



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Graduação em Física

Montagem de Um Sistema de Microscopia Holográfica Digital

Maria Isabel Ramos Santana

João Pessoa - PB
2025

Maria Isabel Ramos Santana

Montagem de Um Sistema de Microscopia Holográfica Digital

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Física do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Física.

Orientador: Prof. Dr. Jesús Pavón López
Coorientador: Prof. Dr. Thierry Marcelino Passerat de Silans

João Pessoa - PB
2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S232m Santana, Maria Isabel Ramos.

Montagem de um sistema de microscopia holográfica digital / Maria Isabel Ramos Santana. - João Pessoa, 2025.

41 p. : il.

Orientação: Jesús Pavón López.

Coorientação: Thierry Marcelino Passerat de Silans.
TCC (Curso de Bacharelado em Física) - UFPB/CCEN.

1. Microscopia holográfica digital. 2. holografia digital. 3. amplitude. 4. fase. 5. interferometria. 6. intensidade. I. López, Jesús P. II. de Silans, Thierry Marcelino Passerat. III. Título.

UFPB/CCEN

CDU 53(043.2)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Coordenação dos Cursos de Graduação em Física

Ata da Sessão Pública da Defesa do Trabalho de
Conclusão de Curso de Bacharelado em Física, do
discente Maria Isabel Ramos Santana.

Aos 30 dias do mês de setembro do ano de 2025, às 10h, na sala auditório do D2, realizou-se a Sessão Pública da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Física, do discente Maria Isabel Ramos Santana, sendo a Banca Examinadora constituída pelos docentes Prof. Dr. Jesus Pavon Lopez (UFPB), orientador e presidente da banca, Profa. Dra. Karoline Oliveira Moura (UFPB) e Prof. Dr. Sérgio André Fontes Azevedo (UFPB). Dando início aos trabalhos, o professor orientador e presidente da banca examinadora comunicou aos presentes a finalidade da reunião. A seguir, concedeu a palavra ao discente para que fizesse a explanação de seu Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado “Montagem de Um Sistema de Microscopia Holográfica Digital”. Concluída a exposição, o discente foi arguido pelos membros presentes da Banca Examinadora. Após as arguições, a Banca, de comum acordo, declarou que o Trabalho apresentado foi aprovado com nota 10,00. E para constar, encerrada a sessão, lavrou-se esta ata que será assinada pelos presentes. João Pessoa, 30 de setembro de 2025.

Documento assinado digitalmente



JESUS PAVON LOPEZ
Data: 11/10/2025 17:17:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jesus Pavon Lopez
UFPB – Orientador

Documento assinado digitalmente



KAROLINE OLIVEIRA MOURA
Data: 10/10/2025 13:32:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Karoline Oliveira Moura

Documento assinado digitalmente



SERGIO ANDRE FONTES AZEVEDO
Data: 10/10/2025 16:12:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sérgio André Fontes Azevedo

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão, que sempre me apoiaram em todas as fases da minha vida, e aos meus professores, que me guiaram durante este percurso acadêmico.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Um agradecimento muito especial à minha família, que sempre esteve ao meu lado: aos meus pais, Ivonaldo e Cristiane, pelo amor e incentivo incondicionais; ao meu irmão, Mateus, pela cumplicidade e pelo carinho; e ao meu padrinho, Nilton, não apenas pelas amostras de sangue doadas — um gesto que nunca esquecerei —, mas por toda a ajuda e presença em momentos importantes. Agradeço também a todos os meus familiares que, de tantas formas, me apoiaram e fortaleceram durante essa jornada. Este trabalho é tão meu quanto de cada um de vocês.

Agradeço aos meus amigos e companheiros desses quatro anos, que compartilharam comigo as vitórias e as conquistas: às maravilhosas meninas da Física, Fernanda, Rafaelly, Tarcila, Inês e Bárbara; e aos meninos, Apolo, Erick, Hugo, Carlos, Miguel e Kelvin. Um agradecimento especial também ao meu namorado, Lukas, que, apesar de ter aparecido apenas no final do curso, me ajudou o máximo possível nessa reta final.

Aos meus companheiros de laboratório, Isaac, que sempre supervisionava e ajudava quando eu tinha dúvidas; Alisson, Fernanda, Carlos, Gessiane, Igor e Rayanne; e, em especial, a Vinicius, minha dupla de laboratório, que lutou muito comigo para fazer nosso projeto funcionar.

Por fim, agradeço a todos os professores que me auxiliaram em minha jornada acadêmica; a Charlie, por me emprestar o microscópio usado neste trabalho, a Guillermo por tão gentilmente me ceder o uso do HOLODIG e, especialmente, aos meus orientadores, Dr. Jesús Pavón López e Dr. Thierry Marcelino Passerat de Silans, pela paciência, sabedoria e apoio inestimável em cada etapa deste projeto.

Resumo

A Microscopia Holográfica Digital (MHD) é uma técnica interferométrica que permite a reconstrução tridimensional de objetos microscópicos de fase com alta resolução e sem a necessidade de marcadores. Este projeto tem como objetivo desenvolver um sistema robusto de MHD baseado na arquitetura de um interferômetro de Mach-Zehnder, precisamente alinhado sobre uma mesa inercial para garantir estabilidade de fase. O sistema foi projetado para a aquisição e reconstrução numérica de hologramas digitais, fornecendo imagens de contraste de fase quantitativo. Apresentamos uma estrutura teórica e prática abrangente para a montagem do sistema, juntamente com uma análise detalhada dos métodos numéricos utilizados para a reconstrução holográfica. As capacidades do nosso aparato são demonstradas por meio da imageamento de glóbulos vermelhos humanos, destacando seu potencial para diagnósticos médicos—particularmente na identificação de anomalias morfológicas associadas a condições como a anemia falciforme. Nossos resultados reforçam a viabilidade da MHD como uma ferramenta poderosa para análise biológica não invasiva e abrem caminho para futuras integrações com protocolos automatizados de triagem de doenças.

Palavras-chave: Microscopia holográfica digital, holografia digital, amplitude e fase da luz

Abstract

Digital Holographic Microscopy (DHM) is a powerful interferometric technique that enables high-resolution, label-free, three-dimensional reconstruction of microscopic phase objects. This project aims to develop a robust DHM system based on a Mach-Zehnder interferometer architecture, precisely aligned on an inertial table to ensure phase stability. The system is designed for the acquisition and numerical reconstruction of digital holograms, providing quantitative phase contrast imaging. We present a comprehensive theoretical and practical framework for the system's assembly, alongside a detailed analysis of the numerical methods employed for holographic reconstruction. The capabilities of our apparatus are demonstrated through the imaging of human red blood cells, highlighting its potential for medical diagnostics—particularly in identifying morphological abnormalities associated with conditions such as sickle cell anemia. Our results underscore the viability of DHM as a powerful tool for non-invasive biological analysis and pave the way for future integration with automated disease screening protocols.

Keywords: Digital holographic microscopy; digital holography; amplitude; light phase.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Gravação holográfica (em linha) e reconstrução de uma imagem.	13
Figura 2 – Esquema da configuração experimental para um interferômetro de Mach-Zehnder	18
Figura 3 – Esquema experimental usado para Microscopia Holográfica Digital. . .	20
Figura 4 – Foto da configuração experimental para Microscopia Holográfica Digital.	20
Figura 5 – Medida do tamanho de três glóbulos em um holograma	21
Figura 6 – Medida do tamanho de um glóbulo	21
Figura 7 – Régua de Calibração	21
Figura 8 – Sistema de coordenadas adotado no processo de simulação da difração da luz por um holograma digital.	25
Figura 9 – Reconstrução da onda de distribuição $\tilde{\psi}(u, v)$ no plano (u, v) a uma distância D do plano de reconstrução.	29
Figura 10 – Reconstrução da onda óptica $\psi(x, y)$ no plano da imagem a partir do plano (u, v)	31
Figura 11 – Régua de calibração através da lente de 40x	34
Figura 12 – Glóbulos com leucemia observados por um microscópio óptico	35
Figura 13 – Holograma de glóbulos com leucemia	35
Figura 14 – Reconstrução do holograma dos glóbulos vermelhos	36
Figura 15 – Holograma de amostra de sangue sem corante	36
Figura 16 – Reconstrução do holograma sem corantes	37
Figura 17 – Imagem do laser com interferência visto através da lente objetiva de 100x	37

Sumário

1	INTRODUÇÃO	10
2	PRINCÍPIOS DA HOLOGRAFIA	12
2.1	Holografia Clássica	12
2.1.1	Geração do Holograma	12
2.2	Holografia Digital	15
2.3	Aplicações	16
3	MICROSCOPIA HOLOGRÁFICA DIGITAL	17
3.1	Princípios da Microscopia	17
3.2	Interferômetro de Mach-Zehnder	18
3.3	Montagem Experimental	19
3.4	Aplicações	21
4	RECONSTRUÇÃO DO HOLOGRAMA	23
4.1	Método da Transformada de Fourier	24
4.2	Método do Espectro Angular	26
4.3	Dupla Propagação	29
4.4	<i>Unwrapping</i>	32
4.5	HOLODIG	33
5	RESULTADOS	34
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39

1 Introdução

A palavra holografia vem do grego e significa toda escrita ou sinal inteiro , sendo "holos"(todo, inteiro) e "grafos"(sinal, escrita). A holografia é, segundo o dicionário, uma técnica para obter imagens em três dimensões de um objeto iluminado. (PRIBERAM,). Em simples palavras, é um método óptico que consiste em armazenar e reconstruir as informações da fase e amplitude da frente de onda difratada ou refletida de um objeto, aproveitando a interferência de dois feixes.

A história da holografia está profundamente relacionada à compreensão da natureza ondulatória da luz. Em 1801, Thomas Young demonstrou de forma satisfatória essa natureza ondulatória por meio de seu famoso experimento da dupla fenda, estabelecendo os fundamentos para o desenvolvimento futuro da holografia (GABOR, 1971). Mais de um século depois, em 1947, Dennis Gabor, considerado o precursor da holografia, começou a desenvolvê-la enquanto tentava melhorar a resolução de microscópios eletrônicos. Gabor descreveu um método para registrar a informação completa de um campo de luz, incluindo sua fase e amplitude, em uma placa fotográfica (GABOR, 1948).

No entanto, a holografia de Gabor apresentava algumas limitações significativas. A principal delas era a necessidade de uma fonte de luz altamente coerente. Essa limitação foi superada com a invenção do laser na década de 1960 (LEITH; UPATNIEKS, 1963). Os lasers proporcionaram uma fonte de luz com a coerência necessária para a holografia, permitindo a criação de hologramas mais claros e detalhados. Este avanço marcou o verdadeiro início da era moderna da holografia.

O processo de gravação e reconstrução da frente de onda luminosa foi inicialmente descrito por G. L. Rogers em 1950 para investigar efeitos ópticos. Rogers foi o primeiro a utilizar o termo "holograma" para descrever o registro codificado da frente de onda luminosa, conforme detalhado em seus trabalhos sobre o design de experimentos para gravação e reconstrução de objetos tridimensionais em luz coerente (ROGERS, 1966).

Quando o holograma gravado é iluminado com o feixe de referência, ele difrata a luz de tal forma que recria a frente de onda original do objeto, permitindo que um observador veja uma imagem tridimensional (BRITO, 2015). Essa propriedade de recriar a imagem tridimensional é uma das características mais notáveis da holografia e a distingue de outras formas de imagem tridimensional, como a estereoscopia (BENTON; BOVE, 2008).

Com diversas aplicações práticas, a holografia pode ser usada para medir deformações e vibrações de objetos, análise de tensões em materiais e estudo de fluidos (KREIS,

2005). Na área da segurança, hologramas são amplamente usados em cartões de crédito, passaportes e outros documentos importantes para evitar falsificações (GOODMAN, 1996). No campo da arte, hologramas são usados para criar exposições tridimensionais impressionantes (GOODMAN, 1996). E, mais recentemente, a holografia tem sido explorada para uso em tecnologias de realidade aumentada e virtual, abrindo novas fronteiras na interação homem-máquina. (BENTON; BOVE, 2008)

Além das aplicações mencionadas, a holografia também se mostrou promissora em áreas como a microscopia, sendo usada para gerar imagens tridimensionais de alta resolução. Essa capacidade tem contribuído significativamente para um diagnóstico mais preciso de condições médicas, como a anemia falciforme (BRITO, 2015). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é estudar e desenvolver um microscópio holográfico digital, explorando suas potenciais aplicações na medicina e em outros campos científicos.

A microscopia holográfica digital é uma técnica avançada de imagem amplamente utilizada em diversas áreas devido à sua capacidade de oferecer informações volumétricas precisas e detalhadas de objetos microscópicos. Na biologia e medicina, ela permite o estudo de células, tecidos e organismos vivos em tempo real, sem a necessidade de corantes ou fixadores, possibilitando a observação de processos biológicos complexos com alta resolução (BRITO, 2015). Já na engenharia e ciência dos materiais, essa técnica é empregada na análise de superfícies, medição de deformações e inspeção de materiais, sendo especialmente útil para identificar defeitos e irregularidades em componentes e auxiliar no controle de qualidade de produtos. (MONTEIRO, 2012)

Além de suas aplicações práticas, a microscopia holográfica digital tem-se consolidado como ferramenta essencial para investigação científica multidisciplinar, permitindo a análise não invasiva de fenômenos microscópicos com precisão tridimensional. Neste contexto, este trabalho visa desenvolver um sistema avançado de captura e reconstrução de hologramas digitais, combinando fundamentos de óptica física, técnicas experimentais e processamento computacional. Este trabalho busca não apenas implementar a técnica, mas também explorar seu potencial para quantificar dinâmicas estruturais em escala microscópica, com aplicações que vão desde a biologia celular até a caracterização de materiais. Ao integrar hardware especializado e algoritmos de reconstrução, pretende-se contribuir para o aprimoramento dessa metodologia, ampliando suas possibilidades no estudo de sistemas complexos.

2 Princípios da Holografia

2.1 Holografia Clássica

A holografia digital foi primeiro apresentada em 1948 pelo Engenheiro húngaro-britânico Dennis Gabor, que publicou o artigo *A new microscopic principle* na revista *Nature* (GABOR, 1948), ao tentar resolver o problema da perda de resolução de imagens do microscópio eletrônico. Ele propôs um registro fotográfico das imagens chamado de holografia. Os microscópios ópticos tinham o problema da limitação de imagens, já que os mesmos só obtêm resultados bidimensionais. (ZHANG; YAMAGUCHI, 1998)

Dennis Gabor, após muito pensar e estudar sobre o assunto, fez inúmeros experimentos no intuito de estudar e aprimorar a holografia. A configuração inicial desse processo, descreve um método de imagem sem lentes em duas etapas. Gabor registrou fotograficamente um padrão de interferência gerado pela interação entre a luz dispersa de um objeto e uma onda de referência coerente, cunhando o termo "holograma." No segundo estágio, a reconstrução da imagem ocorria pela difração de um feixe coerente por uma transparência correspondente ao holograma desenvolvido (HECHT, 2017).

A holografia é um processo, de dois passos, que registra o padrão de franjas de interferência luminosa entre dois feixes de luz e os reconstrói a frente de onda com as mesmas características da original. (BRITO, 2015) De modo que se possa observar uma imagem tridimensional do objeto.

Com o passar dos anos, a holografia evoluiu significativamente, especialmente após a invenção do laser em 1960, que forneceu uma fonte de luz coerente ideal para a produção de hologramas de alta qualidade. Pesquisadores como Emmett Leith e Juris Upatnieks, nos Estados Unidos, e Yuri Denisyuk, na União Soviética, desenvolveram técnicas avançadas que permitiram a criação de hologramas tridimensionais mais nítidos e detalhados. Hoje, a holografia continua a ser um campo de pesquisa ativo, com novas tecnologias, como os hologramas digitais gerados por computador e os displays holográficos, prometendo revolucionar áreas como realidade aumentada, armazenamento de dados e imageamento médico. (GOODMAN, 1996)

2.1.1 Geração do Holograma

A priori, a gravação holográfica analógica de um objeto pode ser definida como o registro do padrão de interferência entre uma onda (FO) que emana do objeto e uma onda

de referência (FR) que não interage com o objeto. Quando a direção de propagação de FR não coincide com a de FO, diz-se que uma geometria fora de eixo está sendo utilizada. O registro desse padrão de interferência por meio de um meio sensível à luz é o que chamamos de holograma. (SOSA, 2014)

Considerando o espectro eletromagnético, a faixa óptica (400 - 700 nm) destacou-se como a mais adequada para holografia devido à alta resolução proporcionada pelos comprimentos de onda curtos, à sensibilidade do olho humano e à disponibilidade de materiais de registro otimizados. Dentre as fontes de luz nessa faixa, o laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) sobressaiu-se por oferecer coerência, monocromaticidade e alta intensidade, propriedades essenciais para a formação de padrões de interferência estáveis no registro holográfico (LOPEZ, 2012).

Veja que a imagem abaixo representa um holograma clássico.

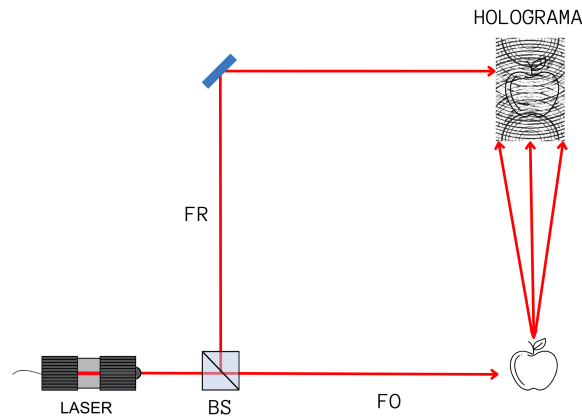


Figura 1 – Gravação holográfica (em linha) e reconstrução de uma imagem.

O processo de geração de um holograma, ilustrado na Figura 1, inicia-se com um feixe laser que é dividido por um beamsplitter (BS) em dois braços: o feixe de referência, que incide diretamente no meio de registro, e o feixe objeto, que é refletido pelo alvo a ser holografado. Quando os dois feixes se recombinam no meio de registro (como uma emulsão fotográfica ou um sensor digital), o padrão de interferência resultante é gravado, codificando tanto a intensidade quanto a fase da luz refletida pelo objeto. Esse padrão, após processamento, reconstitui a onda luminosa original, criando a ilusão tridimensional característica dos hologramas.

Note que os dispositivos de detecção são sensíveis apenas à intensidade da luz, logo, analisaremos esse fenômeno de acordo com a intensidade luminosa (I). Esta intensidade, distribuída sobre um anteparo, resulta da sobreposição dos feixes objeto ($\vec{O}$) e referência ($\vec{R}$). Cada feixe é representado pelos vetores de campo elétrico, e ao combiná-los, obtemos

o campo elétrico total $\vec{E} = \vec{O} + \vec{R}$. (SOSA, 2014) (LOPEZ, 2012) Com isso,

$$I = |\vec{E}|^2 = |\vec{O} + \vec{R}|^2 = (\vec{O} + \vec{R})^* \cdot (\vec{O} + \vec{R}) = |\vec{O}|^2 + |\vec{R}|^2 + \vec{O}^* \cdot \vec{R} + \vec{R}^* \cdot \vec{O} \quad (2.1)$$

onde os dois primeiros termos são os de ordem zero (ou autocorrelação), e o terceiro e o quarto são as imagens real e virtual, respectivamente (BRITO, 2015).

Quando,

$$\vec{O} = \vec{O}_0 e^{i\phi_1} \quad (2.2)$$

$$\vec{R} = \vec{R}_0 e^{i\phi_2} \quad (2.3)$$

A função da intensidade torna-se:

$$I = |\vec{O}_0|^2 + |\vec{R}_0|^2 + 2(\vec{R}_0 \cdot \vec{O}_0) \cos(\phi_1 - \phi_2) \quad (2.4)$$

Essa equação representa a intensidade sobre o plano do holograma, no qual é registrada a interferência dos feixes.

Um aspecto importante da holografia é que cada ponto do holograma armazena informações sobre todo o objeto registrado. Isso significa que, diferentemente de uma fotografia comum, qualquer parte do holograma contém dados sobre toda a cena capturada. Essas informações são gravadas através de um processo chamado interferometria, que compara e registra as diferenças entre dois estados diferentes da luz (como antes e depois de interagir com o objeto).

Na prática, a reconstrução ocorre ao iluminar o holograma com um feixe idêntico ao utilizado como referência durante o processo de gravação, como na equação 2.5 que representa o campo ondulatório reconstruído. Isso permite a formação de uma imagem virtual na mesma posição em que o objeto original se encontrava. Para o observador, essa imagem parece estar localizada atrás do holograma, proporcionando a sensação de tridimensionalidade. Matematicamente, o processo de reconstrução pode ser escrito como:

$$I\vec{R} = \vec{R}|\vec{O}|^2 + \vec{R}|\vec{R}|^2 + \vec{R}(\vec{O}^* \cdot \vec{R}) + \vec{R}(|\vec{R}| \cdot \vec{O}) \quad (2.5)$$

Adicionalmente, uma imagem real é gerada no mesmo lado onde o observador se encontra, mas esta não é visível diretamente, pois está fora de foco. No entanto, ao posicionar uma tela em um local adequado, é possível visualizar essa imagem real, ampliando as possibilidades de análise e exploração do holograma. (FANTIN, 2003).

A reconstrução óptica dos campos ondulatórios que representam um objeto a partir de seu holograma gera simultaneamente uma imagem real e uma imagem virtual. A imagem real se forma pela convergência da frente de onda, resultando em uma imagem nítida. Já a imagem virtual é criada pela divergência da frente de onda, dando a impressão de que a luz está sendo emitida pelo objeto, tal como estava posicionado durante a gravação do holograma. (KREIS, 2005)

2.2 Holografia Digital

A holografia clássica, apesar de produzir hologramas de alta qualidade, é um processo notoriamente moroso e intensivo, no qual é recorrente o uso de métodos químico-fotográficos. Em contrapartida, a holografia digital permite uma reconstrução numérica e a geração de imagens digitais, utilizando um método muito mais simples de gravação de imagem, com laser, câmera CCD e computador. (FLORES, 2019)

Uma das capacidades fundamentais da holografia - tanto clássica quanto digital - é registrar simultaneamente a amplitude e a fase do campo óptico. O diferencial da holografia digital está na quantificação numérica direta desses parâmetros, possibilitada pelo processamento computacional dos padrões de interferência capturados por sensores digitais. Esse avanço, aliado ao desenvolvimento de técnicas de armazenamento e processamento digital, permite calcular com precisão tanto a amplitude quanto a fase separadamente - uma análise quantitativa que na holografia convencional exigia processos indiretos e mais complexos (MONTEIRO, 2012).

Veja que é comum ver na literatura diversos termos para descrever "holografia", entre eles, um dos mais utilizados é a interferometria. Com o avanço das tecnologias de laser e o aprimoramento da resolução dos sensores de imagem, foi possível, também, aprimorar as técnicas de holografia. Como resultado, as fronteiras entre interferometria de Michelson, interferometria de Mach-Zehnder, interferometria de Twyman-Green e holografia interferométrica tornaram-se consideravelmente mais fluidas do que antes. O propósito unificador dessas abordagens é registrar e reconstruir a frente de onda óptica, independentemente de sua textura. Isso indica uma interconexão fundamental entre a holografia e a interferometria, estreitando ainda mais seus laços. (PICART; LI,) Neste trabalho, como é possível ver a seguir, foi usado um interferômetro de Mach-Zehnder para a montagem experimental.

Como dito anteriormente, o holograma é uma representação digital do padrão de interferência resultante da interação coerente entre a onda proveniente do objeto e a onda de referência. A frequência espacial desse padrão é influenciada pelo ângulo formado entre

esses dois campos de onda interferentes. A reconstrução digital da onda complexa, que incorpora informações sobre a amplitude e a fase, é realizada com base na integral de difração de Kirchhoff. (FERNANDEZ, 2017)

2.3 Aplicações

A holografia, uma técnica avançada de imagem tridimensional, possui uma ampla gama de aplicações em diversas áreas, desde ciência e medicina até arte e entretenimento. Na medicina, por exemplo, a holografia é utilizada para visualização e análise de estruturas anatômicas complexas, permitindo uma melhor compreensão das relações espaciais entre órgãos e tecidos. Além disso, na indústria, a holografia é empregada em testes não destrutivos e inspeção de qualidade de produtos, proporcionando uma análise detalhada de superfícies e estruturas. Na área de segurança, a holografia é utilizada em sistemas de autenticação e identificação, como cartões de crédito e passaportes, devido à sua capacidade de criar imagens difíceis de serem falsificadas. Na arte e entretenimento, a holografia é explorada para criar experiências visuais imersivas e cativantes, como em exposições de arte holográfica e espetáculos de hologramas em concertos e eventos. (ZHANG; YAMAGUCHI, 1998)

3 Microscopia Holográfica Digital

3.1 Princípios da Microscopia

A microscopia é uma técnica essencial na ciência e na medicina, permitindo a visualização de estruturas invisíveis a olho nu. Com o desenvolvimento de diferentes tipos de microscópios, os cientistas puderam explorar o microcosmo com detalhes sem precedentes.

Um microscópio óptico convencional é composto principalmente por dois tipos específicos de lentes: a objetiva e a ocular. A lente objetiva é responsável pela primeira etapa da ampliação, criando uma imagem ampliada do objeto observado. A lente ocular, por sua vez, amplia ainda mais essa imagem, tornando-a visível ao olho humano. Além das lentes, uma fonte de luz é crucial para a iluminação da amostra. Esta luz atravessa a amostra, ou é refletida nesta, permitindo que detalhes finos, como os glóbulos vermelhos do sangue, por exemplo, sejam visualizados com clareza. A combinação dessas lentes e da iluminação adequada não apenas amplia as estruturas minúsculas, mas também melhora o contraste e a resolução da imagem, facilitando a análise detalhada das amostras (MURPHY; DAVIDSON, 2013).

O desenvolvimento de técnicas avançadas de microscopia, como a microscopia de fluorescência e a microscopia eletrônica, expandiu ainda mais as capacidades dos microscópios. A microscopia de fluorescência utiliza fluoróforos para marcar componentes específicos das células, permitindo a visualização de processos biológicos em tempo real (SLAYMAN, 2001). Já a microscopia eletrônica, que inclui a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET), utiliza feixes de elétrons em vez de luz para obter imagens com resolução muito superior, revelando detalhes ultrafinos das estruturas celulares e moleculares (FUNK, 2008).

Como visto anteriormente, Gabor desenvolveu a holografia para superar as limitações dos microscópios ópticos convencionais, permitindo a obtenção de imagens tridimensionais de amostras microscópicas (GABOR, 1948). A microscopia holográfica digital, uma das aplicações mais eficientes da holografia moderna, alcança esses objetivos com vantagens práticas significativas. Ao substituir os processos analógicos por captura digital (sensores CMOS) e reconstrução computacional, a técnica elimina dificuldades inerentes aos métodos tradicionais.

Entre suas principais vantagens, destaca-se a profundidade de campo estendida, que

contorna a limitação imposta pela alta magnificação em microscopia convencional. Além disso, permite o foco a posteriori em diferentes planos da amostra, facilitando análises tridimensionais precisas (JUNIOR, 2012). Esses avanços tornam a técnica particularmente valiosa para estudos que demandam reconstrução tridimensional de estruturas microscópicas sem perda de resolução.

3.2 Interferômetro de Mach-Zehnder

O interferômetro de Mach-Zehnder (Fig. 2), desenvolvido por Ludwig Mach e Ludwig Zehnder, é uma engenhosa invenção que permite explorar a interferência da luz. Composto por dois divisores de feixe e espelhos, ele divide um feixe de luz em dois caminhos distintos e depois os recombina. As diferenças de fase entre esses caminhos geram padrões de interferência, revelando detalhes sutis sobre as propriedades ópticas e físicas dos materiais.

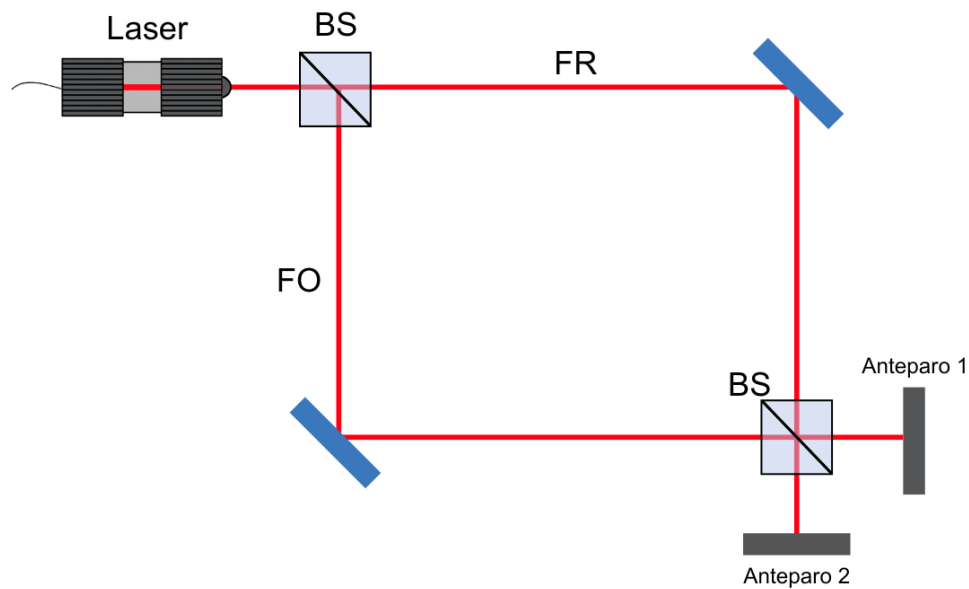


Figura 2 – Esquema da configuração experimental para um interferômetro de Mach-Zehnder

A versatilidade do interferômetro de Mach-Zehnder o torna indispensável tanto em pesquisas fundamentais quanto em aplicações práticas. Na holografia digital, por exemplo, ele pode ser utilizado para gerar os feixes de referência e objeto com controle preciso de fase e intensidade, essenciais para a captura de hologramas de alta qualidade. Além disso, sua configuração permite o estudo de fenômenos como variações de índice de refração

em materiais e a detecção de mínimas deformações mecânicas, demonstrando sua ampla utilidade em metrologia óptica e imageamento científico.

Além disso, a escolha do Mach-Zehnder para aplicações em microscopia holográfica digital é estratégica devido à sua configuração de dois caminhos separados. Essa separação permite que o microscópio, que contém a amostra, seja facilmente inserido em apenas um dos braços (o feixe de objeto), enquanto o outro braço permanece livre como o feixe de referência. Essa arquitetura de feixes fisicamente separados confere grande flexibilidade e facilita o alinhamento, o que seria significativamente mais difícil de ser alcançado em interferômetros de reflexão, como o de Michelson, onde os feixes de objeto e referência geralmente compartilham o mesmo percurso ou são sobrepostos

3.3 Montagem Experimental

A montagem experimental deste trabalho baseia-se em um interferômetro de Mach-Zehnder modificado, utilizando um laser de He-Ne ($632,8\text{nm}$) como fonte luminosa coerente. O sistema óptico inicia-se com um filtro espacial (FE) (composto por uma lente objetiva e um pinhole de $30\mu\text{m}$) que retira a colimação do feixe laser, produzindo uma frente de onda plana ideal para interferometria. O feixe é então dividido pelo primeiro divisor de feixe (BS) (90/10) que transmite 90% da luz que recebe e reflete os outros 10% em dois braços: o feixe de referência (10%) e o feixe objeto (90%).

O feixe objeto (FO) é direcionado para a amostra (A) e, subsequentemente, para uma lente objetiva (LO) que amplifica a imagem, enquanto o feixe de referência (FR) percorre um caminho separado com controle de intensidade, feito com o uso de filtros de densidade neutra. A recombinação dos feixes a partir do segundo divisor de feixe (BS) (50/50) gera o padrão de interferência que é capturado por uma câmera CMOS, permitindo o registro digital do holograma. Esta configuração oferece vantagens significativas em termos de resolução espacial e sensibilidade quando comparada a sistemas convencionais. Observe o esquema a seguir:

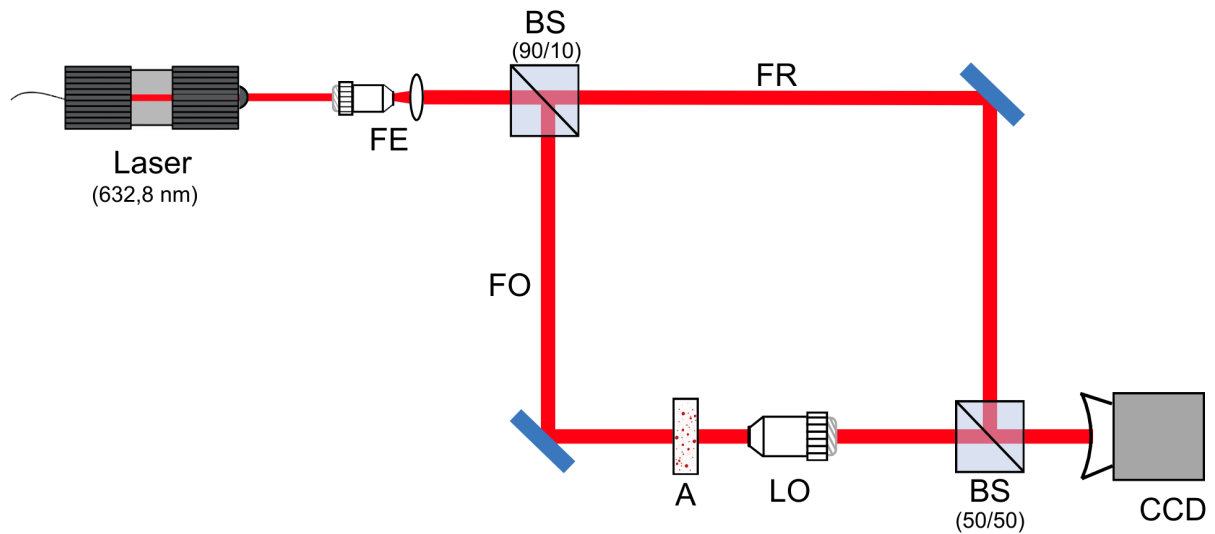


Figura 3 – Esquema experimental usado para Microscopia Holográfica Digital.

Aqui têm-se uma foto da montagem experimental na mesa óptica:

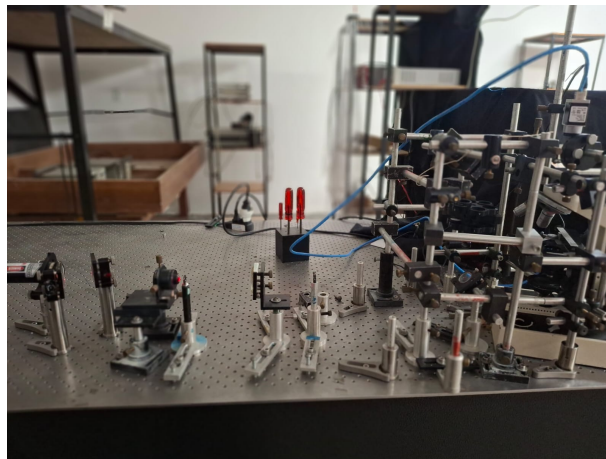


Figura 4 – Foto da configuração experimental para Microscopia Holográfica Digital.

No protótipo desenvolvido, a lente objetiva foi posicionada a uma distância fixa da câmera CMOS, estabelecendo uma relação de magnificação constante para análise dimensional direta das amostras. A calibração do sistema foi realizada utilizando uma régua de calibração padronizada (escala de $10\mu m$, Fig. 7), permitindo a conversão pixel-para-micrômetros. Mediante este procedimento, determinou-se que os glóbulos vermelhos analisados apresentam diâmetro de $6,53 \pm 0,16\mu m$ (Figuras 5 e 6), valor condizente com a literatura para eritrócitos humanos (BRITO, 2015).

Para garantir a estabilidade do padrão de interferência, a montagem foi realizada em uma mesa óptica com isolamento vibratório, minimizando perturbações mecânicas

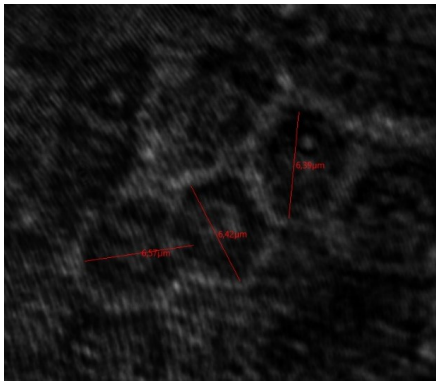


Figura 5 – Medida do tamanho de três glóbulos em um holograma



Figura 6 – Medida do tamanho de um glóbulo

externas. Adicionalmente, filtros ópticos foram inseridos no braço de referência para equilibrar a intensidade dos feixes, otimizando o contraste dos padrões de interferência capturados pela câmera CMOS.

Os hologramas capturados foram processados no software HOLODIG (desenvolvido por Francisco e Guillermo Palacios no MATLAB®), que implementa alguns métodos de reconstrução: transformada de Fourier, método do espectro angular e o método da dupla propagação cujos detalhes computacionais serão discutidos na Seção 4..

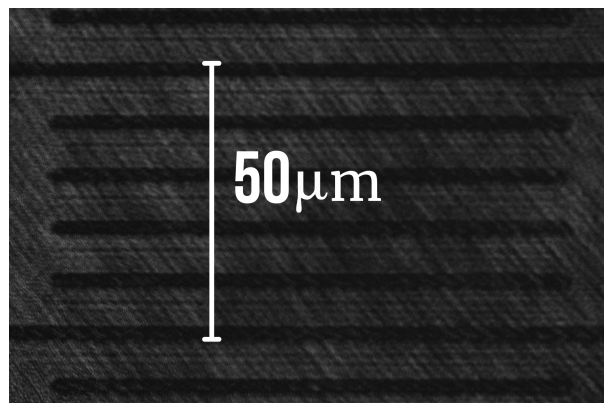


Figura 7 – Régua de Calibração

3.4 Aplicações

A técnica empregada neste trabalho consiste em um método avançado, que tem sido amplamente utilizado em diversas áreas devido à sua capacidade de oferecer uma visualização precisa e detalhada de objetos microscópicos em três dimensões. Na biologia e medicina, por exemplo, ela permite o estudo de células, tecidos e organismos vivos

em tempo real, sem a necessidade de corantes ou fixadores que poderiam interferir na integridade da amostra.

Como demonstrado por (MONTEIRO, 2012), esta técnica permite a análise tridimensional quantitativa de superfícies com resolução nanométrica, superando as limitações dos campos ópticos convencionais com relação à profundidade de campo e capacidade de medição precisa.

No contexto da engenharia e ciência dos materiais, a técnica tem-se mostrado eficaz para aplicações em metrologia de superfícies, possibilitando medições precisas de rugosidade e topografia (KREIS, 2005). Outra aplicação significativa encontra-se na área de inspeção não destrutiva, onde o método permite a identificação precisa de defeitos internos e trincas em componentes industriais.

No âmbito industrial, a microscopia holográfica digital vem sendo incorporada em sistemas de controle de qualidade, onde sua capacidade de fornecer imagens tridimensionais de alta resolução possibilita a verificação dimensional de microcomponentes e a detecção precoce de falhas em linhas de produção. A versatilidade do método permite sua aplicação em diversos setores industriais, desde a fabricação de componentes eletrônicos até a indústria aeronáutica, onde a precisão dimensional é crítica. Essa ampla aplicabilidade corrobora o potencial da técnica como ferramenta indispensável para avanços em pesquisa e desenvolvimento de materiais. (MONTEIRO, 2012)

4 Reconstrução do Holograma

A reconstrução de hologramas constitui etapa fundamental para as aplicações científicas e tecnológicas da holografia, sendo o processo responsável pela recuperação da informação tridimensional contida na amostra. Na holografia digital, esse procedimento apresenta vantagens significativas em relação aos métodos clássicos: a reconstrução numérica dispensa o uso de componentes ópticos físicos, sendo realizada inteiramente através de algoritmos computacionais. Essa abordagem oferece maior flexibilidade operacional, permitindo ajustes nos parâmetros de reconstrução e facilitando análises quantitativas posteriores.

A holografia está diretamente ligada ao princípio ondulatório da luz e pode ser explicada pelos princípios de difração e interferência. Neste trabalho, a holografia é realizada essencialmente através da interferência. O holograma é definido como o padrão de interferência resultante da combinação de duas ondas: a onda do objeto e a onda de referência (PICART,).

A reconstrução do campo ondulatório complexo a partir do holograma digital envolve a multiplicação do holograma pela onda de referência. Esse procedimento pode ser comparado à iluminação da placa holográfica pelo feixe de referência em uma reconstrução óptica tradicional, onde se ilumina uma placa holográfica com um feixe semelhante ao feixe de referência para revelar a imagem armazenada. No caso digital, em vez de usar um holograma físico, utiliza-se um holograma digital armazenado em um computador (ÁLVAREZ, 2011).

Para a holografia digital, o desafio central reside no cálculo eficiente e preciso da integral de difração. Três abordagens amplamente utilizadas para este fim são o método da transformada de Fourier, o método do espectro angular e a dupla propagação (KIM, 2010).

O Princípio de Huygens postula que cada ponto de uma frente de onda primária atua como uma fonte de ondículas esféricas secundárias. Essas ondículas se propagam para fora, e a nova frente de onda em um momento posterior é formada pela envoltória dessas ondículas. Esse princípio permite determinar a forma e a direção da onda à medida que ela se afasta de sua fonte. Fresnel propôs que o princípio de Huygens poderia ser entendido como um fenômeno de interferência, resultando assim no denominado princípio de Huygens-Fresnel.(COSTA, 2005).

4.1 Método da Transformada de Fourier

Algo importante a se saber para a reconstrução digital do holograma são diversos parâmetros experimentais, tais como as características da fonte de iluminação, o tamanho do pixel do sensor eletrônico e a distância do objeto ao sensor. (MONTEIRO, 2012)

Para reconstruir digitalmente o holograma, um dos métodos mais diretos emprega a transformada de Fourier. Esta abordagem é derivada da integral de difração de Fresnel-Kirchhoff e permite o cálculo eficiente do campo de onda no plano da imagem. Adicionalmente, o domínio de Fourier é propício para a aplicação de filtros espaciais que visam atenuar ruídos experimentais. (ÁLVAREZ, 2011)

Para obter a reconstrução do holograma digitalmente, realiza-se uma reconstrução numérica da imagem utilizando a transformada de Fourier. A expressão utilizada na reconstrução de hologramas digitais é derivada a partir da integral de Fresnel-Kirchhoff, que descreve a difração de uma onda luminosa ao passar por uma abertura em um plano perpendicular ao feixe incidente. Esta integral, amplamente empregada em óptica, permite calcular a distribuição espacial da onda difratada, baseando-se na sua propagação através da abertura (FLORES, 2019).

Consideram-se dois planos: o plano do holograma e o plano da imagem reconstruída, como ilustrado na Figura 8. A função $h(\xi, \eta)$ representa a amplitude do campo no plano do holograma, enquanto a distância ρ denota a separação entre um ponto no plano do holograma e o ponto correspondente no plano da imagem. A função $\psi(x, y)$ descreve a amplitude no plano da imagem reconstruída.

Adicionalmente, $R(\xi, \eta)$ é a função que representa a amplitude do feixe de referência no plano ξ, η , e λ é o comprimento de onda da luz utilizada. O ângulo θ é definido entre a linha que une os pontos correspondentes em ρ e o eixo z , que é perpendicular a ambos os planos. A expressão $\left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos \theta\right)$ é conhecida como fator de obliquidade, e é usada para descrever a modulação angular da intensidade do feixe em relação à normal dos planos. (FLORES, 2019)

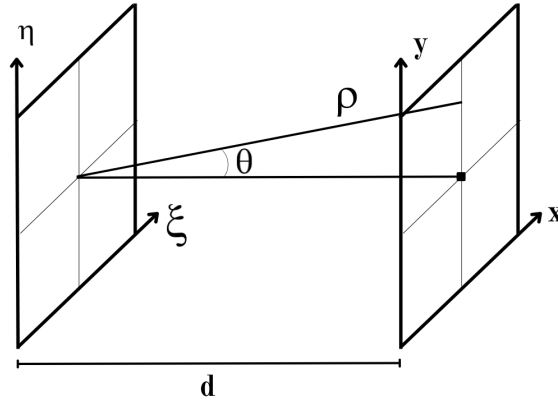


Figura 8 – Sistema de coordenadas adotado no processo de simulação da difração da luz por um holograma digital.

$$\Psi(x, y) = \frac{i}{\lambda} \iint_{-\infty}^{\infty} h(\xi, \eta) R(\xi, \eta) \frac{\exp\left(-\frac{i2\pi}{\lambda} \rho\right)}{\rho} \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos \theta\right) d\xi d\eta \quad (4.1)$$

$$\text{onde } \rho = \sqrt{d^2 + (x - \xi)^2 + (y - \eta)^2}$$

Veja que, se a distância d entre o holograma e a imagem real é muito maior que a máxima dimensão do sensor da câmera, poderá ser usada a teoria da difração escalar de Fresnel para campo próximo (MONTEIRO, 2012). Esta condição se cumpre desde que

$$d^3 \gg \frac{\pi}{4\lambda} [(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2]_{max}^2 \quad (4.2)$$

No contexto da montagem de um microscópio holográfico digital, a aproximação de Fresnel $\rho = d + \frac{(x-\xi)^2}{2d} + \frac{(y-\eta)^2}{2d}$ é comumente empregada devido à condição dada pela equação 4.2 ser fácil de se conseguir experimentalmente, sua simplicidade e eficiência computacional, bem como à sua capacidade de fornecer resultados precisos em muitas situações práticas, e com ela, a equação (4.1) torna-se, a equação do campo ondulatório (COSTA, 2005)

$$\Psi(x, y, d) = \exp\left[\frac{i\pi}{\lambda d}(x^2 + y^2)\right] \iint I_h(\xi, \eta) R(\xi, \eta) g(\xi, \eta) \times \exp\left[-\frac{2i\pi}{\lambda d}(\xi x + \eta y)\right] d\xi d\eta. \quad (4.3)$$

(ÁLVAREZ, 2011)

Onde a função de fase quadrática $g(\xi, \eta)$ é a resposta de impulso (4.4), $R(\xi, \eta)$ é a função que representa a amplitude do feixe de referência no plano $\xi\eta$ e $I_H(\xi, \eta)$ é a amplitude do holograma.

$$g(\xi, \eta) = \frac{ie^{i\frac{2\pi d}{\lambda}}}{\lambda d} e^{\frac{i\pi}{d\lambda}(\xi^2 + \eta^2)} \quad (4.4)$$

A Integral de Fresnel-Kirchhoff descreve o campo no plano como resultante da superposição de infinitas fontes pontuais secundárias, todas localizadas na própria abertura, que neste caso corresponde ao holograma. (BRITO, 2015)

Algo importante a se saber para a reconstrução digital do holograma são diversos parâmetros experimentais, tais como as características da fonte de iluminação, o tamanho do pixel do sensor eletrônico e a distância do objeto ao sensor. (MONTEIRO, 2012)

4.2 Método do Espectro Angular

O nome 'método do espectro angular' deve-se à interpretação da decomposição de Fourier de um campo U , que representa a amplitude complexa de uma onda eletromagnética. Esse campo U pode ser visto como uma soma de ondas planas que se propagam em diferentes direções. (GOODMAN, 1996) A ideia central é que, ao decompor o campo em suas componentes de Fourier, é possível analisar e manipular a propagação da luz em diferentes direções e planos.

Imagine uma onda monocromática que incide no plano (x,y) e se propaga na direção z . Onde $U(x,y,0)$ é o campo complexo no eixo z , e queremos obter o campo $U(x,y,z)$, que pode ser expresso como uma soma de ondas planas, cada uma com uma direção de propagação específica. Para tal, vamos escrever esse plano tomando a transformada de Fourier bidimensional (ROQUE, 2013)

$$U(x, y, 0) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} A(k_x, k_y, 0) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (4.5)$$

onde $U(x,y,0)$ é a amplitude complexa da onda no plano $z=0$, representando a intensidade e a fase do campo luminoso no holograma. $A(k_x, k_y, 0)$ é o espectro angular da onda no plano $z=0$, ou seja, a decomposição da onda em ondas planas. $e^{i2\pi(k_x x + k_y y)}$ representa uma onda plana que se propaga em $z=0$ com os componentes k_x e k_y do vetor de onda. E $dk_x dk_y$ são os elementos diferenciais que somam todas as contribuições das ondas planas.

Essa equação é a transformada inversa de Fourier bidimensional. Ela reconstrói o campo $U(x, y, 0)$ a partir do espectro angular $A(k_x, k_y, 0)$, que pode ser expresso da seguinte forma:

$$A(k_x, k_y, 0) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} U(x, y, 0) e^{-i2\pi(k_x x + k_y y)} dx dy \quad (4.6)$$

onde k_x e k_y são as frequências espaciais nas direções x e y . (ROQUE, 2013)

O campo para um z qualquer pode ser expresso como:

$$U(x, y, z) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} A(k_x, k_y; z) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (4.7)$$

Como $U(x, y, z)$ satisfaz a equação de Helmholtz, temos que (GOODMAN, 1996)

$$\nabla^2 U(x, y, z) + k^2 U(x, y, z) = 0. \quad (4.8)$$

logo,

$$\nabla^2 \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} A(k_x, k_y; z) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y + k^2 \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} A(k_x, k_y; z) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y = 0 \quad (4.9)$$

-Resolvendo o laplaciano, teremos

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} A(k_x, k_y; z) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} = -(2\pi k_x)^2 A(k_x, k_y; z) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} \quad (4.10)$$

$$\frac{\partial^2}{\partial y^2} A(k_x, k_y; z) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} = -(2\pi k_y)^2 A(k_x, k_y; z) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} \quad (4.11)$$

$$\frac{\partial^2}{\partial z^2} A(k_x, k_y; z) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} = e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} \frac{d^2}{dz^2} A(k_x, k_y; z) \quad (4.12)$$

Com isso

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \left(\frac{d^2}{dz^2} A(k_x, k_y; z) + [-(2\pi)^2 [(k_x)^2 + (k_y)^2] + k^2] A(k_x, k_y; z) \right) e^{i2\pi(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y = 0 \quad (4.13)$$

Podemos calcular a transformada de Fourier para chegar na equação diferencial,

$$\frac{d^2}{dz^2} A(k_x, k_y; z) + \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 [1 - (\lambda k_x)^2 - (\lambda k_y)^2] A(k_x, k_y; z) = 0 \quad (4.14)$$

cuja solução é,

$$A(k_x, k_y, z) = A(k_x, k_y, 0)e^{i\frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{1-(\lambda k_x)^2-(\lambda k_y)^2}z} \quad (4.15)$$

Voltando para a expressão do campo, teremos:

$$U(x, y, z) = \mathcal{FFT}^{-1}[A(k_x, k_y, 0)e^{i\frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{1-(\lambda k_x)^2-(\lambda k_y)^2}z}] \quad (4.16)$$

No plano $z=0$, o espectro angular $A(k_x, k_y, 0)$ é dado pela transformada de Fourier do campo $U(x, y, 0)$

$$A(k_x, k_y, 0) = \mathcal{FFT}[U(x, y, 0)] \quad (4.17)$$

Substituindo 4.17 em 4.16, teremos:

$$U(x, y, z) = \mathcal{FFT}^{-1}[\mathcal{FFT}[U(x, y, 0)]e^{i\frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{1-(\lambda k_x)^2-(\lambda k_y)^2}z}] \quad (4.18)$$

Veja que a FFT (Transformada Rápida de Fourier) é preferida em relação à DFT (Transformada Discreta de Fourier) devido à sua maior eficiência computacional. Enquanto a DFT requer $O(N^2)$ operações (ou seja, N^2 multiplicações e somas complexas), a FFT reduz essa complexidade para $O(N \log N)$. Essa melhoria é alcançada ao dividir o problema em partes menores e aproveitar simetrias matemáticas, tornando a FFT muito mais rápida, especialmente para grandes valores de N .

O método do Espectro Angular (MEO) é amplamente preferido em comparação com o CV (Convolução) e o SFTF (Transformada de Fourier de Fração de Seno) devido à sua flexibilidade e eficiência. Diferente do CV, que exige uma distância mínima de reconstrução e demanda mais tempo de cálculo, o MEO não possui restrições de distância, permitindo a reconstrução de hologramas plano-imagem, onde o plano da imagem coincide com o do CCD. Além disso, o ASA mantém as dimensões da imagem reconstruída idênticas às do holograma original, ao contrário do SFTF, que altera a escala da imagem, o que pode ser problemático em aplicações como a reconstrução de hologramas de cor.

Outra vantagem do MEO é sua capacidade de lidar com objetos maiores que o CCD, uma limitação do método CV, que só funciona para objetos menores, resultando em imagens reconstruídas com poucos pixels e qualidade reduzida. O ASA, por outro lado, é aplicável a uma variedade de cenários, incluindo a reconstrução de hologramas de objetos extensos, sem comprometer a resolução ou a precisão dimensional. Essas características tornam o ASA mais versátil e eficiente, consolidando-o como o método mais utilizado na reconstrução de hologramas em aplicações práticas. (ROQUE, 2013)

4.3 Dupla Propagação

O método de dupla propagação baseia-se em dois estágios fundamentais de processamento do campo óptico. Na primeira etapa, o campo é propagado até o plano focal posterior da lente objetiva - conhecido como plano de Fourier - onde ocorre uma separação espacial natural dos componentes espectrais. Esta característica permite a aplicação de filtragem espacial seletiva, eliminando termos indesejados como a ordem zero e a imagem conjugada (real), que se encontram fisicamente separados do termo útil no domínio de Fourier. A segunda etapa consiste na propagação das amplitudes complexas filtradas até o plano de imagem final. Esta abordagem sequencial oferece vantagens significativas para microscopia quantitativa, já que combina a remoção de artefatos com a preservação da informação estrutural relevante da amostra, resultando em imagens com maior resolução espacial e relação sinal-ruído aprimorada. (JUNIOR, 2012)

O campo produzido pela lente objetiva pode ser reconstruído em qualquer plano ao longo da direção de propagação do campo. Normalmente, como vimos nos métodos de reconstrução anteriores, o campo óptico $\psi(x, y)$ no plano da imagem é calculado pela propagação da frente de onda $\psi(\xi, \eta)$ a uma distância $z = d$ do plano do holograma (ξ, η) , fig. 8.

No método da dupla propagação, desenvolvido por Palacios e colaboradores (PALACIOS et al., 2011), têm-se dois estágios que envolvem os campos de propagação das ondas. No primeiro estágio, fig. 9 vamos reconstruir a onda de distribuição $\tilde{\psi}(u, v)$ no plano (u, v) a uma distância $z = D$ do plano de reconstrução.

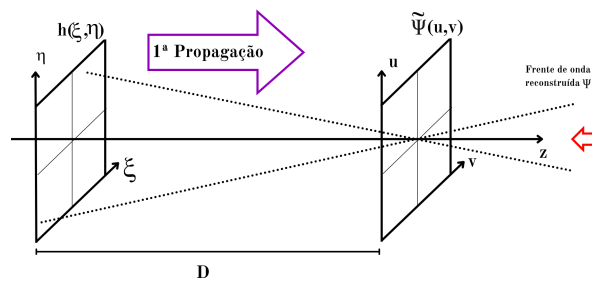


Figura 9 – Reconstrução da onda de distribuição $\tilde{\psi}(u, v)$ no plano (u, v) a uma distância D do plano de reconstrução.

Aplicando o método do espectro angular (MEA), visto anteriormente, é possível calcular a distância D . Em seguida, usa-se a transformada simples de Fourier para a

primeira propagação.

$$\psi(u, v; z) = A e^{\frac{i\pi}{\lambda z}(u^2+v^2)} \mathcal{F}[h(\xi, \eta) e^{\frac{i\pi}{\lambda z}(\xi^2+\eta^2)}] \quad (4.19)$$

onde z é a distância da reconstrução, $\mathcal{F}$ é o operador da transformada de Fourier e $A = e^{\frac{i2\pi z}{\lambda}}$ pode ser considerado uma onda plana de referência, $h(\xi, \eta)$ é o campo óptico no plano do holograma e $e^{\frac{i\pi}{\lambda z}(\xi^2+\eta^2)}$ é aplicado ao campo no plano inicial do holograma, $h(\xi, \eta)$, antes da transformada de Fourier. Ele atua como um "modulador de fase". Basicamente, ele adiciona uma curvatura quadrática à frente de onda, preparando-a para a propagação. Com isso, em $z = D$ filtra-se o espectro angular para suprimir o termo de ordem zero e a imagem real.

$$\psi^f(u, v; D) = A e^{\frac{i\pi}{\lambda D}(u^2+v^2)} \mathcal{F}[h^f(\xi, \eta) e^{\frac{i\pi}{\lambda D}(\xi^2+\eta^2)}] \quad (4.20)$$

Note que $e^{\frac{i\pi}{\lambda D}(u^2+v^2)}$ é aplicado após a transformada de Fourier. Ele ajusta a fase de cada componente de frequência espacial da onda no plano de Fourier, garantindo que a propagação para a distância z seja calculada corretamente. $\psi^f(u, v; D)$ é o campo óptico filtrado no plano (u, v) a uma distância D , o superescrito 'f' indica que o campo foi filtrado. D é a distância específica da primeira propagação. E $h^f(\xi, \eta)$ é o campo óptico no plano do holograma, mas já filtrado para suprimir o termo de ordem zero e a imagem real.

O campo complexo $\psi^f(u, v; D)$, como visto em (PALACIOS et al., 2011), é semelhante à distribuição de plano complexo $\tilde{\psi}(u, v)$ no plano focal posterior da lente objetiva, que pode ser expresso por

$$\tilde{\psi}(u, v) = S_\phi(u, v) \mathcal{F}[o(x_0, y_0, \lambda f)] \cong \psi^f(u, v; D) \quad (4.21)$$

onde

$$S_\phi(u, v) = \frac{i}{\lambda f} e^{-ik(S_0+f)} e^{\frac{ik}{2f}(u^2+v^2)(1-\frac{S_0}{f})} \quad (4.22)$$

sendo $S_\phi(u, v)$ um fator de fase, S_0 a distância entre o objeto e a lente, f a distância focal, λ o comprimento de onda da onda plana incidente e k o número de onda, onde $k = \frac{2\pi}{\lambda}$.

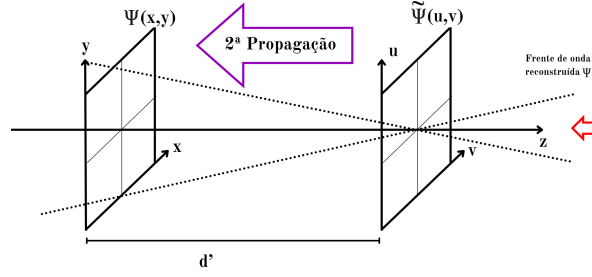


Figura 10 – Reconstrução da onda óptica $\psi(x, y)$ no plano da imagem a partir do plano (u, v) .

Na segunda parte desse método, o campo complexo $\psi(x, y; d')$ que está a uma distância arbitrária d' pode ser obtido pela propagação do campo $\tilde{\psi}(u, v)$ a uma distância d' , onde o resultado será uma transformada inversa de Fourier,

$$\psi(x, y; d') = \mathcal{F}^{-1}[\tilde{\psi}(u, v; D)e^{id'\sqrt{k^2+k_u^2+k_v^2}}] \quad (4.23)$$

onde $k = \frac{2\pi}{\lambda}$, k_u e k_v correspondem às frequências espaciais de u e v , respectivamente. A implementação numérica dessa equação é chamada de algoritmo da dupla propagação e é dada por:

$$\psi(m, n; d') = \mathcal{F}\mathcal{F}\mathcal{T}^{-1}[\tilde{\psi}(l, j; D)\exp[2\pi id'\sqrt{(\frac{1}{\lambda})^2 + (\frac{l}{N\Delta\xi})^2 + (\frac{j}{M\Delta\eta})^2}]] \quad (4.24)$$

onde j, l, m, n são inteiros $(-\frac{M}{2} < j, l < \frac{M}{2})$ e $\tilde{\psi}(l, j; D)$ é a formulação discreta da equação 4.21. Pela equação 4.24 podemos obter a intensidade da imagem $I(x, y; d')$ calculando o módulo quadrado de 4.24 $(|\psi(m, n; d')|^2)$ e a imagem de fase $(\phi(x, y; d'))$ calculando $\arg[\psi(m, n; d')]$.

O método de Dupla Propagação é particularmente útil em microscopia holográfica digital porque permite compensar distorções ópticas e melhorar significativamente a resolução espacial da imagem reconstruída. Ao decompor o processo em dois estágios - primeiramente propagando para o plano focal da lente objetiva e depois para o plano de imagem final - o método consegue separar e corrigir eficientemente os efeitos de difração das imperfeições do sistema óptico. Essa abordagem é mais precisa do que os métodos de propagação única, pois preserva melhor as informações de fase e amplitude do campo óptico.

A eficácia do método reside em sua capacidade de reconstrução quantitativa precisa do campo de onda, permitindo análises tanto da intensidade quanto da fase da luz. Isto é especialmente valioso para aplicações como imageamento de células biológicas ou estruturas micro/nano, onde pequenas variações de fase podem conter informações críticas. A filtragem no domínio espectral entre as duas propagações ainda permite a supressão seletiva de ruídos e artefatos, resultando em imagens mais limpas e confiáveis.

4.4 Unwrapping

Em sistemas de interferometria óptica, a fase medida é *wrapped* (envolvida) no intervalo $(-\pi, \pi]$ devido à natureza periódica das funções trigonométricas utilizadas na aquisição. O *phase unwrapping* (desdobramento de fase) consiste na recuperação da fase absoluta contínua a partir desse sinal descontínuo, removendo os saltos de 2π decorrentes do enovelamento. Formalmente, o objetivo é reconstruir um campo de fase $\phi(x, y)$ contínuo a partir de sua representação *wrapped* $W[\phi(x, y)]$, onde: (GHIGLIA; PRITT, 1998)

$$W[\phi(x, y)] = \phi(x, y) \bmod 2\pi \in (-\pi, \pi]. \quad (4.25)$$

Sendo $W[\phi(x, y)]$ a fase enovelada (*wrapped*) que é medida, $\phi(x, y)$ a fase absoluta contínua (que queremos recuperar) e $\bmod 2\pi$ a operação de módulo 2π , que garante que o resultado esteja no intervalo $(-\pi, \pi]$.

A fase *wrapped* associada ao sinal $\phi(t)$ pode ser expressa como

$$W(\phi(t)) = \phi(t) + 2\pi k_\phi(t) \quad (4.26)$$

onde $k_\phi(t) = \left\lfloor \frac{\pi - \phi(t)}{2\pi} \right\rfloor$ envolve (*wraps*) os valores da fase $\phi(t)$ ao intervalo $(-\pi, \pi]$, W é o operador de *wrapping* e $\psi(t) = W(\phi(t))$ é a saída *wrapped*.

O processo de *phase unwrapping* é aquele em que os saltos artificiais de 2π no sinal *wrapped* $\psi(t)$ devem ser detectados e eliminados, com o objetivo de reconstruir o sinal contínuo original $\phi(t)$.

Uma reconstrução não ambígua da fase por *unwrapping* é possível apenas se for satisfeita a condição de Itoh, em que a diferença entre duas amostras em uma fase contínua não excede π . (GHIGLIA; PRITT, 1998)

O *unwrap* é usado porque o mapa de fase tem uma descontinuidade na função arco-tangente, que é representada como um gráfico bidimensional limitado ao intervalo de valores de fase de $-\pi$ a π . Desse modo, o mapa gerado apresenta saltos que correspondem

à variação desse intervalo. Para remover essa ambiguidade, fazemos um processo chamado *phase unwrapping* (desdobramento de fase). (BRITO, 2015)

4.5 HOLODIG

Graças à generosa colaboração do Dr. Guillermo Palacios, que gentilmente cedeu o programa HOLODIG - um software desenvolvido para reconstrução digital de hologramas - foi possível realizar de forma ágil e eficiente a reconstrução das imagens holográficas. Com os métodos da transformada de Fourier, do espectro angular e da dupla propagação disponíveis no software, a reconstrução dos hologramas obtidos na montagem experimental tornou-se significativamente mais simples.

5 Resultados

Como resultado, conseguiu-se montar um microscópio holográfico, cujos hologramas deram resultados satisfatórios. Foram utilizadas amostras de sangue com leucemia, com o intuito de obter reconstruções digitais dos glóbulos vermelhos.

Usando uma régua de calibração para calibrar o sistema, pôde-se medir o comprimento dos glóbulos e obteve-se que eles têm $\approx 7\mu m$ de comprimento, o que está de acordo com a literatura.

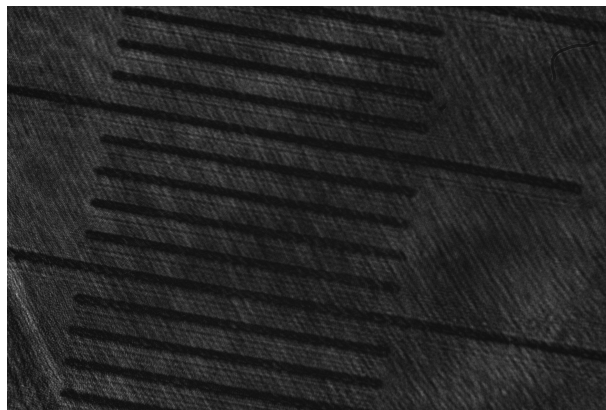


Figura 11 – Régua de calibração através da lente de 40x

O processamento computacional dos hologramas foi realizado mediante o software HOLODIG, permitindo a reconstrução numérica tridimensional dos eritrócitos. As imagens obtidas revelam a morfologia bicôncava característica dos glóbulos vermelhos, além de sua distribuição espacial no campo de observação.

O experimento demonstrou desempenho satisfatório, produzindo imagens que contêm informações adicionais de fase e tridimensionais, as quais não estão acessíveis através de microscopia óptica convencional. A Figura 12 apresenta uma imagem de microscópio óptico convencional, enquanto a Figura 13 mostra o holograma correspondente obtido pelo sistema de microscopia holográfica digital (MHD). Ambas as imagens foram capturadas por um sensor CMOS acoplado ao sistema, utilizando uma lente objetiva de 60 $\times$ para observação dos glóbulos vermelhos. A Figura 12 foi obtida sob iluminação convencional (lanterna branca) sem o aparato interferométrico, enquanto a Figura 13 requereu iluminação coerente com laser de He-Ne ($\lambda = 632,8nm$) e todo o arranjo experimental previamente descrito para registro dos padrões de interferência.

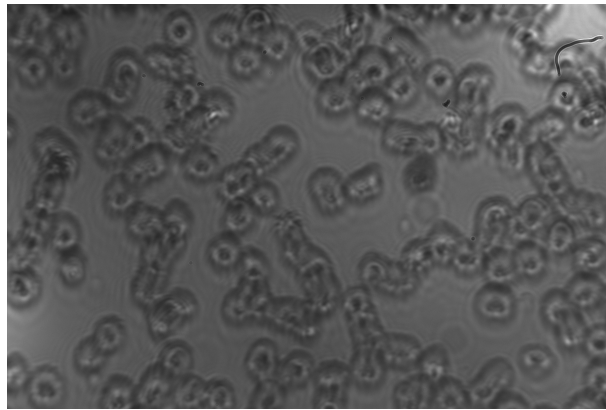


Figura 12 – Glóbulos com leucemia observados por um microscópio óptico

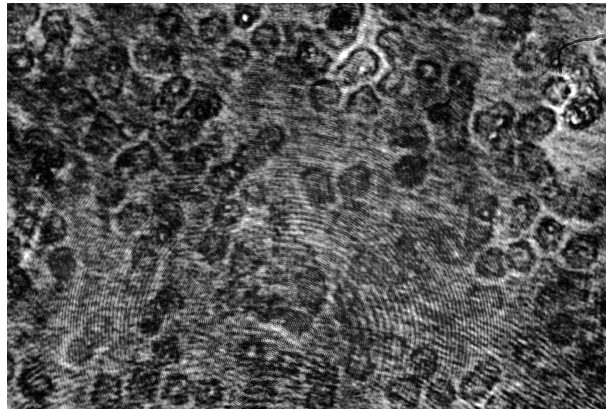


Figura 13 – Holograma de glóbulos com leucemia

Observa-se que a imagem convencional exibe características estéticas mais nítidas, enquanto o holograma do MHD apresenta um padrão de interferência menos intuitivo, com aparência manchada. Contudo, embora menos atraente visualmente em sua forma bruta, o registro holográfico codifica informações tridimensionais completas da amostra. Através dos princípios da holografia digital, a Figura 13 pode ser reconstruída numericamente para extrair seu mapa de fase, permitindo uma visualização tridimensional dos glóbulos vermelhos, conforme demonstrado na Figura 14.

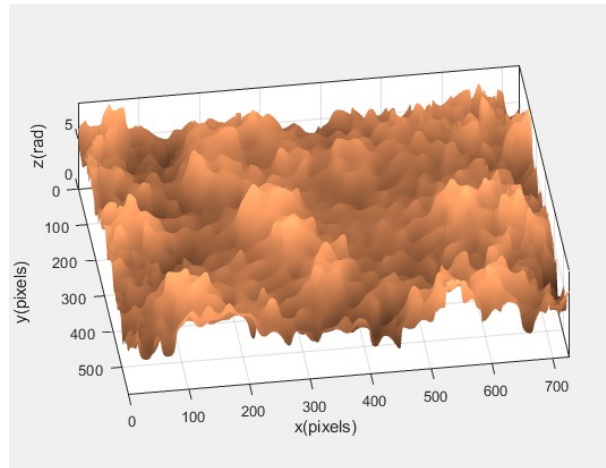


Figura 14 – Reconstrução do holograma dos glóbulos vermelhos

Foi observado que a preparação das amostras é uma etapa importante no processo de captura do holograma. A Fig. 13 foi obtida a partir de uma amostra fixada com corantes, os quais são adequados para visualização em microscópios ópticos convencionais. Entretanto, quando se substitui a luz branca por luz laser, os corantes perdem sua finalidade e acabam mais atrapalhando do que ajudando, como pode ser observado na Fig. 15, que mostra um holograma obtido de uma amostra sem corante.

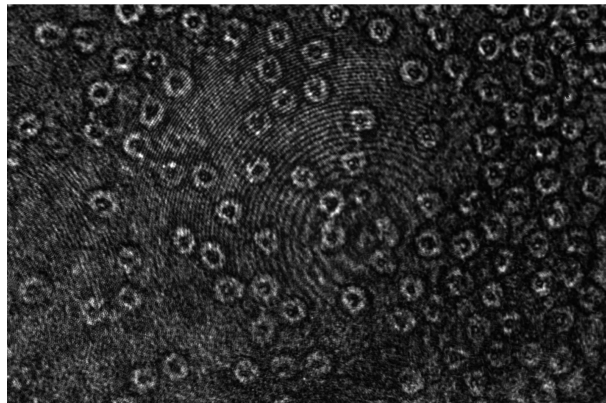


Figura 15 – Holograma de amostra de sangue sem corante

Cuja reconstrução, realizada utilizando o método da dupla propagação, obteve os seguintes resultados:

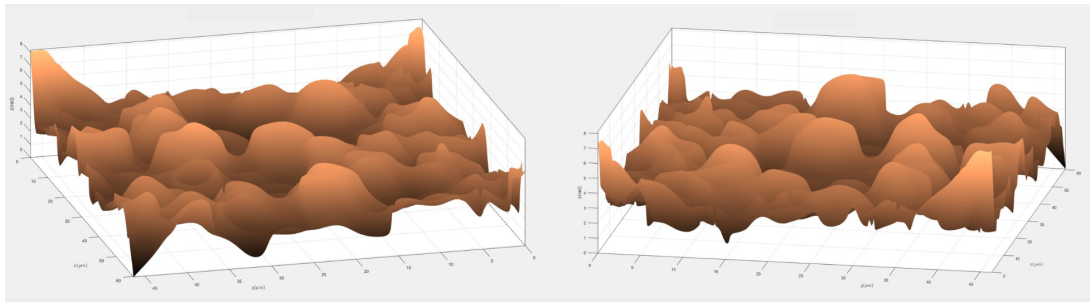


Figura 16 – Reconstrução do holograma sem corantes

Verificou-se, em ambos os hologramas, que parte das aberrações ópticas observadas decorre de características intrínsecas do sistema laser (como desvios de alinhamento e imperfeições de coerência) e da sensibilidade inerente ao arranjo experimental (como vibrações mecânicas e instabilidades térmicas). Conforme ilustrado na Figura 17, que mostra o padrão de interferência do laser sem amostra, é possível identificar aberrações provenientes tanto da fonte luminosa quanto da lente objetiva utilizada.

Para melhorar essa interferência, implementou-se o ajuste dinâmico de filtros ópticos no feixe de referência, otimizando assim o padrão de interferência em função da lente objetiva empregada ($40\times$, $60\times$). Esse procedimento permitiu a aquisição de hologramas para diferentes configurações de magnificação.

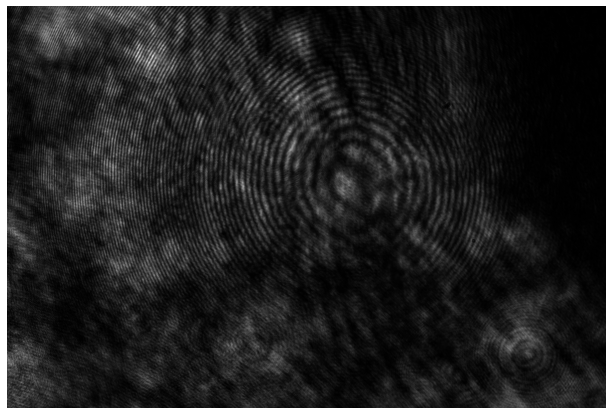


Figura 17 – Imagem do laser com interferência visto através da lente objetiva de $100\times$

Particularmente notável é a capacidade de análise quantitativa proporcionada pela técnica, que possibilita medições de parâmetros volumétricos e superficiais em três dimensões, superando as limitações bidimensionais da microscopia convencional. A representação tridimensional obtida não apenas confirma a viabilidade do método, mas também demonstra seu potencial para estudos morfométricos detalhados em hematologia.

6 Considerações finais

O presente trabalho teve como objetivo principal implementar e desenvolver um sistema de microscopia holográfica digital, explorando seus princípios teóricos, metodologias experimentais e aplicações práticas. A técnica mostrou-se eficaz na captura e reconstrução de imagens tridimensionais de amostras microscópicas, em particular de glóbulos vermelhos, demonstrando seu potencial para análises quantitativas em biologia e medicina.

A montagem experimental baseada em um interferômetro de Mach-Zehnder permitiu a obtenção de hologramas digitais, superando algumas limitações dos microscópios ópticos convencionais.

Os resultados obtidos confirmaram a viabilidade da técnica para aplicações médicas, como o estudo de células sanguíneas e a detecção de anomalias como a anemia falciforme. A resolução alcançada permitiu visualizar glóbulos vermelhos com dimensões próximas a $8\mu m$, em concordância com valores encontrados na literatura.

Embora os resultados confirmem o potencial da técnica, sua trajetória de consolidação passa necessariamente pela superação de limitações identificadas, tais como a sensibilidade a ruídos, a complexidade do aparato experimental e a carga computacional inerente ao processamento. O aprimoramento contínuo nestas frentes—seja pelo refino de algoritmos, pela criação de sistemas mais compactos e acessíveis, ou pela incorporação de ferramentas de análise automatizada—é fundamental para transformar o promissor potencial aqui demonstrado em uma ferramenta robusta e ubíqua para diagnóstico e pesquisa.

Este trabalho contribuiu para o avanço do conhecimento na área de microscopia holográfica digital, demonstrando sua eficácia como ferramenta para imageamento microscópico tridimensional. Os resultados obtidos reforçam o potencial da técnica para revolucionar diversas áreas da ciência e tecnologia, abrindo caminho para pesquisas futuras que poderão explorar todo o seu potencial. Acredita-se que, com os devidos aprimoramentos, a microscopia holográfica digital poderá se tornar uma ferramenta indispensável em laboratórios de pesquisa e diagnóstico médico.

Referências

- BENTON, S. A.; BOVE, V. M. *Holographic Imaging*. [S.l.]: Wiley, 2008.
- BRITO, I. V. d. *Técnicas de Microscopia Holográfica Digital aplicadas à análise de sistemas biológicos*. Tese (Dissertação (Mestrado em Física)) — Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Orientador: Prof. Dr. Mikiya Muramatsu.
- COSTA, G. G. G. *Espectrometria de Lente Térmica: Teoria e Aplicações*. Tese (Tese (Doutorado)) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- FANTIN, A. V. *Holografia digital complexa utilizando um interferômetro shearing*. Tese (Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica)) — Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- FERNANDEZ, M. V. *Desenvolvimento da Microscopia Holográfica Digital por Reflexão para Avaliação 3D de Superfícies*. Tese (Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica)) — Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Orientador: Prof. Dr. Edison Gonçalves.
- FLORES, M. C. X. *Introdução à Holografia Digital da Transformada de Fourier*. Dissertação (Monografia (Graduação em Física - Bacharelado)) — Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2019. Orientador: Prof. Dr. Paulo Acioly Marques dos Santos.
- FUNK, R. L. *Introduction to Microscopy*. Oxford: Oxford University Press, 2008.
- GABOR, D. A new microscopic principle. *Nature*, v. 161, n. 4098, p. 777–778, 1948.
- GABOR, D. *Holography, 1948-1971*. 1971. Nobel Lecture delivered December 11, 1971. Nobel Prize in Physics 1971. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/gabor-lecture.pdf>>.
- GHIGLIA, D. C.; PRITT, M. D. *Two-Dimensional Phase Unwrapping: Theory, Algorithms, and Software*. [S.l.]: Wiley, 1998.
- GOODMAN, J. W. *Introduction to Fourier Optics*. [S.l.]: McGraw-Hill, 1996.
- HECHT, E. *Optics*. 5. ed. [S.l.]: Pearson Education, 2017. ISBN 9780133977226.
- JUNIOR, R. B. d. R. F. *Introdução à Microscopia Holográfica Digital*. Dissertação (Monografia (Graduação em Física - Bacharelado)) — Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012. Orientador: Prof. Dr. Paulo Acioly Marques dos Santos.
- KIM, M. K. Applications of Digital Holography in Biomedical Microscopy. *Journal of the Optical Society of Korea*, v. 14, n. 2, p. 77–89, 2010.

- KREIS, T. *Handbook of Holographic Interferometry: Optical and Digital Methods*. [S.l.]: Springer, 2005.
- LEITH, E. N.; UPATNIEKS, J. Wavefront reconstruction with continuous-tone objects. *Journal of the Optical Society of America*, v. 53, p. 1377–1381, 1963.
- LOPEZ, M. A. P. A. *Microscopia Holográfica Digital Aplicada na Análise de Tecidos Biológicos*. Dissertação (Dissertação (Mestrado em Física)) — Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Orientador: Prof. Dr. Mikiya Muramatsu.
- MONTEIRO, J. M. *Métodos de Interferometria para Inspeção Não Destrutiva*. Tese (Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica)) — Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal, Setembro 2012. Orientador: Mario Augusto Pires Vaz; Coorientador: Hernani Lopes.
- MURPHY, D. B.; DAVIDSON, M. W. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2013.
- PALACIOS, F. et al. Alternative reconstruction method and objects analysis in digital holographic microscopy. 2011.
- PICART, P. *Interferences and Diffraction: Holography: Recording/Reconstruction*. [S.l.: s.n.]. [Detalhes da publicação não fornecidos].
- PICART, P.; LI, J.-c. *Digital Holography*. [S.l.: s.n.]. [Detalhes da publicação não fornecidos].
- PRIBERAM. *Holografia*. In: *Dicionário Priberam da Língua Portuguesa*. Acesso em: 7 dez. 2023. Disponível em: <<https://dicionario.priberam.org/holografia>>.
- ROGERS, G. L. The design of experiments for recording and reconstructing three-dimensional objects in coherent light (holography). *Journal of Scientific Instruments*, v. 43, p. 677–680, 1966.
- ROQUE, G. F. P. *Compensación de aberraciones de fase en Microscopía Holográfica Digital*. Dissertação (Trabalho de Diploma (Licenciado em Física)) — Departamento de Física, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 2013.
- SLAYMAN, K. M. *Biological Microscopy*. San Diego: Academic Press, 2001.
- SOSA, Y. C. A. *Nuevo método para análisis de polarización usando Microscopía Holográfica Digital*. Dissertação (Trabalho de Diploma (Licenciado em Ciências Físicas)) — Departamento de Física, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, 2014. Tutores: Dr. C. Jorge Octavio Ricardo Pérez, Lic. Guillermo Francisco Palacios Roque.
- ZHANG, T.; YAMAGUCHI, I. Three-dimensional microscopy with phase-shifting digital holography. *Optics Letters*, v. 23, n. 15, p. 1221–1223, 1998.

ÁLVAREZ, A. S. *Aplicación de la Microscopía Holográfica Digital al estudio de los eritrocitos de humanos*. Dissertação (Trabalho de Diploma (Licenciado em Ciências Físicas)) — Departamento de Física, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 2011. 2010-2011.