. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 201, p. 321–328, 2014. doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.011.
- 8 GALLOWAY, D.A. et al. A smartphone-based chip-scale microscope using ambient illumination. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 16, p. 87–92, 2016.
- 9 FANG, Y. et al. An on-chip instrument for white blood cells classification based on a lens-less shadow imaging technique. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–14, 2017.
- 10 COSKUN, A. F.; SU, T. W.; OZCAN, A. Wide field-of-view lens-free fluorescent imaging on a chip. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 7, p. 824–827, 2010.
- 11 TAKEHARA, H. et al. On-chip cell analysis platform : implementation of contact fluorescence microscopy in microfluidic chips. **AIP Advances**, v. 7, n. 9, p. 095213, 2017.
- 12 GOODMAN, J. W. **Introduction to Fourier optics**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1996.
- 13 ZÍLIO, S. C. **Óptica moderna**. São Carlos: IFSC, 2009.
- 14 KIM, M. K. **Digital holography microscopy: principles, techniques, and applications**. New York: Springer, 2011. (Springer series in optical sciences, 162)
- 15 DENG, Y.; CHU, D. Coherence properties of different light sources and their effect on the image sharpness and speckle of holographic displays. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- 16 MUDANYALI, O. et al. Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 11, p. 1417–1428, 2010.
- 17 ROY, M.; SEO, D.; et al. A review of recent progress in lens-free imaging and sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 130–143, 2017. doi: 10.1016/j.bios.2016.07.115.

- 18 DELACROIX, R. et al. Cerebrospinal fluid lens-free microscopy: a new tool for the laboratory diagnosis of meningitis. **Scientific Reports**, v. 7, p. 39893, 2017. doi:10.1038/srep39893.
- 19 KANKA, M.; RIESENBERG, R.; et al. Reconstruction of high-resolution holographic microscopic images. **Optics Letters**, v. 34, n. 8, p. 1162–1164, 2009.
- 20 ZHANG, J. et al. Adaptive pixel-super-resolved lensfree in-line digital holography for wide-field on-chip microscopy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11777, 2017.
- 21 GÖRING, L. et al. Lensless digital holographic microscope using in-line configuration and laser diode illumination. **Proceedings of SPIE**, v. 10127, 2017. doi: 10.1117/12.2250927.
- 22 GABOR, D. A new microscopic principle. **Nature**, v. 161, n. 4098, p. 777–778, 1948.
- 23 GABOR, D. Holography 1948-1971. **Nature**, v. 177, n. 4046, p. 299–314, 1972.
- 24 LEITH, E. N.; UPATNIEKS, J. Wavefront reconstruction with continuous-tone objects. **Journal of the Optical Society of America**, v. 53, n. 12, p. 1377, 1963.
- 25 POON, T.-C.; LIU, J.-P. **Introduction to modern digital holography**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.
- 26 WU, Y.; OZCAN, A. Lensless digital holographic microscopy and its applications in biomedicine and environmental monitoring. **Methods**, v. 136, p. 4-16, 2017. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.08.013.
- 27 SCHNARS, U.; JÜPTNER, W. P O. Digital recording and numerical reconstruction of holograms. **Measurement Science and Technology**, v. 13, n. 9, p. R85, 2002.
- 28 KIM, M. K. Principles and techniques of digital holographic microscopy. **SPIE Reviews**, 2010. Disponível em: <<http://faculty.cas.usf.edu/mkkim/papers.pdf/2010%20SR%201%20018005.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- 29 RAWAT, S. et al. Compact and field-portable 3D printed shearing digital holographic microscope for automated cell identification. **Applied Optics**, v. 56, n. 9, p. D127, 2017.
- 30 OH, C. et al. On-chip differential interference contrast microscopy using lensless digital holography. **Optics Express**, v. 18, n. 5, p. 4717–4726, 2010.
- 31 LITWILLER, D. CCD vs . CMOS : facts and fiction. 2001. Disponível em: <https://www.fer.unizg.hr/_download/repository/ST03Photonics_Spectra_CCDvsCMOS_Litwiller.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- 32 SEO, S. et al. Multi-color LUCAS : Lensfree On-chip cytometry using tunable monochromatic illumination and digital noise reduction. **Cellular and Molecular Bioengineering**, v. 1, p. 146–156, 2008. doi.org/10.1007/s12195-008-0018-6.
- 33 LEE, M.; YAGLIDERE, O.; et al. Field-portable reflection and transmission microscopy based on lensless holography. **Biomedical Optics Express**, v. 2, n. 9, p. 2721, 2011.
- 34 ROSTYKUS, M.; MOSER, C. Compact lensless off-axis transmission digital holographic microscope. **Optics Express**, v. 25, n. 14, p. 16652–16659, 2017.

- 35 AUWELYN, T. H. P. et al. Reflective lens-free imaging on high-density silicon microelectrode arrays for monitoring and evaluation of in vitro cardiac contractility. **Biomedical Optics Express**, v. 9, n. 4, p. 1827–1841, 2018.
- 36 FANG, Y. High-precision lens-less flow cytometer on a chip. **Micromachines**, v. 9, n. 5, p. 227, 2018.
- 38 ALLIER, C. et al. Lens-free video microscopy for the dynamic and quantitative analysis of adherent cell culture. **Journal of Visualized Experiments**, n. 132, p. 1–12, 2017. doi: 10.3791/56580.
- 39 ALLIER, C. et al. Imaging of dense cell cultures by multiwavelength lens-free video microscopy. **Cytometry A**, v. 91, n. 5, p. 433–442, 2017.
- 40 JIN, G.; et al. Biosensors and bioelectronics lens-free shadow image based high-throughput continuous cell monitoring technique. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 38, n. 1, p. 126–131, 2012.
- 41 MOMEY, F. et al. Lensfree diffractive tomography for the imaging of 3D cell cultures. **Biomedical Optics Express**, v. 7, n. 3, p. 7296–7301, 2016.
- 42 DALOGLU, M. U. et al. Label-free 3D computational imaging of spermatozoon locomotion , head spin and fl agellum beating over a large volume. **Light: science & applications**, v. 7, n. 1, p. 17111–17121, 2018.
- 43 WU, Y.-C. et al. Air quality monitoring using mobile microscopy and machine learning. **Light: science & applications**, v. 6, n. 9, p. e17046, 2017.
- 44 BISHARA, W. et al. Holographic opto-fluidic microscopy. **Optics Express**, v. 18, n. 26, p. 696–701, 2010.
- 45 SEO, S. et al. Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 6, p. 777–787, 2009.
- 46 ZHANG, Y. et al. Wide-field imaging of birefringent synovial fluid crystals using lens-free polarized microscopy for gout diagnosis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 28793, 2016. doi:10.1038/srep28793.
- 47 RAY, A. et al. Computational sensing of herpes simplex virus using a cost-effective on-chip microscope. **Scientific Reports**, v. 7, n. 4856, 2017. doi:10.1038/s41598-017-05124-3.
- 48 VELI, M.; OZCAN, A. Computational sensing of staphylococcus aureus on contact lenses using 3D imaging of curved surfaces and machine learning. **ACS Nano**, v. 12, n. 3, p. 2554–2559, 2018.
- 49 TSENG, D. et al. Lensfree microscopy on a cellphone. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 14, p. 1787, 2010.
- 50 IM, H. et al. Digital diffraction analysis enables low-cost molecular diagnostics on a smartphone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5613–5618, 2015.
- 51 LUO, W. et al. Pixel super-resolution using wavelength scanning. **Light: science and applications**, v. 5, p. e16060, 2016. doi:10.1038/lsa.2016.60.
- 52 GREENBAUM, A. et al. Maskless imaging of dense samples using pixel super-resolution based multi-height lensfree on- chip microscopy. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 7, p. 1242, 2012.

- 53 SONG, J. et al. Sparsity-based pixel super resolution for lens-free digital in-line holography. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24681, 2016. doi:10.1038/srep24681.
- 54 RIVENSON, Y. et al. Phase recovery and holographic image reconstruction using deep learning in neural networks. **Light: science & applications**, v. 7, n. 17141, 2018. doi:10.1038/lsa.2017.141.
- 55 SHECHTMAN, Y. et al. Phase retrieval with application to optical imaging: a contemporary overview. **IEEE Signal Processing Magazine**, v. 32, n. 3, p. 87–109, 2015.
- 56 FEIZI, A. et al. Yeast viability and concentration analysis using lens-free computational microscopy and machine learning. **Proceedings of SPIE**, v. 10055, p. 1005508, 2017. doi: 10.1117/12.2252731
- 57 SOBIERANSKI, A. C. **Proposta de uma plataforma de imageamento microscópico portátil baseada em holografia digital inline**. 2015. 174 p. Tese (Doutorado em Informática) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- 58 SOBIERANSKI, A. C. et al. Portable lensless wide-field microscopy imaging platform based on digital inline holography and multi-frame pixel super-resolution. **Light: science and applications**, v. 4, n. 10, p. e346, 2015.
- 59 THORLABS. **Camera CMOS**. Disponível em: <<https://www.thorlabs.com/thorProduct.cfm?partNumber=DCC1545M>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- 60 ARDUCAM. **CameraMT9J001-1**. Disponível em: <<http://www.arducam.com/camera-modules/10mp-mt9j001mt9j003/mt9j001-1/>>. Acesso em: 23 jan. 2018.