

Milton Augusto Morais Sarmento Pato de Macedo

Métodos Instrumentais de Reconstrução 3D em Microscopia

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra para a obtenção do grau de Doutor em Física, especialidade de Física
Tecnológica



Universidade de Coimbra

2012

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor Carlos Correia, meu orientador, desde logo por, através da sua capacidade de ver mais longe, ter proporcionado a possibilidade de realização deste trabalho. O seu apoio em diversas fases do trabalho foi fundamental para ultrapassar alguns obstáculos técnicos bem como na busca de soluções cientificamente válidas. A confiança em mim depositada foi um tónico decisivo para que, num percurso com demasiadas intermitências, fosse possível chegar até aqui. Também os seus conselhos e sugestões foram importantes na fase de escrita desta tese.

Quero agradecer ao Grupo de Electrónica e Instrumentação, do Centro de Instrumentação, por ter criado as condições logísticas para a realização deste trabalho. Agradeço a disponibilidade de todos, querendo em particular referir a colaboração dos colegas que participaram no projecto, a Mestre Ana Fernandes e o Mestre António Júlio Barata, e a forma prestável como o Doutor António Pinto Rodrigues disponibilizou uma solução para efectuar os primeiros testes de varrimentos do sistema.

Uma palavra também de agradecimento ao Instituto Biomédico para a Investigação da Luz e Imagem (IBILI) por, na fase inicial deste trabalho, ter cedido a mesa óptica e inúmeros componentes ópticos para a realização dos primeiros testes do circuito óptico.

Agradeço ao Professor Doutor Miguel Morgado por estar sempre disponível, pelo apoio nos testes realizados no IBILI, pelas sugestões valiosas que permitiram ultrapassar uma fase mais difícil do trabalho e pelas correcções propostas em parte do texto desta tese.

Não quero deixar de agradecer ao Professor Doutor José Higinio Correia pela disponibilidade e prontidão com que me facultou alguns componentes, desenvolvidos pelo seu grupo de investigação da Universidade do Minho, que foram muito úteis para diversificar o tipo de aplicações do sistema e dos métodos de reconstrução tridimensional.

À minha família, André, Inês e Catarina, quero agradecer a motivação que, consciente ou inconscientemente, me deram para levar este trabalho até ao fim. Em particular à Catarina, pelo incentivo e apoio contantes, pela sua compreensão e pelos sacrifícios que aceitou passar nesta fase de escrita da tese, aqui fica o meu enorme agradecimento.

Por fim, um agradecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento concedido a este trabalho (projecto PRAXIS/C/FIS/10207/98).

Resumo

Neste trabalho foi construído um protótipo laboratorial de um microscópio óptico de varrimento numa mesa óptica, com a finalidade de aproveitar as características dos sensores de imagem, do tipo matriz linear, para o desenvolvimento de um sistema com a capacidade de recolher imagens com informação tridimensional (3D).

A construção deste protótipo envolveu a definição do circuito óptico e a selecção dos seus componentes e o desenvolvimento de um módulo autónomo de leitura do sensor linear bem como de aplicações MATLAB que permitem configurar os varrimentos da plataforma do objecto, controlar o sensor e adquirir os seus dados e visualizar e processar a imagem. É feita uma descrição deste protótipo, discutindo-se as opções realizadas no que se refere à configuração do circuito óptico e à arquitectura global do microscópio e do módulo de leitura do sensor.

Foram realizados testes com diferentes fontes de luz e modos de iluminação. São apresentados os resultados da avaliação da qualidade da imagem nomeadamente no que respeita à avaliação de contraste, resolução lateral, para a qual foi implementado um novo método para a determinação da função de espalhamento pontual (PSF), e principalmente a sua resposta axial. Com o modo de iluminação em linha, através da MTF, obteve-se um valor da razão de Strehl de 0,86, e determinaram-se os valores da resolução lateral e axial de aproximadamente 350 nm e 8 μm , respectivamente.

O protótipo foi usado em aplicações na área da microscopia mais tradicional, como o da inspecção de circuitos integrados (IC), em que foi desenvolvida uma aplicação MATLAB para construir e visualizar as imagens bidimensionais (2D), após a aquisição de cada conjunto de dados lineares do sensor, e testar algoritmos de reconstrução 3D. São apresentadas imagens da ligação do fio metálico à *pad* de um IC (*wire bonding*) com informação 3D.

As técnicas de microscopia 3D têm aplicações no campo da metrologia, nomeadamente perfilometria. O protótipo foi testado neste tipo de aplicações, com o intuito de avaliar a sua capacidade para obter medidas como a espessura ou altura, largura e inclinação de estruturas 3D, através da aplicação de diversos métodos de reconstrução e visualização 3D. Os resultados foram consistentes, em especial na determinação de perfis de uma estrutura 3D existente num componente micromaquinado, em que se obtiveram valores de altura e inclinação muito próximos dos indicados nas especificações do componente.

Abstract

A laboratorial prototype of a scanning optical microscope (SOM) using a linear image sensor was built on an optical table. The aim was to develop a system with the ability to collect three-dimensional (3D) images taking advantage of the characteristics of linear sensors.

In order to compose this prototype a set of equally important tasks was carried namely the definition of the optical circuit and selection of its components, the development of a stand-alone sensor readout module and MATLAB applications to perform the scanning of object stage, to control the sensor and its data acquisition and to display and process the images. A description of the prototype is presented in this thesis that includes a discussion of the choices made during this work namely relative to optical circuit arrangement and global microscope as well as sensor readout module architecture.

In the course of the work tests using different light sources and illumination modes were performed. The main results of image quality assessment are presented, namely those concerning image contrast, lateral resolution, in which a new method for the determination of point spread function (PSF) was developed, and system axial response. It was achieved a Strehl ratio equal to 0.86 for line illumination configuration, derived from MTF, and experimental values for lateral and axial resolution of approximately 350 nm and 8 μm , respectively.

The application of the system in usual microscopy field as integrated circuit inspection was made. A MATLAB application was developed in order to build and display two-dimensional (2D) images after the acquisition of each data set from linear sensor and also to test 3D reconstruction algorithms. Wire bonding images showing 3D information are presented.

Applications of 3D microscopy techniques in metrology, namely in profilometry, are usual, so this prototype was tested in this type of applications aiming at testing its ability to get thickness or height, width and slope measurements in 3D structures. Some 3D reconstruction and visualization methods as topographic maps or 3D profiles were used in different structures. The results were solid particularly from the profiles of one 3D structure in a micromachined component, from which the height and slope experimental values were very close to product specifications.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	vii
Lista de Acrónimos	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xxi
Cap. 1. Introdução	1
1.1. Estrutura da tese	4
Referências bibliográficas	6
Cap. 2 – Fundamentos e técnicas de microscopia óptica tridimensional	9
2.1. Introdução	9
2.2. Formação de imagem no microscópio de campo claro	10
2.2.1. PSF	12
2.2.1.1. Microscópio confocal vs microscópio convencional	13
2.2.1.2. Microscópio com detector do tipo fenda	14
2.2.1.3. Resolução lateral	15
2.2.2. Resolução axial	16
2.2.2.1. Microscópio confocal	17
2.2.2.2. Microscópio confocal vs microscópio com detector do tipo fenda	17
2.2.3. MTF	18
2.2.4. Aberrações	19
2.2.4.1. Tipos de objectivas	20
2.2.4.2. Razão de Strehl	21
2.3. Construção da imagem	22
2.3.1. Métodos de varrimento	23
2.3.1.1. Varrimento ponto a ponto	24
2.3.1.2. Varrimento de múltiplos pontos	25
2.3.1.3. Varrimento de fenda	25
2.3.2. Amostragem	25
2.3.2.1. Teorema da amostragem	26
2.3.3. Ruído	27
2.3.3.1. Tipos de ruído	28
2.3.3.1.1. Ruído fotónico	28
2.3.3.1.2. Ruído de leitura	28
2.3.3.1.3. Ruído térmico	29
2.3.3.1.4. Ruído de quantização	29
2.3.3.2. Relação sinal-ruído	29
2.3.3.3. Digitalização da intensidade	30
2.3.3.4. Efeito da gama dinâmica no contraste	31
2.3.3.5. Efeito do ruído na resolução	32
2.3.4. Detectores	34

2.3.4.1. PMT	34
2.3.4.2. APD e SPAD.....	35
2.3.4.3. CCD	35
2.3.4.4. CMOS	37
2.3.4.5. Bidimensionais vs lineares.....	39
2.4. Técnicas de microscopia óptica 3D	39
2.4.1. Microscópio confocal.....	39
2.4.1.1. Varrimento série.....	41
2.4.1.2. Máscara com aberturas programáveis.....	42
2.4.2. Microscópio com iluminação estruturada.....	43
2.4.3. Microscópio confocal de linha.....	44
Referências bibliográficas.....	46
Cap. 3 – Microscópio de bancada	49
3.1. Introdução	49
3.2. Arquitectura do microscópio.....	50
3.2.1. Módulo autónomo de leitura do sensor.....	51
3.2.2. Configuração epi-iluminada.....	52
3.2.2.1. Varrimento da plataforma	53
3.3. Montagem óptica	54
3.3.1. Componentes mecânicos.....	54
3.3.1.1. Sistema <i>Microbench</i>	55
3.3.1.2. Plataformas de posicionamento	55
3.3.2. Fonte de luz.....	56
3.3.2.1. Laser.....	56
3.3.2.2. Luz branca.....	57
3.3.3. Componentes ópticos	58
3.3.3.1. Lentes	58
3.3.3.1.1. Lente Colectora.....	59
3.3.3.1.2. Lente Anamórfica	59
3.3.3.1.3. Lente Condensadora / Objectiva.....	60
3.3.3.2. Filtros	61
3.3.3.3. Diafragmas/Iris	61
3.3.3.4. Divisor de feixe.....	62
3.3.3.5. LSD	63
3.3.3.6. Fendas	63
3.3.4. Sensor.....	63
3.4. Módulo de leitura do sensor.....	65
3.4.1. Arquitectura do módulo	65
3.4.2. Leitura de dados do sensor.....	66
3.4.3. Comunicação com o PC.....	68
3.4.4. Software do PIC	70
3.5. Posicionador.....	70
3.5.1. Características do posicionador	71
3.5.2. Controlo dos posicionador	72
3.6. Software do PC	73
3.6.1. Aplicações MATLAB	73
Referências bibliográficas.....	76
Cap. 4. Avaliação da qualidade da imagem do microscópio	77
4.1. Introdução	77

4.2. Caracterização do microscópio	78
4.2.1. Estabilidade da iluminação	78
4.2.2. Repetibilidade do posicionamento	79
4.2.3. Conclusão.....	80
4.3. Contraste	80
4.3.1. Medição da CTF	81
4.3.2. Determinação da MTF a partir da CTF.....	81
4.3.2.1. Iluminação de campo amplo	84
4.3.2.2. Iluminação em linha.....	84
4.3.2.3. Razão de Strehl	85
4.3.2.3.1. Iluminação de campo amplo vs iluminação em linha.....	85
4.3.2.3.2. Efeito do deslocamento axial	86
4.3.2.4. Variação do contraste com a posição axial	86
4.3.3. Conclusão.....	87
4.4. Resolução lateral	88
4.4.1. Anisotropia da resolução lateral.....	88
4.4.2. Método de determinação da PSF	91
4.4.2.1. Modelo	92
4.4.2.2. Implementação	92
4.4.2.3. Determinação da PSF.....	94
4.4.2.4. Teste do método	96
4.4.3. Método de cálculo da resolução a partir da LSF.....	97
4.4.4. Conclusão.....	99
4.5. Resolução axial	100
4.5.1. Curvas teóricas	100
4.5.2. Iluminação em linha.....	102
4.5.3. Iluminação de campo amplo	104
4.5.4. Conclusão.....	105
Referências bibliográficas.....	106
Cap. 5. Aplicações	107
5.1. Introdução	107
5.2. Construção das imagens.....	109
5.2.1. Imagens 2D	109
5.2.2. Extração e visualização de informação 3D	111
5.3. <i>Wire bonding</i>	112
5.3.1. Montagem óptica	113
5.3.2. Reconstrução de imagens 3D.....	113
5.3.2.1. Cálculo do diâmetro do fio de ligação	118
5.3.2.1. Comparação de imagens com taxas de amostragem diferentes	119
5.3.3. Conclusão.....	123
5.4. Perfilometria	123
5.4.1. Componente micromaquinado	125
5.4.2. Montagem óptica	125
5.4.3. Determinação dos perfis	127
5.4.4. Conclusão.....	130
5.5. Moeda de 1-cêntimo portuguesa.....	130
5.5.1. Imagens e mapas 3D	131
5.5.2. Conclusão.....	140
5.6. Pistas de PCB.....	141
5.6.1. Determinação da espessura e largura.....	141

5.6.2. Conclusão.....	147
Referências bibliográficas.....	148
Cap. 6. Conclusões e trabalho futuro	149
6.1. Conclusões	149
6.2. Trabalho futuro	152
Referências bibliográficas.....	153
Apêndice 3.1. Especificações do sensor <i>LIS-1024</i>	155
Apêndice 3.2. Esquema eléctrico do módulo de leitura do sensor	157
Apêndice 3.3. GUIs.....	159
Complete_GUI.....	159
IC_Image.....	160
USAF_Image	161
Profilometry_SiFrame.....	162

Lista de Acrónimos

1D - *One-Dimensional*

2D - *Two-Dimensional*

3D - *Three-Dimensional*

ADC – *Analog-to-Digital Converter*

AOD - *Acousto-Optical Deflector*

APD - *Avalanche PhotoDiode*

APDA – *Avalanche PhotoDiode Array*

APS – *Active Pixel Sensor*

CCD – *Charge-Coupled Device*

CDS - *Correlated Double Sampling*

CMOS - *Complementary Metal Oxide Semiconductor*

CTF - *Contrast Transfer Function*

DPR – *Dynamic Pixel Reset*

DSP – *Digital Signal Processor*

ERF - *Edge Response Function*

FOV - *Field-Of-View*

FPN - *Fixed Pattern Noise*

FWHM - *Full Width at Half Maximum*

GUI – *Graphical User Interface*

IC – *Integrated Circuit*

JDD - *Just Detectable Difference*

LSD – *Light Shaping Diffuser*

LSF - *Line Spread Function*

MTF - *Modulation Transfer Function*

MTF_{DL} - *MTF Diffraction Limited*

NA - *Numerical Aperture*

OTF - *Optical Transfer Function*

PAF – *Photodiode Array Fluorometer*

PC – *Personal Computer*

PCB - *Printed Circuit Board*

PMT - *PhotoMultiplier Tube*

PSF - *Point Spread Function*

PSF_{xx} - *Point Spread Function X-axis*

PSF_{yy} - *Point Spread Function Y-axis*

PWM – *Pulse Width Modulation*

QE - *Quantum Efficiency*

ROI – *Region Of Interest*

SEM - *Scanning Electron Microscopy*

SIM - *Structured Illumination Microscopy*

SNR - *Signal-to-Noise Ratio*

SOM - *Scanning Optical Microscope*

USART – *Universal Synchronous Asynchronous Receiver Transmitter*

Lista de Figuras

2.1.	Esquema de um microscópio confocal (reproduzido de [1]).	10
2.2.	Esquemas de um microscópio óptico de varrimento (reproduzido de [1]).	11
2.3.	Esquema da geometria de um sistema generalizado de microscopia (reproduzido de [3]).	12
2.4.	Representação das PSFs ideais (consideram-se aberturas circulares pontuais e detectores tipo fenda muito estreita e de comprimento infinito). São apresentadas as comparações entre as PSFs: (a) do microscópio confocal e convencional; (b) do confocal e detector tipo fenda com fonte pontual (anisotrópica); (c) com detector tipo fenda e iluminação em linha, paralelas entre si (anisotrópica) e perpendiculares.	15
2.5.	Comparação das curvas de resposta axial: (a) do microscópio confocal com um objecto pontual (tracejado) e planar (cheio); (b) do microscópio confocal com a do microscópio com detector do tipo fenda, para o caso de um objecto planar.	17
2.6.	Ilustração do significado de contraste e de MTF (adaptado de [12]).	19
2.7.	Esquema do microscópio confocal com os dois modos de varrimento principais: (a) varrimento do objecto; (b) varrimento da iluminação (reproduzido de [19]).	23
2.8.	Esquema dos três métodos de varrimento: (a) ponto a ponto; (b) múltiplos pontos; (c) fenda (reproduzido de [19]).	24
2.9.	Efeito da gama dinâmica no contraste. Contagens máximas do sinal iguais a: (a) 4090; (b) 2440; (c) 1700 (reproduzido de [19]).	32
2.10	Efeito do ruído de Poisson entre duas distribuições separadas pela distância obtida pelo critério de Rayleigh. O valor médio de fótons detectados em cada distribuição é igual a: (a) 10; (b) 100; (c) 1000 (reproduzido de [19]).	33
2.11.	Esquema do armazenamento de electrões no poço de potencial (adaptado de [23]).	35
2.12.	Esquema do modo de leitura <i>full frame</i> de um CCD (reproduzido de [23]).	36
2.13.	Esquema do microscópio confocal de varrimento laser (reproduzido de [35]).	40
2.14.	Esquema de uma configuração de um microscópio de varrimento série (reproduzido de [37]).	41
2.15	Esquema de um microscópio confocal de varrimento série usando dois discos de Nipkow, sendo um deles com microlentes (reproduzido de [35]).	42
2.16.	Diagrama com o esquema deste microscópio confocal com uma máscara com aberturas programáveis (reproduzido de [38]).	42

2.17.	Esquema da configuração óptica do microscópio com uma grelha na iluminação para projecção sobre o objecto (reproduzido de [39]).	44
2.18.	Esquema da configuração no modo de reflexão de um microscópio com sensor linear (reproduzido de [32]).	45
3.1.	Sistema de teste com o PAF. PAFPC e PAFDET são os módulos de hardware do fluorómetro do PC e do detector, respectivamente; OTS – plataforma de translação do objecto; PDU – Unidade de <i>drive</i> do piezoeléctrico.	51
3.2.	Diagrama de blocos do microscópio de bancada.	51
3.3.	Esquema da forma como a informação sobre a distribuição de luz no sensor chega ao PC.	52
3.4.	Esquema da configuração epi-iluminada.	53
3.5.	Imagens das duas montagens ópticas: (a) na mesa óptica; (b) na placa de montagem óptica (<i>breadboard</i>).	54
3.6.	Exemplo da distribuição da luz no sensor. (a) luz laser com fenda de iluminação; (b) luz laser com LSD.	57
3.7.	Espectro das lâmpadas de halogénio e de arco de mercúrio e de xénon (reproduzido do www-lot-oriel.com - <i>LOT-Oriel Group Europe</i>).	57
3.8.	Espectro de transmissão do filtro DT-Green (reproduzido do catálogo da <i>Linos</i>)	61
3.9.	Esquema de montagem com diafragmas/iris ajustáveis.	62
3.10.	Diagrama de blocos do módulo.	65
3.11.	Fotos do módulo: (a) face dos componentes; (b) face do sensor.	66
3.12.	Diagrama das temporizações do ciclo de aquisição de dados do sensor (os tempos não se encontram à escala).	67
3.13.	Formato do <i>frame</i> da comunicação RS-232.	68
3.14.	Diagrama de fluxo do algoritmo de aquisição de dados e a tabela com os descritivos dos sinalizadores (<i>flags</i>) usados.	69
3.15.	Esquema das funcionalidades das aplicações MATLAB.	74
4.1.	Esquema da montagem óptica que foi usada numa grande parte dos testes descritos neste capítulo.	78
4.2.	Imagens da luz reflectida num espelho plano, com fenda de iluminação: (a) no eixo-Y; (b) no eixo-X. A imagem da direita foi obtida: (a) 5 min; (b) 30 min após a da esquerda.	79
4.3.	Gráficos do integral da intensidade recolhida nos 1024 pixels do sensor em função da posição axial do espelho. Aproximação por valores: (a) maiores; (b) menores da posição axial.	80
4.4.	Exemplo de uma imagem do alvo da USAF usada para a determinação da MTF.	81
4.5.	Representação dos dados experimentais, CTF medida, MTF determinada e MTF_{DL} para a iluminação de campo amplo.	84
4.6.	Representação dos dados experimentais, CTF medida, MTF determinada e MTF_{DL} para a iluminação em linha.	85

4.7.	Comparação dos dados experimentais e das MTF determinadas com a iluminação de campo amplo e em linha.	85
4.8.	Comparação dos dados experimentais e das CTF medidas com a iluminação de campo amplo em duas posições axiais separadas de 2 μm .	86
4.9.	Comparação entre o contraste, com a iluminação de campo amplo e em linha, em função da posição axial, para valores da frequência espacial de: (a) 161 lp/mm; (b) 228 lp/mm; (c) média dos quatro valores de frequência espacial.	87
4.10.	Imagens do alvo da USAF obtidas com: (a) iluminação de campo amplo; (b) iluminação em linha. A barra de escala nas figuras é de 5 μm (direcção horizontal – eixo-Y; direcção vertical – eixo-X).	89
4.11.	Imagens do grupo de três barras do alvo da USAF com frequência espacial de 181 lp/mm, usando iluminação em linha. Imagens obtidas com os dados tal como recolhidos no sensor tendo-se as barras na orientação: (a) perpendicular; (b) paralela ao sensor. FOV: 20 μm x 20 μm (direcção horizontal – eixo-X; direcção vertical – eixo-Y).	89
4.12.	Imagens do alvo da USAF com iluminação: (a) de campo amplo; (b) em linha. À direita apresentam-se os perfis obtidos ao longo das linhas apresentadas nas imagens da esquerda, que atravessam o conjunto de barras perpendiculares (a tracejado) e paralelas (a cheio) ao sensor, do grupo de frequência espacial de 144 lp/mm (direcção horizontal – eixo-Y; direcção vertical – eixo-X).	90
4.13.	Perfis semelhantes aos da figura 4.12, mas para o grupo de frequência espacial de 228 lp/mm, obtidos com iluminação: (a) de campo amplo; (b) em linha. Conjunto de barras perpendiculares (a tracejado) e paralelas (a cheio) ao sensor.	91
4.14.	Esquema da montagem óptica usada neste teste.	93
4.15.	Imagens do alvo da USAF de conjuntos de três barras: (a) do grupo 6; (b) do grupo 7 (direcção horizontal – eixo-X; direcção vertical – eixo-Y).	93
4.16.	Representação das PSF 1D determinadas com o algoritmo segundo: (cheio) eixo-Y; (tracejado) eixo-X.	95
4.17.	Representação da PSF 2D obtida com as PSF 1D da figura 4.16 (usam-se escalas diferentes nos dois eixos).	95
4.18.	Representação dos objectos simulados e das suas imagens obtidas com as PSF calculadas em cada eixo. Objectos com barras na direcção do eixo-Y com aplicação de: (c) PSF_{yy} ; (a) PSF_{yy} truncada; (b) objecto com barras na direcção do eixo-X e aplicação da PSF_{xx} .	96
4.19.	Representação de: (a) ERF medida a partir da imagem do alvo da USAF; (b) LSF calculada a partir da ERF.	98
4.20.	Comparação dos dados e LSF experimental com as PSF teóricas para um detector tipo fenda (ideal) nas duas direcções laterais.	98

4.21.	Comparação das curvas de resposta axial, simuladas numericamente, por aplicação das expressões (4.11) para o microscópio confocal e com detector tipo fenda. A largura/diâmetro é de 1,5 u.o. para a fenda 1/confocal 1 e de 24 u.o. para a fenda 2/confocal 2.	101
4.22.	Dados experimentais e curvas de resposta axial, simuladas numericamente, para o caso do detector tipo fenda de largura igual: (a) 24 u.o. (fenda de iluminação paralela ao sensor); (b) 1,5 u.o. (fenda de iluminação perpendicular ao sensor).	102
4.23.	Comparação dos dados experimentais para os casos de fendas de iluminação e detecção: (+) paralelas; (◊) perpendiculares.	103
4.24.	(a) Distribuição da luz pelos pixels do sensor. FOV: 312 μm x 500 μm (direcção horizontal – eixo-Z; direcção vertical – eixo-X). As escalas são diferentes nos dois eixos. (b) Intensidade em função da posição axial, $I(z)$.	104
5.1.	Esquema da construção de uma imagem 2D. Cada pixel tem uma largura de 7,8 μm no espaço imagem. Os varrimentos no eixo-Y têm intervalos de amostragem, no espaço objecto, que variam entre 1 e 20 μm .	109
5.2.	Esquema que descreve a construção de uma imagem 2D do alvo da USAF. (1) Imagem linear (dados de uma leitura do sensor); (2) Representação 3D dos valores da intensidade no plano XY (após varrimento no eixo-Y); (3) Imagem 2D com os dados lidos directamente do sensor; (4) Imagem 2D com escalas iguais nos dois eixos. Em (3) e (4): direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X.	111
5.3.	Fotos: (a) <i>lab-on-a-chip</i> , (b) pormenor das ligações do fio metálico às <i>pads</i> (<i>wire bonding</i>) ((a) reproduzida de [5] e (b) adaptada de [6]).	112
5.4.	Esquema da montagem óptica com iluminação de campo amplo.	113
5.5.	Imagem <i>best-focus</i> do fio de ligação. FOV: 620 μm x 400 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).	114
5.6.	Imagens do fio de ligação: (a) seis imagens <i>raw-data</i> de planos XY separados entre si de 9 μm ; (b) imagens correspondentes aos planos 2 a 5 obtidas com os valores de $I_{out}(x_i, y_i, z_k)$ calculados com a expressão (5.1). FOV: 460 μm x 210 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).	115
5.7.	Esquema para ilustrar a relação entre o número de pixels e o número de imagens em linha para o FOV de 210 μm no espaço imagem, no caso em que os espaçamentos no eixo-Y são de 20 μm .	116
5.8.	Imagens <i>auto-focus</i> obtidas com: (a) valores máximos das seis imagens <i>raw-data</i> $I(x_i, y_i, z_k)$; (b) valores da imagem <i>raw-data</i> , $I(x_i, y_i, z_k)$, em que z_k é a posição, no eixo-Z, em que $I_{ext}(x_i, y_i)$ é máximo. FOV: 460 μm x 210 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).	117
5.9.	Mapas 3D obtidos com os valores da altura em que se têm os valores máximos de: (a) $I(x_i, y_i)$; (b) $I_{ext}(x_i, y_i)$ com a parametrização 17 x 1.	118

5.10.	Imagens da ROI, retiradas da imagem referida: (a) no ponto (1); (b) no ponto (2); (d) no ponto (3). FOV: 220 μm x 117 μm). Imagem (d) retirada da imagem completa apresentada em (c) que foi obtida a partir do mapa topográfico. FOV: 460 μm x 210 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X) (a imagem (c) está numa escala diferente).	119
5.11.	Imagens de 3 planos XY com espaçamentos de 20 μm . Imagens com amostragem no eixo-Y de: (a) 5 μm ; (b) 20 μm . FOV: 180 μm x 210 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).	120
5.12.	Esquema para ilustrar a relação entre o número de pixels e o número de imagens em linha para o FOV de 210 μm no espaço imagem, no caso em que os espaçamentos no eixo-Y são de 5 μm .	120
5.13.	Imagens <i>auto-focus</i> obtidas com: (1) valores máximos das imagens <i>raw-data</i> $I(x_i, y_i, z_k)$ dos vários planos focais; (2) valores da imagem <i>raw-data</i> , $I(x_i, y_i, z_k)$, em que z_k é a posição, no eixo-Z, em que $I_{ext}(x_i, y_i)$ é máximo. Imagens com amostragem no eixo-Y de: (a) 5 μm (e três planos focais); (b) 20 μm (e seis planos focais). FOV: 180 μm x 210 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).	121
5.14.	Mapas 3D obtidos com os valores da altura em que se têm os valores máximos de: (a) $I(x_i, y_i, z_k)$; (b) $I_{ext}(x_i, y_i)$ com a parametrização 17 x 3; (c) com a parametrização 17 x 1, todos relativos às imagens com taxa de amostragem de 5 μm . (d) Mapa 3D obtido da mesma forma que (c) mas para as imagens com taxa de amostragem de 20 μm .	122
5.15.	(a) Foto do microinterferómetro de Fabry-Perot; (b) esquema do seu diafragma (reproduzidas (a) de [9] e (b) de [8]).	125
5.16.	Esquema do perfil ilustrando as suas dimensões (reproduzida de [8]).	125
5.17.	Esquema da montagem óptica com iluminação em linha na direcção perpendicular ao sensor.	126
5.18.	(a) Representação da curva $I(z)$; (b) distribuição da intensidade da luz no plano XZ.	126
5.19.	Perfis da estrutura, em que o eixo-X e o eixo-Y representam a direcção perpendicular e paralela à sua direcção lateral, respectivamente. (a) perfil 3D; (b) perfil 2D obtido com a primeira linha adquirida no sensor ($y = 0$) usada para construir o perfil em (a) [10].	128
5.20.	Perfil com os valores medidos das dimensões da estrutura (não se encontra à escala).	129
5.21.	Perfis das três superfícies horizontais da estrutura, mostrando com mais detalhe as superfícies: (a) da esquerda; (b) centro; (c) direita do perfil 3D representado na figura 5.19 [10].	129
5.22.	Imagens de uma moeda de 1-cêntimo (a) Face comum; (b) Face nacional. O seu diâmetro é de 16,25 mm.	130
5.23.	Imagem de uma estrutura em relevo numa moeda de 1 cêntimo portuguesa construída através da montagem de cinco imagens adquiridas em posições contíguas no eixo-X. FOV: 800 μm x 560 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X) [11].	131

5.24.	Matriz 3 x 3 de imagens. De (a) a (c) adquiridas no mesmo plano XY mas deslocadas 500 μm no eixo-X. De (1) a (3) foram adquiridas em posições axiais diferentes, com espaçamentos de 20 μm . FOV de cada imagem: 1 mm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.	132
5.25.	Matriz 3 x 3 de imagens (análoga à figura 5.24). Cada imagem desta figura está deslocada 250 μm no eixo-Y em relação à imagem correspondente dessa figura, pertencendo ao mesmo plano XY. FOV de cada imagem: (a) e (b) 2 mm x 200 μm ; (c) 1 mm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.	133
5.26.	Conjuntos de três imagens de cada ROI representada na figura 5.24: (cima) imagem na posição axial mais elevada; (meio) imagem <i>auto-focus</i> ; (baixo) imagem construída com os valores da posição axial em que ocorre a intensidade máxima. Os mapas 3D representam esses valores da posição axial, que correspondem à altura $h(x_i, y_i)$. Nas linhas (a) a (c) têm-se as mesmas ROIs que as das linhas correspondentes na referida figura. FOV de cada imagem: 1 mm x 125 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas iguais nos dois eixos.	134
5.27.	Conjuntos de três imagens de cada ROI representada na figura 5.25. Ver legenda da figura 5.26 para interpretar as imagens e mapas 3D. FOV: linhas (a) e (b): 2 mm x 125 μm ; linha (c): 1 mm x 125 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas iguais nos dois eixos.	135
5.28.	Mapas 3D obtidos com os valores da altura em que se têm os valores máximos de $I_{ext}(x_i, y_i)$ com a parametrização: (1) 17 x 1; (2) 5 x 5. Em cada linha as ROIs são iguais à linha correspondente da figura 5.27.	136
5.29	(a) Imagens dos três planos axiais com espaçamentos de 20 μm ; (b) Imagem <i>auto-focus</i> (cima) e a construída com os valores da posição axial em que ocorre a intensidade máxima (baixo). FOV de cada imagem: 1 mm x 125 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas iguais nos dois eixos. (c) Mapas 3D: (esquerda) Representa esses valores da altura $h(x_i, y_i)$ (posição axial em que ocorre o máximo de intensidade); (direita) obtido com os valores da altura em que se têm os valores máximos de $I_{ext}(x_i, y_i)$ com a parametrização 17 x 1.	137
5.30.	Imagens de doze planos XY com espaçamentos de 10 μm . FOV de cada imagem: 700 μm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.	138
5.31.	Mapas 3D de uma estrutura: (a) oblíqua e (b) paralela relativamente ao sensor. As duas imagens, topo e fundo, são de planos XY com uma separação de 40 μm . FOV: (a) 600 μm x 120 μm ; (b) 700 μm x 120 μm [14]. As imagens têm escalas iguais nos dois eixos.	139
5.32.	Imagens de doze planos XY com espaçamentos de 10 μm . FOV: 190 μm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.	142

- 5.33. Pista de PCB paralela ao sensor: (a) Imagem *auto-focus*. FOV: 190 μm x 115 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). A imagem tem escalas iguais nos dois eixos. (b) Perfil 3D da pista e perfil 2D extraído para o pixel n . 142
- 5.34. Imagens de oito planos XY com espaçamentos de 10 μm . FOV: 500 μm x 400 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos. 144
- 5.35. Imagem *auto-focus* referente aos oito planos XY da figura 5.34. FOV: 500 μm x 235 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). A imagem tem escalas iguais nos dois eixos. 144
- 5.36. Pista perpendicular ao sensor: Perfis 3D e 2D de uma das suas extremidades laterais. 145
- 5.37. Imagens de doze planos XY com espaçamentos de 10 μm . FOV: 100 μm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos. 146
- 5.38. Imagens de seis cortes axiais, planos XZ, com espaçamentos de 20 μm (no eixo-Y). FOV: 120 μm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Z; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos. 147

Lista de Tabelas

3.1.	Comparação das principais características dos três sensores.	50
3.2.	Comparação das características das duas objectivas. (*) os valores do campo de visão referem-se ao caso em que o diâmetro da ocular é de 18 mm.	60
3.3.	Propriedades do motor e do parafuso de avanço dos posicionadores da série T-LA.	71
3.4.	Características do posicionador T-LA28.	72
3.5.	Funcionalidades das aplicações MATLAB para processamento de imagens e representação de perfis 3D.	74
4.1.	Descrição do algoritmo executado para a determinação da PSF.	94
4.2.	Valores da resolução axial calculada como metade da FWHM das curvas de simulação numérica e dos dados experimentais.	103
5.1.	Valores da unidade de amostragem no objecto no eixo-X.	110
5.2.	Valores do factor multiplicativo a usar para construir uma imagem 2D com escalas iguais nos dois eixos, no caso da objectiva 20X (serão o dobro no caso da objectiva 40X).	110
5.3.	Valores da média e desvio padrão do diâmetro do fio obtidos para as imagens (1), (2) e (3) representadas na figura 5.10 (a), (b) e (d), respectivamente.	119
5.4.	Parâmetros das amostragens efectuadas em cada um dos três eixos.	127
5.5.	Valores da média e desvio padrão da altura das estruturas representadas nos mapas 3D da figura 5.31: (a) oblíqua e (b) paralela ao sensor.	140
5.6.	Valores da média e desvio padrão da largura das duas estruturas (esquerda e direita) representadas no mapa 3D da figura 5.31 (b).	140
5.7.	Valores da média e desvio padrão da altura (posição axial) dos pontos de uma ROI definida no interior da pista da figura 5.33 (paralela ao sensor) e da largura da pista considerando outra ROI que ultrapassa os limites laterais da pista. (*) O valor da altura indica a posição axial no conjunto de doze planos axiais.	143
5.8.	Valores da média e desvio padrão da largura da pista. Considerou-se uma ROI definida na pista da figura 5.35 (perpendicular ao sensor).	144
5.9.	Valores da média e desvio padrão das alturas / posições axiais dos planos da pista e lateral e conseqüente valor da altura da pista. Consideram-se duas ROIs, uma em cada plano.	145

Cap. 1. Introdução

Em diversos campos de aplicação da microscopia óptica tais como as ciências da vida, ciência dos materiais ou teste de circuitos integrados, é fundamental obter informação sobre a profundidade das diferentes características do objecto. Nos microscópios ópticos convencionais faz-se a iluminação de todo o objecto, que se designa por iluminação de campo amplo¹, pelo que a imagem é formada a partir da luz recebida de pontos do objecto que se encontram a profundidades diferentes. As imagens obtidas com esta técnica têm então a contribuição desta luz proveniente de planos anteriores e posteriores ao plano focal, o que provoca a degradação da qualidade da imagem. Consequentemente, esta técnica é incapaz de extrair informação tridimensional (3D), isto é, não tem capacidade de discriminação axial, também designada por seccionamento óptico.

A primeira técnica que permitiu ultrapassar esta limitação foi a microscopia confocal [1,2], que se mantém um método amplamente usado para obter o seccionamento óptico. Num microscópio confocal é colocada uma abertura circular (*pinhole*) no trajecto óptico de iluminação (braço) e outra no de detecção, em planos conjugados. Com esta configuração a imagem da abertura circular de iluminação é formada no objecto que está colocado num plano conjugado. Por sua vez a abertura circular de detecção, colocada em frente ao detector que usualmente é um fotomultiplicador (PMT), apenas recebe a luz proveniente desse plano, visto que a restante é bloqueada, não atravessando a abertura. Além desta capacidade de discriminação axial a sua resolução lateral é também melhor do que a do microscópio convencional, ou do que outras configurações de microscópios ópticos de varrimento (SOM). Isto porque da sua configuração resulta que as duas lentes, condensadora e objectiva, contribuem igualmente para a formação da imagem.

Os seus principais pontos fracos são:

- Tempos de aquisição de imagem longos devido à necessidade de construir a imagem a partir da recolha da luz recebida de todos os pontos do objecto, implicando assim a realização de varrimentos nos três eixos.
- Baixa relação sinal-ruído (SNR) devido à pouca intensidade da luz que atinge o detector. Para o efeito da confocalidade ser ideal a abertura circular devia ser pontual, mas para melhorar a SNR sem degradar a capacidade de seccionamento

¹ Na literatura inglesa também se encontra a designação de *full-illumination*.

óptico, é necessário a abertura ter um raio tipicamente da ordem do raio do disco de Airy [3].

- Complexidade do esquema óptico que degrada a eficiência óptica do sistema contribuindo também para a reduzida fracção de luz que atinge o detector, o que obriga a que a fonte de luz seja mais intensa, normalmente laser. Tudo isto contribui também para o custo elevado destes microscópios, que têm ainda um condicionalismo prático importante que é o da dificuldade em efectuar o alinhamento das duas aberturas circulares.

Face a este cenário foram desenvolvidos vários métodos com o propósito de melhorar o mérito do microscópio confocal e, simultaneamente, reduzir os seus pontos fracos. Uma aproximação consiste na introdução de um disco de Nipkow¹ no braço de iluminação e outro no de detecção, implementando desta forma uma estrutura similar a um conjunto de microscópios confocais em paralelo. Esta configuração é designada por microscopia de varrimento série (*Tandem Scanning Microscopy*²) [4,5].

Todavia a distância entre as aberturas tem que ser suficiente para evitar a interferência mútua (*crosstalk*), pelo que apenas uma percentagem muito pequena da luz atravessa as aberturas. Uma primeira consequência é a necessidade de se usar também uma fonte de luz laser para assegurar uma SNR razoável. No sentido de reduzir este efeito, uma solução foi a colocação de microlentes no disco de Nipkow do braço de iluminação, de forma a focar a luz num segundo disco idêntico, comum ao ramo de iluminação e detecção³, aumentando assim a luz disponível e, conseqüentemente melhorando a SNR [6,7]. Outro método consiste na utilização de uma máscara com aberturas circulares, em que a transmitância de cada abertura é programável. Pode ser obtida usando um modulador espacial de luz (SLM) de cristais líquidos em que a sequência usada para abrir e fechar cada abertura não está correlacionada com todas as sequências restantes [8,9].

Mais recentemente foi desenvolvido um método baseado na chamada iluminação estruturada. A característica-chave consiste na projecção, no objecto, de uma rede com frequência espacial única, colocada no braço de iluminação de um microscópio convencional modificado. O efeito de seccionamento óptico resulta do facto de o sistema obter uma imagem correcta do objecto apenas nas partes em que o padrão da rede está focado. É necessário remover o padrão da rede da imagem do objecto através de

¹ Contém milhares de aberturas circulares formando uma espiral de Arquimedes.

² Por vezes também designada por *Direct-View Microscopy*.

³ Usa uma configuração epi-iluminada

processamento subsequente, tendo sido descritos diferentes métodos na literatura [9-11]. Estes métodos têm a vantagem de usar uma fonte de luz branca (como por exemplo uma lâmpada de halogénio).

Outro método que também explora a confocalidade, mas com aberturas com a forma de fendas e não aberturas circulares, é designado por microscópio confocal com varrimento da fenda (*slit-scanning confocal microscope*). Tem uma capacidade de seccionamento óptico pior do que o microscópio confocal [12-14]. No entanto tem a vantagem de permitir aquisições mais rápidas, pois evita o varrimento numa das direcções laterais, e melhor SNR devido à maior fracção de luz que atinge o detector. Verifica-se que em algumas aplicações o contraste das imagens é uma ordem de grandeza melhor do que no microscópio confocal convencional [1].

Inicialmente, à semelhança do microscópio confocal, usava-se como detector um PMT que, não sendo um sensor de imagem, não permitia a formação da imagem de detalhes na direcção da fenda. Com o aparecimento, e rápido desenvolvimento, dos sensores semicondutores de imagem, como CCD (*Charge Coupled Device*) e CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*), surgiram algumas aplicações de sensores do tipo matriz linear em configurações deste tipo [15-17]. Esta aplicação de sensores de imagem CMOS lineares, com o seu baixo custo e pequena largura de pixels, é potencialmente interessante pois permitirá um acréscimo de capacidade de discriminação axial inerente a esta configuração com fenda, através do processamento da distribuição da intensidade da luz recolhida nos seus pixels.

Todas estas técnicas de microscopia óptica 3D podem ser aplicadas em áreas em que se pretende obter medidas de características tridimensionais. A área da metrologia de superfícies é um campo de aplicação atractivo, nomeadamente para determinar a rugosidade de superfícies bem como a forma de objectos. Isto apesar de existirem outras técnicas com maior exactidão, umas designadas de contacto como, por exemplo, o microscópio de força atómica (AFM) [18] e outras (não envolvendo o contacto) como a microscopia electrónica de varrimento (SEM), não esquecendo a importância dos métodos ópticos interferométricos.

Apesar de estas técnicas de microscopia 3D serem na sua essência métodos de imagem, têm sido aplicadas nesta área, muito em especial a microscopia confocal, pois, devido à sua capacidade de obter informação de profundidade, permitem extrair mapas 3D (por vezes designados de topográficos). Esta técnica tem como ponto fraco, neste tipo de aplicação, a limitação na gama de medida da inclinação e altura de superfícies, decorrente

do seu pequeno campo de visão (FOV). A abertura numérica da objectiva determina esta gama de valores, podendo obter-se campos de visão muito menores do que o milímetro até próximo do centímetro [19]. São também conhecidos casos de aplicação de microscópios confocais em perfilometria [20-22], bem como de microscópios de varrimento série [23], este com a vantagem de utilizar luz branca.

Neste contexto, e no entendimento que o potencial do microscópio confocal de varrimento de fenda poderia ser aumentado com a utilização de um detector linear de luz, foi apresentada à FCT uma candidatura a financiamento, com a finalidade de explorar um circuito óptico com um detector linear de luz para, com a aplicação de algoritmos subsequentes à aquisição da imagem, se obter uma imagem com informação tridimensional. Assim, este trabalho teve na sua génese um projecto financiado pela FCT, PRAXIS/C/FIS/10207/98, tendo como investigador responsável o Prof. Doutor Carlos Correia, que foi o orientador desta tese, e que foi desenvolvido no Grupo de Electrónica e Instrumentação, integrado no Centro de Instrumentação do Departamento de Física da Universidade de Coimbra.

1.1. Estrutura da tese

O texto desta tese está dividido em seis capítulos. Neste primeiro capítulo fez-se a descrição do estado da arte e a apresentação da motivação que esteve na base deste trabalho.

Os fundamentos da formação de imagem num microscópio óptico de varrimento apresentam-se no capítulo 2, fazendo-se a caracterização da imagem do microscópio confocal e de outras configurações com o detector tipo fenda ou detector linear. São também abordadas as questões mais relevantes no processo de construção de imagem neste tipo de microscópios, com especial ênfase na descrição dos tipos de varrimentos, fontes de ruído e suas consequências e as opções disponíveis em termos de detectores de luz para microscopia. Por fim faz-se uma descrição sucinta das técnicas mais relevantes de microscopia óptica 3D.

No capítulo 3 é feita a descrição do protótipo laboratorial do microscópio montado numa mesa óptica. Apresenta-se a arquitectura do microscópio e faz-se a descrição dos componentes que integram a montagem óptica, do módulo autónomo de leitura do sensor de imagem CMOS linear e das aplicações MATLAB que permitem realizar os varrimentos, adquirir os dados do sensor e visualizar e processar a imagem.

No capítulo 4 descrevem-se os testes realizados para avaliar a qualidade da imagem. Desde uma abordagem sucinta de aspectos não directamente da imagem mas com grande importância na sua formação como a estabilidade da iluminação e a repetibilidade dos varrimentos até à determinação da resolução axial, que é fundamental para o objectivo do trabalho. São ainda avaliados outros dois parâmetros igualmente importantes para uma boa qualidade da imagem: a resolução lateral e o contraste.

As aplicações deste protótipo são descritas no capítulo 5. Num ponto prévio é ilustrada a forma como as imagens bidimensionais (2D) são construídas a partir dos dados lineares (1D) obtidos directamente do sensor. Foram obtidas imagens de um circuito integrado (IC), em particular observando as ligações do fio metálico a uma *pad*. Usou-se um componente micromaquinado com uma estrutura 3D para se obter e representar os seus perfis. Foram adquiridas imagens e representados mapas 3D de uma moeda de 1-cêntimo. Foi ainda determinada a espessura e largura de pistas numa placa de circuito impresso (PCB). Em todas estas aplicações foram usados diversos métodos de reconstrução e visualização 3D.

No capítulo 6, e último, são retiradas as conclusões globais do trabalho, que foram sendo apresentadas para cada ponto particular nos capítulos 4 e 5. São também apresentadas algumas ideias para dar continuidade a este trabalho.

Referências bibliográficas

- [1]. Sheppard, C.J.R and Shotton, D.M., “Confocal Laser Scanning Microscopy”, BIOS Scientific Publishers, Oxford (1987)
- [2] Wilson, T. Ed., “Confocal Microscopy”, Academic Press, London (1990)
- [3] Sheppard, C.J.R., Gu, Min and Roy, Maitreyee “Signal-to-noise ratio in confocal microscope systems”, *Journal of Microscopy*, 168 (3), pp. 209-218 (1992)
- [4] Wilson, T. and Hewlett, S.J., “Optical sectioning strength of the direct view microscope employing finite-sized pin-hole arrays”, *Journal of Microscopy*, 163 (2), pp. 131-150 (1991)
- [5] Xiao, G.Q., Corle, T.R. and Kino, G.S., “Real-time confocal scanning optical microscope”, *Appl. Phys. Lett.*, 53 (8), pp. 716-718 (1998)
- [6] Tanaami, T. et al., “High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks”, *Applied Optics*, 41 (22), pp. 4704-4708 (2002)
- [7] Nakano, A., “Spinning disk confocal microscopy – a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic”, *Cell Structure and Function*, 27, pp. 349-355 (2002)
- [8] Wilson, T., Juskaitis, R., Neil, M.A.A. and Kozubek, M., “Confocal microscopy by aperture correlation”, *Opt. Letters*, 21 (23), pp. 1879-1881 (1996)
- [9] Wilson, T., “New Approaches to Real-Time Three-Dimensional Imaging in Light Microscopy”, *Proceedings of Royal Microscopical Society*, 33 (4), 259-264 (1998)
- [10] Neil, M.A.A. et al., “Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope”, *Opt. Letters*, 22 (24), pp. 1905-1907 (1997)
- [11] Mitic, J. et al., “Optical sectioning in wide-field microscopy obtained by dynamic structured light illumination and detection based on a smart pixel detector array”, *Opt. Letters*, 28 (9), pp. 698-700 (2003)
- [12] Wilson, T, “Depth response of scanning microscopes”, *Optik*, 81 (3), pp. 113-118 (1989)
- [13] Wilson, T. and Hewlett, S.J., “Imaging in scanning microscopes with slit-shaped detectors”, *Journal of Microscopy*, 160 (2), pp. 115-139 (1990)
- [14] Sheppard, C.J.R. and Mao, X.Q., “Confocal microscopes with slit apertures”, *Journal of Modern Optics*, 35 (7), pp. 1169-1185 (1988)
- [15] Brakenhoff, G.J. and Visscher, K., “Confocal imaging with bilateral scanning and array detectors”, *Journal of Microscopy*, 165 (1), pp. 139-146 (1992)
- [16] Brakenhoff, G.J. and Visscher, K., “Imaging modes for bilateral confocal scanning microscopy”, *Journal of Microscopy*, 171 (1), pp. 17-26 (1993)
- [17] Benedetti, P.A., Evangelista, V., Guidarini, D. and Vestri, S., “Confocal-line microscopy”, *Journal of Microscopy*, 165 (1), pp. 119-129 (1992)

- [18] Ermakov, A.V. and Garfunkel, E.L., “A novel AFM/STM/SEM system”, *Review of Scientific Instruments*, 65 (9), pp. 2853-2854 (1994)
- [19] Tiziani, H.J., Wegner, M. and Steudle, D., “Confocal principle for macro- and microscopic surface and defect analysis”, *Opt. Eng.*, 39 (1), pp. 32-39 (2000)
- [20] Cha, S. et al, “Nontranslation three-dimensional profilometry by chromatic confocal microscopy with dynamically configurable micromirror scanning”, *Applied Optics*, 39 (6), pp. 2605-2613 (2000)
- [21] Lin, Paul C: et al, “Single-shot depth-section imaging through chromatic slit scan confocal microscopy”, *Applied Optics*, 37 (28), pp. 6764-6770 (1998)
- [22] Reed, M.G. et al, “Surface profiling of combustion chamber deposits using aperture correlation confocal microscopy”, *Journal of Microscopy*, 189 (3), pp. 188-191 (1998)
- [23] Jordan, H-J et al, “Confocal white light microscopy”, *NanoFocus Messtechnik GmbH*

Cap. 2 – Fundamentos e técnicas de microscopia óptica tridimensional

2.1. Introdução

Um microscópio convencional, também designado de microscópio de campo amplo, produz imagens que são obscurecidas na direcção axial por contribuições fora do plano focal. Não é portanto capaz de realizar o seccionamento óptico de um objecto tridimensional (3D).

Num microscópio convencional epi-iluminado¹ é feita a iluminação simultânea de todo o campo de visão (FOV) do objecto² provocando a reflexão por toda a profundidade do objecto, não apenas do plano focal. Assim uma parte da luz recolhida pela objectiva do microscópio, que irá formar a imagem, vem de regiões do objecto acima ou abaixo do plano focal, degradando o contraste e nitidez da imagem [1].

Uma forma de fisicamente evitar (ou pelo menos reduzir fortemente) que a luz proveniente de outros planos que não o focal contribua para a imagem é iluminar apenas um ponto do objecto. Para isso, coloca-se uma abertura circular (*pinhole*) no ramo de iluminação e, através de varrimentos, é possível construir uma imagem. Em simultâneo coloca-se uma abertura confocal no plano imagem da objectiva, conforme esquema da figura 2.1.

Este é o princípio que está na base da microscopia confocal, resultando na sua capacidade de fornecer imagens 3D e, em simultâneo, obter uma melhor resolução lateral que o microscópio convencional. No entanto, dada a sua maior complexidade, os microscópios confocais são usualmente muito caros. Além disso têm limitações como as baixas velocidades de aquisição de imagens e sensibilidade [2].

Estes aspectos negativos do microscópio confocal levaram a que fossem desenvolvidas diversas técnicas alternativas à confocal, no sentido de reduzir este efeito de perda de nitidez da imagem, recolhida pela objectiva, típica do microscópio convencional. De uma forma geral, estas técnicas usam diferentes conjugações de formas de iluminação e geometrias do detector.

¹ A configuração epi-iluminada está ilustrada na figura 2.1.

² Por este motivo alguns autores adoptam a terminologia *full-field*.

Neste capítulo pretende-se fazer uma exposição das técnicas de microscopia óptica 3D mais importantes. Para uma melhor compreensão das suas características e conseqüentemente das suas vantagens e desvantagens, faz-se uma apresentação dos pontos fundamentais que determinam a imagem óptica formada pelo microscópio, bem como os que contribuem para a imagem digital que é visualizada no monitor de um computador pessoal (PC).

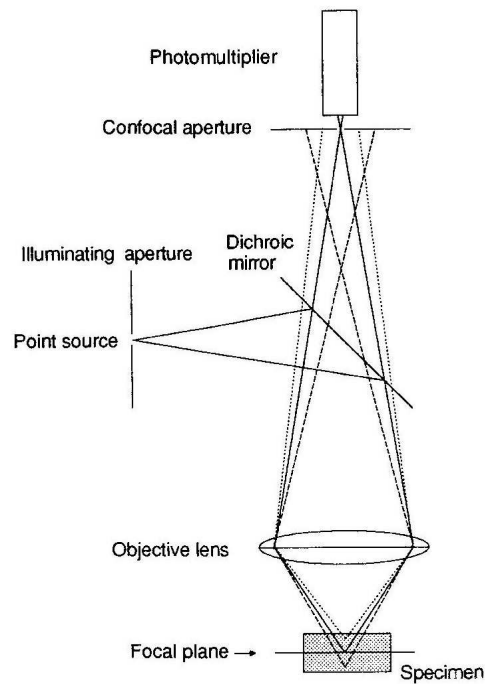


Figura 2.1. Esquema de um microscópio confocal (reproduzido de [1]).

2.2. Formação de imagem no microscópio de campo claro

Vão-se usar os esquemas da figura 2.2 para complementar uma breve descrição e comparação entre o processo de formação de imagem na microscopia convencional e na confocal, ou outras técnicas de microscopia que usam alguma espécie de filtro espacial na iluminação ou detecção.

O microscópio convencional com iluminação crítica está esquematizado na figura 2.2 (a). É usada uma fonte de luz incoerente com uma área grande, sendo a luz focada pela lente condensadora no objecto de tal forma que é iluminada uma área correspondente a todo o FOV da objectiva (*full-field illumination*). A objectiva forma a imagem transmitindo em paralelo a informação de cada ponto iluminado no objecto. É assim a objectiva que determina a resolução da imagem, enquanto a lente condensadora controla a coerência

espacial de todo o processo de formação da imagem, podendo variar entre totalmente coerente e totalmente incoerente¹.

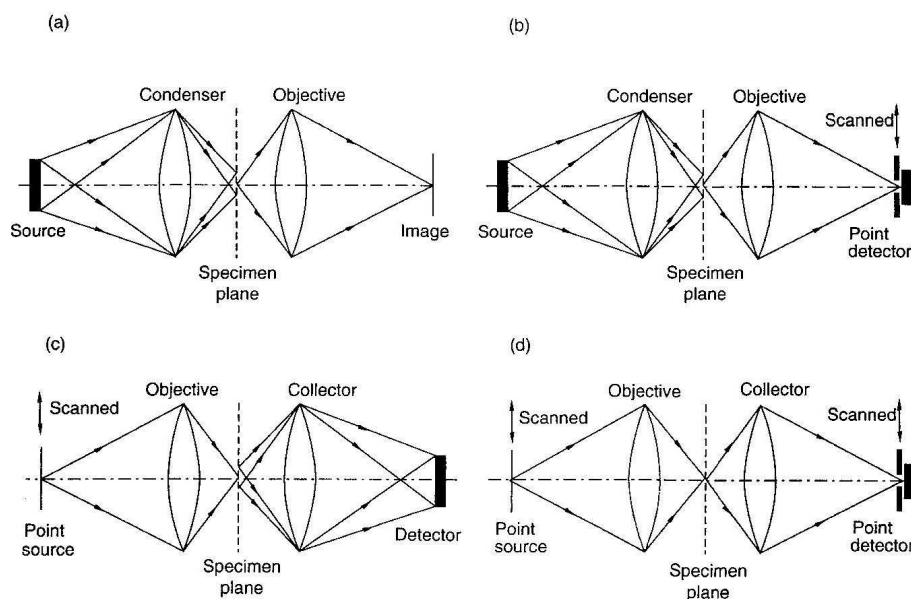


Figura 2.2. Esquemas de um microscópio óptico de varrimento (reproduzido de [1]).

Nos casos em que as aberturas numéricas da lente condensadora e da objectiva são iguais, o que acontece frequentemente na prática², a formação de imagem apesar de ser parcialmente coerente, tem muitas semelhanças com a incoerente [1].

Na figura 2.2. (b) representa-se o esquema do mesmo microscópio convencional, mas no caso em que é colocada uma abertura pequena em frente ao detector, sendo a imagem bidimensional (2D) formada fazendo o varrimento da abertura no plano XY. O seu recíproco, em que os percursos dos raios ópticos são idênticos mas invertidos apresenta-se na figura 2.2. (c), pelo que usando os princípios ópticos da reciprocidade e da equivalência, as propriedades de formação de imagem são idênticas [1]. Neste caso, que se poderá considerar um microscópio óptico de varrimento (SOM), a resolução é determinada pela primeira lente, designada por objectiva.

Combinando estas duas últimas configurações obtém-se o esquema da figura 2.2. (d) que representa o microscópio óptico (de varrimento) confocal. Pela simetria do esquema conclui-se que as duas lentes são igualmente importantes na formação da imagem, o que resulta na melhoria da resolução. O microscópio confocal comporta-se como um sistema

¹ A fonte e a lente condensadora agem como uma fonte efectiva, parcialmente coerente, dado que as aberrações da lente condensadora não são importantes. Por esta razão na configuração de iluminação de Kohler, a mais usada, em que se coloca o plano do objecto conjugado com o diafragma (*field diaphragm*) e não com a fonte de luz, a formação da imagem é em princípio igual à com iluminação crítica [1].

² Como é o caso da configuração epi-iluminada.

coerente de formação de imagem mas com uma PSF efectiva melhor que a do microscópio convencional com iluminação coerente.

Estes esquemas representam a geometria de transmissão mas as propriedades de sistemas de transmissão e de reflexão para um objecto colocado no plano focal são idênticas [1]. Assim, podem ser consideradas também para o estudo da formação de imagem de microscópios de reflexão, particularmente usando a configuração epi-iluminada.

2.2.1. PSF

A caracterização da imagem óptica, formada nos diversos sistemas de varrimento usados em microscopia, pode ser feita com base no esquema da figura 2.3 em que, novamente por uma questão de simplicidade, se considera um sistema de transmissão [3].

Neste esquema a fonte é pontual, as lentes objectiva e colectora são descritas através das funções pupila¹, P_1 e P_2 , enquanto que a função $D(x_2, y_2)$ indica a sensibilidade do detector.

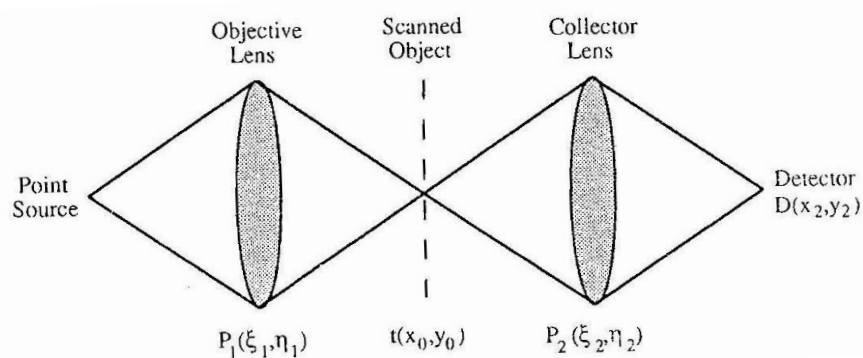


Figura 2.3. Esquema da geometria de um sistema generalizado de microscopia (reproduzido de [3]).

Para se obter a PSF considera-se um objecto pontual, com a simplificação de se considerar o caso da ampliação unitária, pelo que a partir da expressão geral para a intensidade na imagem obtém-se a expressão (2.1) [3]:

$$I(t, \omega) = |h_1(t, \omega)|^2 \left[D(t, \omega) \otimes |h_2(t, \omega)|^2 \right] \quad (2.1)$$

em que \otimes representa a operação convolução. As coordenadas t e ω são as coordenadas ópticas, que se relacionam com as coordenadas x e y , respectivamente, de acordo com as expressões (2.2), nas quais α é a semi-abertura angular da lente:

¹ A função pupila representa a transmitância da lente.

$$\begin{aligned}
t &= \frac{2\pi}{\lambda} x \sin \alpha \\
\omega &= \frac{2\pi}{\lambda} y \sin \alpha
\end{aligned}
\tag{2.2}$$

As funções $h_{1,2}$ na expressão (2.1) são as PSFs de amplitude das duas lentes, dadas pela transformada de Fourier das respectivas funções pupila, e que para o caso em que estas funções têm simetria circular são obtidas pela expressão (2.3).

$$h(\nu) = \int_0^1 P(\rho) J_0(\nu\rho) \rho d\rho
\tag{2.3}$$

em que J_0 é a função de Bessel de ordem zero da primeira espécie. A variável normalizada ρ no plano da pupila define-se de tal forma que $P(\rho) = 0$ se $\rho > 1$. O parâmetro ν é a coordenada óptica radial, estando então relacionada com t e ω através da expressão (2.4).

$$\nu = \sqrt{t^2 + \omega^2}
\tag{2.4}$$

2.2.1.1. Microscópio confocal vs microscópio convencional

Tratando o microscópio convencional como um microscópio de varrimento, para estes dois tipos de microscópio de varrimento, confocal e convencional, as funções de sensibilidade do detector adequadas são:

- $D = 1$ no microscópio convencional
- $D(x_2, y_2) = \delta(x_2) \delta(y_2)$ no microscópio de varrimento com detector pontual (microscópio confocal).

As expressões da PSF, em que se assume que a lente objectiva e a colectora são iguais e normalizando as expressões para se ter o valor unitário no eixo óptico ($\nu = 0$), são as indicadas nas expressões (2.5).

$$\begin{aligned}
I_{conv}(\nu) &= \left[\frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right]^2 \\
I_{conf}(\nu) &= I_{conv}^2(\nu) = \left[\frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right]^4
\end{aligned}
\tag{2.5}$$

em que J_1 é a função de Bessel de ordem um da primeira espécie.

Estas duas PSFs estão representadas na figura 2.4 (a) podendo comprovar-se o estreitamento desta função no caso do microscópio confocal.

2.2.1.2. Microscópio com detector do tipo fenda

Usando um detector do tipo fenda¹ poderão obter-se características diferentes da imagem de um ponto objecto, dependendo do modo de iluminação [4]. Apresentam-se três casos típicos

- Iluminação de campo amplo - a formação da imagem é semelhante ao microscópio convencional, neste caso exigindo o varrimento do objecto numa só direcção lateral para se construir a imagem 2D.
- Fonte pontual - resulta numa PSF assimétrica, que é semelhante à PSF do microscópio convencional na direcção lateral paralela ao sensor mas, dificilmente distinguível da PSF do microscópio confocal, na outra direcção lateral, perpendicular ao sensor.
- Iluminação em linha – resulta em dois comportamentos diferentes das curvas $I(x,y)$ ou, no caso de se considerarem as coordenadas ópticas, $I(t, \omega)$:
 - Fenda de iluminação e de detecção paralelas – não é produzida a imagem de detalhes paralelos à fenda mas para os detalhes perpendiculares à fenda a PSF é semelhante à do microscópio confocal.
 - Fenda de iluminação e de detecção perpendiculares – a PSF é muito semelhante à do microscópio convencional.

As expressões (2.6) são as PSFs para este microscópio de varrimento, nas suas diferentes variantes de iluminação, obtidas de forma análoga à indicada para os microscópios confocal e convencional, mas agora usando a função de sensibilidade do detector² $D(x_2, y_2) = \delta(x_2)$ do microscópio de varrimento com detector tipo fenda (paralela ao eixo-X).

$$\begin{aligned}
 I(t, \omega) &= \left[\frac{2J_1(v)}{v} \right]^2 \left[\frac{3\pi H_1(2\omega)}{8\omega^2} \right], \text{ com fonte pontual} \\
 I(t, \omega) &= \left[\frac{3\pi H_1(2\omega)}{8\omega^2} \right]^2, \text{ com fendas paralelas} \\
 I(t, \omega) &= \left[\frac{3\pi H_1(2t)}{8t^2} \frac{3\pi H_1(2\omega)}{8\omega^2} \right], \text{ com fendas perpendiculares}
 \end{aligned} \tag{2.6}$$

¹ *Slit detector* designa este tipo de detectores cuja detecção se faz ao longo de uma só direcção, independentemente de ser uma fenda simples ou com uma estrutura de elementos de imagem (pixels) linear.

² Assume-se também lentes objectiva e colectora iguais e normalizam-se as expressões para a unidade no eixo óptico.

Nas figuras 2.4 (b) e (c) estão representadas as PSFs para estas diferentes configurações, todas com detector tipo fenda, evidenciando a anisotropia desta função nas duas direcções laterais.

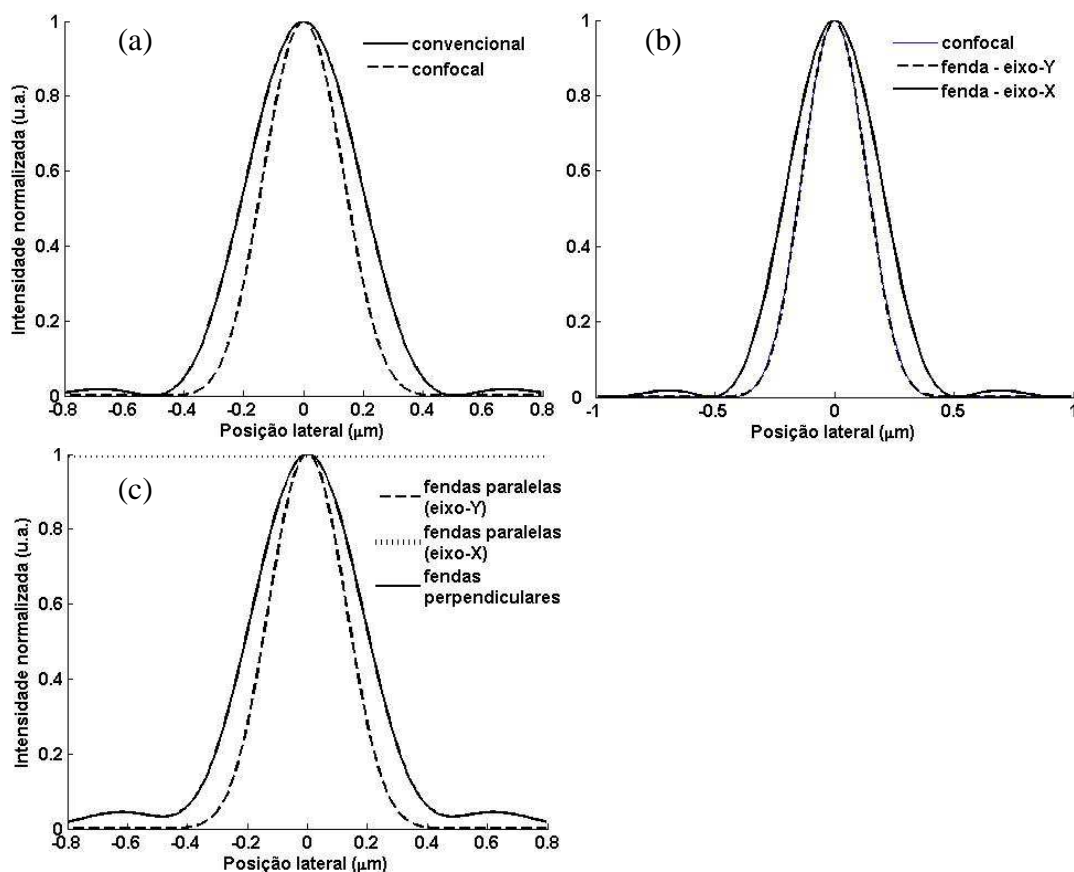


Figura 2.4. Representação das PSFs ideais (consideram-se aberturas circulares pontuais e detectores tipo fenda muito estreita e de comprimento infinito). São apresentadas as comparações entre as PSFs: (a) do microscópio confocal e convencional; (b) do confocal e detector tipo fenda com fonte pontual (anisotrópica); (c) com detector tipo fenda e iluminação em linha paralelas entre si (anisotrópica) e perpendiculares.

2.2.1.3. Resolução lateral

É comum definir-se genericamente o poder de resolução de um microscópio, de acordo com a expressão (2.7) [5].

$$d = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.7)$$

em que d é distância mínima entre dois pontos para que sejam distinguíveis (resolvidos) na imagem dada pelo microscópio, λ é o comprimento de onda da luz e NA^1 é a abertura numérica da objectiva.

¹ $NA = n \sin \alpha$, com n igual ao índice de refração do meio e α a semi-abertura angular da objectiva.

Esta definição resulta do critério de Rayleigh que estabelece que dois pontos são resolvidos se o pico central do padrão de difracção de um dos pontos (disco de Airy) coincidir com o primeiro mínimo de difracção do segundo [6]. Significa, portanto, que corresponde à distância entre o pico central e o primeiro zero da PSF do sistema.

Existe uma outra forma, que é muito usada na prática, de calcular a resolução lateral. Consiste em determinar-se a PSF e calcular a sua FWHM, sendo a resolução lateral igual a metade deste valor. Em boa aproximação, para o caso limitado por difracção, será dada pela expressão (2.8), conhecida por distância de Abbe [7].

$$d = 0,5 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.8)$$

Há ainda quem considere que, a mais importante medida da resolução, é a frequência de corte espacial da função de transferência óptica do sistema (OTF) [1]. A OTF é a transformada de Fourier da PSF, pelo que mostra a capacidade do sistema transmitir diferentes frequências espaciais, sendo a frequência de corte o valor máximo dessa frequência, correspondendo então à distância mínima entre dois pontos.

2.2.2. Resolução axial

Designa-se por resolução axial¹ a capacidade de distinguir a informação proveniente de localizações diferentes ao longo do eixo óptico, sendo assim uma medida da capacidade de discriminação axial ou seccionamento óptico².

Analogamente às coordenadas ópticas t e ω , define-se u como a coordenada óptica na direcção axial, que se relaciona com a coordenada z de acordo com as expressão (2.9)

$$u = \frac{8\pi}{\lambda} z \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right) \quad (2.9)$$

Usualmente existem duas medidas diferentes da resolução axial, obtidas a partir das funções de resposta axial a um ponto e a um plano³. A de resposta a um ponto descreve a forma como dois pontos em localizações diferentes ao longo do eixo óptico são resolvidos. A de resposta a um plano aplica-se a dois objectos planares. Genericamente aplicar-se-ão portanto a casos em que os objectos estão distribuídos dispersamente ou com elevada densidade, respectivamente. A resolução axial pontual e planar define-se como metade da FWHM da função de resposta respectiva [1,8].

¹ É comum aparecer na literatura com a designação de resposta axial.

² Secções ópticas por analogia com as secções físicas que anteriormente era necessário efectuar para ter acesso a informação em diferentes planos axiais.

³ Existe ainda uma terceira, a resposta a uma linha mas não é tão frequentemente considerada.

2.2.2.1. Microscópio confocal

Para exemplificar esta dependência, na figura 2.5 (a) estão representadas as curvas de resposta axial para um microscópio confocal, abertura circular ideal (pontual), para estes dois tipos de objecto. As funções respectivas são apresentadas na expressão (2.10).

$$I_{\text{ponto}}(u) = \left[\frac{\sin(u/4)}{u/4} \right]^4$$
$$I_{\text{plano}}(u) = \left[\frac{\sin(u/2)}{u/2} \right]^2$$
(2.10)

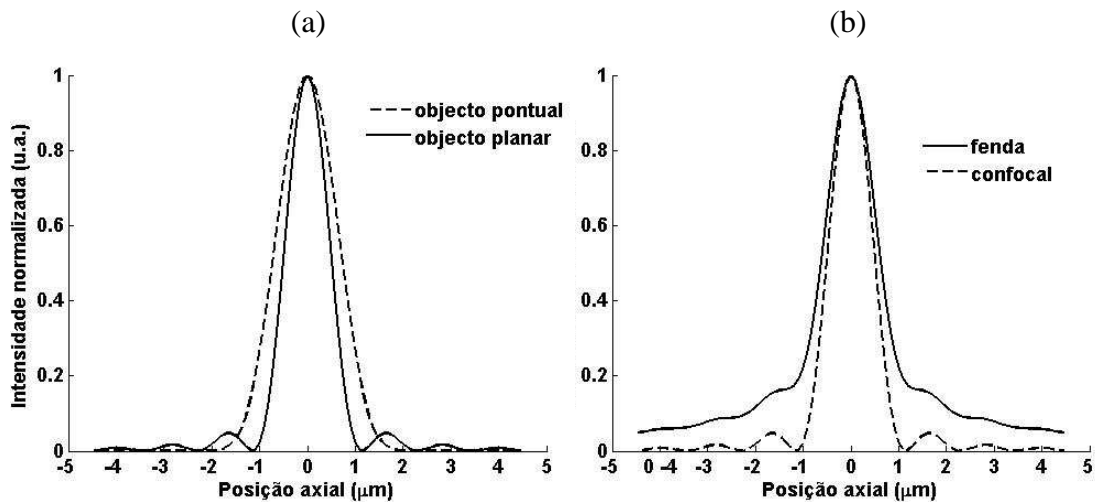


Figura 2.5. Comparação das curvas de resposta axial: (a) do microscópio confocal com um objecto pontual (tracejado) e planar (cheio); (b) do microscópio confocal com a do microscópio com detector do tipo fenda, para o caso de um objecto planar.

2.2.2.2. Microscópio confocal vs microscópio com detector do tipo fenda

Por se considerar ser o que melhor descreve o caso de um microscópio de campo claro no modo de reflexão, nesta comparação será considerada apenas a resposta axial a um plano. Assim, considerando um sistema com pupilas circulares e usando iluminação incoerente conclui-se que [4,9]:

- O microscópio convencional, em que se pode considerar que o detector tem área infinita, não tem capacidade de seccionamento óptico (a intensidade na imagem não varia com o deslocamento ao longo do eixo óptico, eixo-Z).

- A configuração com um detector do tipo fenda e iluminação também em linha¹, em direcções paralelas, é idêntica à com o detector ou a iluminação, pontual mantendo-se o outro em linha.
- A configuração com um detector do tipo fenda e iluminação também em linha, mas em direcções perpendiculares, é idêntica à com a fonte pontual e o detector de área infinita, isto é, ao microscópio convencional, não existindo seccionamento.

Assim, a função de resposta axial (a um plano) com um detector do tipo fenda é dada pela expressão (2.11).

$$I_{plano}(u) = \frac{3\pi}{4u} \int_0^1 [C^2(p) + S^2(p)] d\eta \quad (2.11)$$

em que C e S representam os integrais de cosseno e seno de Fresnel e $p = \sqrt{\frac{2u}{\pi}(1-\eta^2)}$.

Na figura 2.5 (b) compara-se o efeito de seccionamento de um microscópio confocal com o de um microscópio com detector tipo fenda, ambos ideais, isto é, detector pontual e fenda muito estreita e infinita, respectivamente.

2.2.3. MTF

O módulo da função de transferência óptica (OTF) de um sistema de formação de imagem com iluminação incoerente define-se como a função de transferência de modulação (MTF). Note-se que a $OTF(\xi_x, \xi_y)$ representa os valores dos factores complexos de peso aplicados pelo sistema às componentes de frequência (ξ_x, ξ_y) relativamente ao factor de peso aplicado à componente contínua (frequência nula) [10].

No entanto, a definição que é mais comum usar, é a razão entre a profundidade de modulação à saída e à entrada de um sistema óptico, em função da frequência espacial, para alvos sinusoidais de entrada [11]. A profundidade de modulação (M), que normalmente se designa por contraste, define-se de acordo com a expressão (2.12):

$$M = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}}, \quad (2.12)$$

em que I_{max} e I_{min} são os valores máximo e mínimo, respectivamente, da intensidade que tanto pode descrever a irradiância emitida do objecto ou a recolhida na imagem, que são a entrada e saída do sistema, respectivamente.

¹ Existem duas forma de designar a iluminação/deteccção realizadas ao longo de uma única direcção. Neste texto adoptou-se para o detector a designação tipo fenda (*slit-detector*), e para a iluminação a designação em linha (*line-illumination*) por serem os termos mais usuais na literatura.

Assim a definição de MTF é dada pela expressão (2.13).

$$MTF(\xi) = \frac{M_{saída}(\xi)}{M_{entrada\ sinusoidal}(\xi)}, \quad (2.13)$$

em que ξ é a frequência espacial¹.

A ilustração das relações (2.12) e (2.13) é apresentada na figura 2.6, para o caso de um sistema linear constituído por uma lente [12].

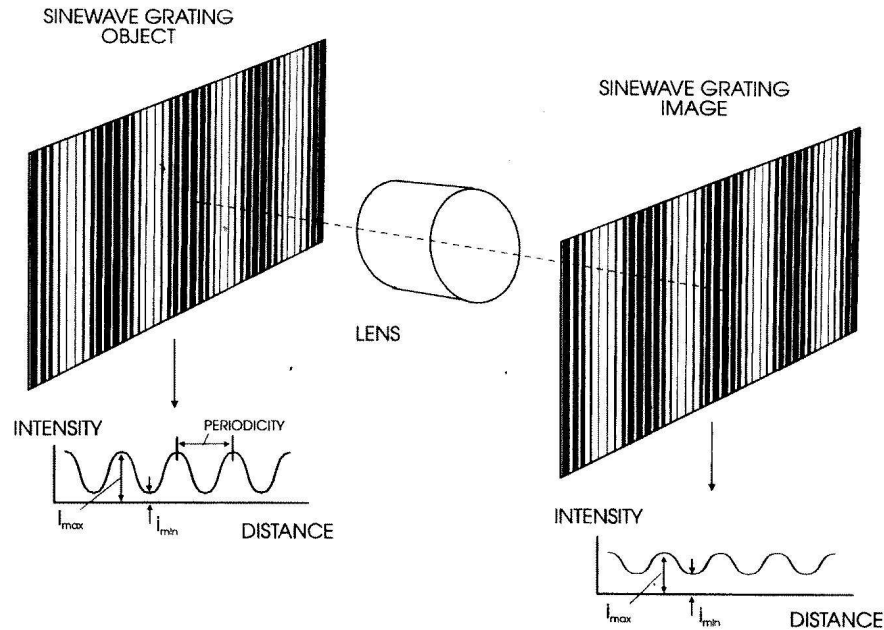


Figura 2.6. Ilustração do significado de contraste e de MTF (adaptado de [12]).

2.2.4. Aberrações

A lente objectiva, que é um componente óptico determinante na formação da imagem do microscópio, tem sofrido uma grande evolução. A objectiva ideal, limitada por difracção, produz, de um ponto objecto infinitamente pequeno, uma imagem com a forma de um disco de Airy. Os desvios desta imagem (limitada por difracção) de um ponto, causados pelas aberrações² da lente, podem ser agrupados em aberrações monocromáticas (independentes do comprimento de onda) e aberrações cromáticas.

De entre as aberrações monocromáticas, a aberração esférica é a que mais usualmente tem impacto no desempenho axial do sistema, sendo, portanto, uma aberração axial³. Surge

¹ A frequência espacial em rigor é a componente no eixo correspondente à direcção da grelha sinusoidal.

² Além dos efeitos das aberrações da frente de onda que se apresentam também se devem considerar os do *defocus* (desvio da posição focal).

³ Como se usa o varrimento do objecto as aberrações não axiais, como o coma e o astigmatismo, não têm efeito na formação da imagem pelo que não são consideradas.

devido ao facto de as frentes de onda à saída da objectiva não serem esféricas. Pode dever-se à deficiente qualidade no seu fabrico, mas também ao seu mau uso, nomeadamente por não se cumprir com o comprimento de tubo especificado, ou porque o meio, entre a objectiva e o plano do foco, tem um índice de refacção incorrecto [13-15]. A presença destas aberrações provoca lobos laterais (*sidelobes*) consideráveis na resposta axial.

Também se sabe que estas aberrações aumentam com o raio da abertura, pelo que se pode reduzir o seu efeito, reduzindo também a abertura da objectiva, ou de qualquer outra lente [14,15].

Outra aberração monocromática é designada por curvatura de campo e traduz o facto de a imagem de um plano, dada por uma lente, ser formada numa superfície esférica. Consequentemente as zonas central e periféricas da imagem não são focadas simultaneamente. Só recentemente, com as objectivas *Plan* é possível ter uma imagem com boa nitidez desde o centro até à borda da lente, mas com um custo maior e menor transmissão.

Quando se usa luz branca, ou apenas não monocromática, tem que se ter em atenção também as aberrações cromáticas. Estas são dependentes do comprimento de onda, podendo ter origem na dispersão da luz, em resultado da variação do índice de refacção de qualquer vidro com o comprimento de onda. Outro efeito é o da largura da imagem de um ponto (PSF) também depender do comprimento de onda. Este último efeito é mais sensível no primeiro mínimo do padrão de difracção, isto é, na orla do disco de Airy do que no centro, influenciando desta forma a resolução [13].

2.2.4.1. Tipos de objectivas

As objectivas têm características específicas consoante o modo de microscopia para que são fabricadas (campo claro, campo escuro, etc), bem como de acordo com as propriedades do meio, nomeadamente o seu índice de refacção (ar, água ou óleo).

Para a escolha da objectiva é muito importante conhecer o grau de correcção das aberrações cromáticas e esféricas, que permite dividir as objectivas nos seguintes grupos:

- Acromática (*Achromatic*) – são as mais simples e menos dispendiosas. Têm alguma correcção para as aberrações cromáticas e pouca para as esféricas e curvatura de campo. Com a sua correcção limitada para aberrações cromáticas e falta de planaridade no campo de visão (FOV), o seu desempenho é degradado. São mais adequadas para aplicações com luz monocromática.

- Apocromática (*Apochromatic*) – têm melhor correcção das aberrações cromáticas e esféricas. Geralmente têm uma maior abertura numérica e distância de trabalho. São ideais para aplicações com luz branca.

Estes tipos de objectivas podem ter diferentes graus de correcção da curvatura de campo. As acromáticas têm a menor correcção (em apenas 65% da área em redor do centro) e as melhores são as planares (*plan*) (> 95%). Existem ainda as semi-planares (*semi-plan* ou *micro-plan*) com uma correcção intermédia [16].

Outro aspecto que diferencia as objectivas é o da sua imagem ser formada num ponto finito ou no infinito (*infinity-corrected*). Tradicionalmente, e até há poucos anos, usavam-se objectivas cuja imagem se forma a uma distância finita, que com a norma DIN (depois ISO), tinha em conta um comprimento do tubo de 160 mm. Mais recentemente passaram a ser fabricadas objectivas corrigidas para o infinito, sendo necessário colocar uma lente (*tube lens*) para formar a imagem. A grande vantagem é a possibilidade de colocar componentes ópticos (filtros, espelhos, etc) no espaço entre a objectiva e esta lente, sem alterar a posição do ponto imagem, pois, como o feixe é paralelo, não é desviado quando atravessa estes componentes planos, independentemente da sua espessura e índice de refração.

2.2.4.2. Razão de Strehl

Uma grandeza de grande utilidade na determinação da importância das aberrações num sistema incoerente é a razão de Strehl. Define-se como a razão entre as intensidades da luz no máximo da PSF desse sistema e no máximo da PSF desse mesmo sistema na ausência de aberrações¹ [10,12]. De acordo com o teorema da ordenada central, a razão de Strehl pode ser então expressa como a razão entre os integrais da MTF determinada experimentalmente e da MTF teórica, para um sistema limitado por difracção, MTF_{LD} , tal como na expressão (2.14) [10,17].

$$Strehl\ ratio = \frac{\int MTF_{exp}}{\int MTF_{LD}} \quad (2.14)$$

Verifica-se que os valores da razão de Strehl têm uma boa correlação com a avaliação, subjectiva, da qualidade da imagem feita visualmente, sendo um critério de qualidade usado para sistemas ópticos com elevada correcção de aberrações. A sua gama útil de valores situa-se aproximadamente entre 0,8 e 1 [12,18].

¹ Este sistema é designado por sistema limitado por difracção (*diffraction limited*).

2.3. Construção da imagem

Todas as formas de microscopia em que a informação óptica é convertida na forma electrónica, para subsequente processamento e visualização, envolvem uma qualquer forma de varrimento do sinal electrónico de leitura (*readout*). Pode, no entanto, fazer-se a divisão em dois tipos conceptualmente distintos:

- Formas de microscopia em que, a imagem óptica 2D de um objecto, é focada convencionalmente no plano imagem de um dispositivo electrónico, como uma câmara de vídeo ou numa matriz 2D de um sensor semiconductor de imagem de uma câmara CCD. A informação no formato electrónico, correspondente à imagem formada pela exposição simultânea da área do dispositivo, é lida de forma sequencial. Este processo pode ser também considerado uma forma de varrimento, neste caso realizado no plano imagem.
- Microscopia óptica de varrimento (SOM) em que o varrimento se descreve no plano objecto. A imagem 2D não é formada no interior do microscópio mas, através do varrimento, faz-se a iluminação sucessiva de diferentes partes do objecto. O resultado da interacção da luz com áreas sucessivas do objecto é recolhido num dispositivo de detecção de luz, normalmente um fotomultiplicador (PMT), ou num sensor de imagem CCD ou CMOS.

Em oposição à imagem do microscópio óptico convencional, enquanto se faz a aquisição da imagem do SOM, o sinal electrónico analógico produzido pelo detector é digitalizado. Podem então acumular-se os dados num qualquer suporte de armazenamento digital e serem visualizados, com taxas semelhantes à taxa vídeo (~ 30 Hz), permitindo o subsequente processamento digital da imagem [1].

Para uma correcta digitalização da informação analógica contida numa imagem, deve ter-se em consideração a natureza discreta da amostragem espacial efectuada, bem como dos seus níveis de intensidade. É então importante escolher uma taxa de amostragem espacial adequada, de forma a permitir reconstruir correctamente a imagem analógica. Também, os níveis de intensidade disponíveis para a discriminação dos seus valores, vão determinar uma correcta visualização da imagem. Neste aspecto, o ruído desempenha um papel fundamental, existindo o ruído inerente ao processo de detecção de fótons mas também a componente associada ao processo de detecção usado, logo dependente do detector escolhido.

2.3.1. Métodos de varrimento

Na figura 2.7 mostram-se os seguintes dois modos de varrimento principais que podem ser usados num SOM:

- Varrimento do objecto (*stage-scanning*) em que o arranjo óptico se mantém estacionário. O feixe de iluminação segue o eixo óptico em todo o microscópio, minimizando-se as aberrações ópticas. Todas as aberrações fora do eixo, como o coma e o astigmatismo¹, estão inerentemente ausentes desta configuração. Por isso fornece a melhor qualidade da imagem. Devido à simplicidade do esquema óptico também é mais eficiente na recolha dos fotões. A sua grande desvantagem é que tem uma velocidade de aquisição muito pequena.
- Varrimento da iluminação (*beam-scanning*), em que se faz deslocar o ponto de incidência da luz no objecto, evitando-se assim a necessidade do movimento rápido do objecto, e aumentando a velocidade possível de varrimento. Na maioria das implementações, usam-se dois espelhos para direccionar o feixe nas duas direcções laterais, enquanto na direcção axial se executa um varrimento mais lento do objecto. Envolve a utilização de zonas da objectiva fora do eixo, o que aumenta a exigência quanto à sua qualidade óptica.

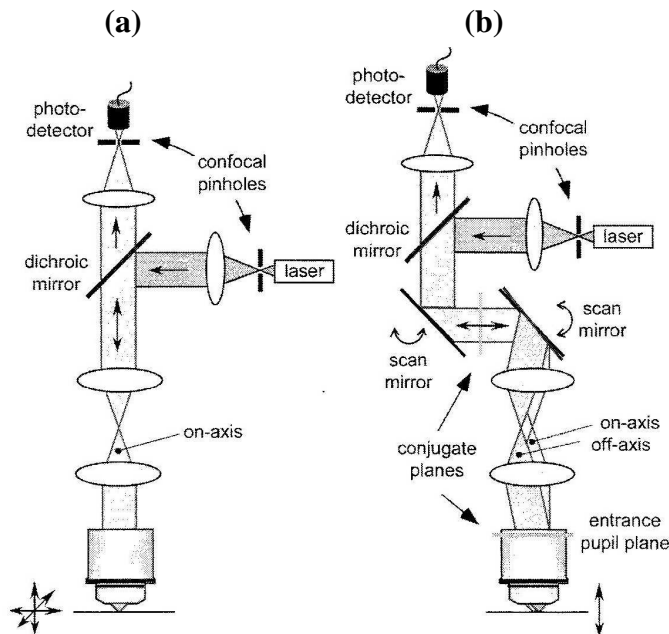


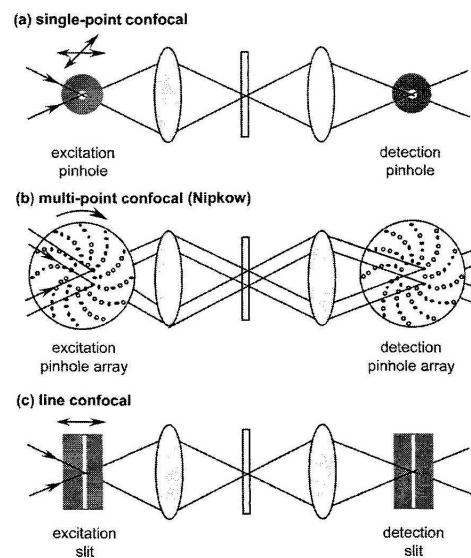
Figura 2.7. Esquema do microscópio confocal com os dois modos de varrimento principais: (a) varrimento do objecto; (b) varrimento da iluminação (adaptado de [19]).

¹ Estas aberrações, coma e astigmatismo, ocorrem para objectos fora do eixo, devido à variação da ampliação lateral com a altura e à assimetria do cone de raios incidentes na lente, respectivamente.

Em conclusão, apesar de com o varrimento do objecto se conseguir um desempenho óptico superior, devido às limitações que impõe relativamente à velocidade de aquisição, é mais frequente usar o varrimento de iluminação. No entanto, mesmo usando o varrimento da iluminação, a velocidade de aquisição por vezes não é suficiente, pelo que foram desenvolvidos métodos que permitem a aquisição paralela da imagem [19].

A figura 2.8 ilustra os três métodos de varrimento que são representativos das configurações mais usadas em SOM, que vão ser descritos em seguida.

Figura 2.8. Esquema dos três métodos de varrimento: (a) ponto a ponto; (b) múltiplos pontos; (c)



fenda (reproduzido de [19]).

2.3.1.1. Varrimento ponto a ponto

Pode ser realizado usando qualquer um dos dois modos de varrimento, do objecto ou da iluminação. Faz-se percorrer o ponto de luz incidente no objecto por toda a sua área, ponto a ponto, o que torna necessário efectuar varrimentos nas duas direcções laterais, para fazer a aquisição de uma imagem 2D. Para o conseguir num tempo razoável, ou mesmo em tempo real, o mecanismo de varrimento deve ser rápido e exacto. Para isso usa-se o varrimento da iluminação, tendo a maioria dos sistemas comerciais, espelhos de varrimento com taxas de varrimento tipicamente de 500Hz, usando um deflector acusto-óptico (AOD), que permite atingir maiores velocidades ($> 15\text{kHz}$), numa direcção. Mais recentemente começaram a usar-se também espelhos galvanométricos ressonantes ($> 7\text{ kHz}$) em sistemas de varrimento rápido [20].

2.3.1.2. Varrimento de múltiplos pontos

Este é um método em que a imagem é recolhida em paralelo através de um esquema de iluminação / detecção múltipla. Usa-se um disco de Nipkow, que consiste num padrão de aberturas circulares¹, através do qual a luz passa, sendo formada a sua imagem no objecto. Com outro disco igual usado na detecção, produz-se o efeito de confocalidade. No caso da configuração epi-iluminada é usado o mesmo disco para a iluminação e detecção. Fazendo rodar o disco consegue-se iluminar a área total do objecto. O diâmetro e o espaçamento entre as aberturas têm que ser seleccionados de forma a evitar a interferência mútua (*crosstalk*).

2.3.1.3. Varrimento de fenda²

Com a utilização da abertura de uma fenda na iluminação, assim como no percurso de detecção, é possível iluminar uma linha completa do objecto em simultâneo. Conjugando-se com o varrimento, com um espelho, ao longo apenas do eixo-Y (perpendicular à fenda), pode usar-se um detector 2D para se fazer a visualização da imagem com taxas de aquisição próximas da taxa vídeo. Desta forma, envolve o varrimento no plano objecto para o eixo-Y e no plano imagem para o eixo-X. A utilização de iluminação em linha, equivalente a uma matriz linear de pontos, é então também um exemplo de recolha paralela de dados por um SOM.

Relativamente à configuração confocal, ou de varrimento ponto a ponto, tem também a vantagem de se obter uma maior intensidade do sinal óptico do microscópio. Poderá também optar-se pelo varrimento do objecto em lugar do varrimento da iluminação, com as vantagens e desvantagens anteriormente referidas.

2.3.2. Amostragem

A resolução ponto a ponto, de acordo com o critério de Rayleigh, é dada pelo raio do disco de Airy. Portanto o padrão de difracção que a objectiva produz na imagem de um objecto pontual, determina a ampliação exigida para que um detector seja capaz de guardar todos os detalhes resolvidos. A questão pode ser também colocada em sentido contrário, isto é, determinar o valor mínimo da distância entre dois pontos, que se pode resolver no plano imagem. Essa distância é calculada então a partir do raio de Airy, como se exemplifica na expressão (2.15), para uma objectiva 20X 0,4NA.

¹ Com a forma da espiral de Arquimedes.

² *Slit-scanning*

$$d_{\text{imagem}} = r_{\text{Airy}} \cdot M = \frac{0,61\lambda}{NA} \cdot M = \frac{0,61 \cdot 550\text{nm}}{0,4} \cdot 20 \cong 16,8\mu\text{m} \quad (2.15)$$

Em microscopia é comum definir-se como *resel*¹, a entidade mínima resolvida opticamente no objecto. Nesta definição usa-se a expressão (2.7), de acordo com o critério de Rayleigh.

Na microscopia tridimensional (3D), nomeadamente na confocal, é necessário definir o equivalente em 3D, isto é, um elemento de resolução 3D. Dado que o *resel* não é inerentemente 2D pode usar-se o mesmo termo para o equivalente a 3D [21]. Em resultado da resolução axial ser pior do que a lateral, a dimensão do *resel* na direcção axial é maior do que nas laterais.

Assim, o valor do *resel* deve ser tomado em consideração para se otimizar a configuração do microscópio, nomeadamente no que se refere à ampliação, mas também no que respeita ao ganho do detector. Para não se perder informação devido a amostragem insuficiente (*undersampling*) deve-se ajustar a ampliação para que a taxa de amostragem obedeça ao critério de Nyquist.

É importante saber distinguir esta noção do *resel*, que se reporta ao espaço objecto, de outras designações usadas para as pequenas divisões da imagem. O termo comum é o *pixel*², a divisão mínima que se pode usar na imagem, que resulta de a imagem não ser contínua, visto que a sua aquisição é feita de um modo discreto. Em microscopia 3D define-se o equivalente ao *pixel* mas para um volume, com a designação de *voxel*.

De forma semelhante, os valores de intensidade em cada *pixel*, que permitem a representação da imagem num PC, são resultado da digitalização de sinais analógicos provenientes do detector de luz usado (PMT, CCD, etc), tendo também valores discretos.

2.3.2.1. Teorema da amostragem

Este teorema está na base da teoria de amostragem discreta. Estabelece que uma função contínua pode ser reconstruída, a partir de uma amostragem com pontos igualmente espaçados, se forem satisfeitos dois critérios:

1. A função ter uma largura de banda limitada, o que significa que o seu espectro de Fourier se anula para todas as frequências acima da frequência de corte, (f_c).
Portanto não pode ter componentes sinusoidais de frequência maiores do que f_c .

¹ *optical RESolution ELe ment*

² Designação comum de *picture element*

2. O intervalo de amostragem não pode ser menor do que $\Delta x = 1/(2f_c)$. Significa que têm que existir no mínimo dois pontos de amostragem, por ciclo da componente sinusoidal de maior frequência da função.

Se $\Delta x < 1/(2f_c)$ então o intervalo de amostragem é menor do que o necessário e diz-se que a função está sobreamostrada (*oversampled*). A sua maior desvantagem é o aumento do volume de dados que representa a imagem. No entanto, é igualmente possível fazer-se a reconstrução [7].

Se $\Delta x = 1/(2f_c)$ tem-se a amostragem crítica, também conhecida por taxa de amostragem de Nyquist. No entanto alguns autores [21] reivindicam um ainda menor intervalo de amostragem, $\Delta x = 1/(2,3f_c)$, para esse valor mínimo. Tem a ver com razões práticas, que tornam difícil a reconstrução com a taxa de Nyquist, visto que implica condições ideais de filtragem passa-baixo.

Caso $\Delta x > 1/(2f_c)$ o intervalo de amostragem é maior do que o exigido pelo teorema, a função está então subamostrada, não sendo possível reconstruir a função sem erro, caso a função efectivamente possua componentes sinusoidais de frequência até ao valor f_c .

Este último caso, em que existe portanto uma incompatibilidade entre a resolução óptica e o tamanho do *pixel* no detector, resulta no chamado *aliasing*¹. Aparecem na imagem características que não estão presentes no objecto.

2.3.3. Ruído

Nesta área o termo ruído é usado genericamente para traduzir uma componente aditiva indesejável numa imagem, que pode ser aleatória ou periódica [7]. Considerando o sinal eléctrico, refere-se então a electrões no sinal, que têm a sua origem noutras fontes que não nos fotões do objecto. No entanto, mesmo o número de fotoelectrões tem uma incerteza associada, característica da contagem de fotões num espaço e intervalo de tempo finitos [5].

Convém fazer também uma referência à noção de fundo (*background*). Pode-se fazer a sua divisão na radiação externa de fundo, que é o número de fotoelectrões que são devidos a radiação externa de fundo no FOV que contém o objecto, e na radiação interna de fundo proveniente de radiação luminescente do próprio *chip* [22].

¹ Este termo resulta do facto de as características do objecto que deram origem aos artefactos na imagem terem uma forma muito diferente da que aparece na imagem.

2.3.3.1. Tipos de ruído

Nas imagens digitais de um microscópio os principais tipos de ruído são o fotónico (ou do tipo *shot*) e o de leitura (*readout*), este com diversas fontes independentes de ruído. Para o caso dos sensores semicondutores de imagem, CCD ou CMOS, devem ser tidas em conta também as fontes de ruído térmico e ruído de quantização [23].

Considerando as várias fontes de ruído independentes (N_i), somam-se os seus quadrados para se obter o ruído total (N), através da expressão (2.16) [5].

$$N = \sqrt{(N_1^2 + N_2^2 + N_3^2 + \dots)} \quad (2.16)$$

Algumas destas formas de ruído podem tornar-se desprezáveis, desde que o projecto electrónico seja correcto e assegurando condições de funcionamento adequadas. Como nunca se pode eliminar o ruído fotónico, este forma o caso limite, nos casos em que todas as outras fontes de ruído foram reduzidas, ficando desprezáveis em comparação com este [23].

2.3.3.1.1. Ruído fotónico

O ruído de Poisson constitui uma propriedade fundamental em qualquer medição de fotões. Pode-se mostrar que a medição de um número elevado de eventos discretos e independentes (não correlacionados), tais como a chegada dos fotões a um fotodetector, dará origem à designada estatística de Poisson [19]. Esta distribuição é assimétrica para números pequenos de fotões mas tende para uma distribuição de Gauss (simétrica) para números elevados [24].

De facto, nestes processos de Poisson, como este exemplo dos fotões, repetindo-se o cálculo da média para diversas medições, obtém-se uma distribuição dos valores da média. Verifica-se que numa medição de N fotões existe uma probabilidade de 63% de o valor médio verdadeiro se situar no intervalo entre $N - \sqrt{N}$ e $N + \sqrt{N}$. Portanto o ruído de Poisson mede-se com \sqrt{N} . Detectando o maior número de fotões possível, apesar do seu valor aumentar, é possível reduzir a sua importância.

2.3.3.1.2. Ruído de leitura

Este tipo de ruído tem origem no processo de leitura do sinal do sensor. É causado pela electrónica do sensor, como por exemplo o pré-amplificador, podendo ser fortemente reduzido usando um circuito electrónico correcto, nomeadamente o seu ADC [23]. Depende fortemente da taxa de leitura, sendo que para taxas muito baixas o ruído varia

com $1/f$, sendo f a taxa de leitura. Para taxas de leitura moderadas (20kHz - 500kHz) este ruído é mínimo e aproximadamente constante. Para taxas elevadas este ruído aumenta e torna-se um componente importante do ruído total. É aditivo, com uma distribuição Gaussiana e independente do sinal. É normalmente expresso pelo seu desvio padrão (valor RMS), em número de electrões.

2.3.3.1.3. Ruído térmico

O ruído térmico, usualmente designado por corrente no escuro (*dark current*), refere-se à criação de pares electrão-lacuna devido a vibração térmica. Este ruído, também designado por ruído de Johnson (e por vezes também de Nyquist), surge então do movimento térmico dos transportadores de carga [25] que origina estes termoelectrões que não é possível distinguir dos fotoelectrões.

Este ruído é resultado de um processo estocástico pelo que o número de termoelectrões obedece também a uma distribuição de Poisson. A taxa de produção de termoelectrões cresce exponencialmente com a temperatura. Tem a consequência de reduzir a gama dinâmica de um *pixel*, podendo adicionar uma quantidade de ruído substancial. Pode ser reduzido significativamente através do arrefecimento do *chip* (CCD) [23].

2.3.3.1.4. Ruído de quantização

Este tipo de ruído é inerente à quantização do valor contínuo da amplitude de um *pixel*, num número finito de níveis discretos, através do ADC, em que é feita a conversão da amplitude de um sinal electrónico analógico na sua representação binária. Poder-se-á então dizer que o ruído de quantização corresponderá a erros de arredondamento.

Pode ser controlado usando um número suficiente de *bits* por *pixel*, pelo que deve ter um valor em amplitude menor do que as outras fontes de ruído. Por exemplo, num ADC de 8-*bits* o nível de ruído é menor do que 0,5% ($1/256$) da gama dinâmica total. Assim, para as câmaras CCD de alta qualidade, ou outros sistemas, que usam ADCs de 8 a 16 *bits*, o ruído de quantização é muito baixo sendo normalmente ignorado.

2.3.3.2. Relação sinal-ruído

A mais importante fonte de ruído é o fotónico, que faz aparecer o limite fundamental da relação sinal-ruído (SNR¹). Poderá então ser importante determinar o número de fótons, pelo que, na expressão (2.17), apresenta-se uma relação entre a potência P de um feixe de

¹ *Signal-to-Noise Ratio*

luz com comprimento de onda λ e o número de fótons n_f incidentes num certo intervalo de tempo t [24].

$$n_f = \frac{Pt\lambda}{hc} \quad (2.17)$$

em que h é a constante de Planck.

Como o ruído fotónico obedece a uma distribuição de Poisson, a média é igual à variância e o ruído é dado pela raiz quadrada da variância. Logo para um sinal com n_f fótons tem-se um ruído fotónico igual a $\sqrt{n_f}$, sendo a SNR dado pela expressão (2.18).

$$SNR = \frac{n_f}{\sqrt{n_f}} = \sqrt{n_f} \quad (2.18)$$

Assim se a luz é detectada num fotodetector de eficiência quântica¹ QE , e o ruído do detector é igual a n_r electrões, pode-se obter a SNR pela expressão (2.19) [24].

$$SNR = \frac{QE \cdot n_f}{\sqrt{QE \cdot n_f + n_r^2}} \quad (2.19)$$

Nos casos em que o número de fótons é elevado tem-se a SNR proporcional à raiz quadrada de QE ($SNR = \sqrt{n_f \cdot QE}$), enquanto para números muito pequenos é proporcional à razão entre QE e n_r ($SNR = n_f \cdot QE/n_r$) [24].

2.3.3.3. Digitalização da intensidade

De forma análoga à definição de *resel* no domínio do espaço, a quantidade designada por *JDD* (*Just Detectable Difference*) descreve a diferença mínima detectável no domínio da intensidade. Está relacionada directamente com o nível de ruído inerente ao processo de detecção e o presente no sistema de detecção.

Considerando um detector ideal, a incerteza na medição do número de fótons deve-se apenas ao ruído de Poisson ($\sqrt{n_f}$). Na prática tem-se também o ruído introduzido pelo detector (térmico, de leitura, etc). Assumindo que este ruído total pode ser representado por um número de fótons no escuro² (n_r), obtém-se *JDD* pela expressão (2.20) [19,21].

$$JDD = \sqrt{n_f + n_r} \quad (2.20)$$

¹ A eficiência quântica é a fracção dos fótons incidentes num detector que são efectivamente detectados.

² Considerando-se que o ruído associado ao processo de detecção é aleatório pode-se considerar que é resultado de variações puramente estatísticas na medição de um número pequeno de fótons no escuro (*dark*) equivalentes.

Conclui-se assim que JDD aumenta, isto é, a capacidade de discriminar diferenças de intensidade na imagem piora se o ruído aumentar. Portanto JDD não está igualmente espaçado¹, tendo um valor que é função do número de fótons detectados.

Pelo contrário, os níveis de cinzento (*grey levels*) na imagem são igualmente espaçados em termos de intensidade (que é proporcional aos fótons detectados), logo tem que se distinguir entre o número de níveis significativos de intensidade (NI), associado ao JDD , e o número de níveis de cinzento necessários para os representar (NC).

Assim, numa imagem com um número de fótons NB no pixel mais brilhante e NE^2 no mais esbatido, considerando apenas o ruído de Poisson, tem-se um JDD de (\sqrt{NB}) e (\sqrt{NE}) , respectivamente. O NI é dado pela expressão (2.21) [21].

$$NI = 2(\sqrt{NB} - \sqrt{NE}) \quad (2.21)$$

Por outro lado o NC , número de níveis de cinzento necessários para a visualização desses níveis significativos de intensidade (NI), é obtido pela expressão (2.22) [19].

$$NC = \frac{NB}{\sqrt{NE}} \quad (2.22)$$

Para concretizar estes conceitos apresenta-se um exemplo. Com $NB = 1000$ seria necessário um ADC de *10-bit* ($2^{10} = 1024$ níveis). Se o sistema de detecção tem um nível de ruído equivalente $NE = 10$ (fótons no escuro), aplicando a expressão (2.21) tem-se $NI = 57$ (níveis de intensidade significativos), enquanto $NC = 316$ (níveis de cinzento), pela expressão (2.22). Significa que a sua representação pode ser feita com uma imagem de *9-bits*. O menor JDD é igual a ~ 3 ($\sqrt{10}$) que corresponde a um único nível de cinzento, enquanto o maior é ~ 32 ($\sqrt{1000}$), que abrange 10 níveis de cinzento.

2.3.3.4. Efeito da gama dinâmica no contraste

O número de níveis de intensidade da luz resolvíveis, níveis de cinzento desde o preto ao branco, é designado por gama dinâmica. Pode ser usado para descrever o número de níveis de cinzento numa imagem ou o número que, potencialmente, uma câmara é capaz de guardar. Na descrição de uma câmara, a gama dinâmica é usualmente calculada como a razão entre o número máximo de electrões (na saturação) e o do ruído de leitura da

¹ Aqui o espaçamento mede-se em número de fótons detectados.

² Considera-se que o número de fótons no pixel mais esbatido corresponde ao número equivalente de fótons no escuro.

câmara (geralmente entre 5-15 electrões). Para um *chip* CCD com um valor de saturação de $40000 e^-/pixel$ e um ruído de leitura de $10 e^-$, a gama dinâmica potencial é de 4000:1 [5].

A limitação da gama dinâmica reduz o contraste na imagem. Na figura 2.9 apresenta-se um exemplo em que um mesmo sinal foi adquirido pelo mesmo PMT, mas com ajustes de ganho diferentes. São assim impostos máximos de intensidade do sinal que correspondem a: (a) 4090; (b) 2440; (c) 1700. Para todos eles tem-se um número de contagens no escuro igual a 226.

A redução da gama dinâmica resulta também no decréscimo dos níveis significativos de intensidade que, de acordo com a expressão (2.21), são de 100 (a), 70 (b) e 50 (c), bem como dos níveis correspondentes de graus de cinzento, de acordo com a expressão (2.22), 270 (a), 160 (b) e 110 (c). A manifestação desta evolução é facilmente perceptível pela variação do contraste entre as três imagens da figura 2.9.

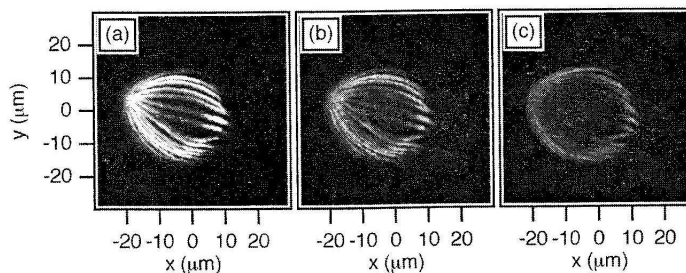


Figura 2.9. Efeito da gama dinâmica no contraste. Contagens máximas do sinal iguais a: (a) 4090; (b) 2440; (c) 1700 (reproduzido de [19]).

2.3.3.5. Efeito do ruído na resolução

A resolução que é possível atingir está dependente da relação sinal-ruído (SNR), que pode ser calculada também pela expressão (2.23).

$$SNR = \frac{I_m - I_f}{I_{std}} \quad (2.23)$$

em que I_m representa o valor médio do sinal, I_f o valor do fundo e I_{std} o valor do desvio padrão do sinal. Os valores do fundo e do desvio padrão são afectados pelas diversas formas de ruído, por exemplo, fotónico, térmico, ou de leitura, que reduzem o SNR do sistema, e consequentemente a visibilidade¹ do vale da intensidade entre os dois máximos, conforme especificado no critério de Rayleigh.

¹ Capacidade de um observador reconhecer dois pontos próximos como estando separados. É um conceito muito mais incerto do que a resolução pois não depende de aspectos de cálculo da teoria da difracção mas

Para se ilustrar este efeito, vai considerar-se apenas o efeito do ruído intrínseco de Poisson. As outras fontes de ruído apenas irão piorar ainda mais a capacidade de tornar perceptível o vale e consequentemente reduzir a resolução possível de atingir.

Na figura 2.10 são representados os resultados de uma simulação numérica da medição de fótons emitidos por dois pontos de brilho igual, separados por uma distância exactamente igual ao critério de Rayleigh. Considera-se assim uma frequência de amostragem igual a dois por FWHM da distribuição resultante de cada fonte pontual.

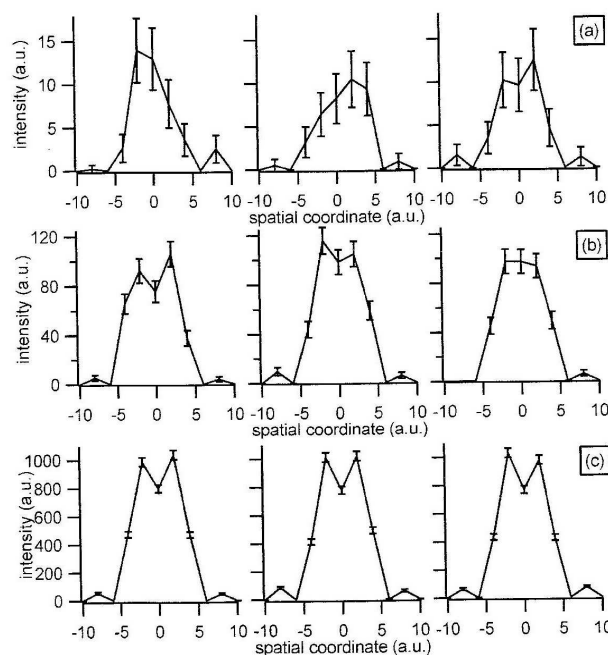


Figura 2.10. Efeito do ruído de Poisson entre duas distribuições separadas pela distância obtida pelo critério de Rayleigh. O valor médio de fótons detectados em cada distribuição é: (a) 10; (b) 100; (c) 1000 (reproduzido de [19]).

Usando o número máximo de fótons igual a 10 (a), 100 (b) e 1000 (c), como se considera apenas o ruído de Poisson, o erro relativo é correspondentemente igual a 32%, 10% e 3,2%, respectivamente, estando as barras de erro representadas na figura. É nítida a diferença entre (a), em que os dois máximos não são de todo distinguíveis, e (c) em que esses dois picos aparecem claramente. Existe ainda a vantagem da reprodutibilidade ao longo das várias medições ser muito melhor, visto que o erro é muito menor.

das funções que o sistema visual usa para determinar como um padrão particular de intensidade deve ser interpretado [26].

2.3.4. Detectores

De entre as características de um detector é comum dar-se mais atenção à linearidade, gama dinâmica e sensibilidade. No caso da detecção de sinais de baixa intensidade, como é frequente no caso da fluorescência, o desempenho do ruído depende de duas propriedades fundamentais do detector: a sua QE e o ruído do detector medido em electrões por *pixel* [1].

Por exemplo, os microscópios confocais podem usar um detector de diferentes tipos tais como o PMT, APD ou câmara CCD [27]. Ao escolher-se o detector, em particular a câmara CCD, deve procurar-se um com a sensibilidade adequada, sem ser exageradamente elevada para o tipo de microscopia pretendido. O seu custo seria mais elevado e seria provável que aumentasse o nível de ruído de muitas origens [28].

A qualidade da imagem, nos casos em que as outras fontes de ruído podem ser desprezadas, é determinada apenas pelo número de fotões detectados. Mas o número de fotões detectados depende de factores tais como o tempo de integração e a QE do detector. Os CCDs, que são habitualmente usados em imagens de campo amplo, têm uma QE elevada, que constitui uma vantagem relativamente aos detectores mais usados em sistemas confocais tais como os PMT [2].

2.3.4.1. PMT

O fotomultiplicador (PMT) é um dispositivo fotométrico, e não de imagem, vulgarmente usado para detecção de níveis baixos de luz. Tipicamente consiste num fotocátodo, que converte os fotões incidentes em electrões, um número de estágios de amplificação, chamados dínodos, e um ânodo. Têm um ganho ou amplificação muito elevado. O sinal (número de contagens) de fundo pode ser reduzido arrefecendo o PMT.

Têm uma QE, tipicamente de 1% a 20%, que depende fortemente do comprimento de onda da luz. Por isso, é importante seleccionar um PMT com um fotocátodo que tem a sensibilidade adequada para os comprimentos de onda (λ) que serão detectados. Por exemplo, para um fotocátodo, muito comum, S20, a QE varia de 13% para 23%, se λ passar de 520 nm para 420 nm. Devido ao seu elevado ganho tem um ruído desprezável. Os PMTs com os materiais clássicos no seu fotocátodo têm maior sensibilidade no azul e UV ($QE \leq 35\%$) [1,25]. É o detector mais comum usado em microscopia confocal dado que é relativamente barato e estável, tem uma elevada sensibilidade, gama dinâmica e ganho (tipicamente de aproximadamente 10^6), e uma resposta muito rápida [27].

2.3.4.2. APD e SPAD

O fotodíodo de avalanche (APD) é um dispositivo semiconductor que constitui uma alternativa ao PMT. Tem um ganho muito elevado na conversão de fótons em electrões. Os APD combinam uma QE elevada com baixo ruído do sensor. A sua QE é tipicamente da ordem dos 80%, na gama de comprimentos de onda 550-750 nm, tornando-se menor para valores mais pequenos do comprimento de onda [27]. A maior limitação é que não têm a gama dinâmica dos PMTs, podendo facilmente atingir a saturação para luz mais intensa.

Contudo para aplicações com luz da baixa intensidade os APDs podem ser a melhor escolha. Podem ser usadas técnicas de contagem de fótons¹, ajustando o circuito, de forma a dar uma resposta maior a qualquer excitação por um fóton [29]. Para a detecção de luz no infravermelho próximo, a utilização de um SPAD (*Single-Photon APD*), com uma QE de 80% para o comprimento de onda de 700 nm pode ter muitas vantagens relativamente ao PMT [27].

É um dispositivo que exhibe um tempo morto² longo. Assim, as taxas de chegada, dos fótons que são detectáveis, são severamente limitadas [1].

2.3.4.3. CCD

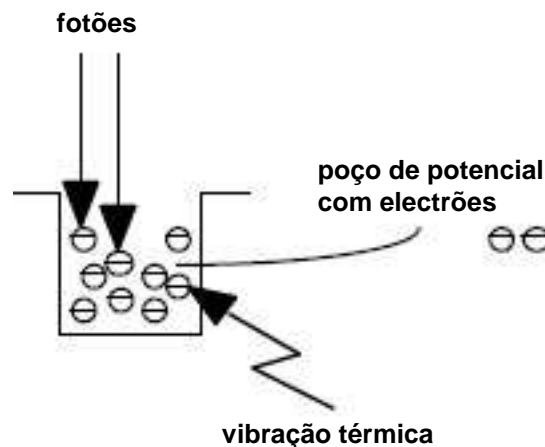


Figura 2.11. Esquema do armazenamento de electrões no poço de potencial (adaptado de [23]).

Em contraste o CCD (*Charge-Coupled Device*) é constituído por uma matriz de elementos (pixels), sendo assim um dispositivo de imagem [1]. O *chip* CCD consiste numa *wafer* fina de silício, material semiconductor, em que são criados pares electrão-

¹ Também nos PMTs podem ser usadas estas técnicas.

² Tempo que tem que decorrer até que o próximo fóton possa ser detectado.

lacuna pelos fotões [5]. De facto, um fotão incidente, com energia suficiente, pode libertar um electrão da banda de valência do semiconductor para a sua banda de condução, criando um par electrão-lacuna. Os electrões libertados, designados por fotoelectrões, são armazenados em poços de potencial. Na figura 2.11 apresenta-se esquematicamente este processo que ocorre em cada pixel [23,28]

Na superfície do silício é definida uma matriz com milhares ou milhões de elementos de imagem (pixels), portanto uma matriz preenchida de elementos fotossensíveis [5]. Existem diferentes modos de leitura sequencial de um CCD, fazendo-se aqui a descrição do modo *full frame*, que está representado esquematicamente na figura 2.12.

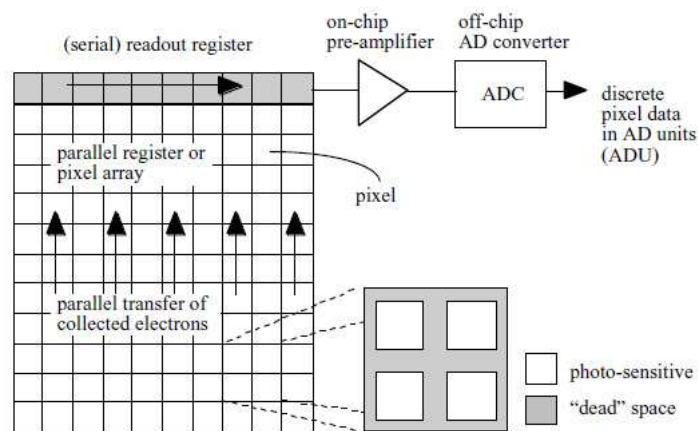


Figura 2.12. Esquema do modo de leitura *full frame* de um CCD (reproduzido de [23]).

Após um tempo de integração especificado, toda a carga é deslocada na direcção de um registo série. Consequentemente é necessário bloquear toda a luz durante a leitura da imagem. Este tempo pode ser longo (segundos) no caso de câmaras CCD lentas. A carga é amplificada, pixel a pixel, e transformada num sinal eléctrico que é depois convertido pelo ADC num valor discreto [23].

Outra característica é o elevado *fill factor*¹. No caso limite de ser igual a 100%, toda a superfície do pixel no CCD é fotossensível, significando que não existirão espaços mortos entre pixels adjacentes [23].

Os semicondutores são materiais fotoemissivos atractivos dado que têm uma QE elevada para comprimentos de onda mais elevados e podem ser projectados com energias de ionização (funções de trabalho) que vão de encontro ao comprimento de onda de interesse ($QE \leq 85\%$) [25]. Têm tipicamente uma QE da ordem dos 30%-50%, mas que pode ultrapassar os 80% usando matrizes CCD finas e do tipo retro-iluminado (*thinned back*

¹ Representa a razão entre a área do pixel efectivamente usada na detecção da luz e a área total do pixel.

illuminated). São frequentemente arrefecidos para reduzir a ruído térmico até valores desprezáveis, ficando o CCD apenas com um pequeno, mas finito, ruído de leitura. Têm maior sensibilidade desde a gama do vermelho do espectro visível até ao infravermelho, devido à sua menor penetração no silício, tendo uma sensibilidade fraca nos fotões UV¹ ou na gama do azul.

Num estudo de comparação com o PMT, verificou-se que têm melhor desempenho para exposições maiores do que, aproximadamente, 25 fotões por pixel, enquanto o PMT é melhor se a exposição for menor [1]. Este resultado é consequência do CCD ter um ruído pequeno, mas finito, para todos os níveis de fotões.

2.3.4.4. CMOS

Nas últimas duas décadas registou-se uma evolução nos sensores de imagem com a tecnologia CMOS, originada na grande procura de sistemas de imagem mais miniaturizados e de menor consumo [30]. Consequentemente abriram-se perspectivas para a sua aplicação noutras áreas, nomeadamente em microscopia.

Apesar de, por vezes, se considerar que os sensores CCD e CMOS não são comparáveis, é inevitável que essa comparação se faça, sendo comum serem apresentadas as seguintes principais vantagens dos sensores com tecnologia CMOS relativamente aos CCDs, [31]:

- Menor custo
- Menor consumo
- Mais compactos (resultado da capacidade de integrar circuitos de temporização, controlo e processamento de imagem no *chip* do sensor).
- Realização de operações electrónicas de visualização (zoom, uso de janelas, etc).

Inicialmente estes sensores usavam os chamados pixels passivos, que consistem num fotodíodo e um transístor, obtendo-se um *fill factor* maior e/ou um tamanho de pixel menor. Demonstraram ter uma excelente QE mas foram penalizados pelo elevado ruído FPN (*Fixed Pattern Noise*). Também não podem ser usados em matrizes de pixels de maiores dimensões, sendo difícil fazer leituras rápidas dos pixels devido ao seu ruído de leitura mais elevado [31].

Posteriormente surgiram os chamados APS (*Active Pixel Sensor*), que são sensores CMOS com um amplificador activo integrado dentro de cada pixel, em que se converte a carga gerada pelo fotão em tensão. O seu *fill factor* é consequentemente pior mas melhora

¹ Ultra-Violeta

a SNR e a gama dinâmica. Podem ser usados em matrizes grandes e com taxas de leitura mais elevadas.

A diferença relativamente aos sensores CCD, em que a carga colectada correspondente a cada pixel, é transportada ao longo dos outros pixels durante o processo de leitura, tem como consequência que, genericamente, os sensores APS têm as seguintes desvantagens relativamente aos CCDs:

- Pior relação sinal-ruído (SNR). O sinal que pode ser recolhido num pixel está relacionado com a área disponível para a recolha de luz dentro do pixel. Assim, quanto maior for o *Fill Factor* mais intenso é o sinal para uma determinada intensidade luminosa. A existência do amplificador em cada pixel, tem como consequência a redução do *Fill Factor*;
- Distorção do sinal ao longo da matriz em resultado de os amplificadores existentes nos diversos pixels da matriz não terem um ganho e *offset* idênticos. Este ruído, designado por FPN, é tipicamente elevado, contudo a sua maior parte pode ser removido com processamento de sinal mas à custa de aumento do custo e consumo [31];
- Além das duas desvantagens anteriores, os amplificadores também limitam a velocidade de operação da matriz de pixels e a capacidade para reduzir o tamanho dos pixels, de forma a competirem melhor com os CCDs. Assim nos APS é necessário fazer um compromisso entre tamanho dos pixels, resolução, qualidade da imagem e velocidade.

Pelo contrário os CCDs são bons dispositivos no que respeita à qualidade da imagem. Têm no entanto a grande desvantagem de não permitirem a fácil integração num único *chip* de funções de uma câmara, tais como temporização e controlo, drivers de relógio, CDS¹, endereçamento aleatório dos pixels e ADC. Necessitam assim de um (circuito) integrado de interface para funcionarem. Logo, os sistemas com CCDs tipicamente consomem maior potência, são mais caros e menos compactos.

A possibilidade de realizar leituras consecutivas sem destruir o conteúdo, permitindo maximizar a SNR e a sua gama dinâmica, é outra vantagem importante dos sensores com a tecnologia CMOS relativamente aos CCDs.

¹ A incorporação de Correlated Double Sampling (CDS) tem sido efectiva na redução do *offset* do amplificador relacionado com o FPN para 0,15%-0,5%.

2.3.4.5. Bidimensionais vs lineares

Os sensores de imagem CCD, normalmente usados em microscopia, são do tipo matriz 2D. Por exemplo os CCDs são usados tipicamente em sistemas confocais com fendas, obtendo-se taxas de aquisição vídeo. É iluminada uma linha completa da amostra em simultâneo e a imagem 2D resultante é gravada, através do varrimento das linhas da imagem, numa matriz 2D do CCD. São raros os casos em que microscópios confocais usam um detector CCD do tipo matriz linear [1]. Também na literatura são poucos os exemplos de aplicação de sensores lineares [32, 33] em microscopia.

No entanto a oferta de sensores lineares, CCD e em particular CMOS, com uma excelente relação custo / desempenho tem vindo a aumentar na última década. Existem características diversas, no que se refere à sua geometria, tendo naturalmente em comum o facto de os pixels estarem dispostos ao longo de uma linha. Os pixels podem ter uma forma rectangular, que é a mais comum, em que a altura é muito superior à largura, mas também podem ser quadrados. Existem ainda sensores com algumas linhas em vez da linha única mais usual.

2.4. Técnicas de microscopia óptica 3D

A microscopia confocal é a técnica de excelência para extrair informação tridimensional de um objecto. No entanto, é uma técnica que não pode ser aplicada em todas as situações, colocando também algumas dificuldades práticas, e os microscópios confocais têm um custo elevado, pelo que foi necessário desenvolver técnicas alternativas.

Dado que neste trabalho foi desenvolvido e testado um microscópio para aplicações no modo de campo claro, fez-se a opção de não se descreverem técnicas específicas do modo de fluorescência, algumas semelhantes às aqui apresentadas, pois a sua diversidade é maior, fazendo recurso nomeadamente a características próprias do processo de fluorescência.

2.4.1. Microscópio confocal

Em microscopia confocal, cujo esquema genérico foi apresentado na figura 2.1, usa-se um detector pontual juntamente com uma fonte pontual. A iluminação feita com a fonte pontual vai recolher informação de uma região muito pequena do objecto e o detector pontual assegura que apenas a luz proveniente dessa mesma pequena área seja detectada.

Uma consequência é que assim tanto a lente objectiva como a lente condensadora contribuem para a formação da imagem, o que resulta numa melhor resolução [34].

Assim, a imagem é mais nítida e tem melhor contraste do que a do microscópio convencional e, o seu aspecto mais relevante, cada imagem representa uma secção fina do objecto. Para além da sua melhor resolução, é possível fazer reconstruções 3D de um volume do objecto, através da montagem de um conjunto de secções finas adquiridas ao longo do eixo óptico (eixo-Z) [35].

Da forma como se obtém a sua capacidade ímpar de seccionamento óptico, resultam também algumas desvantagens. É que para o sinal ter uma amplitude que possa ser detectada com um SNR razoável é necessário usar uma fonte de luz de intensidade elevada, que é normalmente o laser, devido à colocação de uma abertura circular em frente ao detector (tipicamente um PMT). Na figura 2.13 representa-se o esquema do microscópio confocal de varrimento laser (*confocal laser scanning microscope*).

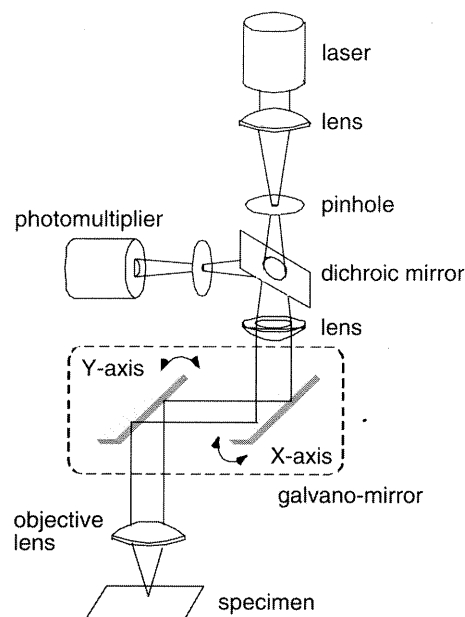


Figura 2.13. Esquema do microscópio confocal de varrimento laser (reproduzido de [35]).

Exige também que o alinhamento do sistema seja feito de forma muito cuidadosa, para que as aberturas circulares de iluminação e detecção se situem em posições equivalentes do sistema óptico [36]. Acresce que a necessidade de varrimento mecânico nas duas direcções laterais para obter a imagem 2D, somadas ao varrimento no eixo-Z, tornam a sua aquisição lenta, o que é um constrangimento importante que pode limitar a sua aplicação em algumas áreas.

2.4.1.1. Varrimento série¹

Constitui uma forma de ultrapassar as limitações principais do microscópio confocal, estando uma das suas configurações apresentada esquematicamente na figura 2.14 [37].

O componente principal é o disco de Nipkow, que contém um número elevado de aberturas circulares. Cada abertura age em simultâneo como abertura de iluminação e detecção, pelo que o sistema actua como uma grande quantidade de microscópios confocais em paralelo, cada um formando a imagem de um ponto específico do objecto. Para evitar que a luz proveniente de uma abertura (sistema confocal) interfira com a da(s) adjacente(s), tem que existir um afastamento entre as aberturas com um valor aproximadamente dez vezes superior ao diâmetro. Como consequência, a luz disponível para iluminar o objecto é reduzida, drasticamente, para 1% [36].

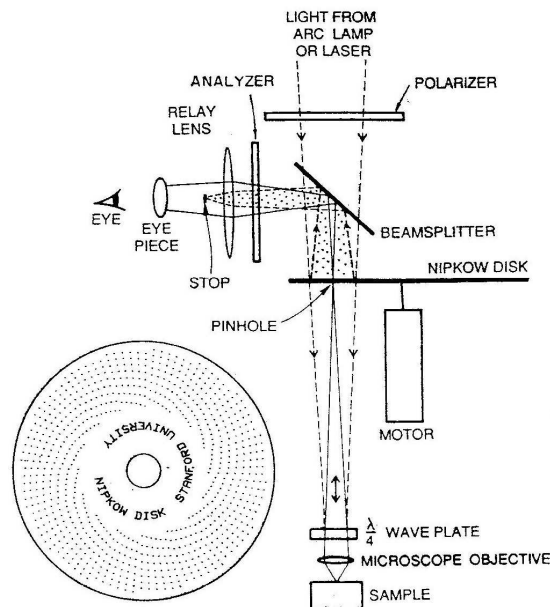


Figura 2.14. Esquema de uma configuração de um microscópio de varrimento série (reproduzido de [37]).

Outra consequência é que assim o objecto tem uma amostragem escassa, sendo necessário dispor as aberturas com a configuração de uma espiral de Arquimedes, e rodar o disco, para se conseguir ter a imagem de todo o objecto [35,37].

Uma solução para este problema de fraca iluminação foi obtida através da colocação de outro disco de Nipkow, contendo uma matriz de microlentes, que permitem guiar de forma eficiente a luz para cada abertura circular. Na figura 2.15 representa-se um esquema desta solução.

¹Tradução adoptada para a designação *tandem scanning*.

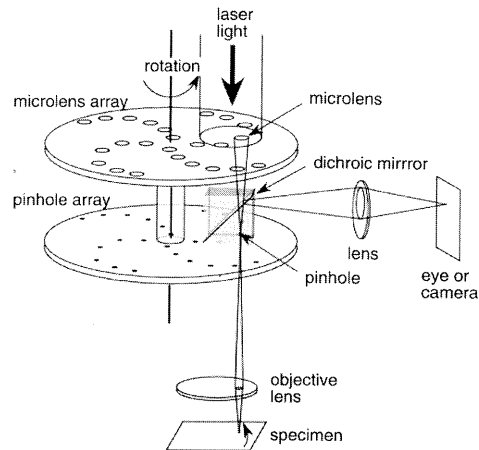


Figura 2.15. Esquema de um microscópio confocal de varrimento série usando dois discos de Nipkow, sendo um deles com microlentes (reproduzido de [35]).

Conseguem-se assim taxas de aquisição de imagem elevadas (da ordem dos 1000 frames/s), o que permite obter uma imagem, puramente confocal, que pode ser observada directamente ou recolhida num detector [35].

2.4.1.2. Máscara com aberturas programáveis¹

No microscópio confocal, a necessidade de usar uma fonte de luz laser não tem qualquer razão fundamental, devendo-se à necessidade de se ter uma iluminação suficientemente intensa. Contudo, seria desejável que tal utilização não fosse necessária, pois aumentaria o número de comprimentos de onda disponíveis, bem como permitiria a redução do seu custo.

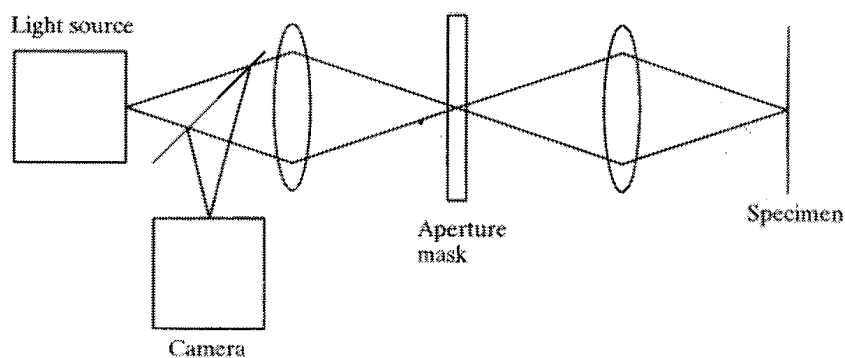


Figura 2.16. Diagrama com o esquema deste microscópio confocal com uma máscara com aberturas programáveis (reproduzido de [38]).

Para isso, é necessário aumentar a fracção de luz disponível, o que se consegue com a implementação de sistemas confocais paralelos com as aberturas confocais colocadas tão

¹Tradução adoptada para a designação *aperture correlation*.

próximas quanto possível, o que exige que seja encontrado algum método para prevenir a interferência mútua entre sistemas adjacentes. Uma forma é através da utilização de uma máscara em que a transmitância de cada abertura circular é programável [38]. O esquema da figura 2.16 representa o microscópio em que a confocalidade múltipla é obtida com a máscara.

Pode ser implementada com um modulador espacial de luz (SLM) de cristais líquidos, em que a sequência usada, para abrir e fechar cada abertura, não está correlacionada com as sequências de todas as outras aberturas [36,38].

2.4.2. Microscópio com iluminação estruturada

Nesta configuração, conhecida por SIM¹, o objecto é iluminado com um padrão espacial específico em vez de se usar iluminação uniforme. É tipicamente conseguido através da colocação de uma máscara no percurso óptico². O padrão de iluminação estruturada codifica informação adicional na imagem, que se vai sobrepor à que está disponível usando iluminação de campo amplo (ou *full illumination*). Para que este método resulte, é necessário efectuar exposições múltiplas (obter imagens múltiplas) para fazer a cobertura total do objecto. Um elemento fundamental no SIM é o processamento de imagem, que é essencial para o processo de descodificação da informação presente na imagem [7].

Tem assim como base o microscópio convencional, que se pode designar por microscópio de campo amplo, dado que este contém todas as características para produzir uma imagem em tempo real usando luz branca, tendo apenas que se encontrar uma forma de introduzir o seccionamento óptico no sistema.

A partir do processo de formação de imagem de um microscópio convencional pode-se concluir que, apenas a componente de frequência espacial nula (constante), não varia com o afastamento do foco (*defocus*). Todas as restantes são atenuadas de forma mais ou menos intensa.

Pode então modificar-se o sistema de iluminação de um microscópio, para que um padrão de uma grelha, com uma única frequência espacial, seja projectado no objecto, como está esquematizado na figura 2.17. Assim o microscópio obterá, de forma eficiente, apenas a imagem das partes do objecto correspondentes aos pontos onde o padrão da grelha está

¹ *Structured Illumination Microscopy*

² Para o modo de fluorescência existe também uma técnica que usa franjas de interferência para a iluminação do objecto.

focado. Obtém-se, então, uma imagem com seccionamento óptico do objecto mas com o padrão da grelha sobreposto, que terá que ser removido.

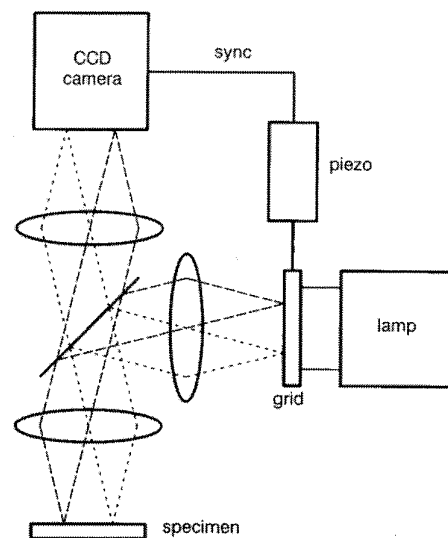


Figura 2.17. Esquema da configuração óptica de um microscópio com uma grelha na iluminação para projecção sobre o objecto (reproduzido de [39]).

A taxa de atenuação com o afastamento da posição focal, ou a capacidade de seccionamento óptico, dependerá do valor da frequência que é projectada no objecto. Este tipo de solução, envolvendo a projecção de vários padrões no objecto para obter informação da sua estrutura 3D, teve várias implementações mas que não conseguiam ultrapassar a dificuldade de encontrar um método simples para remover o padrão da grelha [39]. A solução encontrada envolve o processamento em tempo real de três imagens, obtidas em três posições espaciais da projecção da grelha, para se produzir a imagem com seccionamento óptico [40].

Este método requiere então uma modificação mínima ao microscópio convencional (de campo amplo) permitindo obter imagens de alta qualidade usando fontes de luz branca padrão (não laser) para microscopia. Estas fontes de luz poderão ser usadas em muitas aplicações, mas em certas situações dever-se-á usar luz laser. Um exemplo será o caso em que existe a necessidade de usar um comprimento de onda específico. Até poderá estar disponível numa fonte de luz branca, mas com uma intensidade muito menor do que no laser, inviabilizando a sua utilização [40].

2.4.3. Microscópio confocal de linha

A técnica confocal de linha combina algumas das características do microscópio confocal com as dos métodos de formação de imagem dos microscópios convencionais. É baseada

na introdução de iluminação com a forma de uma linha e na detecção linear da imagem, em posições conjugadas, em alternativa à aproximação confocal com pontos [32]. A figura 2.18 mostra o esquema do microscópio confocal de linha no modo de reflexão.

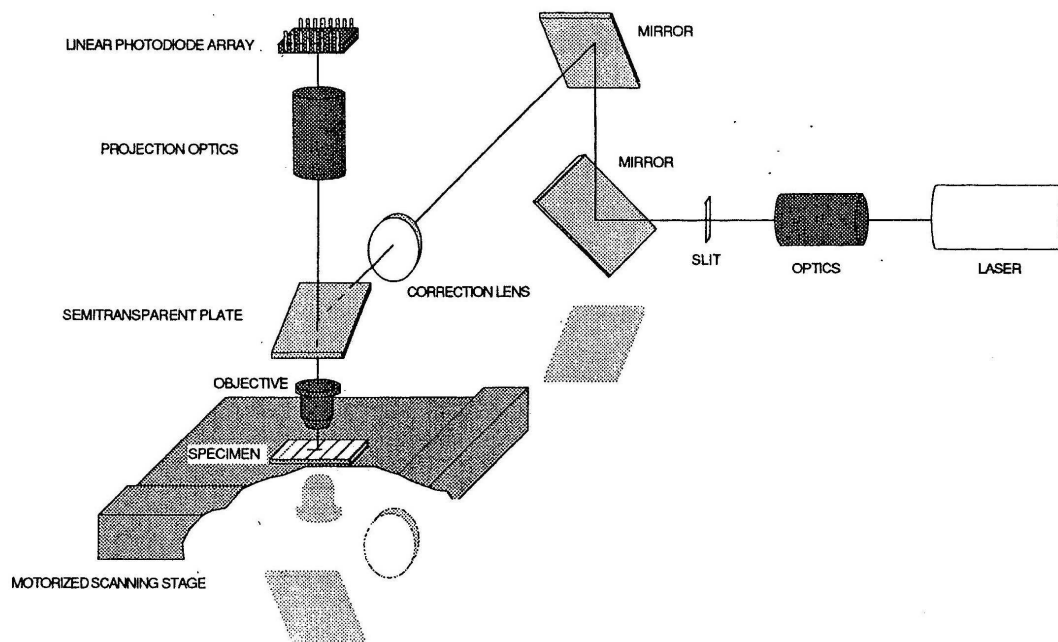


Figura 2.18. Esquema da configuração no modo de reflexão de um microscópio com sensor linear (reproduzido de [32]).

Em todo o percurso óptico não existem componentes ópticos em movimento, pelo que a lente condensadora e a objectiva são usadas na sua parte central. Conjugando com a utilização de sensores de imagem lineares, esta configuração permite obter um sistema rápido e flexível de aquisição de imagem. Em muitos casos podem ser usadas lâmpadas convencionais, pois a exigência quanto à intensidade da fonte é menor do que no microscópio confocal [32]. Não foram apresentados resultados quantitativos da capacidade de seccionamento óptico obtida com esta técnica.

Referências bibliográficas

- [1] Sheppard, C.J.R and Shotton, D.M., “Confocal Laser Scanning Microscopy”, BIOS Scientific Publishers, Oxford (1987)
- [2] Verveer; P.J., “Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy”, PhD Thesis, Delft Tech. University (1998)
- [3] Wilson, T and Hewlett, S.J., “Imaging in scanning microscopes with slit-shaped detectors”, *Journal of Microscopy*, 160 (2), pp. 115-139 (1990)
- [4] Sheppard, C.J.R. and Mao, X.Q., “Confocal microscopes with slit apertures”, *Journal of Modern Optics*, 35 (7), pp. 1169-1185 (1988)
- [5] Murphy, D.B., “Fundamentals of light microscopy and electronic imaging”, Wiley-Liss (2001)
- [6] Dekker, A.J. den and Bos, A. van den, “Resolution – a survey”, *Journal of the Optical Society of America A*, 14 (3), pp. 547-557 (1997)
- [7] Wu, Q, Merchant, F.A. and Castleman, K.R., “Microscope Image Processing”, Academic Press (2008)
- [8] Sabharwal, S et al., “Slit-scanning confocal microendoscope for high-resolution in vivo imaging”, *Applied Optics*, 38 (34), pp. 7133-7144 (1999).
- [9] Wilson, T, “Depth response of scanning microscopes”, *Optik*, 81 (3), pp. 113-118 (1989)
- [10] Goodman, J.W., *Introduction to Fourier optics*”, McGraw-Hill, New York (1968)
- [11] Boreman, G.D. and Yang, S., “Modulation transfer function measurement using three- and four bar target”, *Applied Optics*, supplement, pp. 8050-8052 (1995)
- [12] Williams, T.L., “The Optical Transfer Function of Imaging Systems”, *IoP* (1999)
- [13] Keller, H.E., “Objective lenses for confocal microscopy”, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, James Pawley ed., pp. 111-126, 2nd Ed., Plenum, New York (1995)
- [14] Sheppard, C.J.R., Gu, M., Brain, K. and Zhou, H., “Influence of spherical aberration on axial imaging of confocal reflection”, *Applied Optics*, 33 (4), pp. 616-624 (1994)
- [15] Gu, M. and Sheppard, C.J.R., “Effects of defocus and primary spherical aberration on images of a straight edge in confocal microscopy”, *Applied Optics*, 33 (4), pp. 625-630 (1994)
- [16] *Optics and optical instruments catalog*, Edmund Optics,(2009).
- [17] Lee, J, Rogers, J.D. and Descour, M.R., “Imaging quality assessment of multi-modal miniature microscope”, *Opt. Express*, 11 (12), pp. 1436-1451 (2003)
- [18] Williams, C.S and Becklund, O.A., “Introduction to the Optical Transfer Function”, SPIE Press, Washington (2002)

- [19] Muller, Michiel, "Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy", 2nd Edition, SPIE Press, Washington (2006)
- [20] Tsien, R.Y. and Bacsikai, B.J. "Video-rate confocal Microscopy", Handbook of Biological Confocal Microscopy, James Pawley ed., pp. 459-478, 2nd Ed., Plenum, New York (1995)
- [21] Webb, R.H. and Dorey, C.K., "The pixilated image", Handbook of Biological Confocal Microscopy, James Pawley ed., pp. 55-68, 2nd Ed., Plenum, New York (1995)
- [22] Snyder, D.L., Hammoud A.M. and White, R.L., "Image recovery from data acquired with a charge-coupled-device camera", Journal of the Optical Society of America A, 10 (5), pp. 1014-1023 (1993)
- [23] van Vliet, L.J., Boddeke, F.R., Sudar D., and Young I.T., "Image Detectors for Digital Image Microscopy", Digital Image Analysis of Microbes; Imaging, Morphometry, Fluorometry and Motility Techniques and Applications, Modern Microbiological Methods, M.H.F. Wilkinson, F. Schut eds, pp. 37-64, John Wiley & Sons, Chichester (UK) (1998)
- [24] Sheppard, Colin J.R., Gan, Xiaosong, Gu, Min and Roy, Maitreyee, "Signal-to-noise in confocal microscopes", Handbook of Biological Confocal Microscopy, James Pawley ed., pp. 363-371, 2nd Ed., Plenum, New York (1995)
- [25] Art, J, "Photon detectors for confocal microscopy", Handbook of Biological Confocal Microscopy, James Pawley ed., pp. 183-196, 2nd Ed., Plenum, New York (1995)
- [26] Pawley, J, "Fundamental limits in confocal microscopy", Handbook of Biological Confocal Microscopy, James Pawley ed., pp. 19-37, 2nd Ed., Plenum, New York (1995)
- [27] Masters, B.R., "Confocal microscopy and multiphoton excitation microscopy", SPIE Press, Washington (2005)
- [28] Inoué, S., "Video Microscopy", Plenum Press, New York (1986)
- [29] Webb, R.H., "Confocal optical microscopy", Rep. Prog. Phys., 59, pp. 427-471 (1996)
- [30] Fossum, E.R., "CMOS image sensors: electronic camera-on-a-chip", IEEE Transactions on Electron Devices, 44 (10), pp. 1689-1698 (1997)
- [31] Lo, Y., "Solid-state image sensors: technologies and applications", Proc. SPIE, 3422, pp. 70-80 (1998)
- [32] Benedetti, P. A., Evangelista, V., Guidarini, D. and Vestri, S., "Confocal-line microscopy", Journal of Microscopy, 165 (1), pp. 119-129 (1992)
- [33] Zheng, Y, Bin, D., Xingzhan, L and Ren, Y, "Novel two-dimensional position measurement method with linear array charge coupled device", Opt. Eng., 37 (9), pp. 2601-2604 (1998)
- [34] Wilson, T. Ed., "Confocal Microscopy", Academic Press, London (1990)
- [35] Nakano, A., "Spinning disk confocal microscopy – a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic", Cell Structure and Function, 27, pp. 349-355 (2002)
- [36] Wilson, T., "New Approaches to Real-Time Three-Dimensional Imaging in Light Microscopy", Proceedings Royal Microscopical Society, 33 (4), pp. 259-264 (1998)

- [37] Xiao, G.Q., Corle, T.R. and Kino, G.S., "Real-time confocal scanning optical microscope", *Appl. Phys. Lett.*, 53 (8), pp. 716-718 (1998)
- [38] Wilson, T., Juskaitis, R., Neil, M.A.A. and Kozubek, M., "Confocal microscopy by aperture correlation", *Opt. Letters*, 21 (23), pp. 1879-1881 (1996)
- [39] Neil, M.A.A. et al., "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope", *Opt. Letters*, 22 (24), pp. 1905-1907 (1997)
- [40] Neil, M.A.A. et al., "Wide-field optically sectioning fluorescence microscopy with laser illumination", *Journal of Microscopy*, 197 (1), pp. 1-4 (2000)

Cap. 3 – Microscópio de bancada

3.1. Introdução

A primeira fase deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um protótipo laboratorial de um microscópio óptico de varrimento. No circuito óptico, montado numa mesa óptica, foi usado como detector de luz um sensor do tipo matriz linear, tendo-se desenvolvido um módulo autónomo de leitura do sensor. A imagem é visualizada no monitor de um PC, tendo-se desenvolvido diferentes aplicações MATLAB para implementar todas as funcionalidades exigidas.

Neste capítulo começa-se por apresentar e discutir a arquitectura do protótipo, nomeadamente as seguintes opções fundamentais:

- Circuito óptico com uma configuração epi-iluminada;
- Aquisição da imagem através do modo de varrimento do objecto;
- Módulo de leitura do sensor baseado num microprocessador da família PIC.

Em seguida é apresentada a sua descrição, considerando a sua divisão nos seguintes componentes principais:

- Montagem óptica: em que se apresenta o sistema mecânico, a plataforma de posicionamento, as fontes de luz usadas no decurso deste trabalho bem como todos os componentes ópticos e se termina com a descrição do sensor linear escolhido;
- Instrumentação: para leitura do sensor em que se descreve o módulo desenvolvido, o modo como foi implementada a leitura do sensor e a comunicação do módulo com o PC;
- Posicionadores: em que se faz a descrição das suas características e do modo como é executado o seu controlo;
- Aplicações MATLAB: em que são descritas as suas funcionalidades principais tais como a controlo dos varrimentos, a aquisição de dados do sensor e a visualização e processamento da imagem.

3.2. Arquitectura do microscópio

De acordo com a motivação inicial deste trabalho, o microscópio é baseado num sensor do tipo matriz linear. Inicialmente pensou-se usar um detector de fotodíodos de avalanche (APDA) da EG&G (C30985E). As suas características principais apresentam-se na tabela 3.1. Com o desenvolvimento de um módulo de aquisição de dados baseado em DSPs da Texas Instruments, aproveitando o conhecimento e a experiência do grupo de investigação, e o facto de possuir algumas das ferramentas de desenvolvimento, poder-se-ia obter um sistema rápido de aquisição de imagem. No entanto, a largura dos seus elementos activos (pixels), 150 μm , não permitiria obter os resultados pretendidos.

	C30985E (EG&G)	S3921-128q (Hamamatsu)	LIS-1024 (PVS)
Tipo	Avalanche photodiode linear array	NMOS linear image sensor	Linear CMOS image sensor
Detector	Fotodíodos de avalanche	Fotodíodos	Fotodíodos
QE	85% (900nm) 18% (1060nm)	Não disponível	60% (675nm)
Gama espectral de resposta	400-1100 nm	200-1100nm	350-1100nm
Encapsulamento	34 pinos	22 pinos	PHOTO-DIP 8 pinos LCC 16 pinos
Taxa de aquisição	200 MHz	0,1-500kHz	1kHz-20MHz
n° de pixels	25	128	1024
Largura dos pixels	150 μm	50 μm	7,8 μm

Tabela 3.1. Comparação das principais características dos três sensores.

Numa primeira fase do trabalho, aproveitando o facto de no grupo de investigação se ter desenvolvido um sistema, PAF (*Photodiode Array Fluorometer*), com um sensor do tipo matriz linear da Hamamatsu (S3921-128Q), usou-se o seu hardware e adaptou-se o software, para a realização dos primeiros testes. As características principais deste sensor também foram incluídas na tabela 3.1. Na figura 3.1 é apresentado um esquema deste sistema de teste.

Este sistema permitiu adquirir alguma sensibilidade para as questões de posicionamento e alinhamento dos componentes ópticos. No entanto, o mesmo problema da excessiva

largura dos 128 pixels deste CCD do tipo matriz linear, 50 μm , obrigou a procurar-se outro sensor.

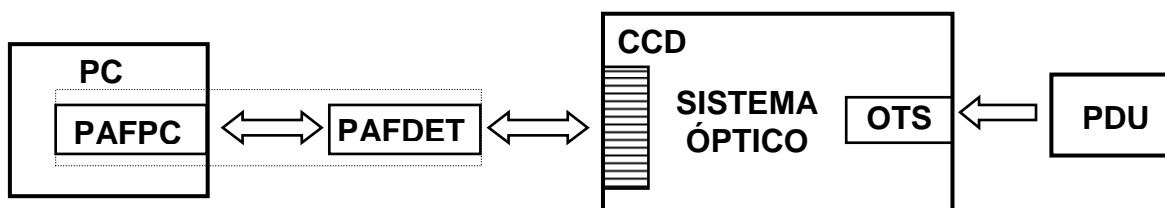


Figura 3.1. Sistema de teste com o PAF. PAFPC e PAFDET são os módulos de hardware do fluorómetro do PC e do detector, respectivamente; OTS – plataforma de translação do objecto; PDU – Unidade de *drive* do piezoeléctrico.

Nesta fase a PVS (*Photon-Vision Systems*) estava a lançar no mercado um novo sensor (*LIS-1024*) com 1024 pixels de largura igual a 7,8 μm , o que configurava uma excelente oportunidade. As suas características principais completam a tabela 3.1.

Foi então desenvolvido um módulo de leitura do sensor que permitisse a sua colocação no sistema óptico de bancada. Na figura 3.2 apresenta-se um diagrama de blocos do microscópio em que se podem identificar os três grandes componentes em que pode ser dividido e que serão descritos neste capítulo.

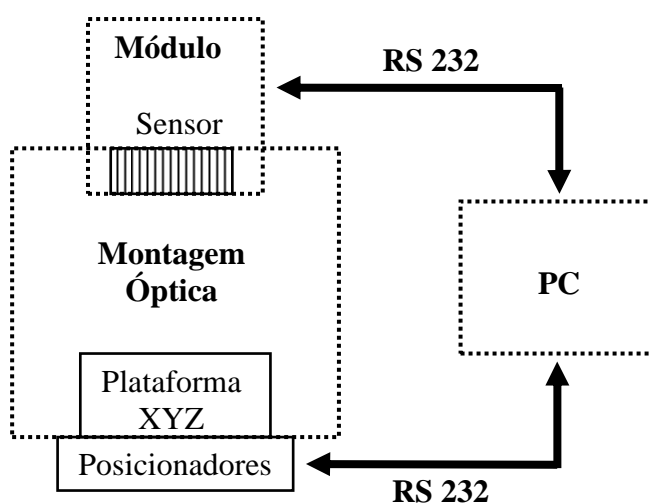


Figura 3.2. Diagrama de blocos do microscópio de bancada.

3.2.1. Módulo autónomo de leitura do sensor

Ao contrário da arquitectura do PAF, que foi usado para os primeiros testes, optou-se por um módulo autónomo¹ de leitura do sensor. Com esta opção sacrificou-se o desempenho do sistema, nomeadamente no que respeita à taxa de aquisição de dados em troca de um menor tempo de desenvolvimento. Caso se viesse a considerar pertinente, no futuro

¹ *Stand-alone*.

poderia ser desenvolvida outra electrónica de aquisição mais rápida. Na figura 3.3 descreve-se esquematicamente, de que forma a informação sobre a distribuição de luz no plano imagem do microscópio chega até ao PC, onde irá ser visualizada.

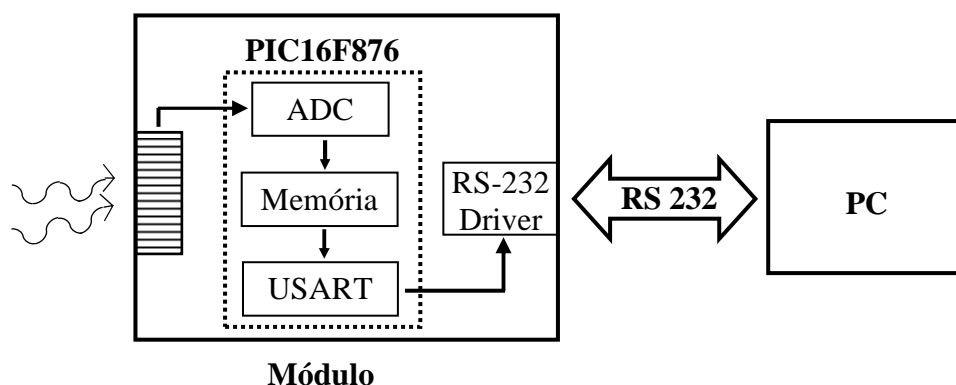


Figura 3.3. Esquema da forma como a informação sobre a distribuição de luz no sensor chega ao PC.

Com o desenvolvimento deste módulo foi conscientemente assumido que a limitação (*bottleneck*) desta arquitectura do microscópio seria o modo de comunicação série, norma RS232, com o PC. Como se verá em detalhe mais à frente neste capítulo, no melhor caso, isto é, com a *baud-rate* (velocidade de transmissão) máxima de 57600 baud^1 , a taxa de aquisição será de 5 frames^2 (de 1024 pixels) por segundo. O entendimento foi de que o objectivo é a demonstração de um método, o que não implica o desenvolvimento de um protótipo com um desempenho otimizado.

3.2.2. Configuração epi-iluminada

Por uma questão de facilidade no manuseamento das amostras, optou-se por testar a técnica através da obtenção de imagens no modo de campo claro. Para a sua não aplicação no modo de fluorescência, contribuiu fundamentalmente a necessidade de dominar algumas técnicas na preparação das amostras, nomeadamente usando os marcadores adequados. As conclusões que se conseguiriam retirar usando o modo de campo claro seriam mais facilmente estendidas ao modo de fluorescência, do que em sentido contrário. É importante notar que no âmbito deste trabalho estão o desenvolvimento e teste de uma técnica, conseqüentemente sem se ter o objectivo de desenvolver ao ponto de a adaptar aos diferentes modos de microscopia, nomeadamente fluorescência e campo claro. Optou-se assim por um circuito óptico usando uma

¹ É a unidade normalmente usada na descrição da velocidade de transmissão, que significa *bit/s*.

² Mantém-se *frame* por não se encontrar tradução considerada adequada.

configuração epi-iluminada, isto é, um microscópio de reflexão. Neste modo os braços de iluminação e detecção têm um troço comum, como mostra a figura 3.4.

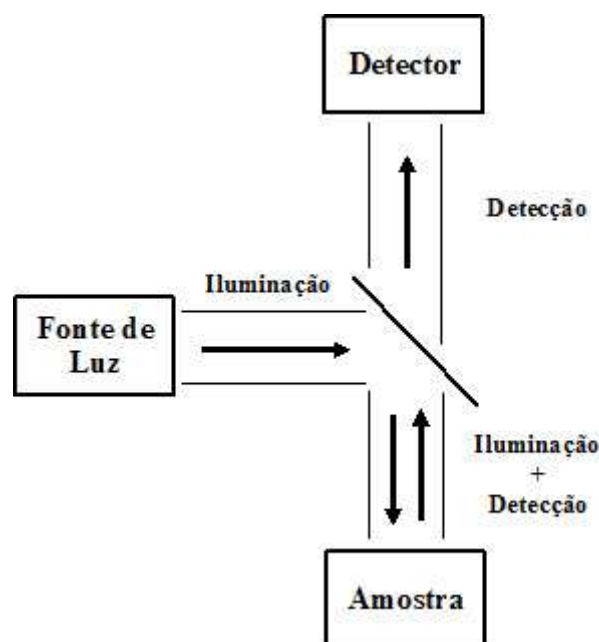


Figura 3.4. Esquema da configuração epi-iluminada.

3.2.2.1. Varrimento da plataforma

Para se adquirirem as imagens bidimensionais (2D) é necessário efectuar um varrimento num dos eixos transversais (ou direcções laterais), no plano do objecto. Para ser possível aplicar algoritmos de reconstrução para se produzirem imagens com informação tridimensional (3D) é também necessário um varrimento no eixo longitudinal, que é a direcção normalmente designada por axial. Estes varrimentos são executados através de deslocamentos do objecto, sendo um tipo conhecido por varrimento do objecto (*stage-scanning*). A outra opção seria o varrimento do feixe (*beam-scanning*) que foi preterida pelas seguintes razões:

- Implica a existência de um dispositivo que provoca o desvio do feixe, logo a luz não atravessa os diferentes componentes ópticos do sistema sempre na zona central, tornando o sistema mais sensível a aberrações das lentes.
- Dificuldade em se montar um dispositivo do tipo cabeça de varrimento¹ no sistema *Microbench* usado na montagem óptica. Além disso, estes dispositivos são vocacionados para a deflexão de feixes laser.

¹ *Scan-head*

Assim, o objecto é colocado numa plataforma XYZ, isto é, são possíveis os movimentos segundo qualquer um dos três eixos, que é o único componente mecânico dinâmico do sistema.

3.3. Montagem óptica

Faz-se uma breve descrição dos componentes ópticos e mecânicos, das fontes de luz e do sensor usado no decurso deste trabalho. Note-se que se construiu um circuito óptico com o menor número de componentes possível, mantendo as características que permitam desenvolver a técnica, pois como se usou óptica de baixo custo o aumento do seu número tenderia a agravar a presença de aberrações.

3.3.1. Componentes mecânicos

Os testes iniciais foram realizados numa mesa óptica da *Melles Griot* existente no IBILI¹. Na montagem usou-se o sistema de posicionamento e alinhamento de componentes mecânicos também da *Melles Griot*, assente em carris ópticos, nos quais se adaptou o sistema *Microbench*. Posteriormente o sistema foi montado no LEI², usando-se uma placa de montagem óptica (*breadboard*) da *Thorlabs* com o sistema *Microbench*. Na figura 3.5 apresentam-se imagens das duas montagens.

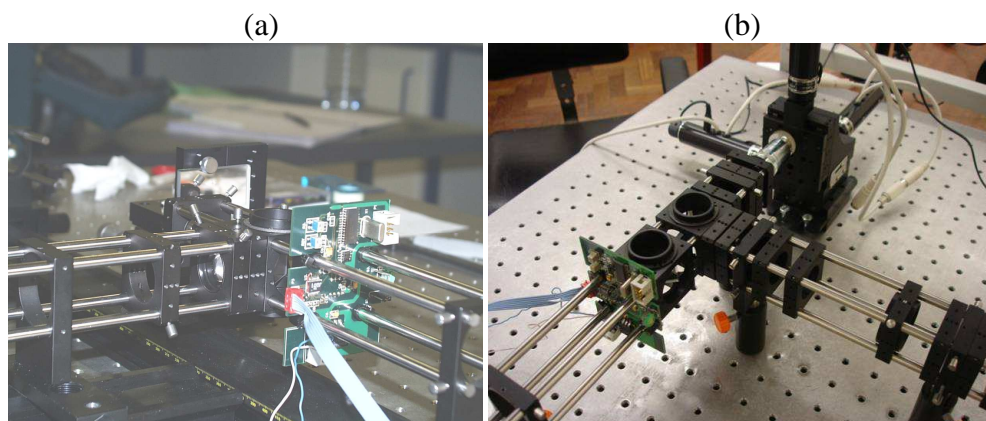


Figura 3.5. Imagens das duas montagens ópticas: (a) na mesa óptica; (b) na placa de montagem óptica (*breadboard*).

¹ IBILI – Instituto Biomédico para a Investigação em Luz e Imagem

² LEI - Laboratório de Electrónica e Instrumentação no Departamento de Física da Universidade de Coimbra

3.3.1.1. Sistema Microbench

O sistema *Microbench* da *Spindler & Hoyer* (posteriormente *Linos*) é um sistema micro-óptico de bancada, compacto, com quatro hastes. Foi desenvolvido com o objectivo de resolver o problema dos sistemas anteriores que eram pouco compactos e em que a sua montagem era demasiado complexa. As suas principais características são a robustez que resulta da sua estabilidade e a precisão com que os componentes são centrados e alinhados. Pela simplicidade da sua integração têm uma extensa aplicação tanto em montagens ópticas laboratoriais como em dispositivos opto-mecânicos. É um sistema vocacionado para a montagem de instrumentação para demonstrações, devido à facilidade com que se observa todo o sistema, mas principalmente em virtude da forma rápida e simples com que se alteram ou adicionam componentes à montagem óptica.

Esta característica é muito importante para este trabalho em que diferentes configurações ópticas foram testadas, sendo necessário frequentemente adicionar ou retirar componentes do sistema, tais como lentes, filtros, fendas, etc.

3.3.1.2. Plataformas de posicionamento

Ao longo deste trabalho foram usadas três plataformas de posicionamento:

- Plataforma X-Y da *Linos* (*P/N - G06 5040 000*) que através de dois parafusos micrométricos (*Micrometer G* da *Linos*) permite mover um objecto nas duas direcções laterais. Tem um percurso máximo de 1 mm e resolução de 10 µm. Foi usado no sistema inicial para montar e alinhar o díodo laser mas a precisão conseguida não foi satisfatória. Isto porque apesar de ser um posicionador para o *Microbench*, foi desenvolvido para usar componentes com diâmetro de 25 mm.
- Plataforma linear da *Linos* (*T 10 PM*) que também com um parafuso micrométrico (igual aos anteriores) permite mover um objecto na direcção axial. É também um posicionador para o *Microbench* e foi usado para efectuar os movimentos do espelho plano, no sistema inicial, nas primeiras medições da resolução axial do sistema.
- Plataforma XYZ da *Melles Griot* (*17 AMB 003*) que oferece uma excelente combinação de características tais como tamanho compacto, percurso, resolução e baixo custo. Esta plataforma, que possui capacidade de flexão, praticamente elimina o atrito e *sticktion*¹ e fornece uma translação muito suave e precisa. Pode

¹ Será definido no ponto 3.5.1.

ser montada directamente na mesa ou placa óptica. O posicionamento nos três eixos pode ser feito manualmente através de parafusos micrométricos. No entanto permite a montagem de posicionadores para realizar o posicionamento automático, tal como foi feito neste trabalho.

3.3.2. Fonte de luz

A fonte de luz é um dos componentes mais importantes em qualquer microscópio óptico. Nomeadamente o facto de ser luz coerente ou incoerente vai ter um papel determinante para as características da formação de imagem. No caso do modo de campo claro, quer em reflexão quer em transmissão, a coerência na luz de iluminação é que determina que é também coerente a luz que atinge o detector, em oposição com o modo de fluorescência, em que é a luz emitida pelo objecto que é detectada. Uma consequência altamente indesejável é a ocorrência do fenómeno designado por granitudo laser¹, que vai degradar a imagem [1]. Consiste na sobreposição de ondas provenientes de pontos diferentes do objecto que, devido à elevada coerência da luz, vão resultar frequentemente numa forte interferência construtiva. Surgem então pontos brilhantes (grãos) na imagem que degradam a sua qualidade.

Este fenómeno tornou-se importante neste trabalho, visto que, por uma questão de facilidade no manuseamento das amostras, se optou por testar a técnica através da obtenção de imagens no modo de campo claro, em reflexão. Assim, só na primeira fase do trabalho foi testada uma fonte de luz laser, posteriormente substituída por uma fonte de luz branca.

3.3.2.1. Laser

Atendendo a que em microscopia confocal se usa normalmente luz laser, foi este o tipo de fonte utilizada nos primeiros testes. Tratava-se de um díodo laser com 4,9 mW com um comprimento de onda de 635 nm. Como a *Linos* não possuía uma fonte laser adequada ao sistema *Microbench*, o alinhamento da fonte de luz laser era uma tarefa muito morosa, não sendo possível assegurar a precisão desejada. Realizaram-se assim os testes iniciais para avaliar a capacidade de discriminação axial deste sistema com o detector linear. Usou-se o método globalmente aceite em microscopia confocal, que consiste em usar como objecto um espelho plano, e deslocar a plataforma do objecto ao longo da direcção do eixo óptico, isto é, aproximar ou afastar o objecto da lente objectiva. Da análise da

¹ *Speckle*.

distribuição da luz recolhida no sensor linear, verificou-se que, mesmo sem a utilização de filtros espaciais do tipo abertura circular (*pinhole*), o fenómeno de granitado laser tinha um impacto muito forte, conforme é ilustrado na figura 3.6 (a).

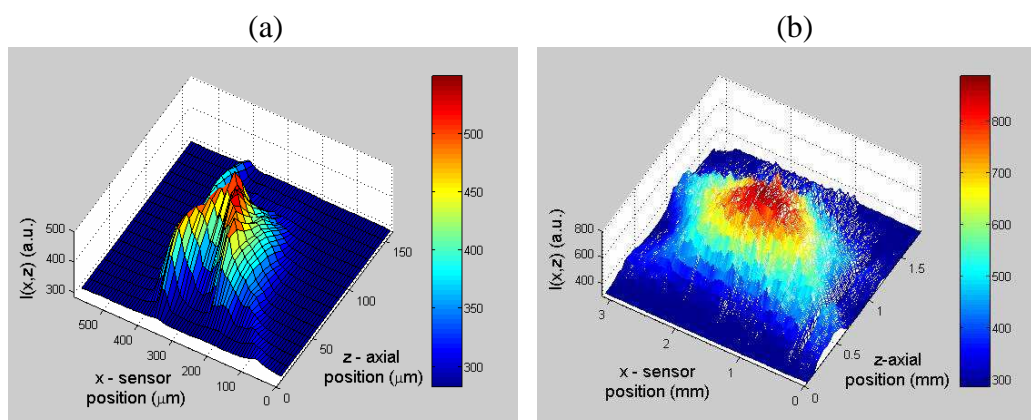


Figura 3.6. Exemplo da distribuição da luz no sensor. (a) luz laser com fenda de iluminação; (b) luz laser com LSD.

3.3.2.2. Luz branca

Perante o efeito de granitado laser que se verificou com a luz laser e tendo em conta que, no modo de campo claro, a questão da intensidade da fonte não é tão importante quanto no modo de fluorescência, optou-se por usar uma lâmpada de halogéneo. Esta solução, que permite cumprir com os requisitos, tem as vantagens do seu baixo custo, elevada diversidade de características e facilidade de manuseamento.

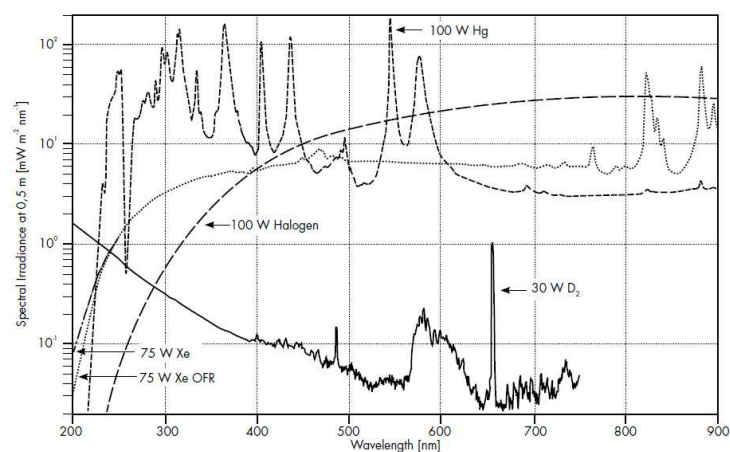


Figura 3.7. Espectro das lâmpadas de halogénio e de arco de mercúrio e de xénon (reproduzido do www-lot-orient.com - LOT-Oriel Group Europe).

O espectro de uma lâmpada de halogénio é contínuo, com variação lenta da radiância, ao contrário das de arco (mais no caso da de mercúrio do que na de xénon), que contêm inúmeras riscas, conforme se pode observar na figura 3.7. O seu menor custo e a sua

maior estabilidade fazem com que a lâmpada de halogénio seja a fonte normalmente usada neste tipo de sistemas, conforme descrito na literatura [2].

Na prática, independentemente da fonte de luz, existe a necessidade de regular a intensidade da iluminação, para que possa abranger um maior número de aplicações. Com diferentes tipos de amostras, ou com diferentes configurações do microscópio, as exigências de intensidade de iluminação são muito díspares.

Usou-se então uma lâmpada de halogéneo comercial de 12V e 50W (*OSRAMHL Xenophot*), fornecida pela *Linos* para ser usada num suporte (*P/N - 065006*) do sistema *Microbench*. A sua intensidade é regulada através de um circuito simples em que se usa um transformador de halogéneo comercial (*LASSO 70K*), sendo o ajuste da intensidade realizado manualmente através de um potenciómetro, usando um botão rotativo com uma sensibilidade adequada.

A opção por este circuito de regulação foi tomada após a verificação de que o transformador para halogéneo controlado electronicamente (*P/N - 125086*), fornecido pela *Linos*, tinha um limite inferior demasiado elevado, não se evitando a saturação do sensor. Para se ultrapassar esta dificuldade poder-se-iam interpor filtros de polarização, o que obrigava a aumentar o número de componentes ópticos.

Optou-se então pelo referido dispositivo menos robusto, mas com o qual se obtém uma precisão adequada, sem alterar o circuito óptico. Tem como aspecto fundamental o facto de permitir variar a intensidade desde o zero até ao valor máximo, de forma a ter a intensidade luminosa no detector dentro da sua gama dinâmica. Acresce que a escolha desta lâmpada permite, também, usar uma intensidade mais elevada em alguns testes visuais, a olho nu, bastante úteis para o alinhamento e posicionamento de componentes no sistema.

3.3.3. Componentes ópticos

Usam-se componentes ópticos de baixo custo, na sua grande maioria da *Linos* para o sistema *Microbench*. As lentes objectivas foram adquiridas à *Edmund Scientific*, pela sua boa relação custo / qualidade e pela sua facilidade de integração no *Microbench*.

3.3.3.1. Lentes

No microscópio convencional a iluminação, proveniente da fonte de luz, incide numa lente designada por colectora, que vai formar uma imagem do filamento da lâmpada no plano focal anterior da lente condensadora. Esta condição tem que ser obedecida para se

obter a iluminação de Kohler¹, que resulta num campo de iluminação uniforme na amostra. Esta é a configuração de iluminação de campo amplo (*wide-field*).

No microscópio confocal a iluminação é pontual, obtida pela passagem do feixe laser por uma abertura circular de iluminação, podendo existir uma lente de varrimento (*scan lens*) no caso do modo de varrimento de feixe. Poderá ser necessário introduzir também as lentes de *relay*², que permitem reproduzir o feixe de iluminação noutra posição do circuito óptico e a lente de tubo³ (*tube lens*) que permite adequar o feixe de iluminação / detecção às características da lente objectiva⁴.

Como o microscópio tem uma configuração epi-iluminada, a mesma lente tem em simultâneo o papel de lente condensadora, para focar a luz na amostra, e de lente objectiva, para formar, no detector, a imagem da luz reflectida na amostra. Assim, nos diferentes esquemas ópticos usaram-se normalmente apenas duas lentes: a colectora e a condensadora / objectiva. Em alguns testes em que se usou a fonte de luz laser, foi também incluída uma lente anamórfica no braço de iluminação.

3.3.3.1.1. Lente Colectora

No caso da fonte de luz laser, a lente colocada no braço de iluminação permitia expandir o feixe que incide na lente objectiva, ou criar as condições de iluminação adequadas para a lente anamórfica, nos casos em que esta foi usada.

Esta lente colectora foi escolhida de entre um conjunto de lentes biconvexas, adquiridas à *Linos*, de diferentes distâncias focais. Na montagem com a fonte de luz branca, nas suas diversas configurações, foi usada uma lente com distância focal $f = 70 \text{ mm}$.

3.3.3.1.2. Lente Anamórfica

Uma das soluções que foi testada para se obter iluminação em linha com a fonte de luz laser, foi uma lente anamórfica da *Thorlabs* (*LG-P4 Single Element Line Generator*) [3]. É uma lente de alta eficiência que produz uma linha de elevado brilho. Foi projectada para ser usada com díodos laser de comprimento de onda igual a 650 nm e com uma divergência de 28° FWHM.

¹ Uma descrição mais detalhada pode ser encontrada por exemplo em [3].

² Fazem a transferência do plano onde se forma a imagem para outro mais apropriado.

³ *Tube lens*, em que se considera normalmente para o tubo um comprimento de 160 mm

⁴ Se a objectiva for do tipo de correcção para o infinito (*infinity-corrected*) o feixe que a ilumina e o que é enviado para o braço de detecção, são feixes paralelos, devendo então ser colocada uma lente de tubo antes da lente objectiva.

3.3.3.1.3. Lente Condensadora / Objectiva

A qualidade da imagem, nomeadamente a sua resolução espacial, depende directamente da abertura numérica da objectiva. Por esta razão a lente objectiva pode ser considerada o componente mais importante num microscópio. Existem objectivas fabricadas para modos específicos, p.ex. campo escuro (*darkfield*), ou para serem usadas com um determinado meio de separação entre a objectiva e a amostra (ar, água, óleo¹, etc), portanto apropriadas ao índice de refacção desse meio. Existindo aplicações com exigências de resolução muito diferentes, como as para fins puramente didácticos e as para investigação na área da biologia ou medicina, ou para fins industriais, as objectivas são constituídas por conjuntos de elementos muito variáveis, com conseqüente correcção das aberrações também muito díspar, resultando assim numa gama de preços muito larga. Como não se pretende construir um produto final, em que o seu desempenho tenha que ser competitivo com os produtos comerciais, entendeu-se ser adequado usar uma lente objectiva (funciona também como lente condensadora) de custo razoavelmente baixo. Naturalmente esta opção impõe condicionalismos importantes no que se refere aos resultados que se poderão obter. Na sua análise será necessário ter em consideração as características da objectiva usada.

Dado que o método vai ser testado em microscopia no modo de campo claro, em reflexão, e não em fluorescência, tendo-se como amostras diferentes materiais tais como semicondutores, componentes micromaquinados, etc, a objectiva deverá ser adequada ao meio ar. Escolheram-se então duas objectivas de baixo custo, uma do tipo *DIN Achromatic* e outra *DIN Micro-Plan*, ambas da *Edmund Optics*, cujas características principais são apresentadas na tabela 3.2.

	DIN Achromatic	DIN Micro-Plan
Abertura Numérica	0,4	0,65
Ampliação	20X	40X
Distância focal (mm)	8,55	4,39
Campo de Visão (mm) (*)	0,90	0,45
Distância de trabalho (mm)	3,30	0,60

Tabela 3.2. Comparação das características das duas objectivas. (*) os valores do campo de visão referem-se ao caso em que o diâmetro da ocular é de 18 mm.

¹ As objectivas são designadas de acordo com o meio como sem imersão (*dry*), imersão em água (*water immersion*) ou imersão em óleo (*oil immersion*).

3.3.3.2. Filtros

Nas diferentes fases deste trabalho foram usados filtros de polarização e/ou de interferência. A sua utilização teve como objectivo a redução da intensidade do feixe e/ou a minimização de aberrações cromáticas.

Com os filtros de polarização usados (da *Linos*) consegue-se luz linearmente polarizada com uma atenuação, no caso de luz branca não polarizada, igual a 32%. A utilização de dois filtros cruzados permite atenuar quase completamente a luz. Ajustando a orientação relativa dos dois filtros pode-se controlar a intensidade da luz.

Na configuração óptica final usou-se um filtro de interferência passa-banda (*Linos DT-Green*) centrado nos 550 nm e com uma largura de aproximadamente 50 nm, cujo espectro se mostra na figura 3.8.

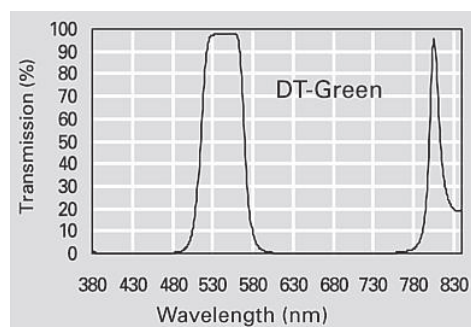


Figura 3.8. Espectro de transmissão do filtro DT-Green (reproduzido do catálogo da *Linos*).

Este filtro não foi escolhido tendo em vista a atenuação do feixe mas devido à necessidade de reduzir as aberrações cromáticas, dado ser utilizada uma fonte de luz branca.

3.3.3.3. Diafragmas/Iris

Com a finalidade de reduzir as aberrações esféricas, que são mais sentidas junto aos bordos das lentes, usaram-se dois diafragmas do tipo iris (*Linos - P/N 061651*), cuja abertura, ajustável manualmente, varia entre 1 mm e 8,5 mm. Consegue-se assim controlar o desvio angular do raio marginal.

A sua colocação está ilustrada na figura 3.9, sendo que a íris 1 (I_1) se encontra antes do divisor de feixe (BS^1) e a íris 2 (I_2) antes da lente condensadora/objectiva.

Refira-se que, ao fechar a íris, vai criar-se o efeito perverso de se obter uma abertura numérica efectiva menor com a consequente redução da resolução espacial [4].

¹ *BeamSplitter* (divisor de feixe).

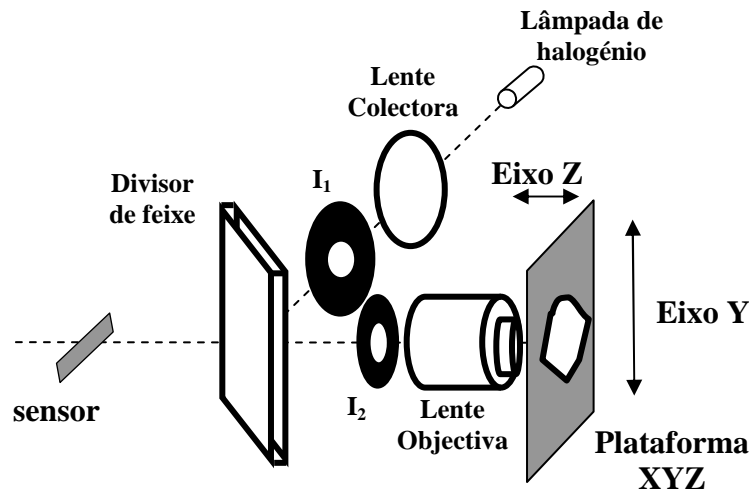


Figura 3.9. Esquema de montagem com diafragmas/iris ajustáveis.

No entanto existe um efeito positivo, que se deve à redução da luz reflectida ou dispersa na periferia da lente condensadora, no caso de I_2 , ou proveniente de qualquer componente óptico ou mecânico do braço de iluminação, no caso de I_1 . Existe ainda uma vantagem prática, pois com a colocação de I_2 é possível visualizar a imagem do filamento no plano focal anterior da lente condensadora, fechando I_2 , e assim proceder ao posicionamento da lente colectora.

Das observações conclui-se que a melhor imagem se obtém não com a íris totalmente aberta, como seria de esperar pela proporcionalidade entre a resolução espacial e a abertura numérica, mas fechando-se aproximadamente 25%, pois obtém-se melhor contraste na imagem. A razão poderá estar na coerência da luz assim conseguida, pois usa-se uma menor porção da fonte de luz para iluminação, logo as relações de fase entre os raios difractados que atingem o sensor é melhor definida e, assim, a interferência no plano imagem resulta em maiores diferenças de amplitude [4].

3.3.3.4. Divisor de feixe

O divisor de feixe (*Linos P/N - 344143*) com transmissão igual à reflexão (50/50) e baixas perdas por absorção, tem forma rectangular com 2,5 mm de espessura e com uma planridade igual a $\lambda/2$.

A luz reflectida no objecto é então focada pela lente objectiva, colocando-se o detector (tipo fenda) no plano imagem. No percurso até ao detector os raios atravessam o divisor de feixe, colocado a 45° relativamente à sua direcção de propagação, sofrendo então um pequeno desvio, mas o feixe prossegue, com a mesma convergência, para o plano focal. Em termos de imagem nada se altera, apenas fica centrada num eixo óptico que após o

divisor de feixe é paralelo ao anterior, com uma pequena translação de $0,84 \text{ mm}^1$. Como o campo de visão do detector nessa direção é muito largo ($1024 \text{ pixels} \times 7,8 \mu\text{m}$), normalmente não será usado na totalidade, pelo que este deslocamento lateral do eixo óptico, após a passagem no divisor de feixe, não causa qualquer constrangimento nos limites da imagem.

3.3.3.5. LSD

A existência de pontos de luz (grãos) e a distribuição de luz não homogênea são problemas comuns em praticamente todas as fontes de luz. Os LSDs tornam os feixes de luz mais suaves e homogêneos sendo assim uma opção a considerar nos casos em que é necessária iluminação uniforme. São produzidas distribuições de luz com uma forma específica em que o ângulo do cone de saída pode ser simétrico (circular) ou não-simétrico (elíptico). A distribuição de luz produzida é quase plana verificando-se que os de maior ângulo são aqueles em que a homogeneidade da luz é melhor.

Nas montagens com a fonte laser foram testados LSDs de saída simétrica (5° de ângulo de cone de saída) e não simétrica ($0,2^\circ \times 40^\circ$).

3.3.3.6. Fendas

Para a configuração com iluminação em linha, uma das opções foi colocar uma fenda no braço de iluminação. No sistema inicial usou-se uma fenda ajustável da *Melles Griot* (07SLT001) que permite variar a largura da fenda de 0 a 4 mm, através de um parafuso micrométrico com uma resolução de $2 \mu\text{m}$. Devido a dificuldades no posicionamento desta fenda ajustável no sistema *MicroBench*, posteriormente usaram-se duas fendas da *Linos*, com larguras de $200 \mu\text{m}$ e 1 mm.

3.3.4. Sensor

Há cerca de uma década a *Photon-Vision Systems* (PVS) lançou no mercado uma família de sensores lineares, LIS, que consistem numa matriz de pixels de fotódodos de baixa corrente no escuro, com um desempenho melhor do que a maioria dos CCDs.

O sensor LIS-1024 usa a arquitectura APS em que existe um amplificador por pixel que converte a carga gerada pelo fóton em tensão. Optou-se por usar este sensor, com um funcionamento extremamente simplificado pela sua lógica interna, que resulta na

¹ Valor obtido através da lei de Snell, considerando o índice de refração do vidro do divisor de feixe (N-BK7) igual a 1,5168.

necessidade de apenas um sinal externo de relógio para selecionar a taxa de leitura dos pixels e três sinais de controlo do modo de leitura. As principais características do LIS-1024 são:

- Múltiplos modos de leitura;
- Ruído muito baixo ($\cong 1$ e- por via de cálculo da média do sinal);
- Relação sinal / ruído elevada (SNR > 84 dB);
- Capacidade de realizar leituras não destrutivas;
- Frequência de leitura de 1,0 kHz a 20,0 MHz;
- Corrente no escuro muito baixa;
- Funções de temporização e controlo completamente integradas;
- Substitui sistemas CCD e não apenas o sensor.

Para a leitura do sensor pode ser seleccionado um dos seguintes quatro modos:

- Modo *Dynamic Pixel Reset*TM (DPR): cada pixel é reinicializado após a leitura, isto é, são reinicializados à medida que são lidos sequencialmente. São assim assegurados tempos de integração idênticos para cada pixel;
- Modo *Dynamic Pixel Reset*TM (DPR) não destrutivo: Semelhante ao anterior com a diferença que a reinicialização interna dos pixels é desactivada permitindo assim a integração contínua até que seja activada a reinicialização externamente;
- Modo *Frame*¹ com leitura destrutiva: Todos os pixels são reinicializados internamente ou activando o sinal externo de reinicialização, no fim do *frame*. Consequentemente o tempo de integração de cada pixel depende da sua posição na matriz;
- Modo *Frame* com leitura não destrutiva: Semelhante ao anterior com a diferença que a reinicialização interna dos pixels é desactivada permitindo assim que a imagem seja preservada e lida nos *frames* seguintes, até que seja activada a reinicialização externamente.

Os modos de leitura não destrutiva possibilitam que sejam realizadas medidas de muito baixo ruído através do cálculo da média do sinal, com um desempenho próximo de um electrão único de ruído [5]². Contudo, tempos de integração longos resultam na integração das correntes no escuro de cada pixel, que podem ser reduzidas arrefecendo o sensor.

¹ Por não se encontrar tradução considerada adequada usa-se *frame*.

² As especificações do sensor encontram-se no apêndice 3.1.

3.4. Módulo de leitura do sensor

Este módulo procura facilitar a integração do sensor linear *LIS-1024* na montagem da bancada óptica. Foi então desenvolvido um módulo de hardware autónomo baseado num microcontrolador da família PIC da *Microchip*, o *PIC16F876*, que comunica com o PC pelo porto série (RS232). A opção por esta família resultou do conhecimento e experiência adquirida em projectos anteriores, assim como da existência das ferramentas avançadas de desenvolvimento de software, que asseguram uma maior facilidade nessa tarefa, nomeadamente no que respeita ao software de gestão dos seus periféricos.

3.4.1. Arquitectura do módulo

O microcontrolador *PIC16F876* foi seleccionado de entre um conjunto de dispositivos similares, atendendo ao facto de cumprir integralmente as especificações pretendidas, dado que possui:

- ADC de 10-bits com o máximo de 5 entradas multiplexadas;
- Três *timers*;
- Porto de comunicação série RS232.

Tem também uma grande flexibilidade na sua configuração, que lhe é conferida pela sua estrutura de interrupções (com 13 fontes de interrupção). A memória de programa *flash* de 8 K (palavras de 14 bits) é perfeitamente adequada, mesmo para programas mais avançados, tirando partido do compilador C altamente eficiente.

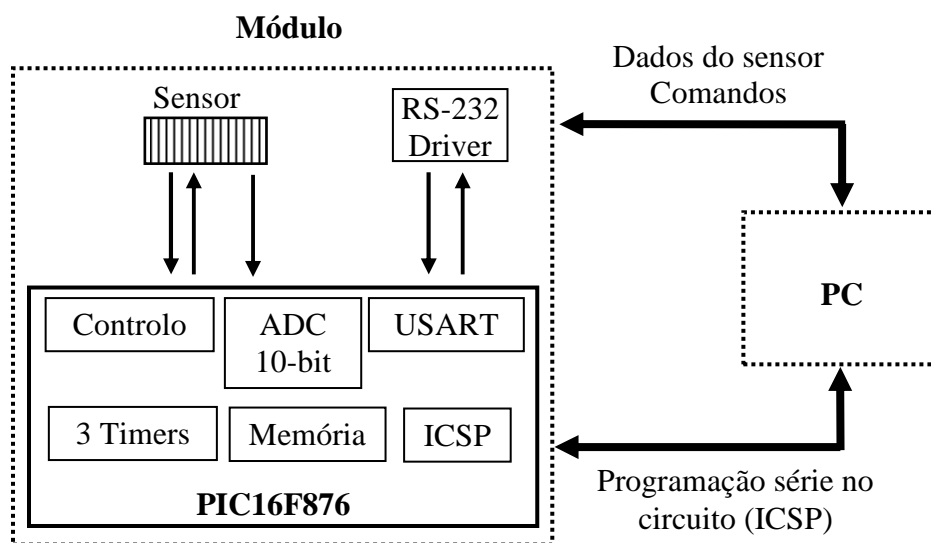


Figura 3.10. Diagrama de blocos do módulo.

Foi considerada a alternativa do microcontrolador *PIC16C745*, que tinha a vantagem de possuir um porto de comunicação série USB mas foi preterido por possuir um ADC de 8-bits.

Na figura 3.10 apresenta-se o diagrama de blocos do módulo. Além do microcontrolador e do sensor, o módulo contém um *driver* para a comunicação RS-232 (*MAX242-Maxim*), que recebe/transmite os sinais de/para o porto RS232 do PIC, formatando-os segundo esta norma, para se processar a comunicação com o PC.

Conforme descrito no diagrama de blocos, o microcontrolador tem outra funcionalidade importante, designada por ICSP (*In-Circuit Serial Programming*), que consiste na possibilidade de se fazer a sua programação no circuito, a partir do PC, através do seu porto série. Na figura 3.11 são apresentadas fotos das duas faces do módulo.

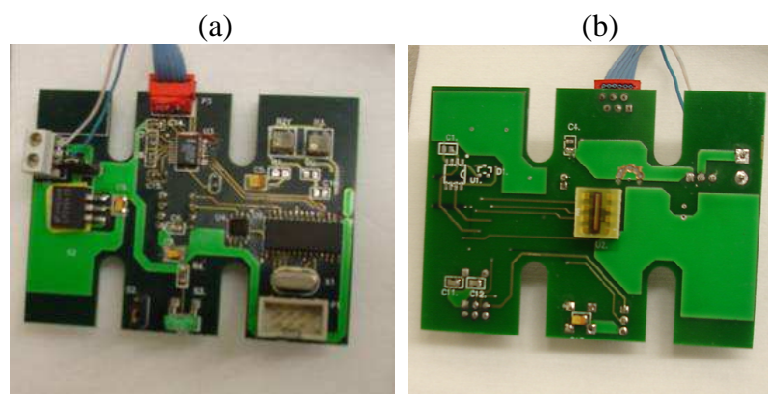


Figura 3.11. Fotos do módulo: (a) face dos componentes; (b) face do sensor.

3.4.2. Leitura de dados do sensor

As três linhas de controlo do sensor, para configuração dos modos de *reset* e de leitura, são disponibilizadas directamente por portos I/O do PIC. Desta forma, este módulo tem a importante capacidade de permitir uma fácil e rápida configuração do modo de operação do sensor, tirando partido da flexibilidade inerente à sua tecnologia CMOS e também da capacidade do PIC para efectuar a sua programação em série no próprio circuito. Esta característica é muito útil pois o modo mais apropriado de funcionamento do sensor depende da aplicação em vista.

No decurso deste trabalho optou-se por usar o sensor no modo de leitura DPR destrutivo, efectuando-se o *reset* de cada pixel à medida que são concluídas as suas leituras, assegurando-se assim a integração por um intervalo de tempo igual, em todos os pixels. A leitura do conjunto seguinte de 1024 pixels, por questões de sincronismo, é iniciada pelo sinal *SYN*, de saída do sensor, que é recebido noutra porto I/O do PIC.

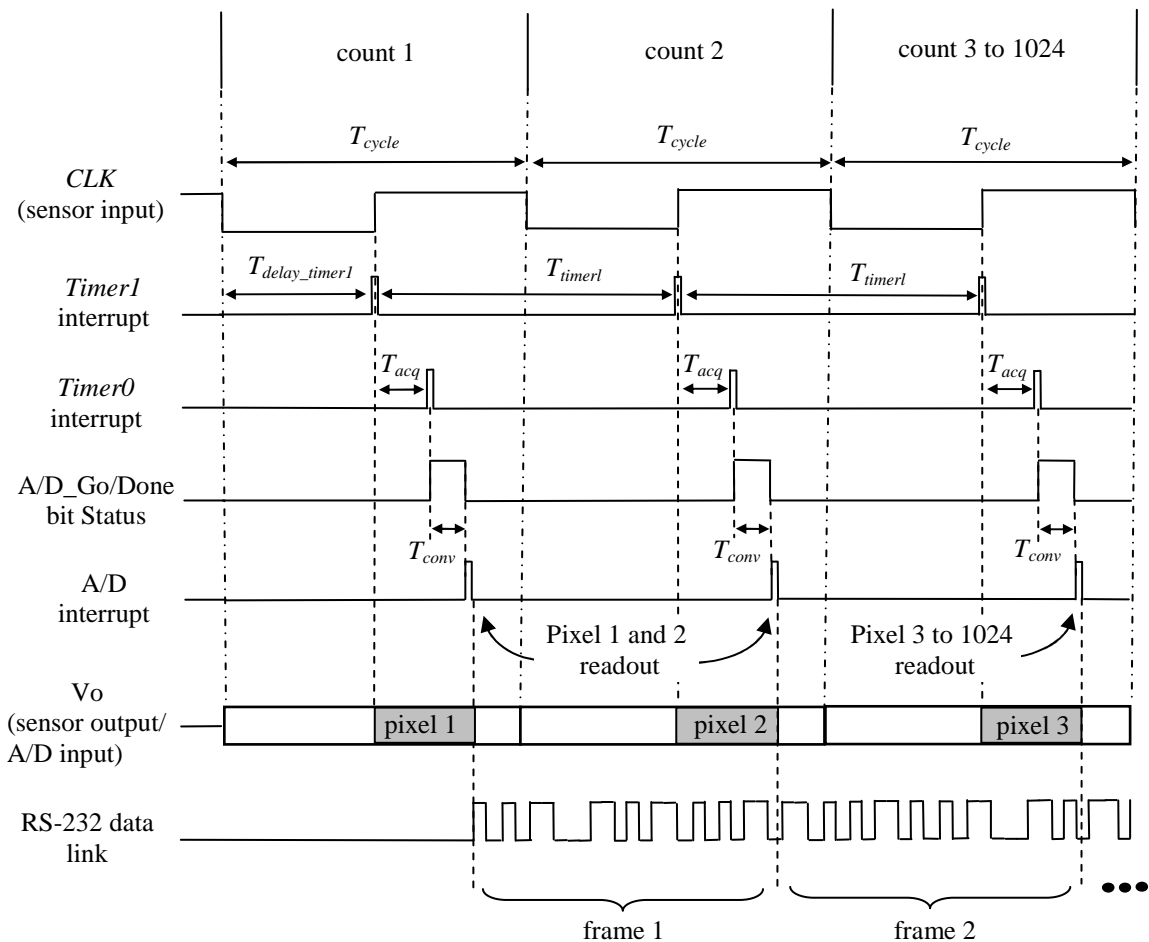


Figura 3.12. Diagrama das temporizações do ciclo de aquisição de dados do sensor (os tempos não se encontram à escala).

A temporização da leitura do sensor é controlada através dos três *timers* do PIC. A figura 3.12 mostra o diagrama de temporização do ciclo de aquisição.

Também o sinal de entrada, relógio do sensor (CLK), é proveniente de um porto I/O do PIC. Para estabelecer a taxa de leitura dos pixels, isto é, criar o sinal de relógio interno do sensor (CLK) usa-se o *timer* do PIC (*Timer2*), no qual é possível programar o modo PWM, implementando-se assim este modo com um *duty-cycle* de 50%, de acordo com as especificações do sinal de relógio do sensor.

Também nas especificações é recomendado que a amostragem do valor de cada pixel seja feita na segunda metade (55 a 95%) do respectivo tempo de leitura. Esta temporização é efectuada programando-se o *Timer1* para a leitura do primeiro pixel, com um valor um pouco superior a metade do período do relógio do sensor (T_{delay_timer1}), e nos pixels seguintes com o período do relógio do sensor (*Timer1*).

Na rotina de resposta à sua interrupção, é carregado um tempo de aquisição (T_{acq}) de 30 μs no *timer* restante (*Timer0*), para que sejam cumpridas as especificações de precisão

do conversor ADC. Na respectiva rotina de interrupção é activado o *A/D_GO/DONE_bit* para dar início à conversão. Assim que se completar o tempo definido de 20 μ s para a conversão do ADC (T_{conv}), é activado o sinalizador do ADC, indicando que o resultado está disponível. A leitura dos registos de dados do ADC é feita na sua rotina de interrupção. O ciclo de aquisição é então baseado na capacidade de gestão de interrupções do PIC.

3.4.3. Comunicação com o PC

O interface RS-232 é usado entre o módulo autónomo e o PC. Como no módulo não existe memória externa (ao PIC), o valor de 10 bits, que resulta da conversão do valor analógico de cada um dos 1024 pixels feita pelo ADC, é enviado para o PC antes do fim da *timeslot* (intervalo de tempo entre conversões consecutivas do ADC). A figura 3.12 também mostra a temporização da comunicação de dados RS-232 com o PC.

O valor de 10 bits lido de cada pixel é empacotado previamente num *frame* de três palavras de 8 bits (*bytes*), que é apresentado na figura 3.13. Então a *timeslot* deve acomodar tempo suficiente para que a USART¹ complete o envio do frame.

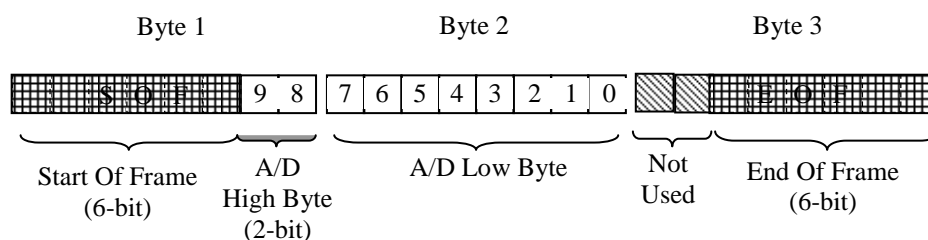


Figura 3.13. Formato do *frame* da comunicação RS-232.

Optou-se por usar na comunicação RS-232 uma *baud rate* de 19200 bps por forma a assegurar uma comunicação de dados correcta com o PC, apesar de os testes mostrarem que com a *baud* máxima (57600 bps) a comunicação decorria praticamente sem erros. Nestas condições a taxa de leitura dos pixels do sensor fica ligeiramente acima de 1 kHz, que corresponde a uma duração da *timeslot* (T_{cycle}) de aproximadamente 900 μ s, resultando na aquisição de 1 *frame* de 1024 pixels por segundo. Nos casos em que não é necessário adquirir a totalidade dos pixels, dada a facilidade na programação do PIC, poder-se-á alterar rapidamente a configuração da leitura do sensor. É o que acontece nos casos em que se definem regiões de interesse (ROI). Para a objectiva 40X, a imagem

¹ *Universal Asynchronous Synchronous Receiver Transmitter*

recolhida nos 1024 pixels do sensor corresponde a $200 \mu m$ na amostra, o que em muitos casos é uma extensão excessiva. Pode então definir-se uma ROI, que consequentemente aumenta a taxa de aquisição em *frames/s*. Para ROIs de 256 e 128 pixels essa taxa de aquisição aumenta por um factor de 4 ou 8, respectivamente.

No apêndice 3.2 apresenta-se o esquema eléctrico do módulo.

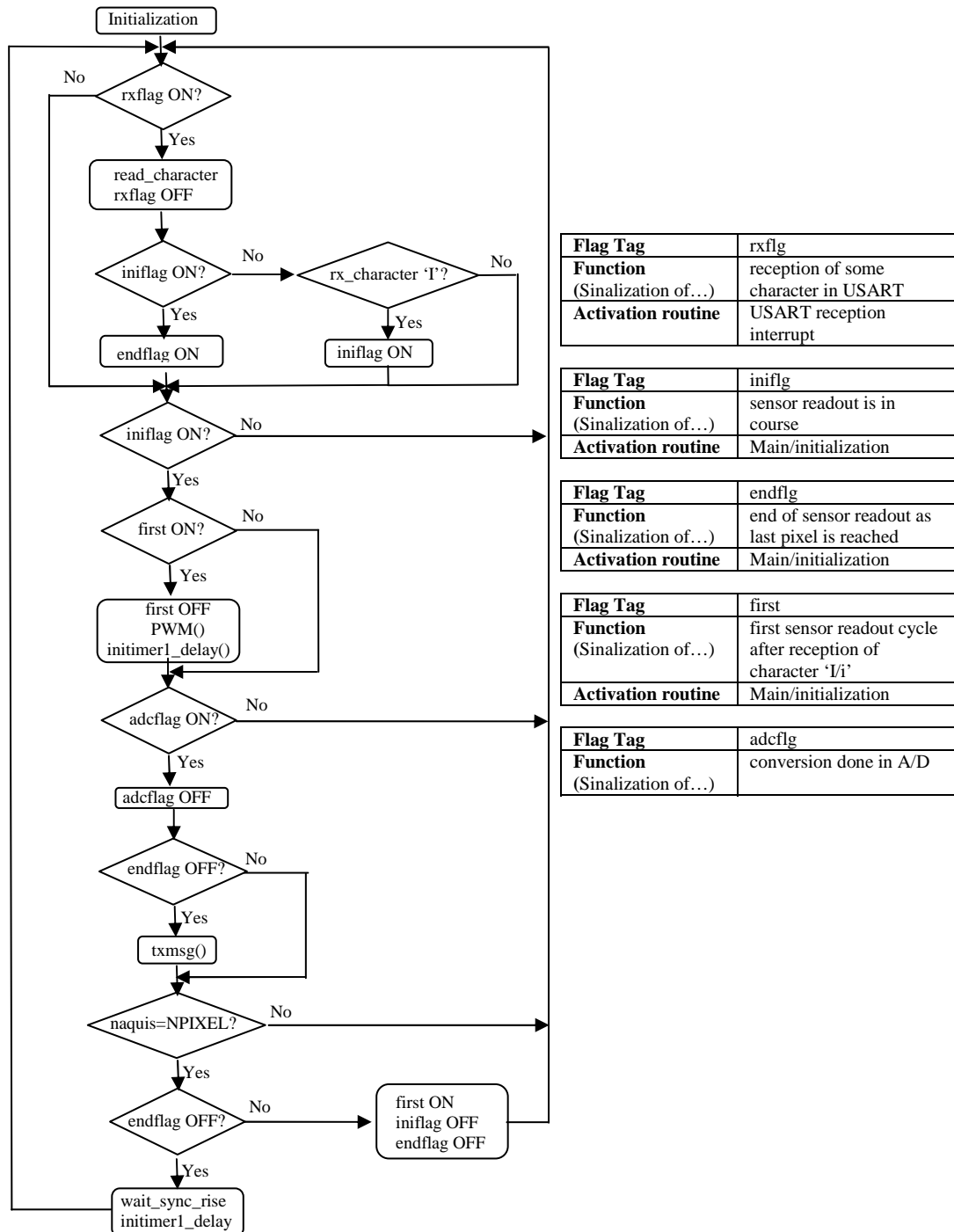


Figura 3.14. Diagrama de fluxo do algoritmo de aquisição de dados e a tabela com os descritivos dos sinalizadores (*flags*) usados.

3.4.4. Software do PIC

O software do PIC foi desenvolvido com o MPLAB, ferramenta de desenvolvimento de software da *Microchip*. O módulo é conectado através de um interface específico ao módulo MPLAB-ICD¹, comunicando este com o PC pelo porto série. Existe um *jumper* na placa que permite configurar a placa seleccionando o modo de depuração de erros (*debug*) ou de execução, na fase de desenvolvimento (em que está conectada ao referido módulo) ou para a aquisição de dados do sensor (sem estar conectada ao módulo), respectivamente.

O programa consiste num ciclo infinito em que se usam as capacidades de interrupção do PIC para activar sinalizadores e consequentemente seleccionar as rotinas que serão executadas. A leitura do sensor inicia-se com uma ordem recebida do PC (do utilizador) e só terminará por vontade expressa do utilizador. Na figura 3.14 representa-se o diagrama de fluxo do algoritmo de aquisição de dados realizado neste ciclo infinito. Apresenta-se também uma tabela com os descritivos dos diversos sinalizadores (*flags*) usados.

Devido à limitação na velocidade de comunicação série com o PC, a taxa de aquisição de dados é baixa. Assim, sendo o tempo de aquisição total de cada pixel de aproximadamente 900 μ s, aproveita-se o tempo de conversão do ADC para carregar o valor do pixel anterior no *buffer* da USART, de modo a ser enviado para o PC.

A sincronização com a leitura realizada pelo sensor é feita no final de cada *frame*. Após a conclusão da leitura do último pixel, o programa espera pelo impulso SYN para dar início a novo processo de leitura.

3.5. Posicionador

Sendo necessário o sistema permitir efectuar varrimentos nos três eixos, de forma automática, procurou-se uma solução em que fosse possível usar a plataforma XYZ da *Melles Griot (17 AMB 003) (XYZ translation stage)*.

Algumas opções, nomeadamente a tecnologia APTTM da *Melles Griot*² e os PicomotorTM da *New Focus*, apesar de terem boas características em termos de resolução, repetibilidade³, etc, tinham como inconveniente a dificuldade de integração num sistema de aquisição e controlo a partir do PC.

¹ *In-Circuit Debugger*

² *Advanced Positioning Technology*

³ *Repeatability*

A *Zaber Technologies* tinha acabado de desenvolver os posicionadores *Zaber*TM da série T, em que o próprio posicionador contém um controlador e um *driver* do motor de passo. Contribuiu para a opção por estes posicionadores lineares T-LA28, o facto de poderem ser facilmente aplicados na referida plataforma XYZ da *Melles Griot*. No entanto, a principal razão é que os três controladores (um para cada eixo) podem ser controlados a partir do PC, pelo porto série RS-232, através de uma aplicação MATLAB (*Mathworks*), não sendo necessário qualquer equipamento adicional.

3.5.1. Características do posicionador

Estes posicionadores, controlados a partir do PC, da série T da *Zaber* realizam o controlo de posição através de motores de passo. Pode então ser construído um sistema sem realimentação reduzindo-se assim o seu custo. Como usam a técnica de micro-passos é possível rodar o motor por um ângulo menor que o do passo. Contudo, por ser incremental¹, o motor tem que ser colocado inicialmente na posição zero, que é reconhecida através de um sensor. Como não existe codificador, a posição real pode tornar-se diferente da posição indicada pelo PC.

O menor custo destes posicionadores é resultado de um projecto mecânico simplificado (sem acoplamento e outros componentes caros), usando-se um sistema de accionamento directo.

Na tabela 3.3 apresentam-se algumas características dos motores de passo, com 64 micro-passos por passo, usados nos posicionadores lineares da gama T-LA da *Zaber*.

Série do produto	Especificações do motor			Especificações do parafuso de avanço	
	nº passos por volta	nº micro-passos por volta	graus por micro-passo	passo em µm por volta	resolução em µm por micro-passo
T-LA	48	3072	0.1171875	304.8	0.09921875

Tabela 3.3. Propriedades do motor e do parafuso de avanço dos posicionadores da série T-LA.

Sendo a resolução definida como a distância equivalente ao menor movimento (incremento) que o posicionador pode executar, que neste caso será o deslocamento correspondente ao movimento de um micro-passo, este posicionador tem então uma resolução de exactamente 0,09921875 µm (~ 0,1 µm). Foi assim escolhido o posicionador T-LA28A, cujas características constam da tabela 3.4.

Abaixo apresentam-se algumas notas relativamente a estas características:

¹ Incremental significa que o posicionamento não é absoluto.

- Repetibilidade – valor máximo do desvio na posição pretendida ao tentar regressar a essa posição, após se ter movido para uma posição diferente;
- Exactidão - valor máximo do desvio relativamente à posição pretendida durante o percurso total do posicionador. Existe o efeito de não linearidade e um erro cíclico com um período de uma rotação do motor, típico de sistemas com parafuso de avanço;
- Estabilidade – capacidade de se manter na mesma posição durante um período longo de tempo. Relacionado com efeitos térmicos;
- *Backlash* – distância na posição pretendida em resultado de se alterar o sentido da aproximação. O valor de 2 μm indica o erro adicional na posição quando se aproxima pelo sentido negativo. Possui rotinas de *anti-backlash* que são usadas para os movimentos no sentido negativo, que consistem em executar um movimento com um excesso de 600 micro-passos (*overshoot*) relativamente à posição pretendida, aproximando-se assim dessa posição no sentido positivo;
- *Sticktion* – devido ao atrito o posicionador pode não se mover quando se manda deslocar um micro-passo. Pode ocorrer vezes consecutivas até que dá um salto do acumulado de micro-passos. E o processo pode repetir-se sucessivamente. Possui rotinas de *anti-sticktion* que são executadas nos casos em que o deslocamento é menor do que 600 micro-passos. Nestes casos primeiro posiciona-se 600 micro-passos afastado da posição pretendida e só em seguida se aproxima dessa posição.

	Extensão	Repetibilidade	Exactidão	<i>Backlash</i>	Carga	Vel. Max
T-LA28	28mm	+/- 0,3 μm	+/- 8 μm	2 μm	50N	4mm/s

Tabela 3.4. Características do posicionador T-LA28.

3.5.2. Controlo do posicionador

O controlo dos três posicionadores montados na plataforma XYZ (um para cada um dos três eixos) é feito a partir do PC, com uma aplicação MATLAB, usando o interface RS-232. Todas as unidades estão conectadas no modo *daisy-chained*, portanto partilhando o mesmo porto série.

A comunicação entre o PC e os posicionadores é feita nos dois sentidos. A partir da aplicação MATLAB são enviadas, por um dos portos série do PC, as instruções no formato próprio, compostas por seis palavras de 8 bits (*bytes*): unidade (posicionador)

selecionada¹, comando e os correspondentes dados (4 bytes). É recebida uma resposta no mesmo formato (6 bytes), com a indicação que o comando foi completado, em alguns casos enviando a posição efectiva, ou com a indicação que ocorreu um erro.

A velocidade lenta de comunicação dos posicionadores com o PC, de 9600 *baud*, é uma das maiores desvantagens destes posicionadores. No entanto, para esta aplicação, a sua facilidade de integração e a versatilidade de programação compensam largamente esta desvantagem.

3.6. Software do PC

A configuração da aquisição e a visualização das imagens do microscópio é feita no PC. Com o sistema com o PAF e nos primeiros testes realizados com o módulo de leitura do sensor a ferramenta usada para o desenvolvimento do software do PC foi o compilador Borland C. Posteriormente, e com a necessidade de integrar diferentes tarefas como a aquisição de dados do sensor, controlo dos posicionadores da plataforma XYZ e visualização e processamento das imagens, optou-se por usar o MATLAB.

3.6.1. Aplicações MATLAB

Com a taxa de aquisição de aproximadamente 1 *frame/s* e dado que se usa um sensor do tipo matriz linear é necessário adquirir um conjunto de *frames*, o que demorará normalmente umas dezenas de segundos, para se construir a imagem 2D. Essa é uma das funcionalidades que a aplicação MATLAB, que foi desenvolvida para a aquisição de dados, possui para que o utilizador possa visualizar a imagem 2D imediatamente após ser adquirida. Esta é a aplicação CompleteGUI² que tem então as seguintes funcionalidades:

- Posicionamento da plataforma que compreende a definição da sequência de varrimento dos três eixos e dos limites da ROI nos três eixos e envio dos comandos para os posicionadores através de um porto série do PC.
- Leitura de dados do sensor através de outro porto série do PC, sendo dado início à aquisição através de um comando enviado para o módulo de leitura do sensor e recebidos os valores de cada pixel.
- Visualização de cada leitura do sensor em tempo real.

¹ As unidades são numeradas por ordem crescente a partir da mais próxima do PC. A numeração começa em um estado o zero reservado para o envio de um comando para ser executado por todas as unidades em simultâneo.

² GUI (*Graphical User Interface*) é a designação no MATLAB para os ambientes gráficos de interface com o utilizador.

- Criação de ficheiros de dados em formato Excel que são guardados no disco rígido do PC.

Foram desenvolvidas outras aplicações MATLAB para processamento de imagens, nomeadamente do alvo USAF e do circuito integrado (IC), e para a representação de perfis 3D. As suas funcionalidades principais estão indicadas na tabela 3.5.

Aplicação	Tarefas
IC_image	<ul style="list-style-type: none"> • Ajuste de contraste • Definição de ROIs • Definição do método e factor do <i>imresize</i> • Visualização de imagens 2D
USAF_image	<ul style="list-style-type: none"> • Definição de ROIs • Visualização da ROI • Gravação do ficheiro imagem (formato JPG) no disco rígido • Aquisição de parâmetros relativos a cada uma das três barras de um grupo (valores máximo e mínimo, pixel com valor máximo, largura em pixels)
Profilometry_SiFrame	<ul style="list-style-type: none"> • Definição de ROIs • Selecção do modo de visualização (2D ou 3D) • Selecção do algoritmo de reconstrução 3D • Representação do perfil 3D

Tabela 3.5. Funcionalidades das aplicações MATLAB para processamento de imagens e representação de perfis 3D.

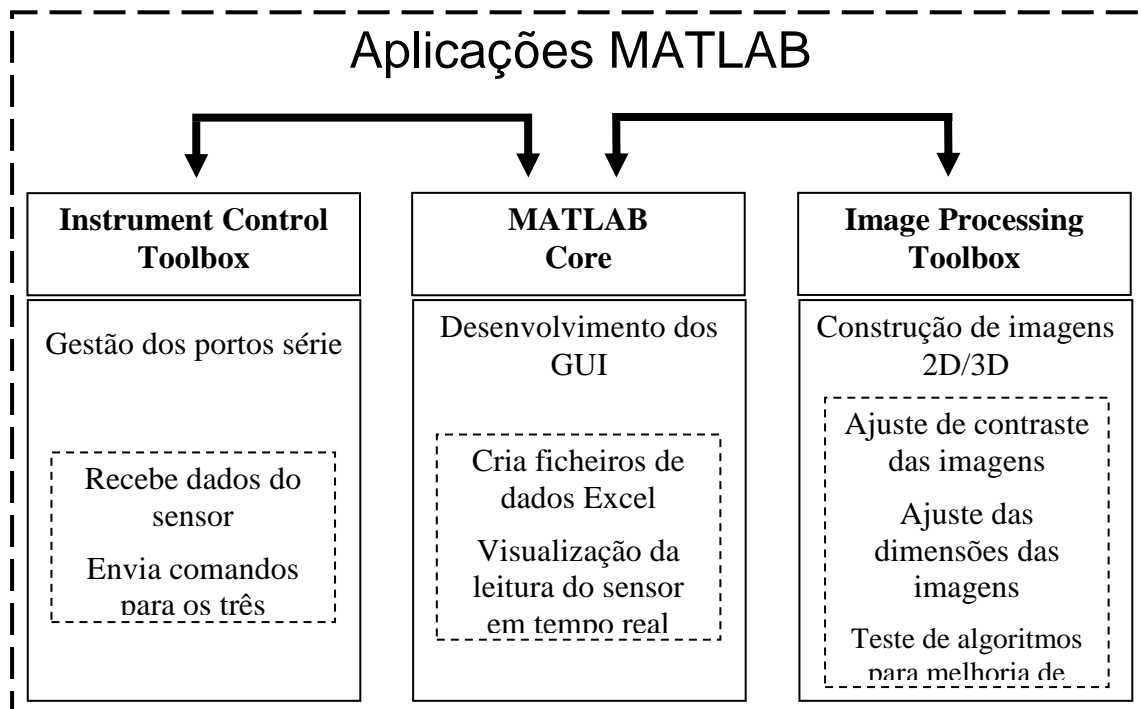


Figura 3.15. Esquema das funcionalidades das aplicações MATLAB.

Em resumo estas aplicações MATLAB usam funções do seu núcleo (*core*), nomeadamente explorando a sua facilidade de desenvolvimento das interfaces gráficas (GUIs), e das *toolboxes* para o controlo de instrumentos e para o processamento de imagem, conforme está esquematizado na figura 3.15.

Os GUI das quatro aplicações MATLAB são apresentados no apêndice 3.3.

Referências bibliográficas

- [1] Ferreira, M., “Óptica e fotônica”, Lidel – edições técnicas, lda (2003)
- [2] Neil, M.A.A. et al., “Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope”, Opt. Letters, 22 (24), pp. 1905-1907 (1997)
- [3] 5245-S01 rev. A, “LG-P4 Single Element Line Generator - Plastic”, Thorlabs, Inc. (2000)
- [4]. Murphy, D.B., “Fundamentals of light microscopy and electronic imaging”, Wiley-Liss (2001)
- [5] PDS0001 Rev. G, “LIS-1024 High Performance Linear CMOS Image Sensor”, Panavision SVI, LLC (2004)

Cap. 4. Avaliação da qualidade da imagem do microscópio

4.1. Introdução

Com o objectivo de avaliar o desempenho do microscópio de bancada foram determinados alguns parâmetros que permitem fazer a caracterização da qualidade da imagem produzida. Foi feita também a avaliação de algumas características da montagem óptica, tais como a estabilidade da iluminação e a repetibilidade e *backlash*¹ no posicionamento do objecto, que podem ter um efeito negativo no seu desempenho. Neste caso a avaliação é meramente qualitativa.

O desempenho do microscópio é determinado pela qualidade da imagem fornecida pelo sistema, que pode ser avaliada por dois métodos diferentes:

- Avaliação quantitativa através da MTF (medida do contraste) e da PSF (medida da resolução);
- Avaliação qualitativa através de imagens de objectos específicos de dimensões conhecidas [1].

Contudo, o poder de resolução de um sistema continua a ser o parâmetro que frequentemente prevalece sobre os restantes, apesar de não existir um consenso amplo sobre a sua definição e consequentemente de um método globalmente aceite para a sua medição [2]. O critério de Rayleigh, que tem associada a largura de banda da imagem, fornece limites de resolução que têm em conta apenas a forma da PSF, calculada a partir da abertura numérica da objectiva e do comprimento de onda da luz. Todavia a resolução de uma imagem é dependente de outras características do sistema, tendo-se concluído que é limitada por erros sistemáticos e aleatórios [3].

Neste capítulo são descritos os métodos de avaliação quantitativa usados, sendo apresentados valores determinados experimentalmente da razão de Strehl, resolução lateral e também da resposta axial, que é uma característica importante das técnicas de microscopia tridimensional (3D). No caso da resolução lateral, um dos métodos usados consistiu na determinação da PSF em que se usou um método original.

¹ Definido no capítulo 3.

4.2. Caracterização do microscópio

Exceptuando as montagens e testes iniciais em que se usou luz laser, neste trabalho foi usada uma fonte de luz branca. Usou-se então uma lâmpada de halogénio, tendo-se realizados testes para avaliar se a sua estabilidade era adequada às necessidades do sistema.

Por outro lado, sendo a imagem construída através de varrimentos conseguidos à custa de deslocamentos da plataforma do objecto, é necessário avaliar se a qualidade da imagem poderá ser degradada devido a erros de posicionamento.

4.2.1. Estabilidade da iluminação

Foi realizado o teste de estabilidade da lâmpada de halogénio com a montagem da figura 4.1.

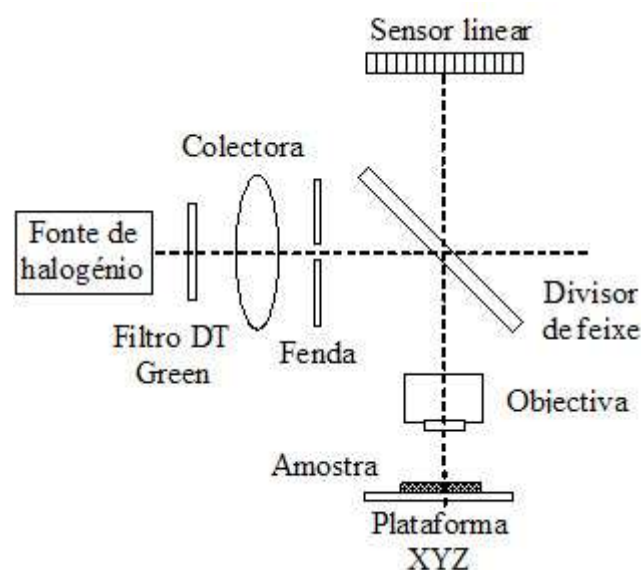


Figura 4.1. Esquema da montagem óptica que foi usada numa grande parte dos testes descritos neste capítulo.

Consistiu em adquirir a imagem de reflexão num espelho, que foi usado como objecto, efectuando apenas varrimentos na direcção lateral perpendicular ao sensor (designada daqui em diante por eixo-Y¹) numa extensão total de 100 μm com espaçamentos de 5 μm . Foram adquiridas duas imagens com intervalos de 5 minutos e outras duas imagens com intervalos de 30 minutos, com a fenda de 200 μm perpendicular e paralela ao sensor, respectivamente.

¹ Eixo-Y designa a direcção lateral na perpendicular à direcção do sensor, esta designada por eixo-X.

As imagens da figura 4.2. (a) referem-se ao caso da fenda perpendicular ao sensor, não se observando diferenças significativas entre as duas imagens, apenas uma pior definição dos limites, passados os 5 minutos. Com a fenda paralela, figura 4.2. (b), nota-se que 30 minutos depois, a margem superior é praticamente imperceptível.

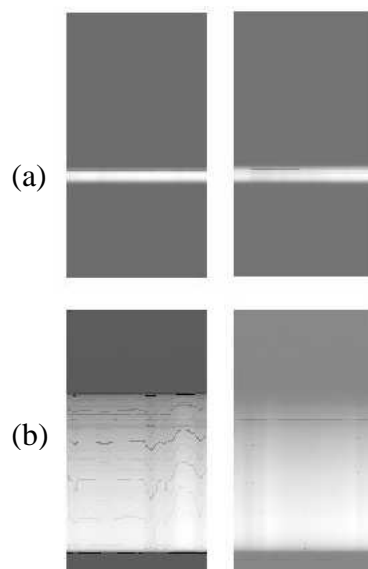


Figura 4.2. Imagens da luz reflectida num espelho plano com fenda de iluminação: (a) no eixo-Y; (b) no eixo-X. A imagem da direita foi obtida: (a) 5 min; (b) 30 min após a da esquerda.

4.2.2. Repetibilidade do posicionamento

Os posicionadores T-LA28 usam motores de passo cujas especificações foram apresentadas no capítulo 3. Para verificar que a fraca repetibilidade, bem como o *backlash*, não contribuirão para piorar a qualidade das imagens, foi realizado um teste que consistiu em fazer mover a plataforma com o espelho, para uma posição axial (z) previamente definida. Repetiu-se esta operação, perfazendo um total de três posicionamentos, em cada um dos sentidos do movimento, isto é, invertendo-se o sentido em que se se aproxima dessa posição.

Neste teste também se usou a montagem óptica da figura 4.1, com a fenda ao longo do eixo-Y. Na figura 4.3 representa-se o integral da intensidade recolhida nos 1024 pixels do sensor para cada posição axial, em função dessa posição. Os varrimentos na direcção axial (eixo-Z) foram descritos com intervalos de $2\ \mu\text{m}$ numa extensão de $50\ \mu\text{m}$. Os resultados obtidos resultam de varrimentos, em que a aproximação à posição axial inicial, previamente definida (considerada $Z = 0$), foi feita a partir das posições $Z = -1000\ \mu\text{m}$ e $Z = 400\ \mu\text{m}$.

Observa-se que só no primeiro posicionamento (em que a aproximação se fez a partir de $Z = -1000 \mu\text{m}$), o pico tem uma forma nitidamente diferente, com flutuações no flanco descendente, sendo todos os restantes semelhantes. Não foi portanto detectado qualquer deslocamento do pico no eixo-Z.

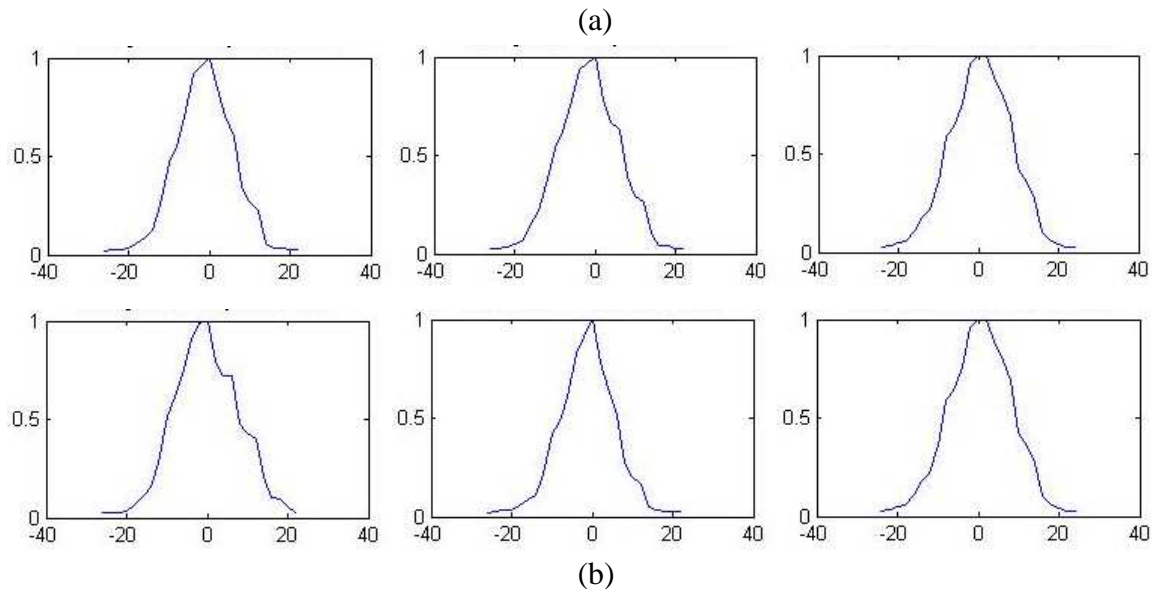


Figura 4.3. Gráficos do integral da intensidade recolhida nos 1024 pixels do sensor em função da posição axial do espelho. Aproximação por valores: (a) maiores; (b) menores da posição axial.

4.2.3. Conclusão

A avaliação qualitativa destes aspectos, importantes para a capacidade do microscópio obter imagens com a qualidade pretendida, não sendo totalmente elucidativa, fornece a indicação de que a estabilidade da fonte de luz poderá não ser a mais adequada nos casos de aquisições mais longas. No que se refere à repetibilidade e *backlash* do posicionamento, o teste efectuado reproduz o tipo de posicionamento que normalmente será efectuado para adquirir as imagens, e os resultados obtidos permitem considerar que não terão efeito negativo na qualidade das imagens, se forem usados estes varrimentos.

4.3. Contraste

A MTF é uma representação usual do desempenho em sistemas de imagem. A determinação desta função foi efectuada com a medição do contraste, de cada grupo / elemento, nas imagens obtidas de um alvo da USAF (*United States Air Force*)¹. O

¹ É um objecto de teste que possui grupos de três barras, cuja separação varia desde as dezenas até um mínimo de aproximadamente $2 \mu\text{m}$, que corresponde à frequência espacial máxima de 228 lp/mm .

contraste foi definido no capítulo 2, expressão (2.12), dado que é entendido como a profundidade de modulação na imagem, podendo referir-se também ao objecto.

O contraste para cada frequência espacial foi então calculado com imagens como a que se mostra na figura 4.4.

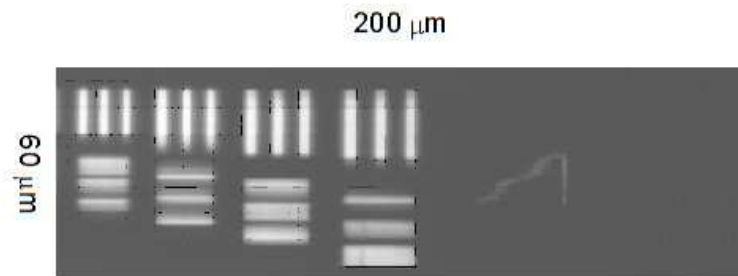


Figura 4.4. Exemplo de uma imagem do alvo da USAF usada para a determinação da MTF.

4.3.1. Medição da CTF

De entre os vários métodos para a determinação da MTF [4], optou-se por usar o método de varrimento, que consiste em medir a variação do contraste com a frequência espacial, quando o objecto é uma grelha sinusoidal. No entanto, embora a MTF esteja definida para grelhas sinusoidais, torna-se muito mais simples usar uma grelha de onda quadrada. Um exemplo deste último tipo de grelha é o alvo da USAF.

Assim, a aproximação de base, consiste em medir a resposta a uma onda quadrada, cuja definição é semelhante à MTF, mas que se designa por função de transferência de contraste (CTF), de acordo com a expressão (4.1) [5].

$$CTF(\xi_f) = \frac{M_{saída}(\xi_f)}{M_{entrada\ quadrada}(\xi_f)}, \quad (4.1)$$

em que ξ_f é a frequência espacial fundamental.

4.3.2. Determinação da MTF a partir da CTF

Após a medição experimental da CTF, que é a resposta a uma entrada quadrada, será necessário fazer a sua conversão na MTF, que é a resposta a uma entrada sinusoidal. O contraste (ou profundidade de modulação) para cada frequência espacial pode ser expresso como uma soma de componentes harmónicas, que são pesadas por dois factores multiplicativos:

- A sua intensidade relativa no objecto (entrada do sistema)
- O valor da MTF do sistema para essa frequência harmónica.

Pode então encontrar-se uma expressão para o valor da CTF, para cada frequência espacial fundamental (ξ_f), em função dos valores da MTF em cada uma dessas frequências harmônicas, como se mostra na expressão (4.2) [1,2,5]:

$$CTF(\xi_f) = \frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{(2n+1)} MTF[2n+1(\xi_f)] \quad (4.2)$$

A equação da conversão da CTF na MTF, que corresponde a inverter a série da expressão (4.2), é a apresentada na expressão (4.3) [1,2,5]:

$$MTF(\xi_f) = \frac{\pi}{4} \sum_{n=0}^{\infty} B_{2n+1} \frac{CTF[2n+1(\xi_f)]}{(2n+1)} \quad (4.3)$$

em que B_{2n+1} pode tomar os valores -1, 0 ou 1 de acordo com a expressão (4.3a) [1]:

$$B_k = \begin{cases} (-1)^m (-1)^{\frac{k-1}{2}} & \text{se } r = m \\ 0 & \text{se } r < m \end{cases} \quad (4.3a)$$

sendo m o total de números primos que se obtém na factorização de k e r o total desses factores primos diferentes.

Tem que se referir o facto de o alvo da USAF ser constituído por conjuntos de três barras cujo comprimento não é infinito, pelo que o seu espectro contém frequências características mais alargadas, e não as componentes harmônicas discretas. Assim, a representação em série da expressão (4.3) não é rigorosa para o alvo da USAF, porque as contribuições para a profundidade de modulação da imagem, ocorrem para outras frequências espaciais além das que a série contém. No entanto, normalmente o erro cometido com esta aproximação é negligenciável [6].

Por outro lado a série na expressão (4.3) representa uma soma infinita, mas considerando que um sistema óptico contém um limite para a frequência espacial transmitida, designado por frequência de corte, ξ_c , pode-se usar esse limite na série. Como, pela expressão (4.2), a $CTF(\xi_f)$ é nula para frequências espaciais maiores do que a frequência de corte ($\xi_f > \xi_c$), conclui-se que a MTF para uma frequência espacial abaixo da frequência de corte, não tem contribuições da CTF a frequências acima desse valor [1]. Tendo em conta cada valor de N , pode aplicar-se a seguinte relação para calcular a MTF:

$$MTF(\xi_f) = \frac{\pi}{4} \sum_{n=0}^N B_{2n+1} \frac{CTF[2n+1(\xi_f)]}{2n+1} \quad \text{para } \frac{\xi_f}{2N+3} < \xi \leq \frac{\xi_f}{2N+1} \quad (4.4)$$

Usando-se uma lâmpada de halogénio, portanto uma fonte de luz incoerente, a OTF estende-se até uma frequência que é o dobro da frequência de corte com luz coerente [7]. No entanto, esta relação não significa que, para um mesmo sistema, as imagens usando

luz incoerente serão melhores do que com luz coerente. A comparação não é tão simples, pois no caso da luz coerente a OTF é uma função de valores de amplitude e com luz incoerente de valores de intensidade, Entre outras razões, acresce que, ter-se-á que considerar também a intensidade das componentes de frequência espacial ao longo de todo o espectro.

Como se viu no capítulo 2, a MTF corresponde ao módulo da OTF. Para se avaliar o contraste das imagens faz-se a comparação com o contraste das imagens para um sistema limitado por difracção. A OTF para este sistema com uma função pupila circular é dada pela expressão (4.5).

$$OTF(\rho) = \begin{cases} \frac{2}{\pi} \left[a \cos\left(\frac{\rho}{2\rho_c}\right) - \frac{\rho}{2\rho_c} \sqrt{1 - \left(\frac{\rho}{2\rho_c}\right)^2} \right] & \rho \leq 2\rho_c \\ 0 & \text{outros} \end{cases} \quad (4.5)$$

em que ρ é o módulo da frequência espacial¹, sendo ρ_c a frequência de corte com luz coerente, que se obtém com uma das expressões seguintes, (4.5a) ou (4.5b).

$$\rho_c = \frac{l}{2\lambda d_i} \quad (4.5a)$$

$$\rho_c = \frac{NA}{0,5\lambda} \quad (4.5b)$$

em que l é o diâmetro da pupila de saída, d_i é a distância ao plano em que se forma a imagem [7], λ é o comprimento de onda da luz e NA a abertura numérica da objectiva. Não existindo termos complexos na expressão (4.5), esta representa a MTF. Para o caso da objectiva 40X 0,65 NA obtém-se uma frequência de corte² de 1136 lp/mm.

Mediram-se os valores da CTF para diferentes frequências espaciais, usando as imagens de conjuntos de três barras do alvo da USAF. A gama de frequências usada nestas medidas é muito menor do que a gama de frequências de passagem, o que se considera adequado em muitas aplicações [4,6,8].

Numa aplicação MATLAB faz-se, de forma interactiva, a selecção da barra, após o que se efectuam os cálculos para se obterem diversos parâmetros, nomeadamente os valores da I_{max} e I_{min} nessa barra. Com esses valores obtém-se a CTF e determina-se a MTF através do cálculo da série apresentada na expressão (4.4).

¹ Enquanto ξ corresponde à frequência espacial numa direcção, ρ é o módulo do seu valor no plano das frequências (pode-se fazer a analogia com o raio em coordenadas polares).

² Usa-se esta unidade (lp/mm), em que lp designa *line pairs*, visto ser a adoptada para expressar as frequências espaciais dos grupos de barras no alvo da USAF.

4.3.2.1. Iluminação de campo amplo

Foram recolhidas imagens do alvo da USAF, usando a montagem descrita na figura 4.1, sem a colocação da fenda no braço de iluminação, isto é, com iluminação de campo amplo. Os dados experimentais desta configuração cobrem a gama de frequências espaciais de 32 lp/mm a 228 lp/mm.

Na figura 4.5 representa-se a CTF medida, a MTF determinada e a MTF_{DL}^1 calculada com a expressão (4.5). Dado que a gama de frequências, coberta pelos dados experimentais, é muito menor do que a ideal, foi feito o ajuste linear aos dados experimentais para se obter a CTF da figura. Para este conjunto de dados, este tipo de ajuste demonstrou ser mais consistente do que os de polinómios de maior grau, tendo-se obtido uma frequência de corte experimental, por extrapolação, igual a 719 lp/mm.

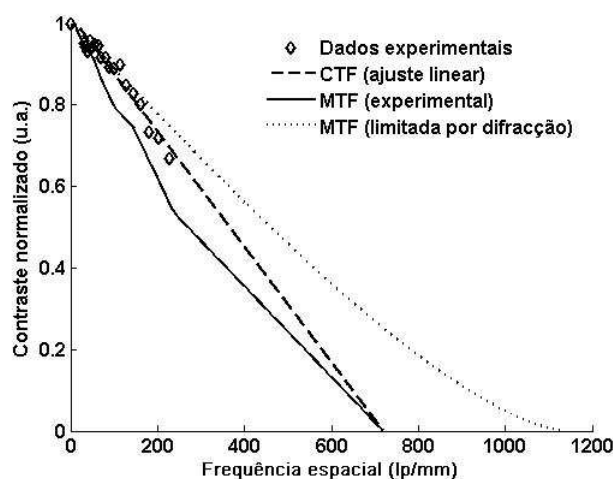


Figura 4.5. Representação dos dados experimentais, CTF medida, MTF determinada e MTF_{DL} para a iluminação de campo amplo.

4.3.2.2. Iluminação em linha

Com a mesma montagem, usou-se uma fenda de 200 μm no braço de iluminação para se obter a iluminação em linha, paralela ao sensor. Os dados experimentais, neste caso, cobrem um gama menor de frequências espaciais, de 128 lp/mm a 228 lp/mm.

Na figura 4.6 representa-se também a CTF medida, a MTF determinada e a MTF_{DL} calculada. A frequência de corte experimental, obtida por extrapolação, é igual a 975 lp/mm.

¹ MTF_{DL} é a designação adoptada para a MTF *diffraction limited*.

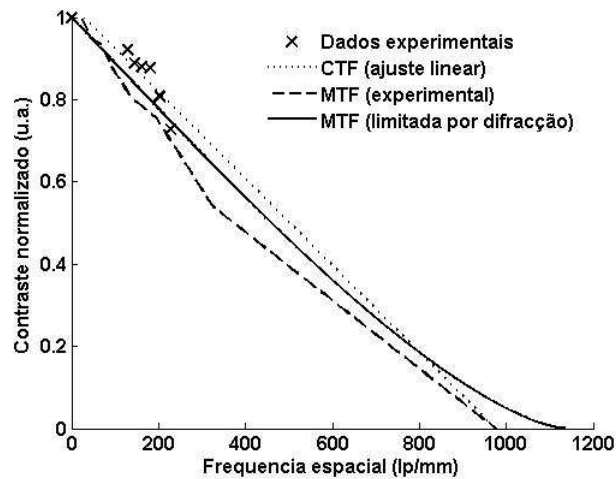


Figura 4.6. Representação dos dados experimentais, CTF medida, MTF determinada e MTF_{DL} para a iluminação em linha.

4.3.2.3. Razão de Strehl

Com as MTFs determinadas para os dois modos de iluminação, calculou-se a razão de Strehl, usando sempre a mesma MTF_{DL} , visto que é determinada pela lente objectiva.

4.3.2.3.1. Iluminação de campo amplo vs iluminação em linha

Na figura 4.7 representam-se as MTF determinadas para a iluminação de campo amplo e iluminação em linha e a MTF_{DL} calculada.

Os valores calculados da razão Strehl para a iluminação em linha e de campo amplo são 0.86 e 0.62, respectivamente.

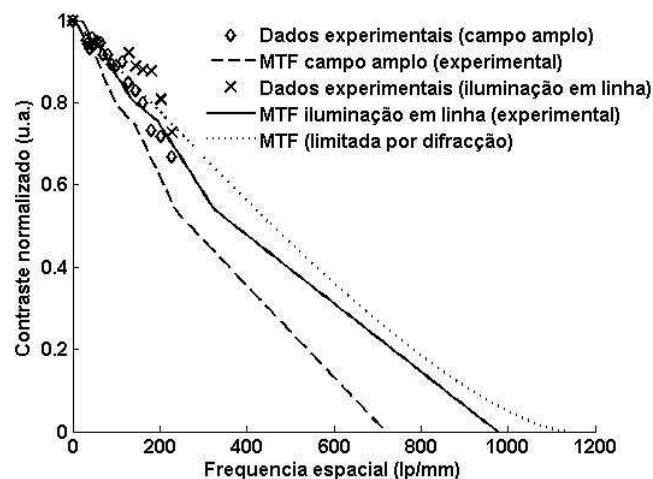


Figura 4.7. Comparação dos dados experimentais e das MTF determinadas com a iluminação de campo amplo e em linha.

4.3.2.3.2. Efeito do deslocamento axial

Foi medida a CTF para duas posições axiais diferentes, separadas de $2\ \mu\text{m}$, com o modo de iluminação de campo amplo. As duas CTFs e a MTF_{DL} estão representadas na figura 4.8. As respectivas MTFs foram determinadas mas, para não sobrecarregar o gráfico, não estão representadas. A partir destas MTFs calcularam-se as frequências de corte e os valores da razão Strehl nas duas posições axiais, sendo iguais a $718\ \text{lp/mm}$ e $0,59$ e $808\ \text{lp/mm}$ e $0,68$, respectivamente.

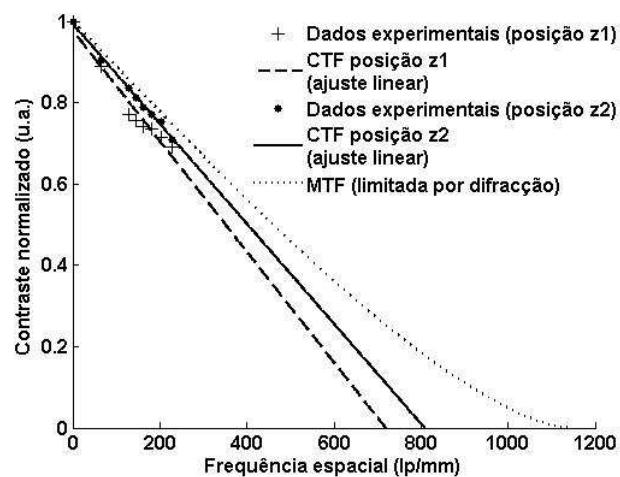


Figura 4.8. Comparação dos dados experimentais e das CTF medidas com a iluminação de campo amplo em duas posições axiais separadas de $2\ \mu\text{m}$.

4.3.2.4. Variação do contraste com a posição axial

Para avaliar a variação do contraste com a posição axial, e comparar esse efeito quando se usa o modo de iluminação de campo amplo e de iluminação em linha, foram obtidas imagens do alvo da USAF em quatro posições axiais, com um espaçamento igual a $5\ \mu\text{m}$. Os dados experimentais obtidos são relativos aos quatro grupos de maior frequência espacial, portanto na gama de frequências de $161\ \text{lp/mm}$ a $228\ \text{lp/mm}$.

Na figura 4.9. (a) e (b) representam-se os valores de contraste para esses valores extremos de frequência espacial, isto é, para $161\ \text{lp/mm}$ e $228\ \text{lp/mm}$, respectivamente, em função da posição axial. O gráfico da figura 4.9. (c) contém os valores médios do contraste das quatro frequências espaciais, medidos em cada posição axial. As barras de erro indicam os valores máximos e mínimos do contraste de cada posição (de entre as quatro frequências espaciais).

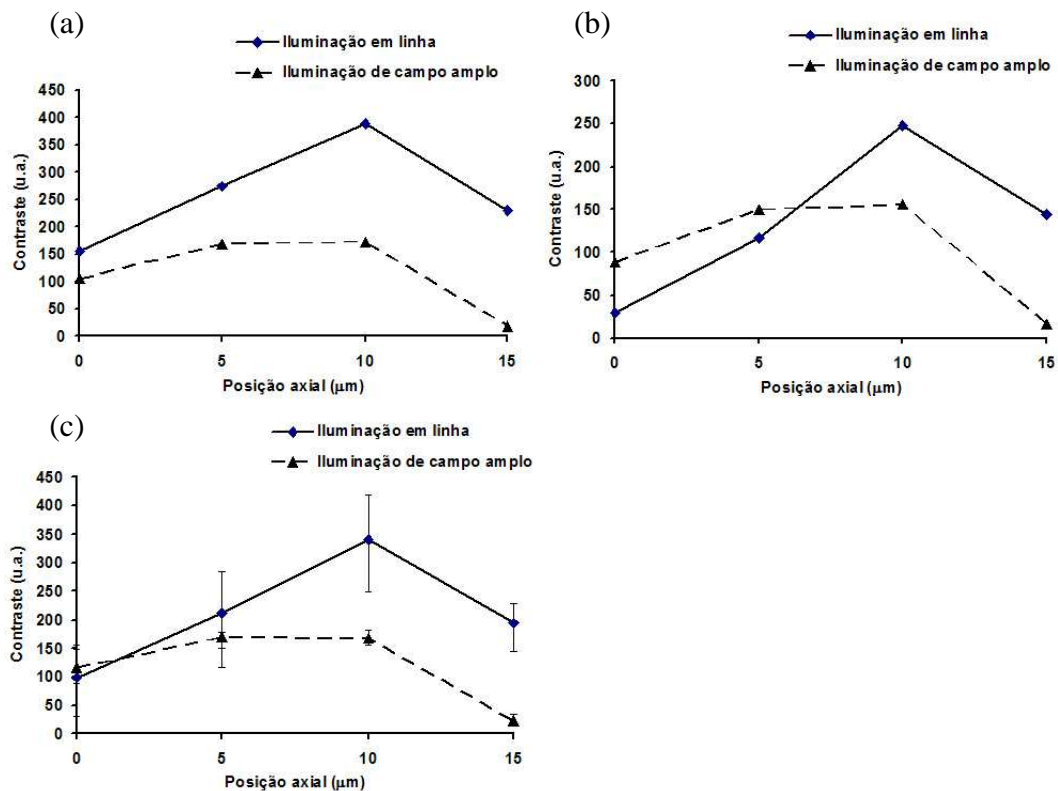


Figura 4.9. Comparação entre o contraste, com a iluminação de campo amplo e em linha, em função da posição axial, para a frequência espacial igual a: (a) 161 lp/mm; (b) 228 lp/mm; (c) média dos quatro valores de frequência espacial.

4.3.3. Conclusão

Na medição das CTFs usou-se uma gama de frequências espaciais muito menor do que a ideal (frequência máxima medida muito menor do que a frequência de corte), o que poderá ter efeito nas MTFs determinadas, apesar de ser considerado adequado em muitas aplicações, conforme está descrito na literatura [6].

Atendendo a que se usaram componentes ópticos de baixo custo, nomeadamente a objectiva, o valor da razão de Strehl de 0,86, obtido com a iluminação em linha, está acima do expectável.

As imagens de melhor contraste, maiores valores da MTF e maior frequência de corte, foram obtidas com a iluminação em linha, colocando-se uma fenda, paralela ao sensor, no braço da iluminação.

Comprovou-se que o deslocamento axial provoca uma degradação da razão de Strehl, o que poderá ser uma consequência dos efeitos de *defocus*¹ e não das aberrações da frente de onda, como por exemplo a aberração esférica [9].

A iluminação em linha demonstra melhor potencial para a discriminação axial, ou seccionamento óptico, pois observa-se uma maior variação do contraste com a posição axial.

4.4. Resolução lateral

Para se fazer a avaliação da resolução lateral do microscópio é necessário conhecer o valor que teoricamente poderá ser obtido. Na literatura encontram-se muitas referências mas para as condições ideais, nomeadamente para uma abertura circular pontual ou uma fenda muito estreita e infinitamente longa, conforme apresentado no capítulo 2.

O detector do sistema, sensor do tipo matriz linear, tem uma geometria semelhante aos detectores do tipo fenda, sendo esta a designação que normalmente será adoptada. No entanto, tem a capacidade de formar a imagem de detalhes paralelos ao sensor, pois contém 1024 pixels ao longo dessa direcção. A sua resolução lateral nesta direcção será similar à do microscópio convencional.

Por outro lado, não sendo colocada uma fenda de detecção em frente ao sensor, a largura deste detector do tipo fenda é a altura dos pixels do sensor, isto é, 125 μm . Este valor é importante tendo-se como referência que para uma abertura circular, o seu diâmetro deveria ser 5,4 μm para manter a confocalidade e maximizar o sinal detectado com o microscópio confocal. Por outro lado, para um diâmetro de 50 μm ou maior, a resolução é equivalente à do microscópio convencional [10].

4.4.1. Anisotropia da resolução lateral

A anisotropia da imagem é um aspecto característico destes sistemas baseados num sensor linear. Na figura 4.10 apresentam-se imagens do alvo da USAF para comparação do desempenho do sistema usando iluminação de campo amplo e em linha, paralela ao sensor, e também para ilustração das diferenças entre as imagens de detalhes paralelos e perpendiculares ao sensor (detector do tipo fenda). Usou-se a montagem óptica já

¹ O *defocus* tem como efeito o aparecimento de um termo na função pupila, que pode ser separado de outro termo que representa as aberrações (da frente de onda).

apresentada na figura 4.1, sendo a iluminação em linha obtida colocando a fenda ao longo do eixo-X.

É então necessário conhecerem-se alguns parâmetros do sistema e da aquisição para se fazer a avaliação. Nomeadamente a altura do sensor, que é igual a $125\ \mu\text{m}$, e que actua como a largura da fenda de detecção, que corresponderá a uma altura no objecto de aproximadamente $3\ \mu\text{m}$, visto que se usou a objectiva $40\times\ 0,65\text{NA}$. No modo de iluminação em linha, usou-se a fenda com uma largura de $200\ \mu\text{m}$ que, analogamente, corresponderá a $5\ \mu\text{m}$ no objecto.

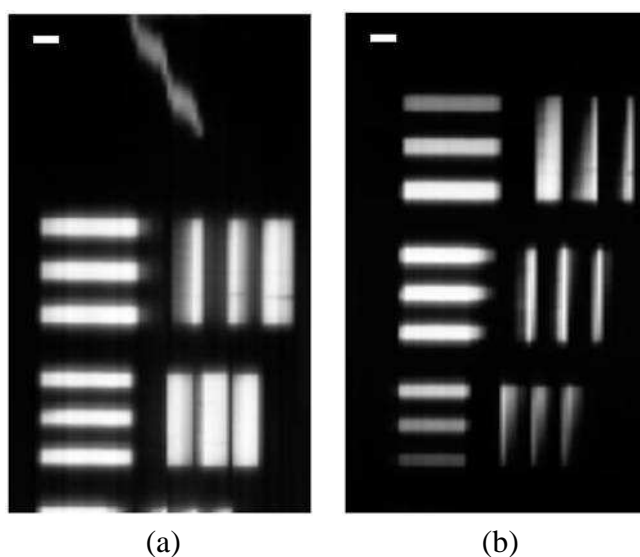


Figura 4.10. Imagens do alvo da USAF obtidas com: (a) iluminação de campo amplo; (b) iluminação em linha. A barra de escala é de $5\ \mu\text{m}$ (direcção horizontal – eixo-Y; direcção vertical – eixo-X).



Figura 4.11. Imagens do grupo de três barras do alvo da USAF com frequência espacial de $181\ \text{lp/mm}$, usando iluminação em linha. Imagens obtidas com os dados tal como recolhidos no sensor tendo-se as barras na orientação: (a) perpendicular; (b) paralela ao sensor. FOV: $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ (direcção horizontal – eixo-X; direcção vertical – eixo-Y).

Efectuou-se o varrimento no eixo-Y, em que a posição da linha no objecto se desloca com espaçamentos de $1\ \mu\text{m}$. Por outro lado a largura de cada pixel é de $7,8\ \mu\text{m}$, pelo que no eixo-X, o intervalo de amostragem no objecto é de aproximadamente $200\ \text{nm}$. Por exemplo, nas imagens da figura 4.11, nos dois grupos de três barras em direcções perpendiculares entre si, ambos com um frequência espacial de $181\ \text{lp/mm}$, cada barra tem uma largura de $2,8\ \mu\text{m}$, pelo que o intervalo de amostragem no eixo-Y está próximo

do limite de Nyquist. Além da elevada largura da fenda de detecção (altura do pixel) esta taxa de amostragem também piora a resolução no eixo-X¹.

As imagens do alvo da USAF apresentadas na figura 4.12 (tal como na figura 4.10) têm a mesma escala em ambos os eixos, pois aplicou-se a função *imresize* do MATLAB, usando o método de interpolação bilinear. Os perfis obtidos ao longo das linhas indicadas nas imagens foram, naturalmente, traçados a partir dos dados lidos do sensor, pelo que podem mostrar um comportamento ligeiramente diferente do que as imagens sugerem. As imagens da figura 4.11 são um exemplo desses dados, evidenciando que, apesar de um FOV quadrado, as dimensões nos dois eixos são muito diferentes.

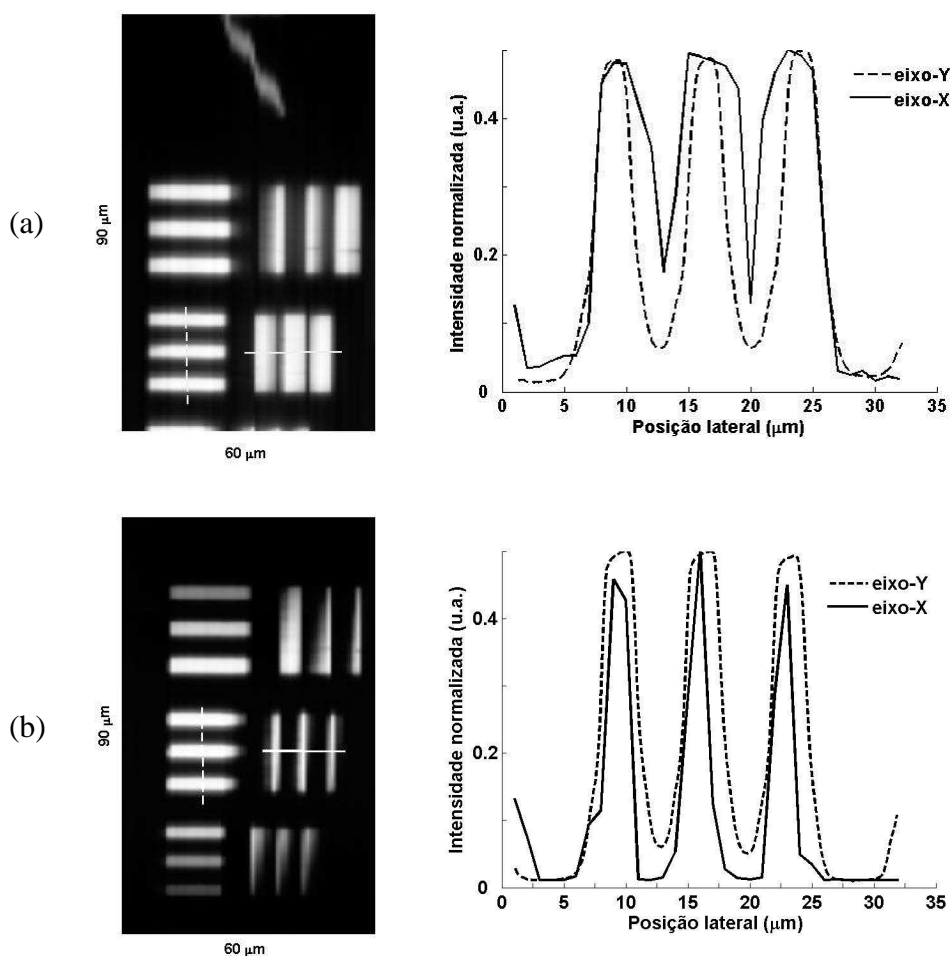


Figura 4.12. Imagens do alvo da USAF com iluminação: (a) de campo amplo; (b) em linha. À direita apresentam-se os perfis obtidos ao longo das linhas apresentadas nas imagens da esquerda, que atravessam o conjunto de barras perpendiculares (a tracejado) e paralelas (a cheio) ao sensor, do grupo de frequência espacial de 144 lp/mm (direcção horizontal – eixo-Y; direcção vertical – eixo-X).

¹ A resolução no eixo-X diz respeito a detalhes com a direcção deste eixo, portanto paralelos ao sensor. Para os perpendiculares ao sensor tem-se a resolução no eixo-Y.

À parte a pouca uniformidade das imagens na figura 4.12 em ambos os modos de iluminação, e um FOV maior com a iluminação de campo amplo, estão criadas as condições adequadas para que a comparação entre as imagens seja feita. Apesar de não se apresentarem dados quantitativos, é perfeitamente claro que a iluminação em linha melhora consideravelmente a resolução lateral em ambas as direcções, sendo mais evidente no eixo-X. Esta conclusão é ainda mais nítida nos perfis da figura 4.13, obtidos a partir do grupo de maior frequência espacial existente no alvo da USAF usado, 228 lp/mm, o que sugere que a melhoria conseguida aumenta com a frequência espacial. A comparação entre a resolução lateral nas duas direcções, eixos-X e Y, é prejudicada pela diferença nos intervalos de amostragem. Têm-se assim curvas muito mais suaves para os perfis ao longo das linhas na direcção do eixo-X (que atravessam os grupos de três barras no eixo-Y), em oposição às curvas para perfis ao longo das linhas no eixo-Y. Contudo o alargamento dos perfis no eixo-X relativamente aos no eixo-Y, que é visível no modo de iluminação de campo amplo, verifica-se também com a iluminação em linha, para a frequência espacial de 228 lp/mm, evidenciando a redução do contraste.

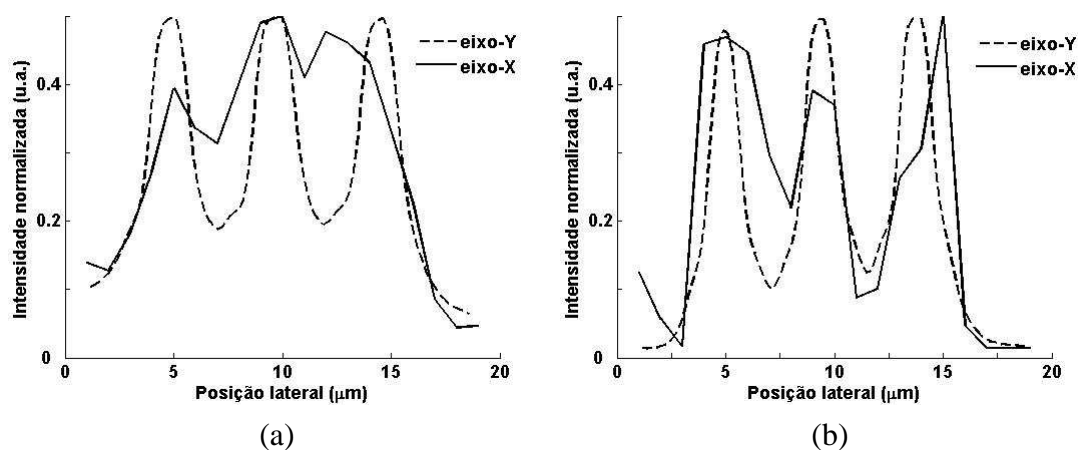


Figura 4.13. Perfis semelhantes aos da figura 4.12, mas para o grupo de frequência espacial de 228 lp/mm, obtidos com iluminação: (a) de campo amplo; (b) em linha. Conjunto de barras perpendiculares (a tracejado) e paralelas (a cheio) ao sensor.

4.4.2. Método de determinação da PSF

As imagens 2D adquiridas com este microscópio contêm informação proveniente de planos anteriores e posteriores ao plano focal. É importante remover o esbatimento que daí resulta, o que pode ser conseguido usando um modelo matemático que descreva o processo de formação da imagem e a sua aquisição no sensor. Os modelos que pretendem descrever o processo com maior exactidão necessitam de maior capacidade de

processamento de dados, sendo importante encontrar um compromisso [11], sendo aplicados em diversos casos modelos simplificados.

4.4.2.1. Modelo

Um modelo, largamente usado, inclui o ruído e o fundo, que pode ser medido facilmente. Considera também o facto de a imagem ser recolhida de forma discreta pelo sensor, pelo que a PSF e o objecto são amostrados numa grelha regular. Assim é obtida a equação matricial apresentada na expressão (4.6) [12].

$$I = N(HO + b) \quad (4.6)$$

em que I é a imagem recolhida pelo sensor, H é a PSF amostrada (matriz que representa o efeito de esbatimento) que pode variar no espaço, O é um objecto discreto, N representa o ruído total na imagem e b o fundo. Note-se que esta multiplicação de matrizes é efectivamente implementada com as transformadas de Fourier [12].

No ruído dever-se-á considerar o resultante da natureza quântica da luz (ruído fotónico). Também a eficiência quântica do detector é determinante, pois reduz o número de electrões que compõem o sinal, tal como o ruído no processo de detecção do sensor (de leitura, térmico, etc) [13]. Neste ruído associado ao detector, dever-se-ia considerar também o FPN característico dos sensores do tipo APS.

No entanto, por razões de velocidade/capacidade de processamento, para a determinação da PSF aplicou-se um modelo muito simplificado, em que o ruído não é considerado, conforme a expressão (4.7).

$$I = HO + b \quad (4.7)$$

4.4.2.2. Implementação

Usou-se a montagem óptica da figura 4.14, com a fenda ao longo do eixo-X. Usa-se como objecto, uma linha do alvo da USAF, cujos parâmetros são bem conhecidos. Foram então aplicadas imagens das linhas correspondentes aos grupos de maior frequência espacial, na gama que vai de 64 a 228 lp/mm, como as apresentadas na figura 4.15. Nestas imagens observa-se que o FOV não cobre todo o comprimento do sensor e em especial na imagem do grupo 7, figura 4.15 (b), pode observar-se a não uniformidade da iluminação.

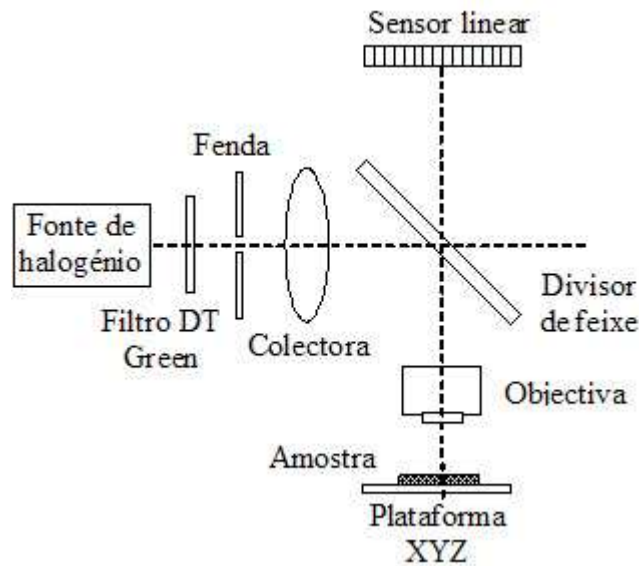


Figura 4.14. Esquema da montagem óptica usada neste teste.

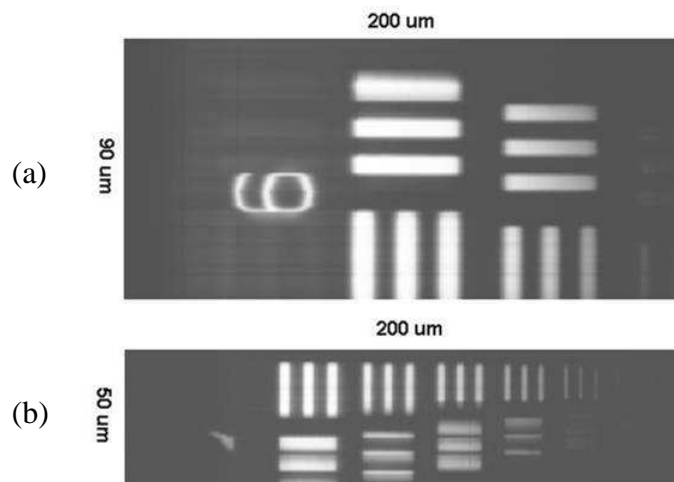


Figura 4.15. Imagens do alvo da USAF de conjuntos de três barras: (a) do grupo 6; (b) do grupo 7 (direcção horizontal – eixo-X; direcção vertical – eixo-Y).

Para a implementação do método foi desenvolvido algum código, incluído numa aplicação MATLAB, que consiste nos passos que se indicam na tabela 4.1.

Relativamente a este algoritmo deve-se acrescentar que:

- Passo 4 - a função O é do tipo degrau (ideal) cuja largura é obtida a partir dos parâmetros disponíveis nas especificações do alvo da USAF;
- Passo 6 – é feita uma regularização simples para evitar a divisão por zero;
- Passo 7 – após a sua execução é feita uma normalização para se obter uma PSF mais facilmente comparável.

Passo #	Descrição	Função
1	Seleccção de uma barra numa imagem do alvo USAF	$I(\textit{Imagem})$
2	Subtracção do fundo	$I - b, b(\textit{fundo})$
3	Cálculo da FFT (<i>Fast Fourier Transform</i>)	$fft(I - b)$
4	Definição da barra teórica correspondente (objecto)	$O(\textit{Object})$
5	Cálculo da FFT do objecto	$fft(O)$
6	Determinação da FFT da PSF (aplicação do modelo)	$fft(H) = fft(I - b) / fft(O)$
7	Cálculo da sua FFT inversa (que corresponde à PSF)	$H = ifft(fft(H))$

Tabela 4.1. Descrição do algoritmo executado para a determinação da PSF.

O método foi aplicado usando linhas nas direcções paralela e perpendicular ao sensor, de forma a obter a PSF no eixo-X e no eixo-Y, respectivamente.

4.4.2.3. Determinação da PSF

As representações das PSFs nos dois eixos laterais, apresentadas na figura 4.16, foram então obtidas a partir de imagens como as da figura 4.15.

Para obter a PSF_{xx} seleccionou-se uma linha no eixo-X do grupo 6 do alvo da USAF e a curva 1D assim obtida foi usada como imagem (I). O objecto (O), construído em MATLAB, foi uma função degrau com uma largura de $8\ \mu\text{m}$ (obtido das especificações do alvo da USAF). De forma semelhante se procedeu para obter a PSF_{yy} , a partir de uma linha no eixo-Y da imagem do grupo 7 do alvo e com uma função degrau com $3,1\ \mu\text{m}$ de largura.

O resultado para a PSF_{xx} é afectado pelo intervalo de amostragem de $1\ \mu\text{m}$ usado no eixo-Y, que corresponde ao deslocamento do varrimento unitário do posicionador do objecto. É um valor acima do limite de Nyquist¹ para a objectiva 40X 0,65NA, que é de $258\ \text{nm}$. Pelo contrário, no eixo-X a amostragem é determinada pela largura dos pixels do sensor ($7,8\ \mu\text{m}$), o que resulta num espaçamento de $195\ \text{nm}$ no espaço objecto.

¹ Este valor foi calculado com a expressão da resolução $d = 0,61\ \lambda/NA$ e considerando a frequência limite igual ao dobro da frequência espacial ($1/d$).

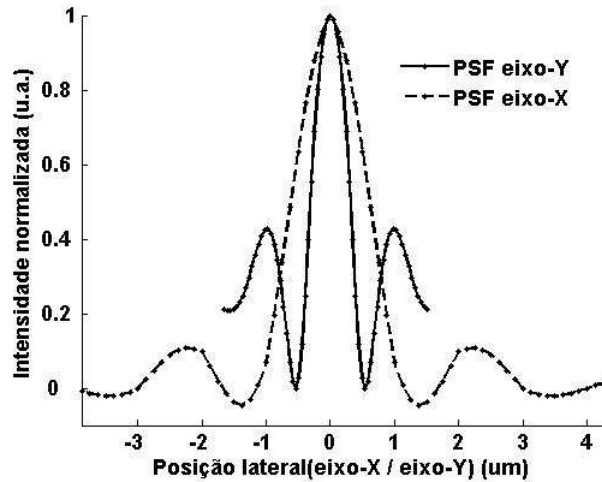


Figura 4.16. Representação das PSF 1D determinadas com o algoritmo segundo: (cheio) eixo-Y; (tracejado) eixo-X.

De acordo com a teoria para o detector do tipo fenda, obtém-se uma PSF_{yy} mais estreita do que a PSF_{xx} , contendo, no entanto, lobos laterais muito pronunciados, que irão prejudicar a aplicação desta PSF experimental na simulação da formação de imagens de objectos. A relação entre a resolução lateral nos dois eixos está próxima do esperado (recorde-se que no microscópio confocal é aproximadamente 1,4 vezes superior ao convencional) tendo-se obtido para metade da FWHM da PSF_{yy} um valor de aproximadamente 300 nm.

Na figura 4.17 está representada a PSF a duas dimensões, no plano XY, que é construída a partir das curvas 1D que representam a PSF em cada um dos dois eixos.

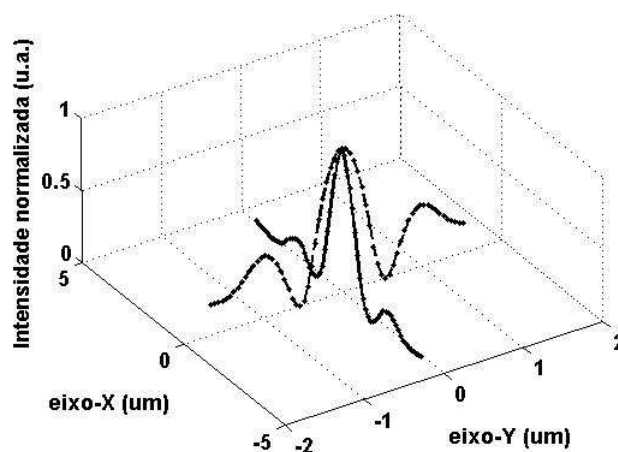


Figura 4.17. Representação da PSF 2D obtida com as PSF 1D da figura 4.16 (usam-se escalas diferentes nos dois eixos).

4.4.2.4. Teste do método

Para testar a validade deste método de determinação da PSF construíram-se objectos para se simular a aplicação da PSF neste modelo de formação de imagem, extremamente simplificado, agora no modo de convolução. Com um código desenvolvido em MATLAB, criaram-se objectos e obtiveram-se as suas imagens, através da operação apresentada na expressão (4.8).

$$I = H \otimes O \quad (4.8)$$

Usaram-se três objectos muito simples (*função O*) que consistem em grupos de três barras paralelas igualmente espaçadas, que podem ter a direcção do eixo-X ou eixo-Y. Poderiam, portanto, representar grupos do alvo da USAF. A resposta do sistema, imagem (*I*), é obtida aplicando a PSF_{xx} ou a PSF_{yy} (*função H*), consoante o caso.

A figura 4.18 mostra, para cada caso, o objecto simulado, a PSF usada e a imagem obtida. Cada linha da figura representa o processo de formação de imagem de acordo com o modelo, isto é, a convolução do objecto com a PSF.

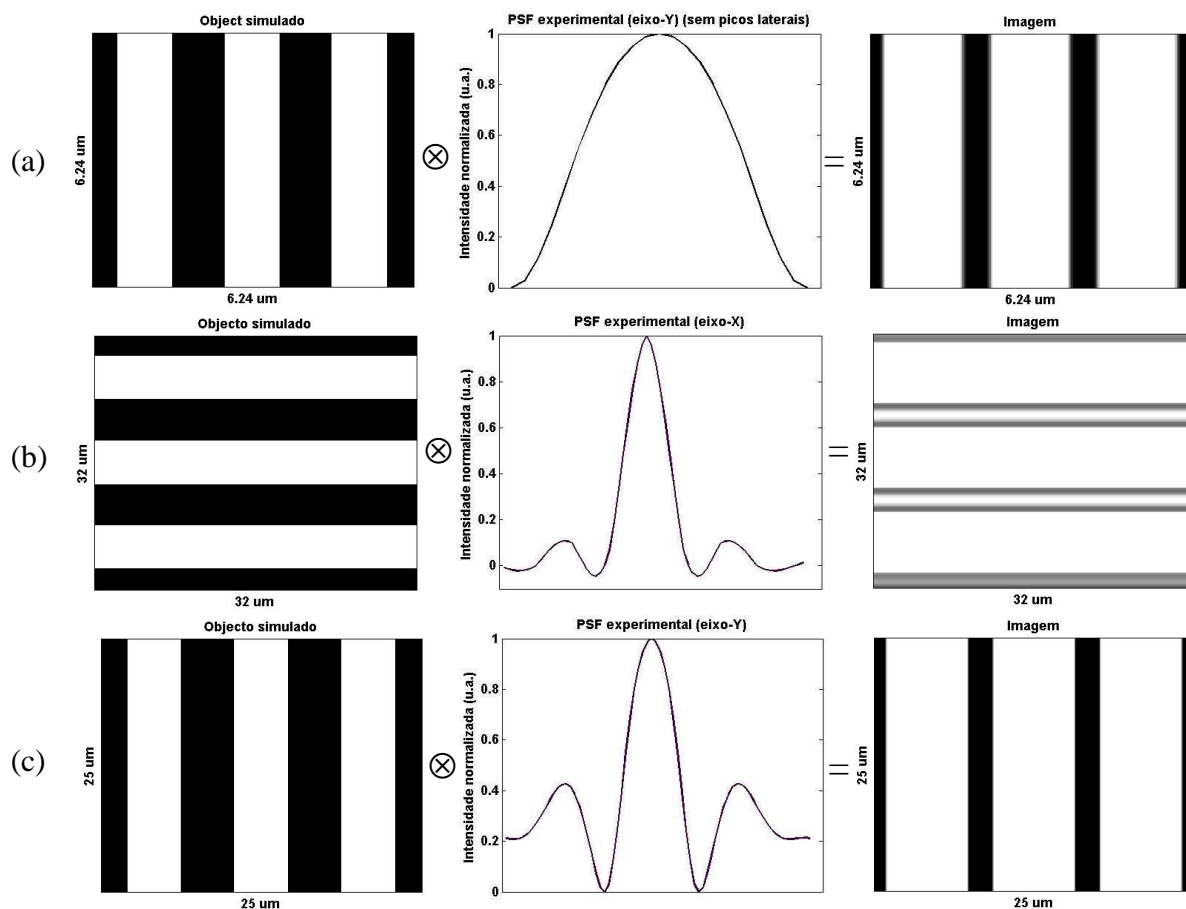


Figura 4.18. Representação dos objectos simulados e das suas imagens obtidas com as PSF calculadas em cada eixo. Objectos com barras na direcção do eixo-Y com aplicação de: (c) PSF_{yy} ; (a) PSF_{yy} truncada; (b) objecto com barras na direcção do eixo-X e aplicação da PSF_{xx} .

Em (a) aplicou-se a PSF_{yy} com os lobos laterais truncados, obtendo-se uma imagem semelhante à do alvo da USAF para barras de largura similar, perpendiculares ao sensor. No (b) aplicou-se a PSF_{xx} , para simular barras do alvo paralelas ao sensor, obtendo-se uma imagem em que os contornos das barras estão mal definidos, analogamente às imagens do alvo. Em (c) foi usada a PSF_{yy} completa, mantendo os seus lobos laterais, percebendo-se que degrada a imagem. Verifica-se que para as barras na imagem ficarem bem individualizadas, é necessário que a separação das barras no objecto seja aproximadamente quatro vezes maior do que no caso em que se usou a PSF_{yy} com os lobos laterais truncados. Esta é a relação entre a separação das barras em (a) e (c).

4.4.3. Método de cálculo da resolução a partir da LSF

As imagens do alvo da USAF, obtidas com a montagem óptica da figura 4.14 com a fenda colocada ao longo do eixo-X, foram também usadas para avaliar a resolução lateral a partir do cálculo da LSF¹.

Para este sistema incoerente de formação de imagens, a LSF pode ser usada como uma estimativa do perfil transversal da PSF. A LSF pode ser calculada facilmente pela derivação da ERF² [8,14].

Usou-se então como função aresta (*edge*) uma barra do alvo, perpendicular ao sensor, com uma largura de 7 μm . A partir da sua imagem, obtida no microscópio, foi medida a ERF. Na prática esta função corresponde ao conjunto de valores de intensidade nos pixels do sensor, ao longo de uma linha que atravessa a aresta, logo na direcção do sensor. A aresta corresponde à transição que ocorre numa das extremidades da barra.

Na figura 4.19 mostra-se a ERF medida e a LSF do sistema, na direcção perpendicular ao sensor, eixo-Y. A LSF é uma curva assimétrica com um lobo lateral muito pronunciado, decorrente de, na função ERF, ser possível visualizar zonas de diferente inclinação ao longo da transição.

Considerando este sensor como um detector do tipo fenda, usando iluminação em linha paralela ao sensor, a PSF não tem simetria circular. Poder-se-ia usar a imagem de uma outra barra, esta paralela ao sensor, para calcular a LSF e conseqüentemente o perfil da PSF na outra direcção lateral, eixo-X. Optou-se por não fazer dado que seria necessário executar o varrimento nessa direcção lateral, com um espaçamento muito menor do que 1 μm , que foi o mínimo usado.

¹ *Line Spread Function*

² *Edge Response Function*

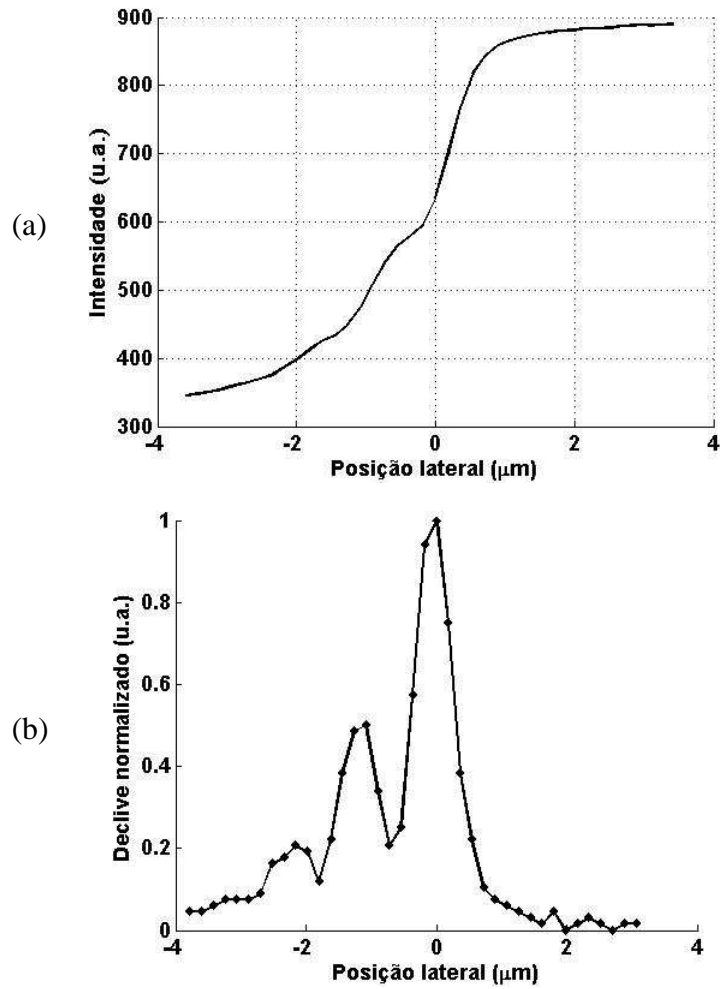


Figura 4.19. Representação de: (a) ERF medida a partir da imagem do alvo da USAF; (b) LSF calculada a partir da ERF.

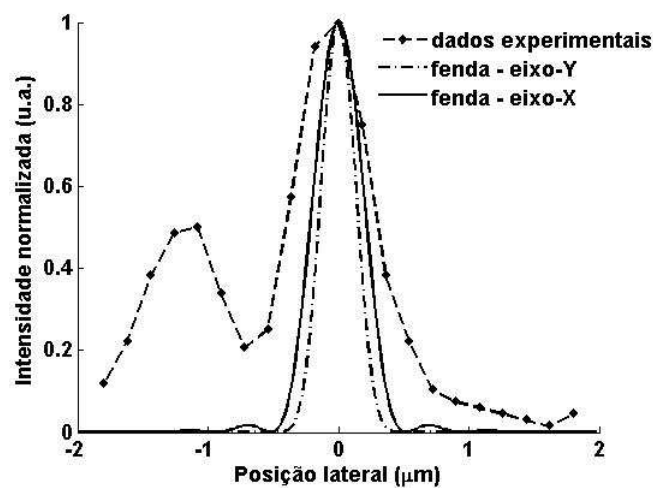


Figura 4.20. Comparação dos dados e LSF experimental com as PSF teóricas para um detector tipo fenda (ideal) nas duas direcções laterais.

A comparação desta LSF experimental com a PSF teórica para o microscópio com detector do tipo fenda (ideal), com uma fonte pontual, é apresentada na figura 4.20. Estão representadas as PSFs nas duas direcções laterais, dada a anisotropia presente nesta configuração.

Visto que metade da FWHM da LSF fornece uma medida da resolução lateral [8], não considerando o lobo lateral, a resolução lateral experimental é de aproximadamente 350 nm. Este valor, referente à direcção do eixo-Y, não difere muito do obtido com o método de determinação da PSF, e deverá ser comparado com a resolução lateral do microscópio confocal, verificando-se que é aproximadamente igual ao dobro do determinado usando o MATLAB para a curva teórica da PSF respectiva (160 nm).

4.4.4. Conclusão

Os perfis traçados, a partir de imagens de diferentes grupos de barras do alvo da USAF, mostram que a iluminação em linha melhora a resolução lateral em ambas as direcções, especialmente no eixo-X, isto é, na direcção paralela ao sensor. Esta melhoria é mais evidente para valores mais elevados da frequência espacial, em especial no perfil para a frequência espacial de 228 lp/mm, a mais elevada presente no alvo. Decorre destes resultados que, ao contrário do que é teoricamente demonstrado para um microscópio com fendas de iluminação e detecção paralelas, com este sensor obtém-se imagens para detalhes com a orientação paralela ao sensor.

O método de determinação da PSF, usando também imagens do alvo da USAF, que foi desenvolvido e testado com um modelo muito simplificado do processo de formação de imagem, permitiu obter uma PSF_{yy} mais estreita que a PSF_{xx} , de acordo com a anisotropia esperada do processo, e com uma relação entre as suas larguras muito próxima do valor teórico de 1,4. A PSF_{yy} contém um lobo lateral que deteriora a sua aplicação, como foi mostrado nas imagens obtidas dos objectos simulados. Mas com a PSF_{yy} truncada e com a PSF_{xx} as imagens da simulação têm semelhanças com as experimentais.

A estimativa do perfil transversal da PSF a partir da ERF, usando ainda imagens do alvo USAF, e em particular o cálculo da sua FWHM, permitiu obter um valor da resolução lateral na direcção perpendicular ao sensor, desprezando o lobo lateral, de aproximadamente 350 nm, que é aproximadamente igual ao dobro do valor teórico, para um detector do tipo fenda muito estreito e infinitamente longo que por sua vez é comparável ao confocal.

4.5. Resolução axial

Tal como para a resolução lateral, é mais comum apresentarem-se as expressões da resolução axial para uma abertura circular pontual ou uma fenda muito estreita e infinitamente longa. No entanto, para avaliar a resolução axial deste microscópio, é necessário comparar com valores teóricos, para as configurações usadas da montagem óptica. Por outro lado está dependente das características do objecto, como se viu no capítulo 2, sendo diferente para um ponto ou um plano objecto [8]. Com estas condicionantes na resposta axial, é importante começar por descrever as curvas teóricas para as configurações usadas, para que se possam contextualizar as medições da resolução axial efectuadas e apresentar os resultados.

4.5.1. Curvas teóricas

Atendendo ao tipo de objecto usado num microscópio de campo claro no modo de reflexão, optou-se por medir apenas a resposta axial a um plano. É conhecida a dependência da resposta axial com o diâmetro da abertura circular e com a largura (e comprimento) da fenda. Na literatura pode encontrar-se a expressão da resposta axial a um plano, de um microscópio com iluminação e detecção em linha com largura finita e comprimento infinito, em direcções paralelas, com iluminação incoerente e baixa abertura numérica [15]. Essa resposta axial apresenta-se na expressão (4.9).

$$I(u, \beta) \propto \int_{-2}^2 OTF^2(0, \xi_y, u) \cdot \text{sinc}\left(\frac{p\xi_y}{2\pi}\right) \cdot \text{sinc}\left(\frac{q\xi_y}{2\pi}\right) \cdot \exp(-i\xi_y\beta) d\xi_y \quad (4.9)$$

em que β representa o deslocamento lateral entre as fendas de iluminação e de detecção e, p e q são as larguras das fendas de iluminação e de detecção, respectivamente, todos expressos em unidades ópticas generalizadas (*u.o.*) laterais. O valor do afastamento do plano focal (*defocus*) u está expresso também em unidades ópticas generalizadas axiais e ξ_y é a frequência espacial normalizada referente à direcção perpendicular à fenda (eixo-Y).

Para se encontrar a expressão $I(u)$ é importante referir que a OTF é idêntica nos trajectos ópticos de iluminação e detecção e que, com ξ_x a frequência espacial normalizada referente à outra direcção lateral (eixo-X), se verifica a expressão (4.10) [15].

$$OTF(\xi, u) = OTF(\xi_x, \xi_y, u) \quad \text{com } \xi = \sqrt{\xi_x^2 + \xi_y^2} \quad (4.10)$$

Aplicando então a aproximação analítica de Stokseth [16] para o cálculo da OTF do sistema, que é mais exacta para planos com um afastamento médio ou grande do plano focal, obtém-se a resposta axial com um detector do tipo fenda, que se compara com a obtida com um detector pontual, na expressão (4.11) [15]:

$$I_{fenda}(u) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} OTF^2(0, \xi_y, u) \cdot \text{sinc}\left(\frac{p\xi_y}{2\pi}\right) \cdot \text{sinc}\left(\frac{q\xi_y}{2\pi}\right) \cdot d\xi_y$$

$$I_{confocal}(u) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} OTF^2(\xi, u) \cdot \text{jinc}\left(\frac{p\xi}{2}\right) \cdot \text{jinc}\left(\frac{q\xi}{2}\right) \cdot \xi d\xi$$
(4.11)

No caso do detector pontual p e q são os diâmetros das aberturas circulares de iluminação e de detecção¹.

Na figura 4.21 representam-se as respostas axiais obtidas através da simulação numérica, isto é, aplicando as expressões (4.11), com os parâmetros das configurações usadas na montagem óptica. Para isso as larguras das fendas são apresentadas em unidades ópticas normalizadas, tendo a de iluminação uma largura igual a 200 μm e a de detecção 125 μm (altura dos pixels do sensor), que são aproximadamente 38 e 24 u.o, respectivamente. O comprimento da fenda de detecção é igual ao comprimento total dos 1024 pixels do sensor, 8 mm, logo a fenda pode ser considerada de comprimento infinito [17].

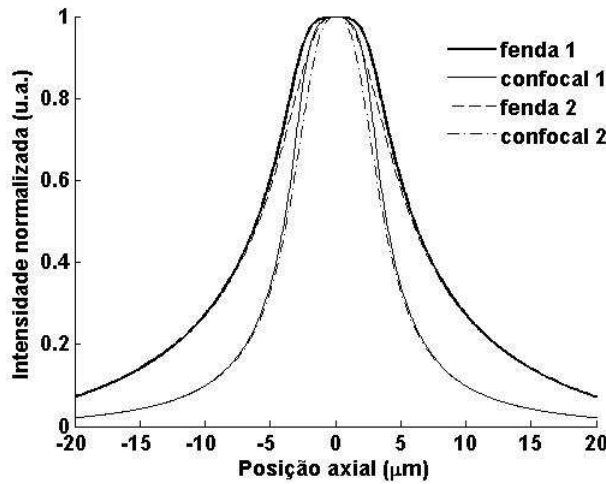


Figura 4.21. Comparação das curvas de resposta axial, simuladas numericamente, por aplicação das expressões (4.11) para o microscópio confocal e com detector tipo fenda. A largura/diâmetro é de 1,5 u.o. para a fenda 1/confocal 1 e de 24 u.o. para a fenda 2/confocal 2.

Também foi usada a configuração com a fenda de iluminação segundo o eixo-Y, isto é, perpendicular ao sensor. Na simulação numérica deste sistema aplicou-se a mesma expressão (4.11), mas considerou-se a largura da fenda de detecção igual à largura de

¹ A função *sinc* define-se como $\text{sinc}(x) = \sin(x)/x$ e a função *jinc* como $\text{jinc}(x) = J_1(x)/x$

cada pixel. Considerando-se o pixel como uma fenda virtual, o sensor seria constituído por 1024 destas fendas, cada uma com uma largura de $7,8 \mu\text{m}$, que corresponde a $1,5 \text{ u.o.}$. Na figura 4.21, além das funções de resposta axial normalizadas para a configuração da montagem óptica usada, apresentam-se também, para comparação, estas configurações mas com aberturas circulares com os diâmetros iguais às larguras das fendas usadas. Observa-se assim que não é possível distinguir as curvas obtidas através das simulações numéricas com a fenda de iluminação paralela e perpendicular à de detecção. Isto porque a largura da fenda de iluminação, sendo igual a 38 u.o. anula a melhoria que resultaria de, na simulação, se considerar a fenda virtual com uma largura de $1,5 \text{ u.o.}$ em oposição à largura de 24 u.o. do sensor.

4.5.2. Iluminação em linha

Usou-se o método mais comum para se fazer a avaliação da capacidade de seccionamento óptico. Consiste em fazer o varrimento de uma superfície plana reflectora através da posição focal, de modo a representar a resposta axial do sistema [18]. O varrimento foi efectuado com espaçamentos de $2 \mu\text{m}$. Os valores da intensidade em cada plano são calculados pela soma das intensidades numa vizinhança de 10 pixels centrada no pixel de maior intensidade. A fenda de iluminação com uma largura de $200 \mu\text{m}$ foi colocada de acordo com o esquema da figura 4.1, sendo testadas as duas orientações conforme referido acima.

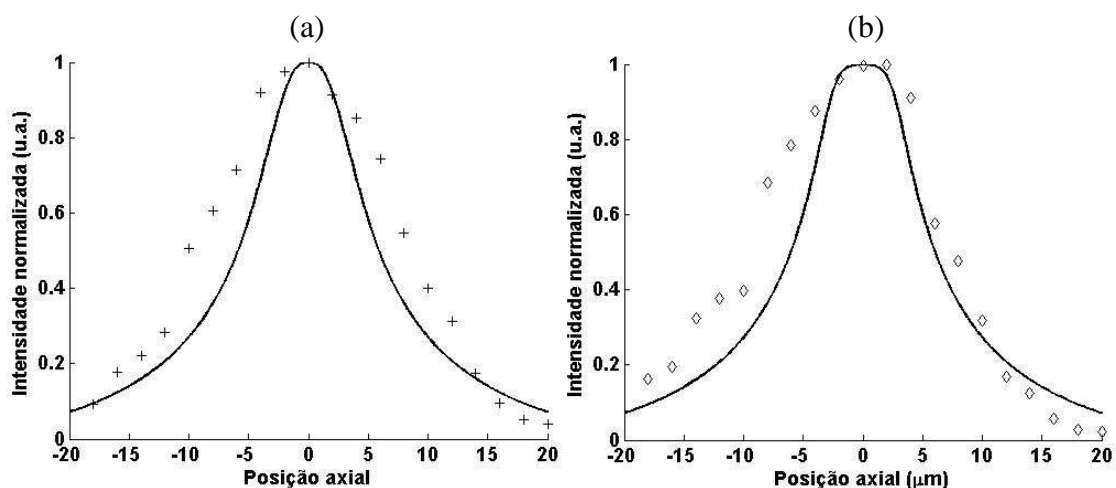


Figura 4.22. Dados experimentais e curvas de resposta axial, simuladas numericamente, para o caso do detector tipo fenda de largura igual: (a) 24 u.o. (fenda de iluminação paralela ao sensor); (b) $1,5 \text{ u.o.}$ (fenda de iluminação perpendicular ao sensor).

Na figura 4.22 mostram-se os pontos experimentais e correspondentes curvas teóricas, para as configurações com a fenda de iluminação paralela e perpendicular ao sensor.

Em oposição com a teoria, em que com as fendas de iluminação e de detecção perpendiculares não existe seccionamento óptico, com este sensor do tipo matriz linear a resposta axial é muito semelhante à observada com as fendas paralelas, conforme se mostra na comparação apresentada na figura 4.23.

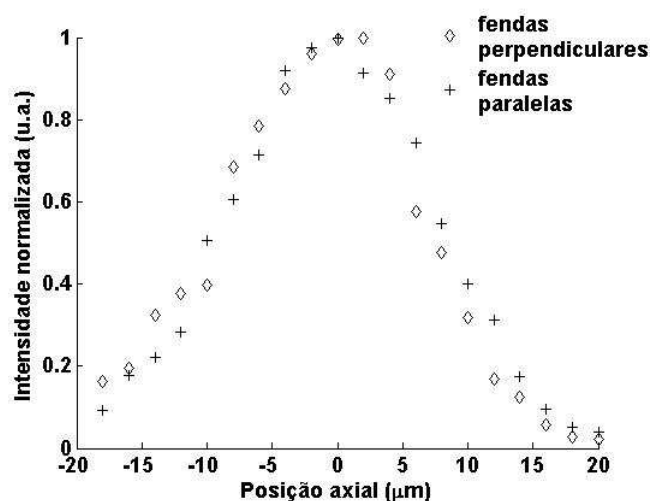


Figura 4.23. Comparação dos dados experimentais para os casos de fendas de iluminação e detecção: (+) paralelas; (◊) perpendiculares.

Esta situação decorre de, com uma fenda de detecção simples, se ter que considerar toda a luz recolhida, enquanto num sensor, é possível, através de algoritmos simples, identificar a distribuição pelos pixels, da luz recolhida em todo o comprimento desse detector do tipo fenda.

	Diâmetro / largura da abertura circular / fenda de detecção	
	7,8 μm (1,5 u.o.)	125 μm (23,6 u.o.)
Dados experimentais	8 μm	10 μm
Simulação numérica com detector tipo fenda	6,1 μm	5,9 μm
Simulação numérica confocal	3,9 μm	3,7 μm

Tabela 4.2. Valores da resolução axial calculada como metade da FWHM das curvas de simulação numérica e dos dados experimentais.

Os valores da resolução axial apresentados na tabela 4.2, foram obtidos pelo cálculo da FWHM das curvas $I(z)$, observando-se um ajuste razoável dos resultados experimentais com as curvas teóricas. Os valores da FWHM para os dados experimentais são determinados com pouca precisão, devido ao elevado intervalo de amostragem (2 μm), que corresponderá ao erro associado a cada um dos valores. Assim, os dois valores da

FWHM experimental estão demasiado afastados, tendo em conta a semelhança das curvas representadas na figura 4.23. No entanto, devido às elevadas margens de erro, os intervalos de valores obtidos acabam por se intersectar.

4.5.3. Iluminação de campo amplo

Foi realizado um teste semelhante sem qualquer fenda de iluminação, isto é, com iluminação de campo amplo. A objectiva usada foi a 20X 0,40NA.

Na figura 4.24 (a) está ilustrada a forma como a distribuição de luz pelos pixels do sensor se comporta com o deslocamento do espelho, neste caso com espaçamentos de 10 μm , ao longo do eixo-Z. Dado que o intervalo de amostragem no eixo-X é determinado pela largura dos pixels, as escalas são diferentes nos dois eixos. Nenhuma forma de filtro espacial foi usada mas pode-se extrair informação sobre a posição axial decorrente do processo de focagem da lente objectiva. Com um algoritmo que para cada posição axial calcula a soma da intensidade nos pixels dentro da largura mínima do *spot* (cerca de 110 μm) obtém-se a função $I(z)$ representada na figura 4.24 (b), em que a FWHM da curva é de aproximadamente 190 μm .

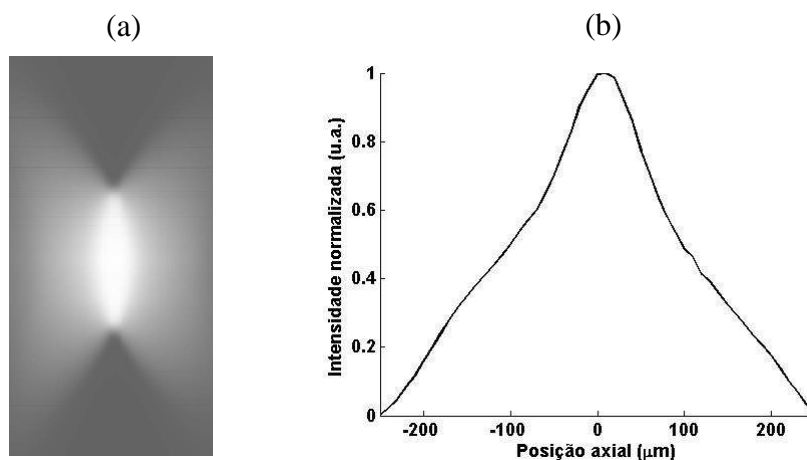


Figura 4.24. (a) Distribuição da luz pelos pixels do sensor. FOV: 312 μm x 500 μm (direcção horizontal – eixo-Z; direcção vertical – eixo-X). As escalas são diferentes nos dois eixos. (b) Intensidade em função da posição axial, $I(z)$.

Para se ter um termo de comparação com a configuração com fenda de iluminação, os valores obtidos para a FWHM, fazendo a simulação numérica considerando a objectiva usada 20X 0,40NA (semelhante à apresentada na tabela 4.2), são 33,9 μm e 34,8 μm com a fenda de iluminação paralela e perpendicular ao detector, respectivamente.

4.5.4. Conclusão

A resolução axial é degradada pelo facto de se usarem fendas de iluminação e detecção com larguras de 38 e 24 u.o., respectivamente. Contudo os resultados experimentais obtidos para a resposta axial do microscópio estão em razoável concordância com as curvas simuladas numericamente, usando estes dados do sistema óptico.

Além disso demonstra-se que a resposta axial do sistema para a configuração com a fenda de iluminação perpendicular ao sensor, ao contrário do previsto pela teoria com fendas de iluminação e detecção perpendiculares, é semelhante à obtida com a fenda de iluminação paralela ao sensor. Como o sensor é do tipo matriz linear, poder-se-á considerar como um conjunto de fendas perpendiculares à direcção do próprio sensor. Assim cada pixel actua como uma fenda de largura igual a 1,5 u.o. e comprimento 24 u.o.

É demonstrada a vantagem destes sensores lineares relativamente a uma fenda simples de detecção, observando-se que, mesmo com iluminação de campo amplo, a partir da distribuição da intensidade da luz pelos pixels do sensor, se pode obter informação sobre a posição axial.

Referências bibliográficas

- [1] Lee, J, Rogers, J.D. and Descour, M.R., “Imaging quality assessment of multi-modal miniature microscope”, *Opt. Express*, 11 (12), pp. 1436-1451 (2003)
- [2] Sheppard, C.J.R and Shotton, D.M., “Confocal Laser Scanning Microscopy”, BIOS Scientific Publishers, Oxford (1987)
- [3] Dekker, A.J. den and Bos, A. van den, “Resolution – a survey”, *Journal of the Optical Society of America A*, 14 (3), pp. 547-557 (1997)
- [4] Williams, T.L., “The Optical Transfer Function of Imaging Systems”, IoP (1999)
- [5] Boreman, G.D. and Yang, S., “Modulation transfer function measurement using three- and four bar target”, *Applied Optics*, supplement, pp. 8050-8052 (1995)
- [6] Williams, C.S. and Becklund, O.A., “Introduction to the Optical Transfer Function”, SPIE Press (2002)
- [7] Goodman, J.W., *Introduction to Fourier optics*, McGraw-Hill, New York (1968)
- [8] Sabharwal, S et al., “Slit-scanning confocal microendoscope for high-resolution in vivo imaging”, *Applied Optics*, 38 (34), pp. 7133-7144 (1999).
- [9] Wilson, T. Ed., “Confocal Microscopy”, Academic Press, London (1990)
- [10] Wilson, T. and Carlini, A.R., “Size of detector in confocal imaging systems”, *Opt. Letters*, 12 (4), pp. 227-229 (1987)
- [11] Conchello, J.A. and Lichtman, J.W., “Optical sectioning microscopy”, *Nature Methods*, 2 (12), pp. 920-931 (2005)
- [12] Verveer, P.J., “Computational and Optical Methods for Improving Resolution and Signal Quality in Fluorescence Microscopy”, PhD Thesis, Delft Tech. University (1998)
- [13] Sheppard, Colin J.R., Gan, Xiaosong, Gu, Min and Roy, Maitreyee, “Signal-to-noise in confocal microscopes”, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, James Pawley ed., pp. 363-371, 2nd Ed., Plenum, New York (1995)
- [14] Kim, J., Kang, D. and Gweon, D., “Spectrally encoded slit confocal microscopy”, *Opt. Letters*, 31 (11), pp. 1687-1689 (2006).
- [15] Poher, V. et al., “Improved sectioning in a slit scanning confocal microscope”, *Opt. Letters*, 33 (16), pp. 1813-1815 (2008)
- [16] Stokseth, A, “Properties of a defocused optical system”, *Journal of the Optical Society of America*, 59 (10), pp. 1314-1321 (1969)
- [17] Wilson, T, “Depth response of scanning microscopes”, *Optik*, 81 (3), pp. 113-118 (1989)
- [18] Zucker, R., “Confocal microscopy system performance: axial resolution”, *Microscopy Today*, 12 (1), pp. 38-40 (2004).

Cap. 5. Aplicações

5.1. Introdução

Os microscópios ópticos de varrimento podem ser aplicados em áreas tão diversas como a biologia, para o estudo de células, e a ciência dos materiais ou inspecção de semicondutores, não se confinando às áreas tradicionais da microscopia convencional.

Pelas suas características, existem técnicas ópticas (sem contacto) muito interessantes para a caracterização tridimensional (3D) de superfícies. No entanto, durante muitos anos as suas aplicações ficaram restritas a determinados tipos de superfícies com variações moderadas da altura e inclinação [1]. De entre essas técnicas, a microscopia confocal é a mais comum, podendo usar-se diversas configurações para a aquisição e avaliação de dados topográficos 3D. É uma técnica em que o tempo de aquisição de um mapa topográfico 3D é longo, pois exige a aquisição de secções a diferentes profundidades. São realizados dois varrimentos laterais no plano XY, sendo necessário um varrimento adicional no eixo-Z, para se ter a informação 3D.

Estas técnicas ópticas têm em comum nas diversas áreas em que são aplicadas (desde a análise de células até às superfícies de componentes), a utilização de objectivas de grande ampliação e abertura numérica (NA) ($0,6 < NA < 1,4$), o que as limita à análise de objectos com volumes pequenos [2].

Neste capítulo vai ser apresentada a descrição de várias aplicações do sistema, tendo como objectivo extrair informação 3D. Começa-se por descrever a forma como, com o sistema desenvolvido neste trabalho, é feito o processamento das imagens lineares lidas directamente do sensor, com vista à construção de imagens bidimensionais (2D). São também apresentadas as formas de visualização de informação 3D.

A primeira aplicação foi feita na área da microscopia mais convencional, e consistiu na inspecção da ligação do fio metálico (*wire bonding*) entre o *chip* e os terminais de um circuito integrado (IC¹). Esta operação de inspecção é feita na indústria para evitar a colocação em mercado de componentes defeituosos. A capacidade de extrair informação 3D foi ilustrada através da aplicação de algoritmos de reconstrução.

Fizeram-se também aplicações na área da metrologia de superfícies, sendo realizados diferentes testes, nomeadamente com a finalidade da determinação de perfis de um

¹ *Integrated Circuit*

componente micromaquinado, caracterização da forma de estruturas em relevo (3D), usando uma moeda, e a medição da largura e espessura/altura de pistas num PCB¹.

Os dados adquiridos no sensor linear são processados com aplicações MATLAB desenvolvidas para o efeito, podendo-se em simultâneo construir as imagens 2D e representar graficamente perfis ou mapas, 2D ou 3D, através dos quais se podem determinar as grandezas dimensionais pretendidas.

¹ *Printed Circuit Board*

5.2. Construção das imagens

Como se usa um sensor do tipo matriz linear, a imagem 2D tem que ser construída a partir dos dados adquiridos do sensor, que correspondem a imagens lineares ao longo da direcção designada por eixo-X. Para ser possível visualizar a imagem 2D, formada no plano imagem, isto é, no plano XY, é necessário adquirir um conjunto de imagens lineares através do varrimento do objecto, colocado na plataforma XYZ, na direcção lateral perpendicular ao sensor (eixo-Y).

5.2.1. Imagens 2D

A figura 5.1 ilustra a construção de uma imagem 2D, pretendendo evidenciar a sua dependência da taxa de amostragem espacial nos dois eixos.

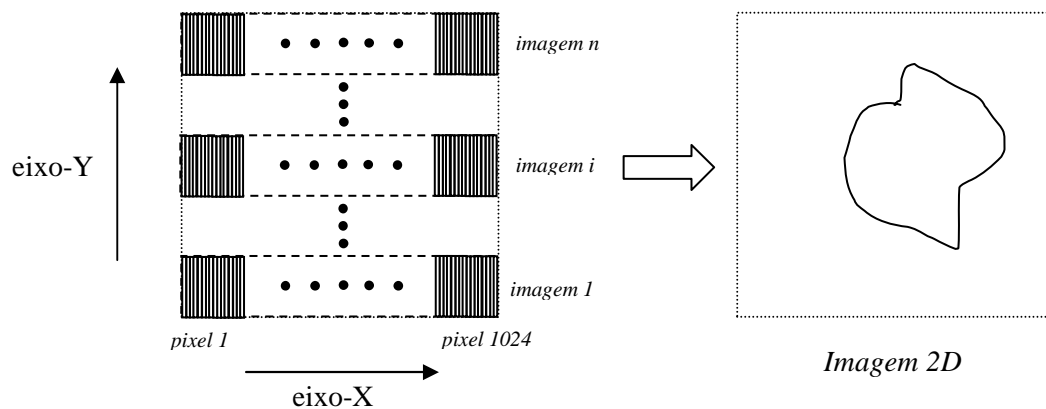


Figura 5.1. Esquema da construção de uma imagem 2D. Cada pixel tem uma largura de $7,8 \mu\text{m}$ no espaço imagem. Os varrimentos no eixo-Y têm intervalos de amostragem, no espaço objecto, que variam entre 1 e $20 \mu\text{m}$.

No eixo-X a taxa de amostragem é determinada pela largura do pixel do sensor, que é de $7,8 \mu\text{m}$. Podem-se unir conjuntos de pixels adjacentes, reunindo-se os fotoelectrões correspondentes. Este processo designa-se por *binning*. Tem a vantagem de se poder aumentar a velocidade de aquisição de imagens, reduzir o tempo de exposição ou melhorar a relação sinal-ruído (SNR), mas à custa de perda de resolução na imagem [3]. A taxa de amostragem no objecto depende também da ampliação da objectiva. Na tabela 5.1 apresentam-se os valores para as duas objectivas usadas, 20X e 40X.

Para o eixo-Y, o intervalo de amostragem é igual ao espaçamento mínimo nos deslocamentos da plataforma XYZ nessa direcção. Tendo em conta as características dos posicionadores, optou-se por usar varrimentos no mínimo de $1 \mu\text{m}$. Para as aplicações em

que era exigido um maior FOV em detrimento de uma melhor resolução lateral na imagem, usaram-se varrimentos superiores, até um máximo de 20 μm .

	Eixo-X			
	Sem binning	Binning 2x	Binning 4x	Binning 8x
Obj 20X	0,39 μm	0,78 μm	1,56 μm	3,12 μm
Obj 40X	0,195 μm	0,39 μm	0,78 μm	1,56 μm

Tabela 5.1. Valores da unidade de amostragem no objecto no eixo-X.

Para se construir uma imagem 2D, que represente de forma fidedigna as dimensões relativas do objecto nas duas direcções laterais, é necessário que a escala seja igual nos dois eixos. Nos casos em que a amostragem nos dois eixos é diferente, usa-se a função *imresize*¹ do MATLAB, em que um dos parâmetros é o factor multiplicativo a aplicar sobre a imagem *raw-data*². Na tabela 5.2 são apresentados os valores desses factores para as diferentes combinações de amostragens nos dois eixos, com a objectiva 20X.

Amostragem no eixo-Y (μm)	Eixo-X			
	Sem binning	Binning 2x	Binning 4x	Binning 8x
1	2,56	1,38	0,64	0,32
2	5,13	2,56	1,28	0,64
5	12,8	6,41	3,21	1,60
10	25,6	12,8	6,41	3,21
20	51,3	25,6	12,8	6,41

Tabela 5.2. Valores do factor multiplicativo a usar para construir uma imagem 2D com escalas iguais nos dois eixos, no caso da objectiva 20X (serão o dobro no caso da objectiva 40X).

Este processo de construção de uma imagem 2D está ilustrado na figura 5.2, usando um exemplo de uma imagem do alvo da USAF.

O sistema tem ainda a possibilidade de aumentar o FOV com varrimentos efectuados no eixo-X. Tal opção é importante em algumas aplicações, em que o FOV em cada aquisição do sensor não é suficiente. Usando-se toda a largura do sensor esse valor é de aproximadamente 400 μm e 200 μm , para as objectivas 20X e 40X, respectivamente. Para se obterem imagens 2D de maior FOV é necessário usar um método para montagem das

¹ Esta função faz a interpolação usando um dos três métodos seguintes: *nearest-neighbor*, bilinear ou bicúbico.

² Imagem construída usando os dados tal como são lidos do sensor, independentemente da relação entre as taxas de amostragem nos dois eixos.

imagens contíguas no eixo-X, de forma a assegurar a correspondência correcta das posições.

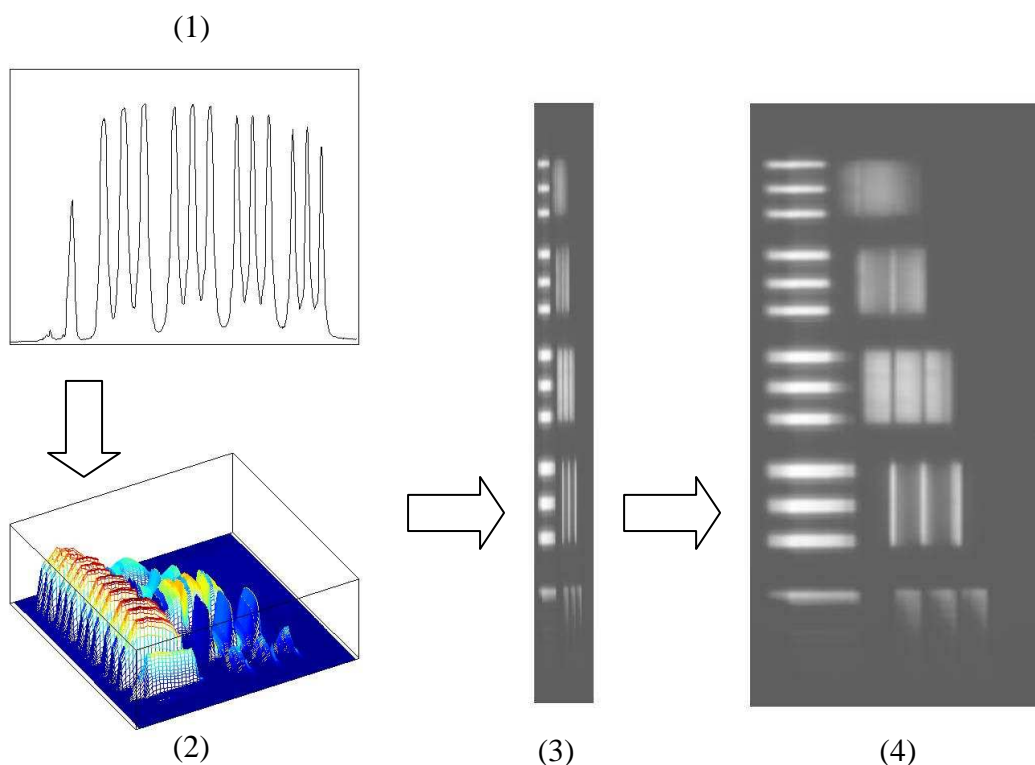


Figura 5.2. Esquema que descreve a construção de uma imagem 2D do alvo da USAF. (1) Imagem linear (dados de uma leitura do sensor); (2) Representação 3D dos valores da intensidade no plano XY (após varrimento no eixo-Y); (3) Imagem 2D com os dados lidos directamente do sensor; (4) Imagem 2D com escalas iguais nos dois eixos. Em (3) e (4): direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X.

5.2.2. Extracção e visualização de informação 3D

As imagens lineares obtidas em cada aquisição de dados do sensor, e as consequentes imagens 2D, são degradadas devido ao facto de a luz recolhida poder ser proveniente de pontos do objecto a profundidades diferentes. Resulta assim numa imagem que contém pontos que deveriam estar nítidos mas que se tornam esbatidos pela referida luz vinda de planos anteriores e posteriores ao plano focal.

Nos microscópios ópticos de varrimento, em que um dos exemplos é o microscópio confocal, para se obter uma imagem que contenha esta informação 3D, são adquiridas imagens de planos do objecto a diferentes profundidades¹, através de varrimentos efectuados ao longo da direcção do eixo óptico, conhecida por direcção axial.

¹ É comum designarem-se estes planos axiais por secções ópticas.

Assim, neste sistema é também efectuado o deslocamento da plataforma XYZ ao longo dessa direcção, designada por eixo-Z. Da mesma forma que no eixo-Y, usaram-se intervalos de amostragem de 1 μm até 20 μm , definidos pelo espaçamento mínimo no varrimento. Como a resolução axial de um sistema depende da abertura numérica da objectiva, a escolha da taxa de amostragem espacial deve ter em consideração a objectiva usada, 0,4 NA ou 0,65 NA.

Existem diferentes formas de visualizar esta informação 3D [4], como é o caso das imagens *auto-focus*, em que se tem uma imagem com informação 3D visto que pontos na imagem estão focados a diferentes profundidades, ou dos mapas topográficos em que é feita uma representação 3D da altura de cada ponto no plano XY, $h(x_i, y_i)$. Nas aplicações do sistema será feita uma descrição mais detalhada dos métodos que foram implementados.

5.3. Wire bonding

No fabrico de ICs usam-se fios metálicos (cobre, ouro ou alumínio) para fazer a ligação entre o *chip* de silício e os terminais (pinos) do IC (*wire bonding*). No processo de soldagem, o fio de ligação é sujeito a uma pressão que pode originar uma microestrutura com relevo, constituindo assim um objecto de teste interessante. Além disso, a visualização do fio à medida que se afasta da *pad*¹, exige capacidade de discriminação axial pois o fio estende-se por pontos com diferentes valores de altura/profundidade.

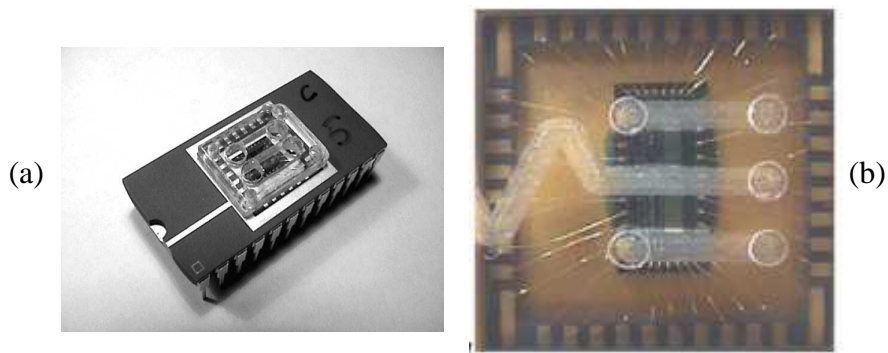


Figura 5.3. Fotos: (a) *lab-on-a-chip*, (b) pormenor das ligações do fio metálico às *pads* (*wire bonding*) ((a) reproduzida de [5] e (b) adaptada de [6]).

Foi então usado como objecto o IC² que se mostra na figura 5.3 [5,6], com o objectivo de recolher imagens da ligação do fio. Esta é uma tarefa de inspecção realizada no processo

¹ Pequena área metálica onde se faz a soldadura do fio.

² *Lab-on-a-chip* cedido pelo Prof. José Higinio Correia da Universidade do Minho

de fabrico de ICs, após a operação de *bonding*. O diâmetro do fio de ligação depende da aplicação mas é normalmente da ordem de algumas dezenas de *microns*.

5.3.1. Montagem óptica

A configuração usada foi a de campo amplo, portanto sem a colocação de qualquer fenda de iluminação. Usou-se a objectiva 20X 0,4NA que tem pior capacidade de discriminação axial mas maior distância de trabalho e FOV. O esquema da montagem óptica é apresentado na figura 5.4.

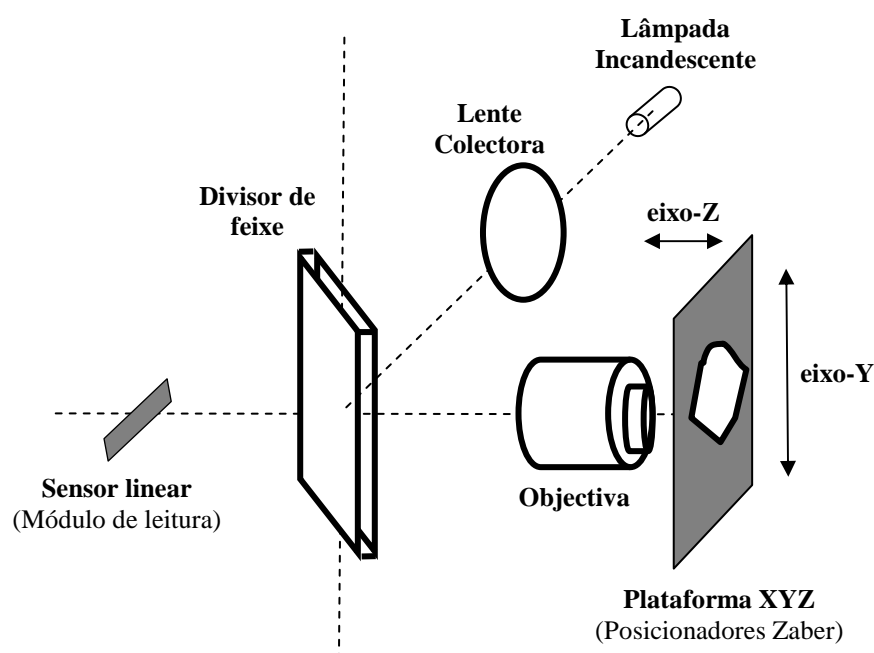


Figura 5.4. Esquema da montagem óptica com iluminação de campo amplo.

5.3.2. Reconstrução de imagens 3D

Foi feita a aquisição de imagens da ligação do fio em diferentes *pads* do IC. Não se efectuou qualquer varrimento na eixo-X, fazendo-se no eixo-Y para se obter cada imagem 2D e no eixo-Z para posteriormente, por aplicação de algoritmos de reconstrução, se extrair a informação 3D.

No entanto, no caso de uma das *pads*, adquiriu-se uma imagem de forma diferente, que é apresentada na figura 5.5, com a intervenção do operador durante o processo. Esta imagem, que se designa por *best-focus*, foi então construída, procurando-se em cada aquisição de uma imagem linear, a melhor focagem nos pontos do fio. Com uma amostragem no eixo-Y de 20 μm , em cada uma destas posições ajustava-se a posição no eixo-Z, até se encontrar aquela em que a imagem linear tivesse o fio melhor focado, isto

é, correspondesse ao plano axial mais próximo do plano focal do fio, para essa posição no eixo-Y. Conforme se pode observar na figura 5.5, o fio tem a orientação perpendicular ao sensor (eixo-Y).

Dada a forma como foi adquirida, a amostragem no eixo-Z não foi fixa. Repare-se que esta imagem com informação 3D foi construída a partir de imagens lineares em profundidades diferentes, não sendo portanto adquirido um conjunto de imagens 2D, mas apenas o equivalente a uma única imagem 2D.

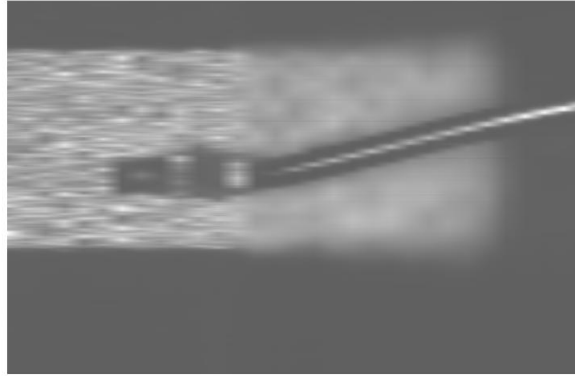


Figura 5.5. Imagem *best-focus* do fio de ligação. FOV: 620 μm x 400 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).

Posteriormente foram adquiridas seis imagens 2D da mesma *pad*, com espaçamentos de 9 μm (no eixo-Z). No eixo-Y o espaçamento foi igual ao da imagem anterior (20 μm). Estas seis imagens apresentam-se na figura 5.6 (a).

Aplicou-se um algoritmo desenvolvido com base num descrito na literatura [7], de forma a se obterem imagens com melhor contraste, em que se usaram as expressões (5.1).

$$I_{out}(x_i, y_i, z_k) = I(x_i, y_i, z_k) + inda \cdot I_n(x_i, y_i, z_{k-1}) + indb \cdot I_n(x_i, y_i, z_{k+1})$$

$$I_n(x_i, y_i, z_k) = \frac{1}{(N \cdot M)} \sum_{a=-(N-1)/2}^{(N-1)/2} \sum_{b=-(M-1)/2}^{(M-1)/2} I(x_i + a, y_i + b, z_k) \quad (5.1)$$

em que N e M são os parâmetros que definem a ROI que se pretende considerar, estabelecendo o número de pixels e de imagens lineares, respectivamente. Os parâmetros *inda* e *indb* são ajustáveis, tendo que obedecer à condição $-0,5 \leq inda, indb \leq 0$. Após alguns testes, optou-se pelos valores intermédios, isto é, $inda = indb = -0,25$.

A selecção dos parâmetros a usar foi feita com base no desenho da figura 5.7. Como se pode observar, usando este sensor e efectuando varrimentos no eixo-Y de 20 μm , existem zonas do objecto que poderão ser iluminadas mas que não são visualizadas. De facto o FOV efectivo com esta objectiva, tendo sido medido no eixo-X a partir das imagens adquiridas, é de 210 μm x 6,25 μm , sendo este último valor determinado pela altura dos

pixels ($125 \mu\text{m} / 20$). Para se definir uma ROI quadrada de modo a ser considerada no cálculo do I_n , usou-se a combinação $N \times M$ igual a 17×1 , pois traduz a relação entre a amostragem nos eixos-X e Y^1 que, neste caso, é determinada pelas dimensões do sensor.

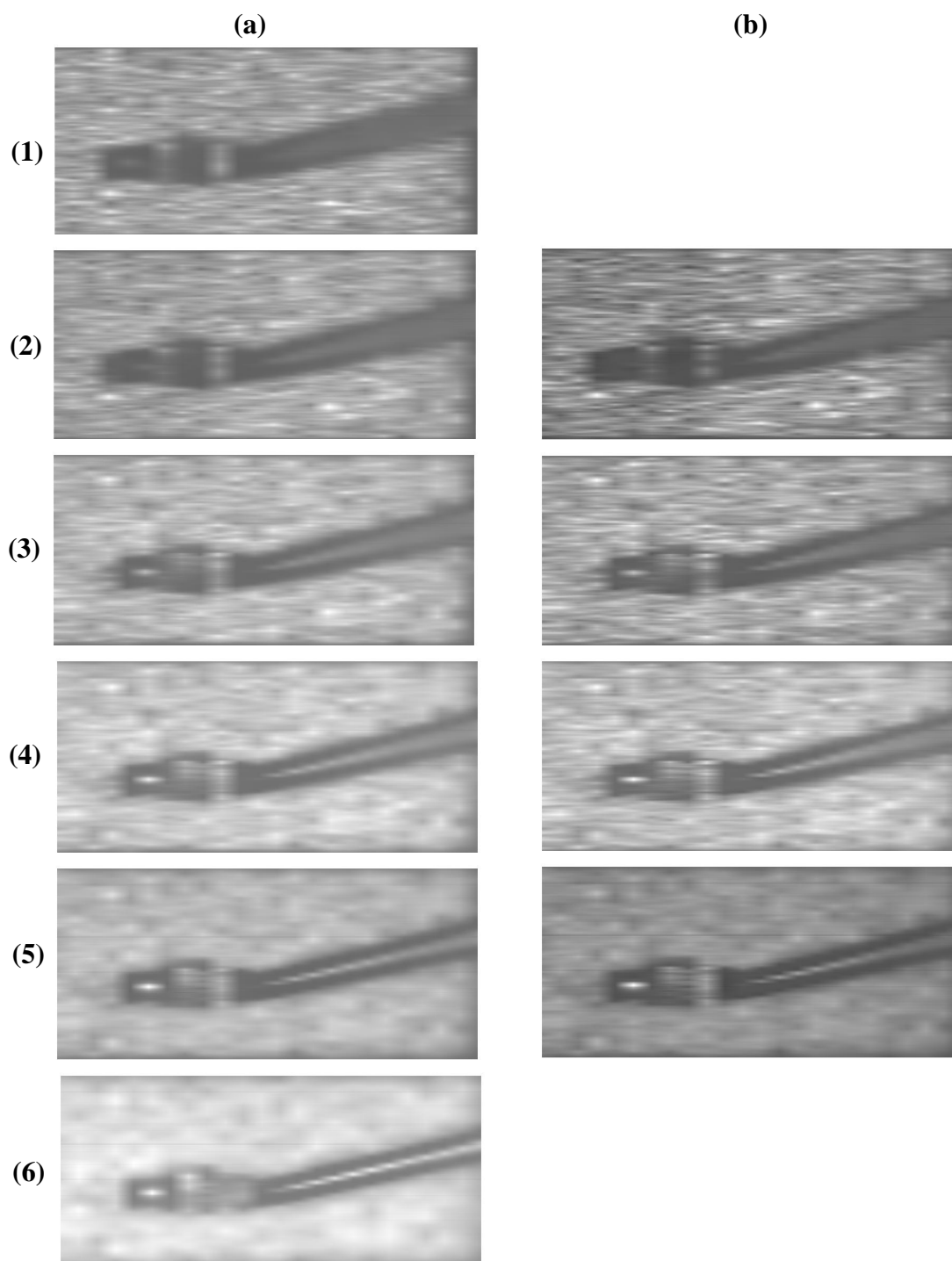


Figura 5.6. Imagens do fio de ligação: (a) seis imagens *raw-data* de planos XY separados entre si de $9 \mu\text{m}$; (b) imagens correspondentes aos planos 2 a 5 obtidas com os valores de $I_{out}(x_i, y_i, z_k)$ calculados com a expressão (5.1). FOV: $460 \mu\text{m} \times 210 \mu\text{m}$ (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).

¹ A relação é de 16×1 mas no algoritmo devem usar-se valores de N e M ímpares.

Para se obterem estas imagens de melhor contraste, usam-se as correspondentes aos planos imediatamente anterior e posterior, pelo que só é possível obter quatro imagens respeitantes aos planos 2 a 5, que se mostram também na figura 5.6 (b).

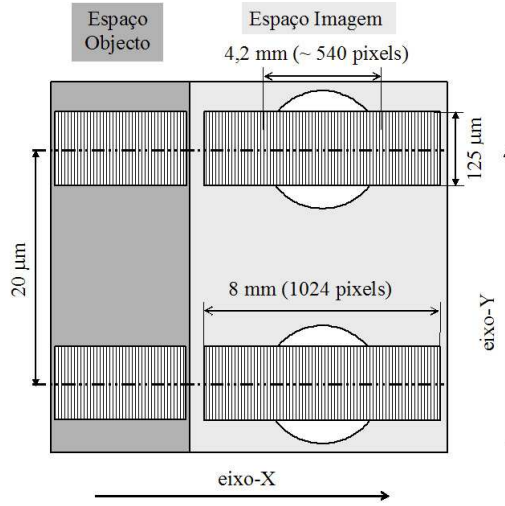


Figura 5.7. Esquema para ilustrar a relação entre o número de pixels e o número de imagens em linha para o FOV de 210 µm no espaço imagem, no caso em que os espaçamentos no eixo-Y são de 20 µm.

Na figura 5.8 são apresentadas duas imagens *auto-focus* calculadas de formas diferentes. Para a construção da imagem *auto-focus* na figura 5.8 (a) foi determinado, para cada pixel, o valor máximo de intensidade de entre as seis imagens *raw-data*, de acordo com a expressão (5.2):

$$I(x_i, y_i) = \underset{k=1}{\overset{N}{\text{MAX}}} I(x_i, y_i, z_k) \quad (5.2)$$

Com o objectivo de reduzir a luz proveniente de planos anteriores e posteriores ao plano focal, que torna a imagem menos nítida, foram aplicadas as expressões (5.3), também adaptadas do algoritmo descrito na literatura [7].

$$I_{ext}(x_i, y_i) = \underset{k=1}{\overset{S}{\text{MAX}}} \left[\frac{\sum_{a=-(N-1)/2}^{(N-1)/2} \sum_{b=-(M-1)/2}^{(M-1)/2} (I_m(x_i, y_i, z_k) - I(x_i + a, y_i + b, z_k))^2}{I_m^2(x_i, y_i, z_k)} \right] \quad (5.3)$$

$$I_m(x_i, y_i, z_k) = \frac{1}{(N \cdot M)} \sum_{a=-(N-1)/2}^{(N-1)/2} \sum_{b=-(M-1)/2}^{(M-1)/2} I(x_i + a, y_i + b, z_k)$$

em que N e M têm o significado igual ao apresentado para a expressão (5.1). O número de imagens 2D usadas é definido por S .

A partir da aplicação deste algoritmo podem-se usar três modos de visualização:

- (1) Imagem obtida directamente com os valores resultantes da expressão (5.3), isto é, com $I_{ext}(x_i, y_i)$;
- (2) Imagem obtida com os valores da imagem raw-data, $I(x_i, y_i, z_k)$, em que z_k é a posição, no eixo-Z, em que $I_{ext}(x_i, y_i)$ é máximo;
- (3) Mapa topográfico obtido com os valores $h(x_i, y_i)$ que correspondem aos valores z_k , posição no eixo-Z, em que $I_{ext}(x_i, y_i)$ é máximo.

A imagem *auto-focus* na figura 5.8 (b) corresponde ao modo de visualização referido no ponto (2), com a parametrização 17 x 1, que indica a combinação $N \times M$ usada. A imagem descrita no ponto (1) contém valores que resultam da aplicação do algoritmo, não reproduzindo a imagem *raw-data*. Esta imagem não é apresentada.

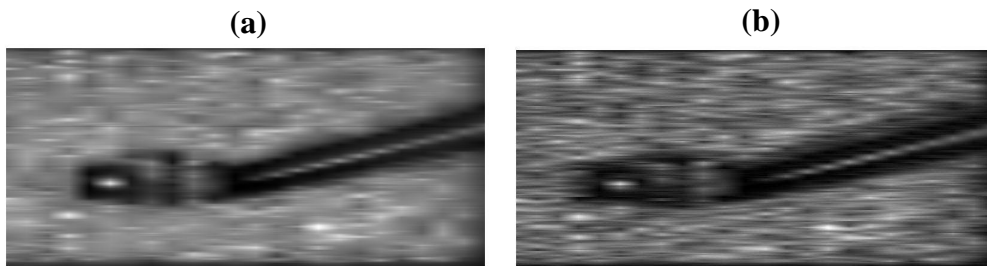


Figura 5.8. Imagens *auto-focus* obtidas com: (a) valores máximos das seis imagens *raw-data* $I(x_i, y_i, z_k)$; (b) valores da imagem *raw-data*, $I(x_i, y_i, z_k)$, em que z_k é a posição, no eixo-Z, em que $I_{ext}(x_i, y_i)$ é máximo. FOV: 460 μm x 210 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).

Na figura 5.9 apresentam-se os mapas 3D respectivos. Significa que os valores das alturas $h(x_i, y_i)$ representadas são os valores da posição no eixo-Z em que, para cada ponto (x_i, y_i) , se têm os valores máximos de $I(x_i, y_i)$ e $I_{ext}(x_i, y_i)$, respectivamente.

No interior da oval a tracejado na figura 5.9 (a) pode observar-se uma estrutura linear com a mesma orientação que a da figura (b). É muito mais difícil de visualizar em (a) porque em (b) os valores da altura nos pontos envolventes ao fio de ligação são muito menores e com uma boa uniformidade.

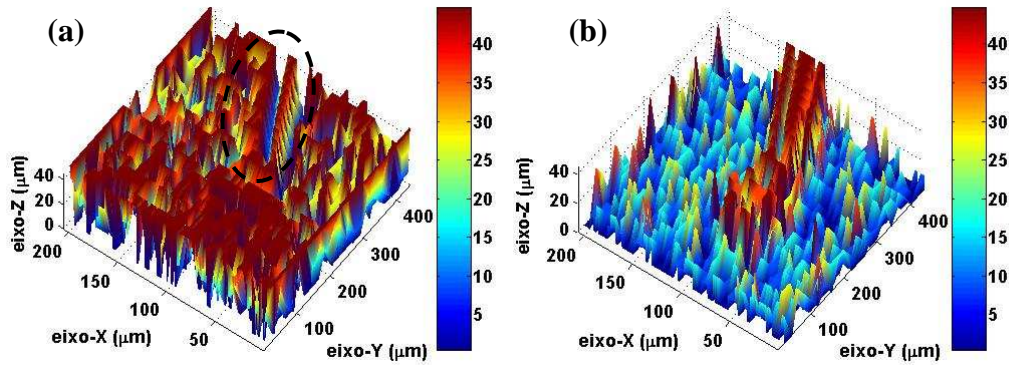


Figura 5.9. Mapas 3D obtidos com os valores da altura em que se têm os valores máximos de: (a) $I(x_i, y_i)$; (b) $I_{ext}(x_i, y_i)$ com a parametrização 17 x 1.

5.3.2.1. Cálculo do diâmetro do fio de ligação

Para se determinar a diâmetro do fio metálico usaram-se três imagens:

- (1) Imagem *auto-focus* obtida com os valores máximos das seis imagens *raw-data* $I(x_i, y_i, z_k)$ - figura 5.8 (a) -;
- (2) Imagem *auto-focus* obtida com os valores da imagem *raw-data*, $I(x_i, y_i, z_k)$, em que z_k é a posição, no eixo-Z, em que $I_{ext}(x_i, y_i)$ é máximo - figura 5.8 (b) -;
- (3) Imagem construída com os valores da altura $h(x_i, y_i)$ representados no mapa topográfico representado na figura 5.9 (b). Na figura 5.10 (c) mostra-se esta imagem.

Definiu-se uma ROI com 300 pixels (117 μm) e doze imagens lineares (220 μm), em que o fio não está em contacto com a *pad*. Na figura 5.10 (a), (b) e (d) pode ver-se essa ROI retirada das três imagens usadas.

O método de cálculo do diâmetro consistiu então em, na ROI definida, obter a FWHM¹ para cada imagem linear, e em seguida calcular o valor médio e o desvio padrão, para o caso da imagem (3). Para o caso das outras duas imagens, (1) e (2), o método foi semelhante, mas como os valores da imagem do fio têm valores de intensidade menores, calculou-se a FWHm (Full Width at Half minimum), de modo análogo ao descrito para a FWHM.

¹ Não se trata rigorosamente da FWHM dado que se determina apenas o número de pixels em cada imagem linear, cujos valores de intensidades são superiores a metade do valor máximo da intensidade nessa imagem linear.

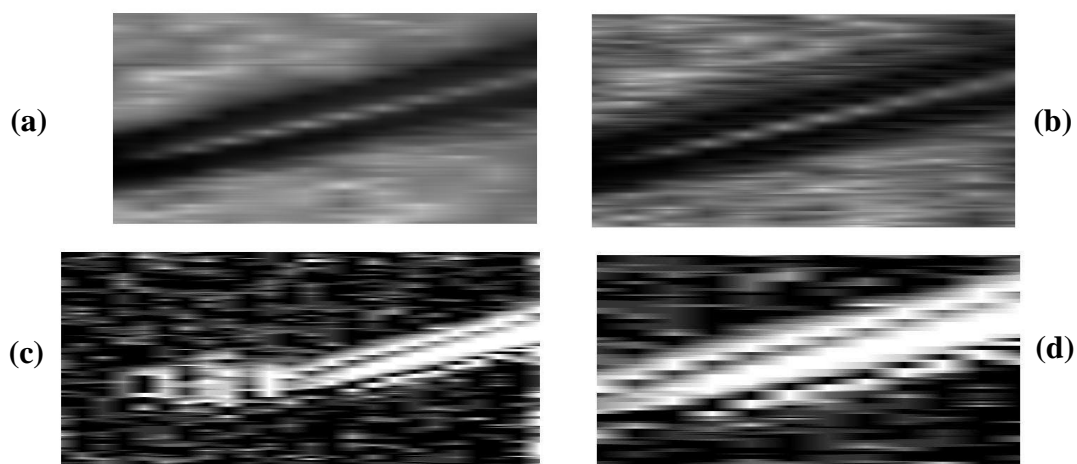


Figura 5.10. Imagens da ROI, retiradas da imagem referida: (a) no ponto (1); (b) no ponto (2); (d) no ponto (3). FOV: 220 μm x 117 μm). Imagem (d) retirada da imagem completa apresentada em (c) que foi obtida a partir do mapa topográfico. FOV: 460 μm x 210 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X) (a imagem (c) está numa escala diferente).

Na tabela 5.3 apresentam-se os valores do diâmetro obtidos com as três imagens. Com a imagem (2) obteve-se um diâmetro muito superior ao das outras duas imagens, devendo definir-se um valor de *threshold* diferente de 50%, que foi o usado no cálculo da FWHM.

Imagem	Diâmetro do fio	
	Média	Desvio padrão
(1)	43,06 μm	4,51 μm
(2)	61,78 μm	6,83 μm
(3)	36,24 μm	7,97 μm

Tabela 5.3. Valores da média e desvio padrão do diâmetro do fio obtidos para as imagens (1), (2) e (3) representadas na figura 5.10 (a), (b) e (d), respectivamente.

5.3.2.1. Comparação de imagens com taxas de amostragem diferentes

Para se avaliar o efeito da taxa de amostragem nas imagens, foram adquiridas três outras imagens da mesma *pad* separadas axialmente entre si de 20 μm , mas com espaçamentos no eixo-Y de 5 μm e com um FOV menor. Na figura 5.11 (a) mostram-se estas imagens. As três imagens apresentadas em (b) são referentes aos mesmos três planos axiais¹, mas retiradas das imagens da aquisição anterior, em que se definiu uma ROI de forma a coincidir com as representadas em (a). Por comparação entre as imagens de cada um dos três pares (a) e (b), verifica-se que a forma da *pad* está muito melhor definida nas

¹ Em rigor os planos axiais não são os mesmos nas imagens 5.11 (a) e (b), devido à diferença entre as respectivas taxas de amostragem no eixo-Z, mas a diferença é no máximo de 3 μm .

imagens (a), com maior taxa de amostragem espacial no eixo-Y, mas as diferenças atenuam-se no par de imagens (3), em que o plano focal está mais afastado da *pad*.

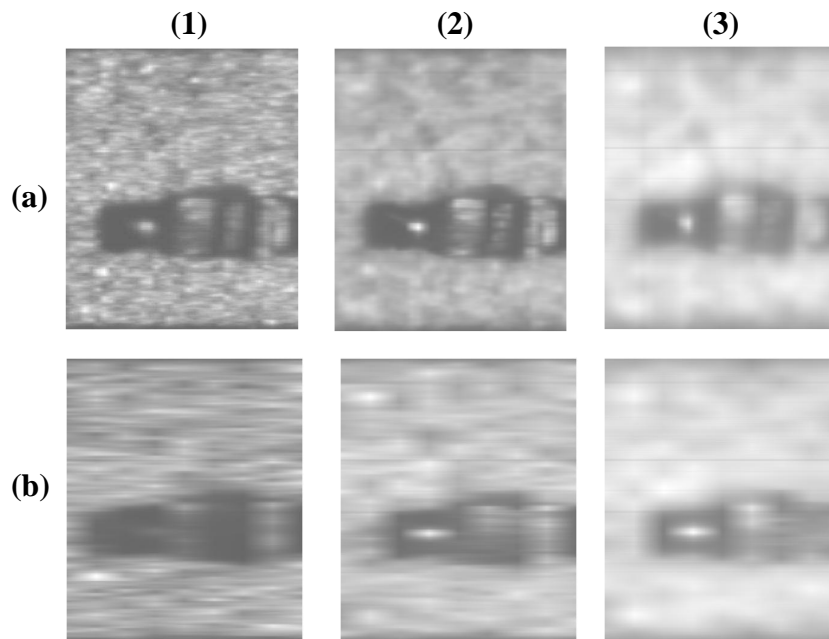


Figura 5.11. Imagens de 3 planos XY com espaçamentos de $20\ \mu\text{m}$. Imagens com amostragem no eixo-Y igual a: (a) $5\ \mu\text{m}$; (b) $20\ \mu\text{m}$. FOV: $180\ \mu\text{m} \times 210\ \mu\text{m}$ (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).

A diferença entre as taxas de amostragem no eixo-Y está bem patente ao comparar-se o desenho da figura 5.12 com o que foi apresentado na figura 5.7.

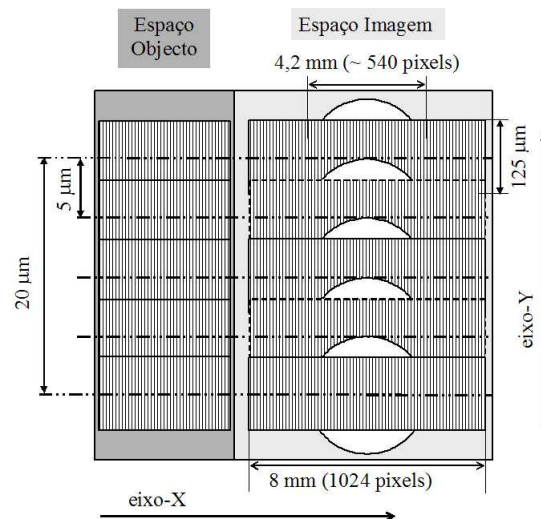


Figura 5.12. Esquema para ilustrar a relação entre o número de pixels e o número de imagens em linha para o FOV de $210\ \mu\text{m}$ no espaço imagem, no caso em que os espaçamentos no eixo-Y são de $5\ \mu\text{m}$.

Os FOVs são idênticos nos dois casos, pois são independentes da taxa de amostragem. Ao contrário do caso anterior, em que existem zonas do objecto que poderão ser iluminadas

mas que não são visualizadas, existe agora sobreposição dos FOVs quando se faz o varrimento no eixo-Y. Isto porque o deslocamento de 5 μm corresponde, com a objectiva 20X, a 100 μm no espaço Imagem. Como a altura dos pixels é de 125 μm , existe uma sobreposição na ROI recolhida no sensor numa determinada imagem em linha, com 1/5 das imagens em linha imediatamente anterior e posterior.

Na figura 5.13 (a) e (b), com espaçamentos no eixo-Y de 5 μm e 20 μm , respectivamente, apresentam-se os dois tipos de imagem *auto-focus*, descritos anteriormente, novamente para se visualizar o efeito da taxa de amostragem. Para o caso da amostragem de 5 μm , aplicou-se a expressão (5.3) para a determinação do $I_{ext}(x_i, y_i)$, mas no cálculo do I_m , usou-se a combinação $N \times M$ com a parametrização 17 x 3, de acordo com a expressão (5.4), para incluir o factor de 1/5 nas imagens vizinhas.

$$I_m(x_i, y_i, z_k) = \frac{1}{(N \cdot 7/5)} \sum_{a=-(N-1)/2}^{(N-1)/2} \left[I(x_i + a, y_i, z_k) + \frac{I(x_i + a, y_i - 1, z_k) + I(x_i + a, y_i + 1, z_k)}{5} \right] \quad (5.4)$$

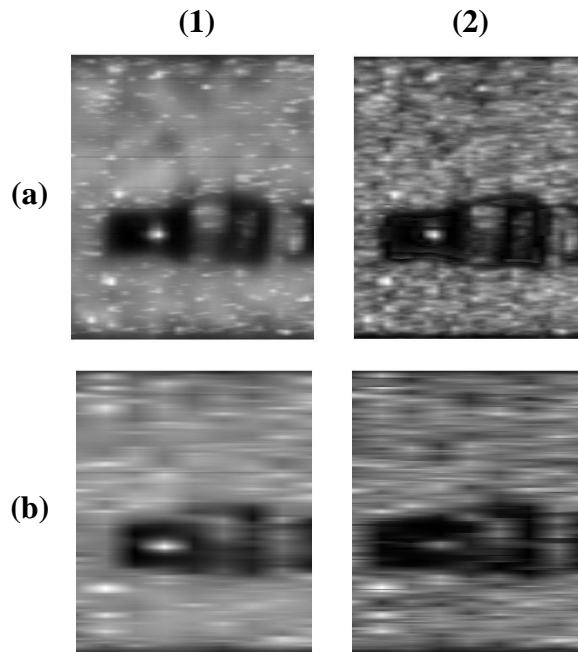


Figura 5.13. Imagens *auto-focus* obtidas com: (1) valores máximos das imagens *raw-data* $I(x_i, y_i, z_k)$ dos vários planos focais; (2) valores da imagem *raw-data*, $I(x_i, y_i, z_k)$, em que z_k é a posição, no eixo-Z, em que $I_{ext}(x_i, y_i)$ é máximo. Imagens com amostragem no eixo-Y igual a: (a) 5 μm (e três planos focais); (b) 20 μm (e seis planos focais). FOV: 180 μm x 210 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X).

Por fim é feita a comparação dos mapas topográficos obtidos com os dois conjuntos de imagens, bem como são apresentados os mapas que resultam da aplicação de diferentes algoritmos ao conjunto de imagens com a taxa de amostragem de 5 μm no eixo-Y.

Assim na figura 5.14 (a) a (c) apresentam-se, respectivamente, os mapas 3D obtidos com os valores da altura em que se têm os valores máximos de $I(x_i, y_i)$ e $I_{ext}(x_i, y_i)$, com as parametrizações 17 x 3, de acordo com a expressão (5.4), e 17 x 1, de acordo com a expressão (5.3). Todos estes mapas são relativos às imagens com a taxa de amostragem no eixo-Y de 5 μm .

O mapa da figura 5.14 (d) foi obtido exactamente da mesma forma que a (c) mas usando as imagens com a taxa de amostragem no eixo-Y de 20 μm . Este mapa não permite identificar a estrutura que se observa nas imagens da figura 5.13 (b). Também no mapa da figura 5.14 (a), de forma muito semelhante ao apresentado na figura 5.9 (a), dificilmente se consegue observar essa estrutura no interior da oval. Pelo contrário nas figuras 5.9 (b) e (c) é feita uma reconstrução dessa estrutura mas é na (b), resultante da aplicação da expressão (5.4), que se obtém uma superfície mais regular na zona envolvente à estrutura.

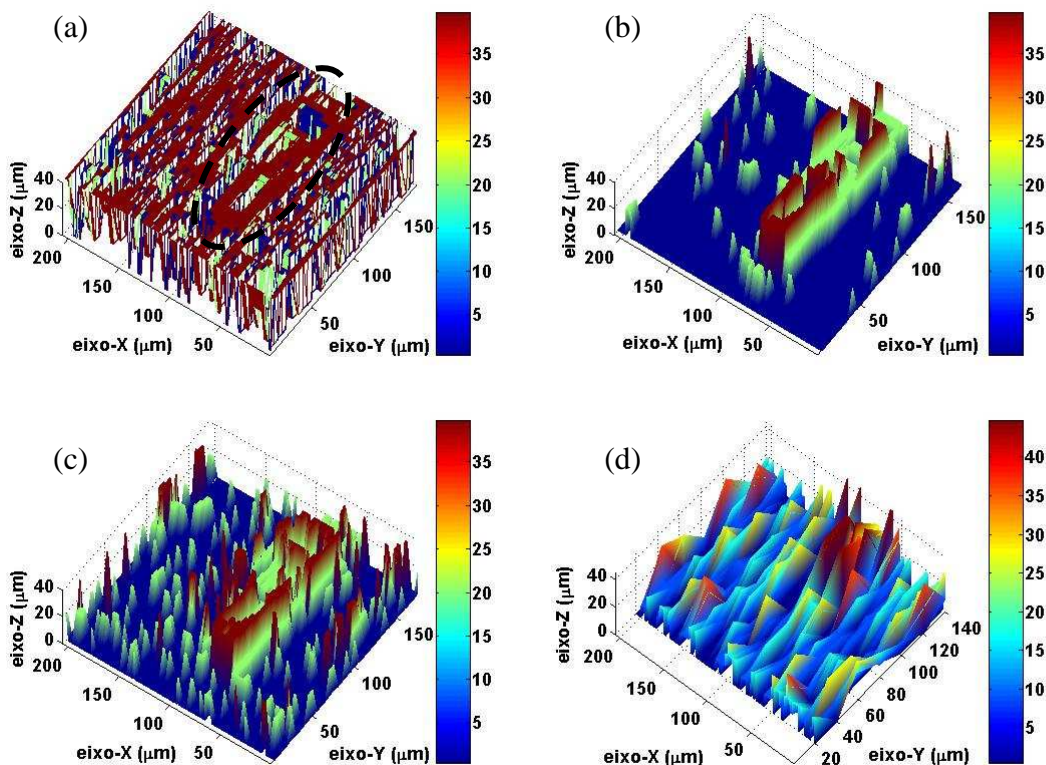


Figura 5.14. Mapas 3D obtidos com os valores da altura em que se têm os valores máximos de: (a) $I(x_i, y_i)$; (b) $I_{ext}(x_i, y_i)$ com a parametrização 17 x 3; (c) com a parametrização 17 x 1, todos relativos às imagens com taxa de amostragem de 5 μm . (d) Mapa 3D obtido da mesma forma que (c) mas para as imagens com taxa de amostragem de 20 μm .

5.3.3. Conclusão

Foram construídas imagens com informação de diferentes planos axiais. A imagem designada por *best-focus* permite observar com nitidez o fio na sua ligação à *pad* e ao longo de um comprimento de algumas centenas de *microns*. Também na imagem *auto-focus* o fio aparece sempre com os seus contornos bem definidos, mesmo ocorrendo variações nas suas posições axiais.

Com a aplicação de um algoritmo adaptado da literatura foi possível obter um mapa 3D que traduz consistentemente as dimensões do fio, usando uma parametrização que resulta da geometria do sensor.

Os valores do diâmetro do fio calculados a partir da imagem *auto-focus* e da imagem construída a partir do mapa 3D são consistentes, obtendo-se um valor próximo dos 40 μm , mas o desvio padrão no segundo caso é muito elevado. O valor obtido com a imagem *auto-focus* resultante da aplicação do algoritmo é demasiado elevado, sendo afectado pelo menor contraste na imagem, o que poderia ser ultrapassado definindo um valor para o *threshold* menor do que os 50%.

Demonstrou-se a importância de uma amostragem adequada, por comparação das imagens *auto-focus* e mapas 3D, obtidos com amostragens no eixo-Y de 5 μm e 20 μm . Verificou-se que a aplicação do algoritmo com a parametrização que traduz a geometria do sensor e a amostragem nas duas direcções laterais é a que permite fazer uma melhor reconstrução 3D.

5.4. Perfilometria¹

No capítulo 2 foram representadas as curvas de resposta axial para diferentes configurações de microscópios ópticos, em particular aqueles em que os detectores são aberturas circulares ou do tipo fenda. Como exemplo, apresenta-se na expressão (5.5), a resposta axial, $I(z)$, para o caso do microscópio confocal, considerando um plano como objecto, que é proporcional ao quadrado de uma função *sinc*:

$$I(z) = \left(\frac{\sin[kz(1 - \cos \alpha)]}{kz(1 - \cos \alpha)} \right)^2 \cdot I_0 \quad (5.5)$$

¹ *Profilometry*

em que k é o número de onda da luz, α é a semi-abertura angular da objectiva e z o afastamento relativamente à posição focal ($z = 0$) na qual a intensidade é I_0 .

A dependência dos dois primeiros factores é comum a outros tipos de configuração, particularmente para detectores do tipo fenda. De igual modo, o parâmetro da FWHM das curvas $I(z)$, usado como uma medida da resposta em profundidade (axial), tem em comum ser dependente do comprimento de onda da luz e da abertura angular (ou da abertura numérica) da objectiva. Usando, novamente, o exemplo do microscópio confocal tem-se a expressão (5.6) [1].

$$FWHM = 2 z_{1/2} \approx \frac{0,443\lambda}{1 - \cos \alpha} \quad (5.6)$$

Conclui-se, portanto, que com uma maior semi-abertura angular da objectiva se consegue uma melhor resolução em profundidade (e também resolução lateral).

A utilização destas técnicas ópticas neste tipo de aplicação¹ tem como maior ponto fraco, a impossibilidade de medir a inclinação e altura de superfícies com valores elevados. É a abertura numérica da objectiva, que está relacionada com a abertura angular, logo com o cone de luz que consegue captar, que determina esses valores máximos.

Existe então um compromisso a fazer para a obtenção destes dois parâmetros, visto que com uma objectiva com maior abertura numérica é possível medir maiores inclinações de superfícies mas com um menor valor máximo da altura. Como a sua distância de trabalho é menor, e a sua ampliação é maior, obter-se-á um FOV menor [1]. Todavia as superfícies que se pretendem medir têm normalmente inclinações pequenas, que podem ser medidas mesmo com uma objectiva 20X 0,4NA [1].

A inclinação, ou declive, da superfície tem então um valor máximo determinado pelo semi-ângulo da abertura numérica, que é dado pela expressão (5.7), para o caso de reflexão (especular) num elemento microscópico liso, da superfície do objecto [1].

$$\alpha_{max}^{spec} = 0,5 \cdot \sin^{-1} NA \quad (5.7)$$

No entanto, nestas superfícies existem frequentemente pequenas rugosidades dentro dos limites do ponto de iluminação. Consequentemente a reflexão difusa aumenta o declive máximo, da superfície, que é possível medir ($\alpha^{dif} \geq \alpha_{max}^{spec}$), logo o valor α_{max}^{spec} refere-se a um limite inferior do declive máximo da superfície.

¹ Em perfilometria pretende-se construir perfis 2D ou 3D com o objectivo de medir algumas dimensões como altura / profundidade ou largura.

5.4.1. Componente micromaquinado

Foi usado um microinterferómetro¹ de Fabry-Perot [8] que contém um diafragma com uma estrutura 3D, configurando um objecto de teste interessante. Na figura 5.15 pode-se observar o componente e um esquema dessa sua estrutura mais central, que se designa por diafragma.

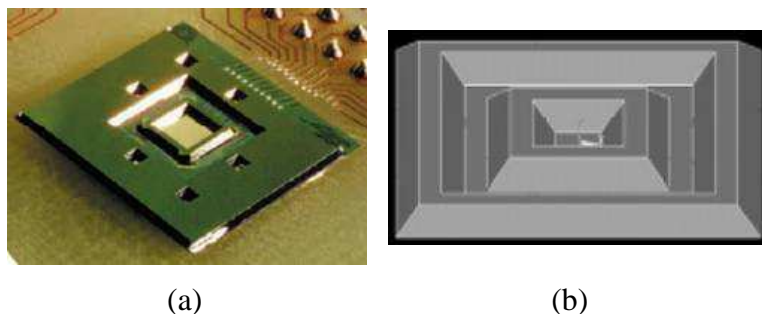


Figura 5.15. (a) Foto do microinterferómetro de Fabry-Perot; (b) esquema do seu diafragma (reproduzidas (a) de [9] e (b) de [8]).

Para que se possam interpretar os resultados obtidos com o sistema, apresenta-se na figura 5.16 um esquema mais detalhado, evidenciando a estrutura de silício. Estas microestruturas têm uma forma quadrada, em que o seu lado tem um comprimento entre 3 e 8 mm. A sua altura é de 525 μm e as paredes laterais têm uma inclinação de 54,74°. O topo tem uma largura de 50 μm , o que implica que a base tem uma largura de 794 μm .

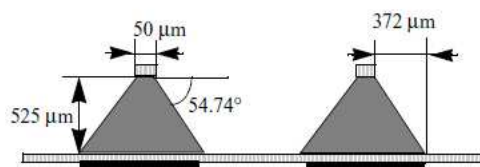


Figura 5.16. Esquema do perfil ilustrando as suas dimensões (reproduzida de [8]).

5.4.2. Montagem óptica

Foi usada iluminação em linha com a fenda de iluminação orientada na direcção do eixo-Y, portanto perpendicular ao sensor, conforme está ilustrado no esquema da figura 5.17. Esta opção foi tomada após a medição da resolução axial para diferentes configurações envolvendo a colocação de uma fenda de 200 μm ou 1 mm na direcção horizontal (eixo-X) ou na vertical (eixo-Y). Usou-se o método descrito no capítulo 4, com o varrimento do espelho plano ao longo da direcção axial (eixo-Z) a ser feito com espaçamentos de 5 μm .

¹ Componente cedido pelo Prof. José Higinio Correia da Universidade do Minho.

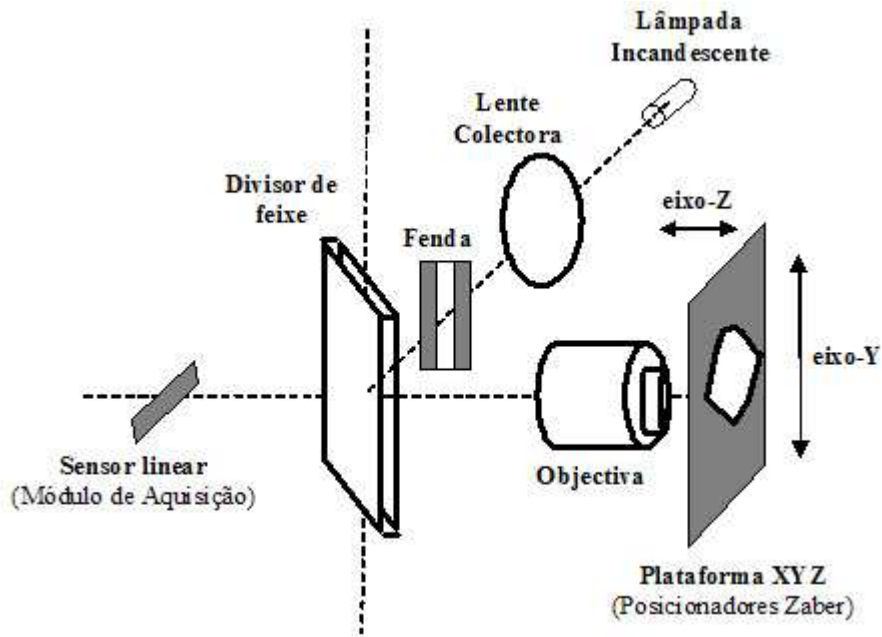


Figura 5.17. Esquema da montagem óptica com iluminação em linha na direcção perpendicular ao sensor.

Os valores máximos da intensidade num pixel do sensor para cada posição axial, subtraídos do fundo, são representados na figura 5.18 (a). A FWHM da curva $I(z)$ obtida é de aproximadamente $30\ \mu\text{m}$.

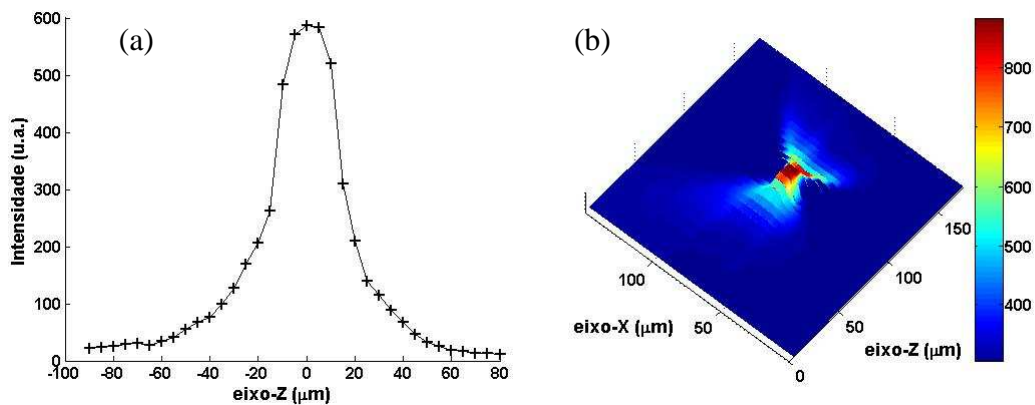


Figura 5.18. (a) Representação da curva $I(z)$; (b) distribuição da intensidade da luz no plano XZ.

A figura 5.18 (b) mostra a distribuição da intensidade da luz no plano XZ, em que o eixo-X é a direcção lateral correspondente ao sensor, logo perpendicular à linha de iluminação. A amostragem no eixo-X é função da largura dos pixels do sensor e com a objectiva usada (40X 0,65NA) é aproximadamente igual a $200\ \text{nm}$ no objecto. Verifica-se que o alargamento é mais rápido na direcção axial (eixo-Z) do que na direcção lateral.

5.4.3. Determinação dos perfis

O componente foi montado na plataforma XYZ para que a estrutura ficasse alinhada com a vertical (eixo-Y). Têm-se assim as paredes laterais da estrutura ao longo da direcção perpendicular ao sensor, portanto paralelas à direcção da iluminação em linha.

Os varrimentos foram executados nas três direcções XYZ, sendo que no eixo-Z o espaçamento foi sempre de 5 μm . Na tabela 5.4 indicam-se os parâmetros relativos ao posicionamento da plataforma durante a aquisição.

Eixo	ROI #	Intervalo de amostragem (μm)	Extensão (μm)
X	1	50	0-100
	2		500-800
	3		1200-1350
Y	1-3	500	0-2000
Z	1	5	0-90
	2		550-620
	3		0-70

Tabela 5.4. Parâmetros das amostragens efectuadas em cada um dos três eixos.

Salienta-se o facto de terem sido definidas três ROIs, com separação entre elas ao longo do eixo-X, pelo facto de nessas zonas de separação, a objectiva não captar a luz reflectida na superfície, e conseqüentemente não ser recolhida luz no sensor.

Nessas zonas de separação tem-se então uma inclinação da superfície superior ao valor da inclinação máxima para a objectiva usada, que é dada pela expressão (5.8).

$$\alpha_{\max} = 0,5 \cdot \sin^{-1} NA = 0,5 \cdot \sin^{-1}(0,65) \cong 20,3^\circ \quad (5.8)$$

Os perfis foram construídos com a aplicação MATLAB designada por *Profilometry_SiFrame*, cujo GUI se apresenta no apêndice 3.3. É calculada a posição axial ou altura da superfície em cada posição lateral (plano XY), a partir da distribuição da luz recolhida no sensor, $I(z)$. O valor da altura foi encontrado a partir da determinação do plano XY em que, nesse pixel, a intensidade tem o seu valor máximo¹. Dado que as superfícies do topo e da base da estrutura são de materiais diferentes [8], foi necessário regular a intensidade da iluminação para a situar dentro da gama dinâmica do sensor.

Por outro lado, como a iluminação em linha tem uma espessura finita, em cada posição lateral no eixo-X, ocorre a reflexão da luz por pontos do objecto em diferentes posições

¹ Outro método consiste no cálculo do centróide, ou centro de gravidade, da distribuição da intensidade em função da posição axial, $I(z)$ [1].

nesse eixo, que poderão encontrar-se a alturas diferentes. No entanto, a configuração usada reduz este efeito pelo facto de a linha de iluminação ser paralela à estrutura.

Na figura 5.19 estão representados os perfis 2D e 3D da estrutura. No perfil 2D da figura 5.19 (b) tem-se a altura representada em função do eixo-X, direcção do sensor, sendo este perfil extraído do 3D, pois corresponde a uma das linhas que atravessa a estrutura, conforme se mostra no perfil 3D da figura 5.19 (a).

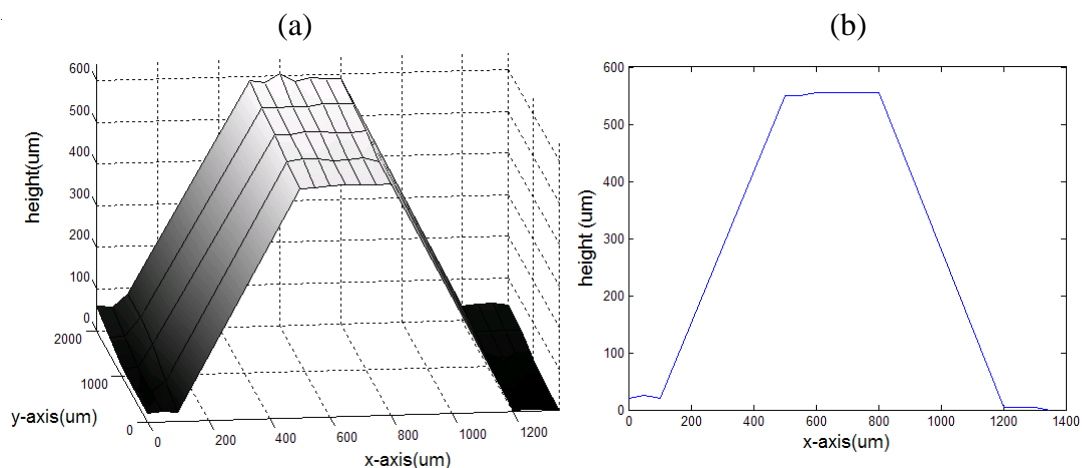


Figura 5.19. Perfis da estrutura em que o eixo-X e o eixo-Y representa a direcção perpendicular e paralela à sua lateral, respectivamente. (a) perfil 3D; (b) perfil 2D obtido com a primeira linha adquirida no sensor ($y = 0$) usada para construir o perfil em (a) [10].

A altura obtida a partir deste perfil 2D foi de $540 \mu\text{m}$, portanto muito próxima da especificação, apresentada na figura 5.16, de $525 \mu\text{m}$. Uma estimativa do valor da inclinação da superfície lateral da estrutura de silício, feita com base nos espaçamentos em que a objectiva não recolheu luz, forneceu um valor de $53,4^\circ$, comparável com o de $54,74^\circ$ indicado para o componente. Na figura 5.20 representa-se o perfil com os valores medidos das dimensões da estrutura.

Mesmo com a iluminação em linha paralela às paredes laterais da estrutura de silício, devido à largura finita da linha, é difícil separar uma amostragem no eixo-X das suas vizinhas. Este efeito é determinante próximo dos limites da superfície, paralela à iluminação em linha, no entanto no interior de uma superfície plana, o valor da altura determinado para cada posição, com o algoritmo simplificado referido acima, não será afectado. Poderá ser esta a explicação para o grande aumento no valor da largura do topo e base da estrutura, Mediram-se valores de $300 \mu\text{m}$ ($50 \mu\text{m}$) e $1100 \mu\text{m}$ ($794 \mu\text{m}$) para o topo e base, respectivamente, indicando-se entre parêntesis os valores reais. O erro absoluto é muito semelhante nos dois valores, apontando para a existência de um erro sistemático cuja causa poderá ser a indicada acima.

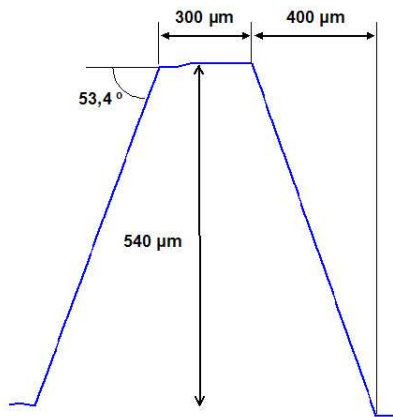


Figura 5.20. Perfil com os valores medidos das dimensões da estrutura (não se encontra à escala).

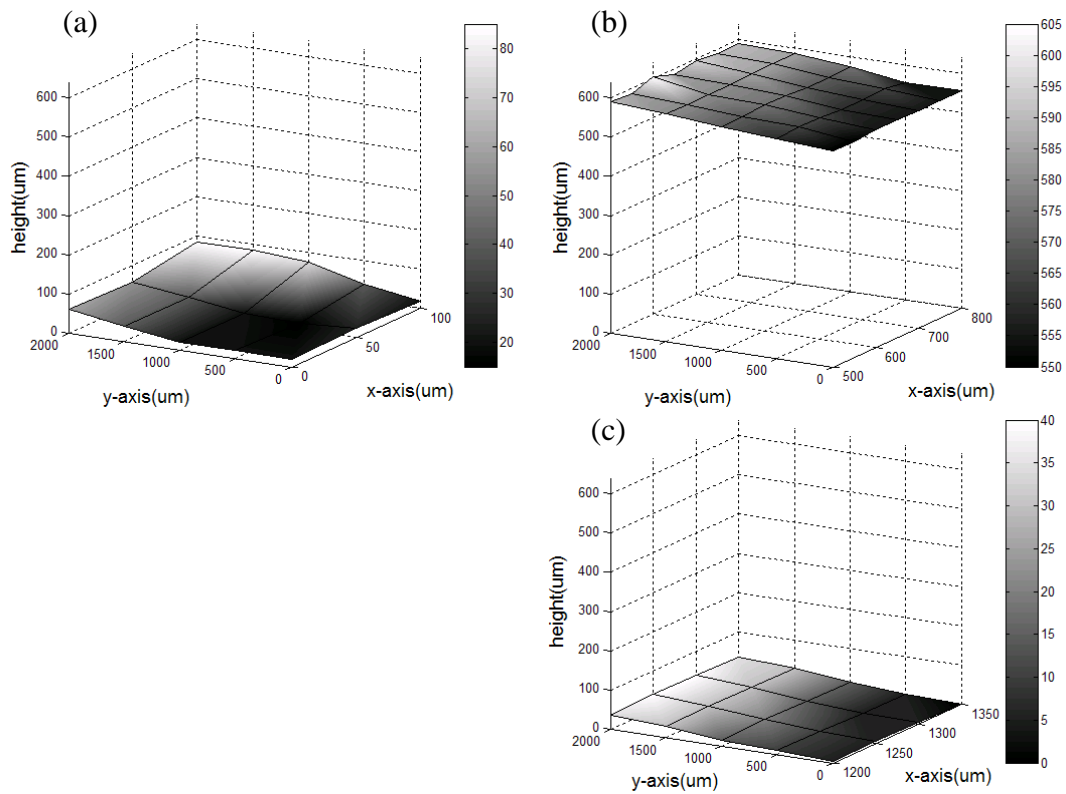


Figura 5.21. Perfis das três superfícies horizontais da estrutura, mostrando com mais detalhe as superfícies: (a) da esquerda; (b) centro; (c) direita do perfil 3D representado na figura 5.19 [10].

As três superfícies horizontais, as duas laterais e a do topo, estão representadas separadamente no figura 5.21. Os intervalos de amostragem no plano XY são iguais nas três. Pode observar-se a planeza, com a excepção da superfície lateral à esquerda da estrutura, figura 5.21 (a). É nítida uma evolução crescente dos valores da altura com o varrimento no eixo-Y em todas as superfícies, o que parece evidenciar uma montagem incorrecta da estrutura na plataforma XYZ.

Na superfície lateral referida, figura 5.21 (a), existe uma amplitude de variação de aproximadamente 100 μm na altura dos pontos da superfície, mas resultante de uma transição consistente presente nos perfis ao longo do eixo-Y, que poderá ser resultado de um defeito no processo de maquinagem.

5.4.4. Conclusão

Usando iluminação em linha com a direcção perpendicular ao sensor foi observado que, mesmo com a aplicação de um algoritmo simples de cálculo da altura, através da determinação do plano focal em que a intensidade é máxima para cada pixel, os perfis 3D obtidos para esta microestrutura permitem calcular o valor da altura e obter uma estimativa da inclinação, com erros relativos de 2,9% e 2,5%, respectivamente.

No entanto, os valores da largura das superfícies (planos horizontais) são muito superiores, sendo que para tal contribuem os efeitos inerentes ao facto de se usar uma fenda de iluminação com uma largura de 200 μm , causando assim uma menor definição dos limites desses planos. A provável montagem incorrecta do componente micromaquinado na plataforma XYZ será a causa de, em todas as superfícies dos três planos horizontais, se observar a mesma inclinação, só possível de detectar devido à boa planeza obtida no perfil de cada superfície.

5.5. Moeda de 1-cêntimo portuguesa

Este tipo de objecto, pelo seu relevo, é adequado para testar a capacidade de um microscópio obter imagens ou mapas topográficos 3D [1]. Na figura 5.22 mostram-se as duas faces de uma moeda de 1-cêntimo, sendo possível observar alguns caracteres e outras figuras cunhadas nas superfícies.

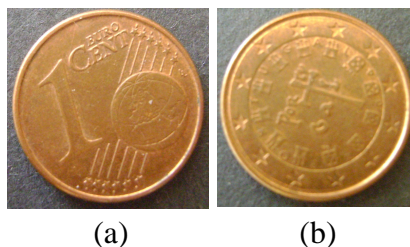


Figura 5.22. Imagens de uma moeda de 1-cêntimo (a) Face comum; (b) Face nacional. O seu diâmetro é de 16,25 mm.

5.5.1. Imagens e mapas 3D

Nos primeiros testes realizados usou-se a montagem da figura 4.14, com iluminação em linha paralela ao sensor. O processamento dos dados foi realizado com duas aplicações desenvolvidas em MATLAB: a *USAF_image* para a construção e visualização de imagens e a *Profilometry_SiFrame* para as representações 3D topográficas.

Na figura 5.23 apresenta-se uma imagem de um desses caracteres, construída a partir de cinco imagens 2D, em que existem descontinuidades em resultado da execução da função *montage*¹. O FOV para uma imagem recolhida com a objectiva 40X 0,65 usando os 1024 pixels do sensor, corresponde a 200 μm (no eixo-X) no objecto. No entanto, não se usaram todos os pixels, pelo que o FOV era pouco superior a 100 μm , que foi o valor do percurso do varrimento realizado na direcção do eixo-X. Com as cinco imagens consegue-se um FOV total de 560 μm (eixo-X) x 800 μm (eixo-Y). Este último valor corresponde ao varrimento total no eixo-Y efectuado com espaçamentos de 20 μm .

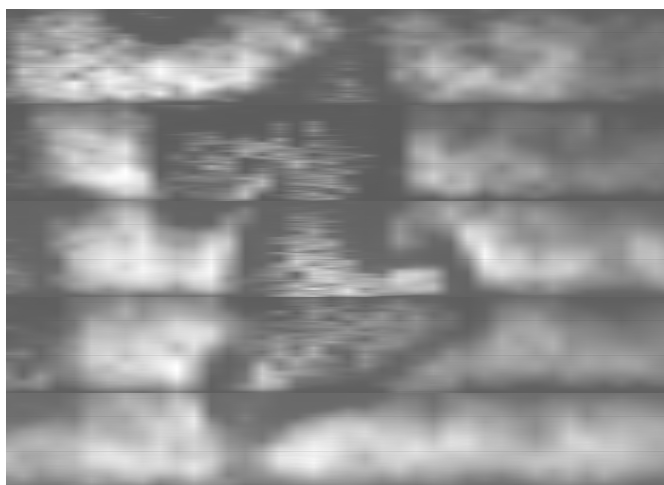


Figura 5.23. Imagem de uma estrutura em relevo numa moeda de 1 cêntimo portuguesa construída através da montagem de cinco imagens adquiridas em posições contíguas no eixo-X. FOV: 800 μm x 560 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X) [11].

Posteriormente usou-se a montagem da figura 4.1, também com iluminação em linha paralela ao sensor. Esta configuração e a anterior estão descritas na literatura em sistemas com iluminação em linha [12,13].

Foram recolhidas imagens de diversas áreas da face da moeda, tendo-se seleccionado algumas imagens que permitem ver estruturas cunhadas na moeda.

Em ambas as figuras seguintes, 5.24 e 5.25, apresentam-se nove imagens numa matriz de 3 x 3. Cada linha, (a) a (c), contém três imagens de planos XY, com uma separação entre

¹ Função do MATLAB que permite visualizar imagens múltiplas.

si de $20\ \mu\text{m}$ no eixo-Z. Por outro lado, as três imagens em cada coluna, (1) a (3), situam-se na mesma posição axial (eixo-Z) mas estão deslocadas, no plano XY. Estas ROIs têm um espaçamento de $500\ \mu\text{m}$ na direcção paralela ao sensor (eixo-X).

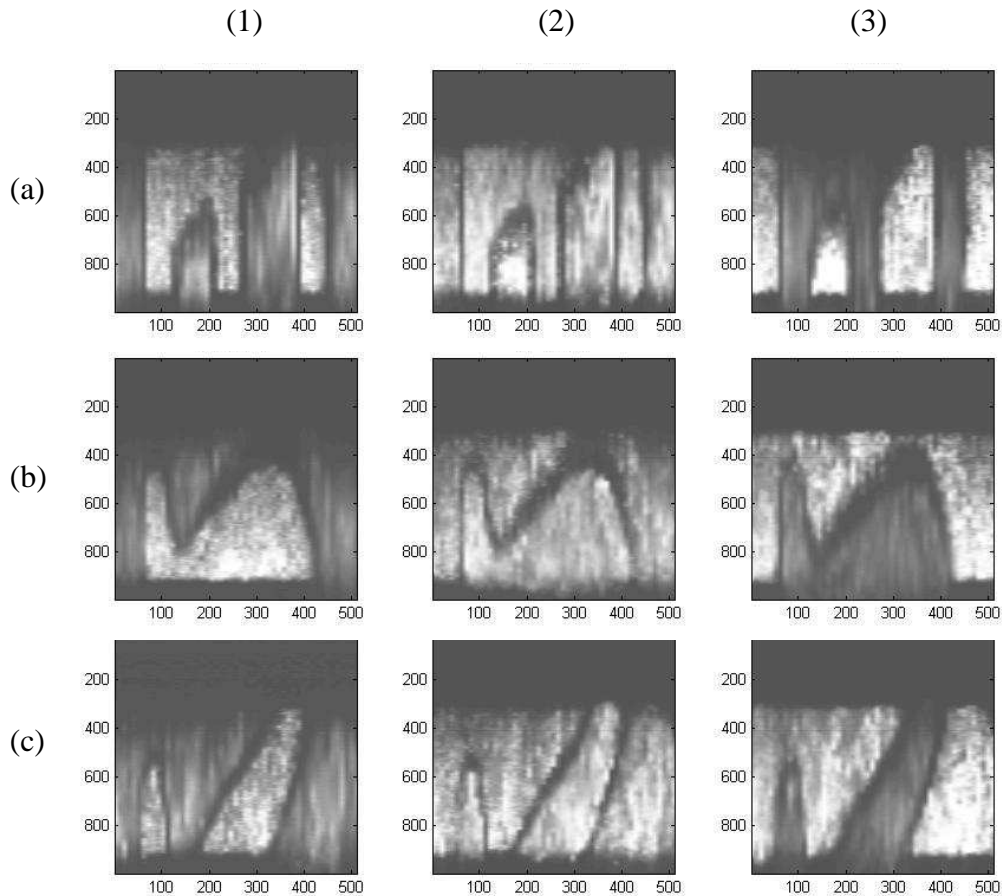


Figura 5.24. Matriz 3×3 de imagens. Imagens de (a) a (c) adquiridas no mesmo plano XY mas deslocadas $500\ \mu\text{m}$ no eixo-X. De (1) a (3) foram adquiridas em posições axiais diferentes, com espaçamentos de $20\ \mu\text{m}$. FOV de cada imagem: $1\ \text{mm} \times 200\ \mu\text{m}$ (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.

A altura/profundidade do plano XY mostrado nas imagens de cada linha das duas figuras é igual, assim como a posição no eixo-X. Apenas na direcção do eixo-Y existe um desvio de $250\ \mu\text{m}$ entre imagens na mesma posição das duas matrizes.

O varrimento total nessa direcção é de $1\ \text{mm}$ nas figuras 5.24 e 5.25 (c) e de $2\ \text{mm}$ na figura 5.25 (a) e (b). Apesar do deslocamento relativo, os FOVs das imagens da figura 5.24 estão totalmente contidos nos da figura 5.25. Esse deslocamento é mais facilmente perceptível comparando as imagens na linha (c), pois nas duas figuras o varrimento total é igual ($1\ \text{mm}$), ao contrário das linhas (a) e (b). Assim, nesta linha, as imagens têm $750\ \mu\text{m}$ comuns.

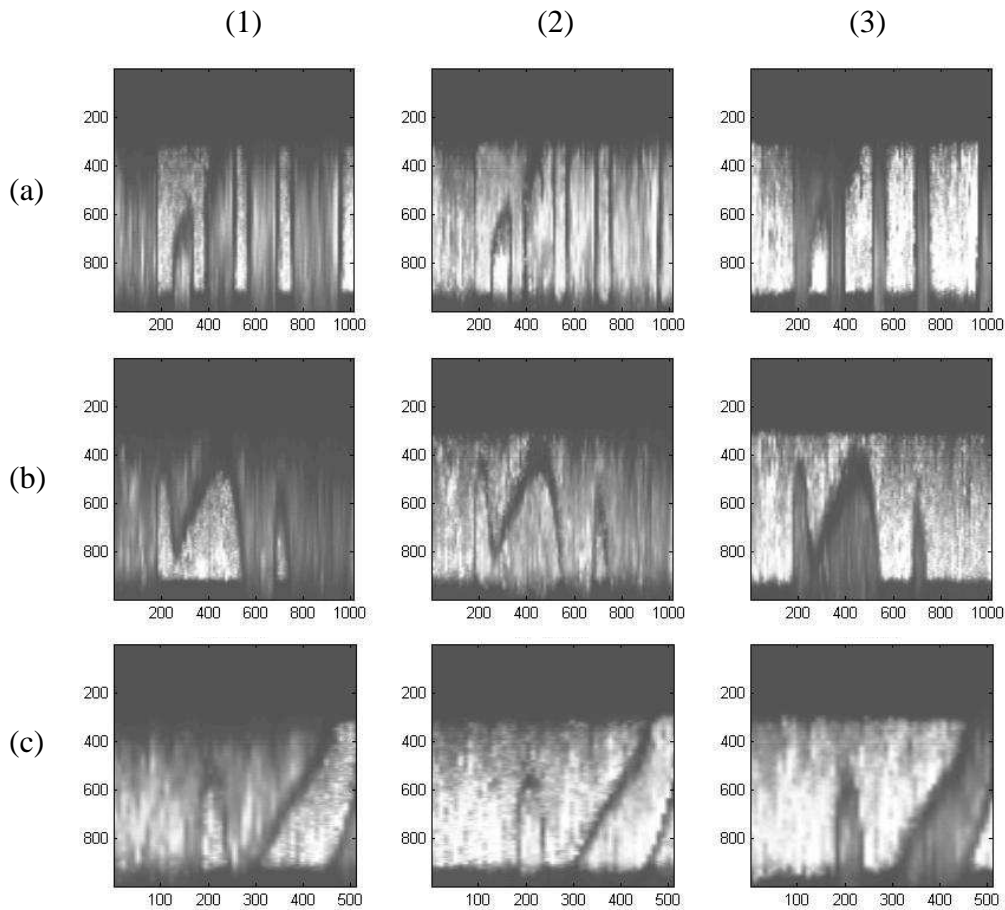


Figura 5.25. Matriz 3 x 3 de imagens (análoga à figura 5.24). Cada imagem desta figura está deslocada 250 μm no eixo-Y em relação à imagem correspondente dessa figura, pertencendo ao mesmo plano XY. FOV de cada imagem: (a) e (b) 2 mm x 200 μm ; (c) 1 mm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.

Em todas as imagens apresentadas têm-se os eixos-X e -Y representados na vertical e horizontal, respectivamente. Assim a escala na vertical das imagens indica a posição em pixels (total de 1024) e na horizontal o número de pontos obtidos na imagem com a aplicação da função *imresize*. As escalas nos dois eixos são diferentes.

Verificou-se que a intensidade da luz no sensor variava com a área da moeda em observação, o que provocava a saturação do sensor em alguns pontos e planos axiais da moeda. Foi assim necessário proceder à regulação da intensidade da fonte, para que todos os valores de intensidade ficassem dentro da gama dinâmica do sensor. Aparentemente a superfície dos caracteres e outras formas cunhadas é diferente da restante superfície, apesar de a moeda ser toda banhada a cobre.

Não sendo possível identificar as formas observadas na moeda é, no entanto, perceptível a diferença de profundidade entre diferentes partes da imagem. As zonas mais claras nas imagens das duas colunas (1) correspondem a partes da moeda em relevo.

Na figura 5.26 mostram-se conjuntos de três imagens e um mapa 3D em cada linha, (a) a (c), que representam a mesma ROI que a das linhas correspondentes da figura 5.24. O mesmo se aplica para as imagens e mapas da figura 5.27 mas relativamente à figura 5.25. Ao contrário das imagens visualizadas nas figuras 5.24 e 5.25, estas têm escalas iguais nas duas direcções, horizontal e vertical.

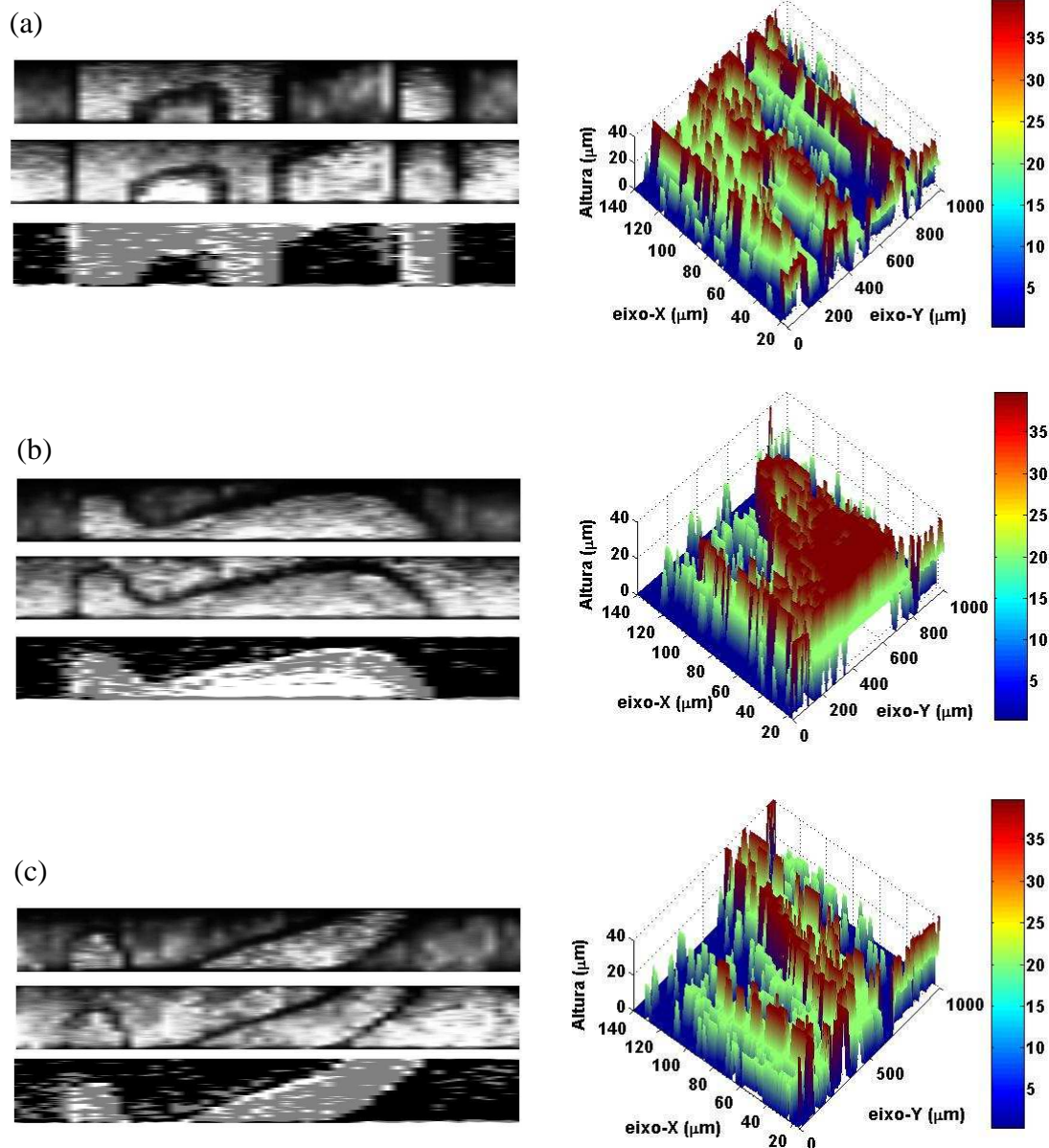
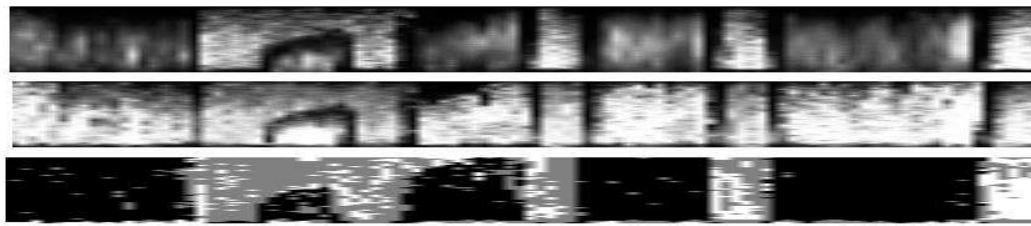
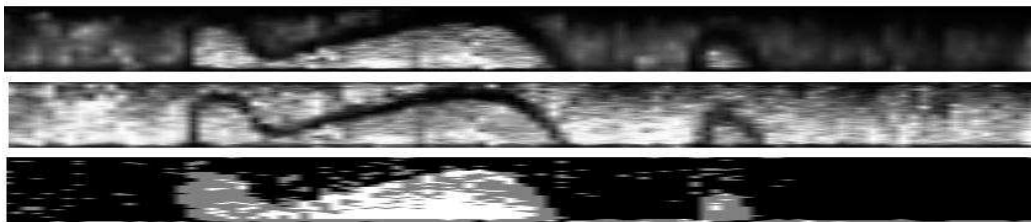
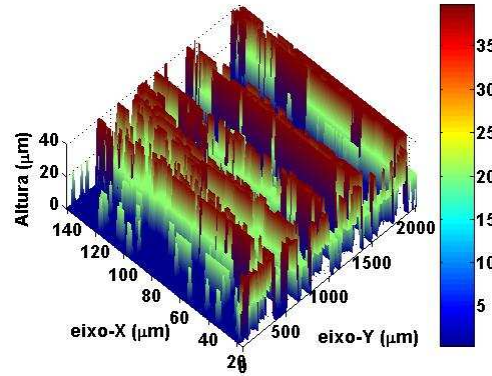


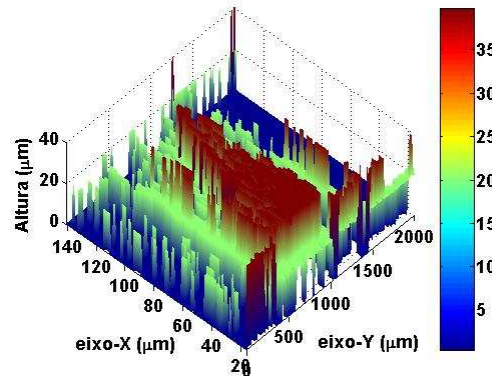
Figura 5.26. Conjuntos de três imagens de cada ROI representada na figura 5.24: (cima) imagem na posição axial mais elevada; (meio) imagem *auto-focus*; (baixo) imagem construída com os valores da posição axial em que ocorre a intensidade máxima. Os mapas 3D representam esses valores da posição axial, que correspondem à altura $h(x_i, y_i)$. Nas linhas (a) a (c) têm-se as mesmas ROIs que as das linhas correspondentes na referida figura. FOV de cada imagem: 1 mm x 125 µm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas iguais nos dois eixos.



(a)



(b)



(c)

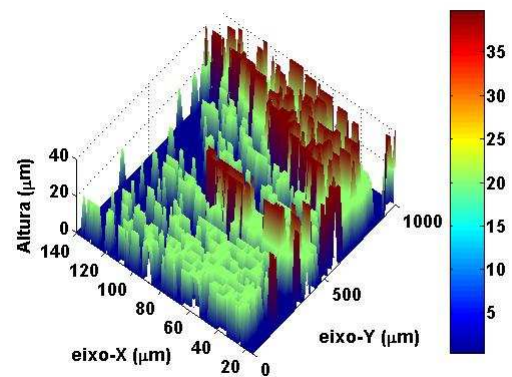
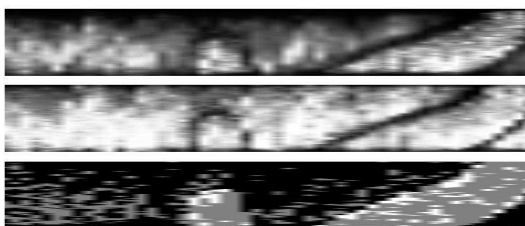


Figura 5.27. Conjuntos de três imagens de cada ROI representada na figura 5.25. Ver legenda da figura 5.26 para interpretar as imagens e mapas 3D. FOV: linhas (a) e (b): 2 mm x 125 µm; linha (c): 1 mm x 125 µm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas iguais nos dois eixos.

As três imagens de cada conjunto representam assim o mesmo plano XY, tendo-se:

- Cima – imagem correspondente à posição axial mais elevada (40 μm no eixo-Z);
- Intermédia – imagem *auto-focus* obtida com os valores máximos da intensidade em cada pixel, $I(x_i, y_i, z_k)$, das imagens *raw-data* nas três posições axiais, de forma semelhante à descrita na secção 5.3
- Baixo - imagem construída com os valores da posição axial em que ocorrem os máximos de intensidade para cada pixel.

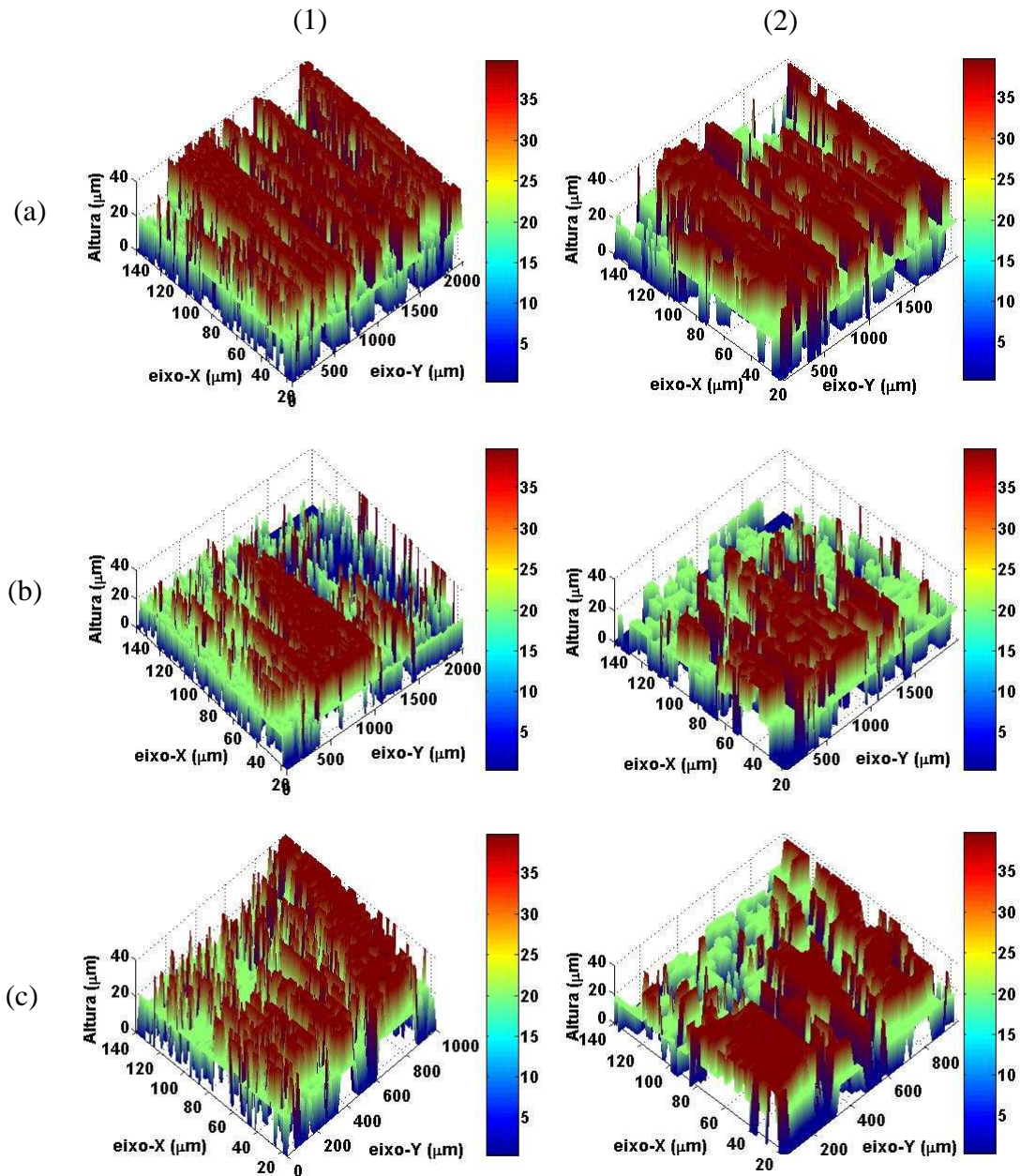


Figura 5.28. Mapas 3D obtidos com os valores da altura em que se têm os valores máximos de $I_{ext}(x_i, y_i)$ com a parametrização: (1) 17 x 1; (2) 5 x 5. Em cada linha as ROIs são iguais à linha correspondente da figura 5.27.

Apresenta-se também para cada imagem o respectivo mapa topográfico, isto é, a altura $h(x_i, y_i)$ que é igual à posição no eixo-Z na qual o valor da intensidade é máximo.

Os FOVs para a direcção horizontal (eixo-Y) são de 1 mm e 2 mm (iguais aos já apresentados nas figuras 5.24 e 5.25), enquanto na direcção vertical (eixo-X) é igual a $125 \mu\text{m}$.

Aplicou-se também o algoritmo descrito na secção 5.3.2 com as parametrizações 17×1 , dado que o intervalo de amostragem no eixo-Y é de $20 \mu\text{m}$, e 5×5 que é a usada na literatura [7]. Na figura 5.28 apresentam-se os mapas 3D obtidos com esses algoritmos, para as três ROIs, usando as imagens de três posições axiais diferentes da figura 5.25, para comparação com os mapas 3D da figura 5.27.

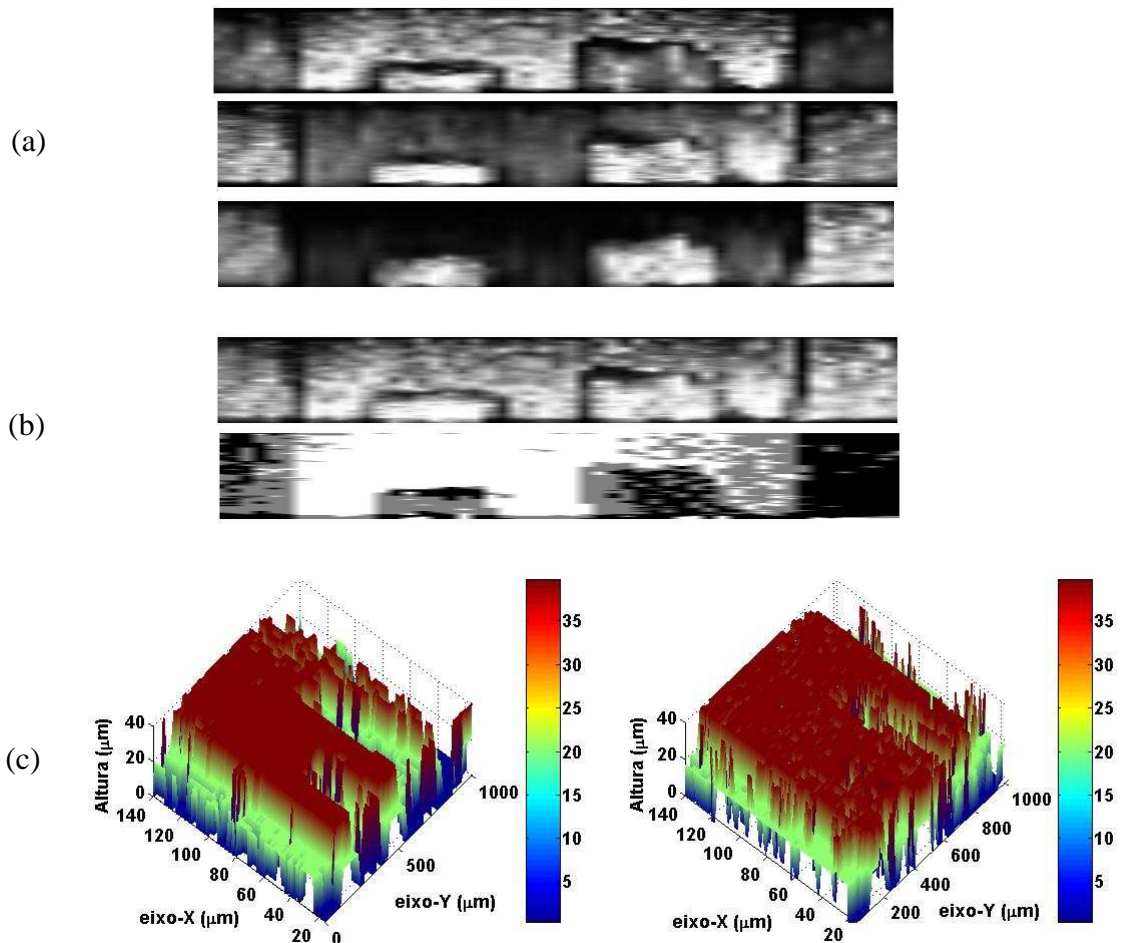


Figura 5.29. (a) Imagens dos três planos axiais com espaçamentos de $20 \mu\text{m}$; (b) Imagem *auto-focus* (cima) e a construída com os valores da posição axial em que ocorre a intensidade máxima (baixo). FOV de cada imagem: $1 \text{ mm} \times 125 \mu\text{m}$ (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas iguais nos dois eixos. (c) Mapas 3D: (esquerda) Representa esses valores da altura $h(x_i, y_i)$ (posição axial em que ocorre o máximo de intensidade); (direita) obtido com os valores da altura em que se têm os valores máximos de $I_{ext}(x_i, y_i)$ com a parametrização 17×1 .

Para se concluir este estudo comparativo entre imagens da moeda com a mesma taxa de amostragem, na figura 5.29 apresentam-se as diversas formas de visualização 2D e 3D, aplicadas nas imagens das figuras anteriores, para uma outra ROI na superfície da moeda. Seria necessário um FOV maior para se ter a sua completa visualização, mas a parte que é visível nesta estrutura em relevo, permite colocar a possibilidade de pertencer a uma letra “E”.

De entre as diversas formas usadas para visualizar a informação 3D nesta aplicação, verifica-se que:

- A imagem construída com os valores da altura de cada pixel é a que permite representar de forma mais clara as diferenças de altura/profundidade de cada ponto das ROIs;
- Através da aplicação do algoritmo é novamente com a parametrização 17 x 1 que se obtém o melhor mapa 3D;
- Nesta aplicação, o mapa 3D com os valores da altura de cada pixel é, na maioria dos casos, melhor do que o obtido com a aplicação do algoritmo.

Para se ter uma mais completa visualização deste efeito de discriminação de profundidade adquiriram-se também doze imagens de planos XY com um espaçamento de 10 μm , que se mostram na figura 5.30. O varrimento no eixo-Y foi realizado também com espaçamentos de 10 μm . As imagens são apresentadas com escalas diferentes nos dois eixos.

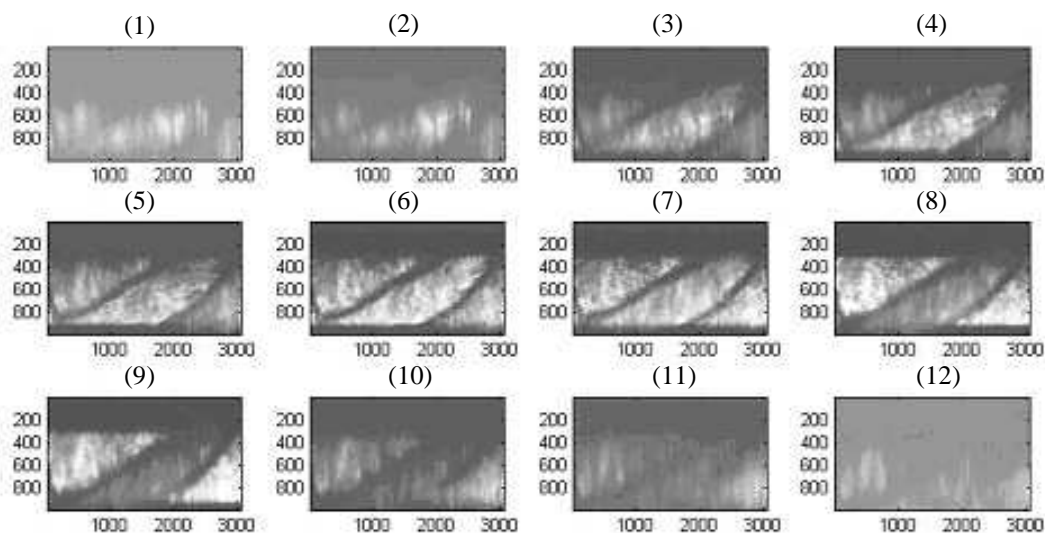


Figura 5.30. Imagens de doze planos XY com espaçamentos de 10 μm . FOV de cada imagem: 700 μm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.

Mesmo com este menor intervalo de amostragem na direcção axial, são visíveis as diferenças entre as imagens em planos vizinhos. Para se representar o mapa topográfico 3D determinou-se a imagem, de entre as dos doze planos, na qual o valor da intensidade é mais elevado, para se calcular a altura de cada ponto da superfície, $h(x_i, y_i)$.

Esta estrutura em relevo tem uma orientação oblíqua relativamente ao sensor, pelo que se fez a mesma representação 3D para outro conjunto de doze imagens, adquirido nas mesmas condições, mas com uma estrutura com a direcção paralela ao sensor.

Na figura 5.31 apresentam-se os dois mapas topográficos, bem como duas imagens de planos XY com uma separação de $40\ \mu\text{m}$.

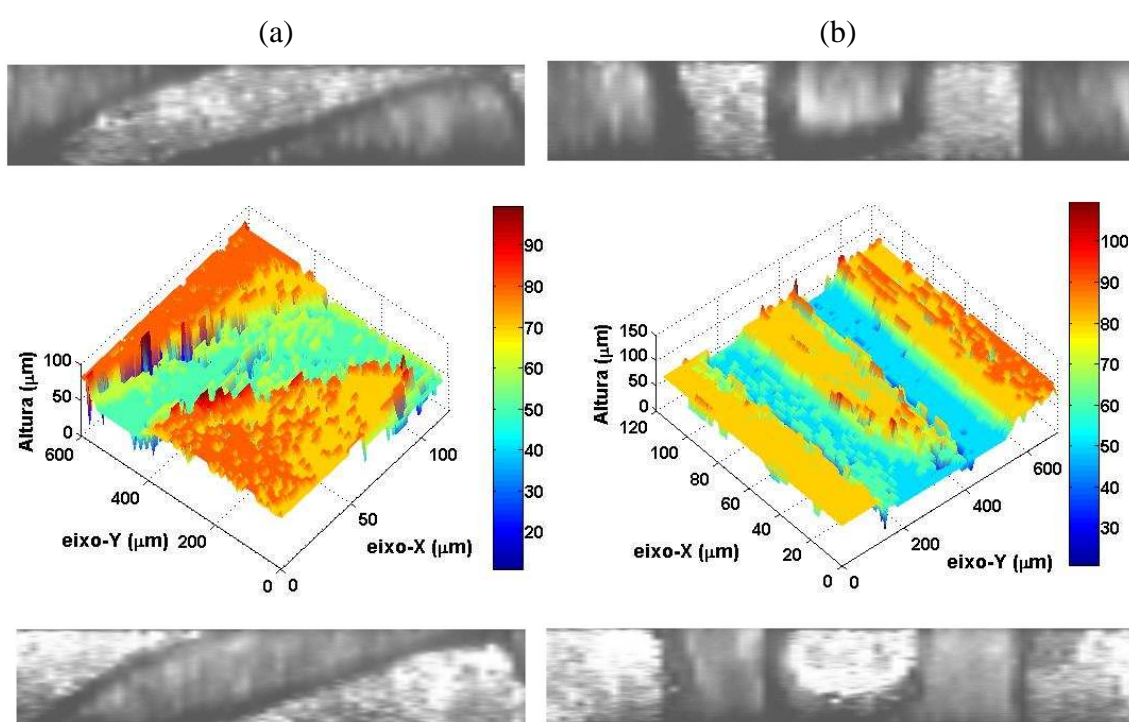


Figura 5.31. Mapas 3D de uma estrutura: (a) oblíqua e (b) paralela relativamente ao sensor. As duas imagens, topo e fundo, são de planos XY com uma separação de $40\ \mu\text{m}$. FOV: (a) $600\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$; (b) $700\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$ [14]. As imagens têm escalas iguais nos dois eixos.

Com este algoritmo simplificado para determinação da altura, ocorrem flutuações nas posições axiais de pontos diferentes num mesmo plano XY, o que provoca uma menor clareza na representação 3D e conseqüentemente degrada a capacidade para realizar medições a partir dos perfis.

Contudo foi possível calcular a altura ou profundidade¹ e a largura das estruturas cujos valores se apresentam nas tabelas 5.5 e 5.6, respectivamente. Para isso definiram-se ROIs nos dois mapas 3D apresentados na figura 5.31, tendo-se calculado os valores da média e do desvio padrão desses dois parâmetros. Para o cálculo da largura considerou-se como valor de transição (*threshold*), a meia altura, dado que foi possível usar este valor que se calculou previamente.

Mapa 3D	Altura	
	Média	Desvio padrão
(a)	26,14 μm	7,72 μm
(b)	27,25 μm	5,04 μm

Tabela 5.5. Valores da média e desvio padrão da altura das estruturas representadas nos mapas 3D da figura 5.31: (a) oblíqua; (b) paralela ao sensor.

Mapa 3D	Largura	
	Média	Desvio padrão
(b) esquerda	149,76 μm	10,97 μm
(b) direita	157,86 μm	19,58 μm

Tabela 5.6. Valores da média e desvio padrão da largura das duas estruturas (esquerda e direita) representadas no mapa 3D da figura 5.31 (b).

5.5.2. Conclusão

Foi usada uma forma simples de alargamento do FOV, que tem interesse nestas aplicações em que a área do objecto que se pretende visualizar pode ser da ordem ou mesmo superior a 1 mm^2 . Foi assim possível formar a imagem de uma estrutura.

A partir da sequência de imagens 2D ao longo da direcção axial, foram construídos mapas topográficos 3D, de estruturas cunhadas na moeda com diferentes orientações. Mesmo com intervalos de amostragem de 20 μm nos eixos-Y e Z foi possível efectuar estas reconstruções 3D. Foram também usadas outras formas de apresentação de informação 3D, tais como a imagem *auto-focus* com os máximos de intensidade em cada pixel ou com os valores da posição no eixo-Z em que ocorrem esses máximos.

Reduzindo os intervalos de amostragem nesses dois eixos para 10 μm foi possível, através destes mapas 3D, calcular valores da altura consistentes de duas estruturas, uma

¹ Dado que o valor $h(x_i, y_i)$ tanto pode referir-se a altura como a profundidade, optou-se por fazer as representações 3D como se a estrutura não fosse em relevo mas em profundidade para melhorar a sua visualização.

com orientação oblíqua e outra paralela ao sensor, e da largura de duas estruturas paralelas ao sensor. No entanto, os valores do desvio padrão são demasiado elevados, particularmente no caso da medição da altura, o que se deve às flutuações presentes nos valores da posição axial (altura) de cada ponto.

5.6. Pistas de PCB

Foi também feita a aplicação do sistema na medição da espessura e largura de pistas num PCB. É uma operação que é realizada na indústria para garantir a qualidade do produto, nomeadamente para assegurar que cumpre com as especificações do cliente.

As especificações das pistas num PCB variam dependendo dos requisitos eléctricos, etc, mas existe um limite inferior recomendado de 4 mils¹ para a sua largura [15]. A espessura de cobre na pista do PCB é nominalmente especificada em *ounce per square foot*². O valor mais comum é 1 oz mas são também usadas outras espessuras tais como 0,5 oz, 2 oz e 4 oz.

A configuração óptica foi a do esquema da figura 4.1. No decurso desta aplicação recolheram-se imagens com as duas objectivas: 20X 0,4NA e 40X 0,65NA.

5.6.1. Determinação da espessura e largura

Foi feita a aquisição de doze planos XY, com um espaçamento (no eixo-Z) de 10 µm, de uma ROI contendo uma pista paralela ao eixo-X, cujas imagens se mostram na figura 5.32. O varrimento no eixo-Y foi executado com um espaçamento de 5 µm.

Ao longo dos doze planos observa-se a variação na nitidez das imagens. Em particular, podem-se observar os limites laterais da pista que tem a orientação paralela ao eixo-X, isto é, a direcção vertical das imagens, em que se representam os 1024 pixels do sensor. Tal como nas aplicações anteriores, o FOV é efectivamente menor, sendo igual a 120 µm e não os 200 µm correspondentes ao comprimento total do sensor.

Na figura 5.33 (a) mostra-se a imagem *auto-focus* da pista e na (b) os mapas 3D e 2D. A sua representação 3D foi construída com o algoritmo que calcula a altura $h(x_i, y_i)$ através da determinação do plano XY em que a intensidade é máxima para essa posição.

¹ A largura das pistas é normalmente expressa em mils (também designada por thou) que corresponde a 1/1000 da polegada, isto é, é igual a 25,4 µm.

² A espessura é calculada com base em unidades do sistema imperial, a partir da relação onça por pé quadrado (*ounce per square foot*) mas normalmente vem expressa simplesmente em onça (cuja abreviatura é oz).

O perfil 2D foi obtido seleccionando o pixel n do sensor e representando a altura $h(x_n, y_i)$, isto é, contendo a altura correspondente a esse pixel n em todas as linhas adquiridas pelo sensor.

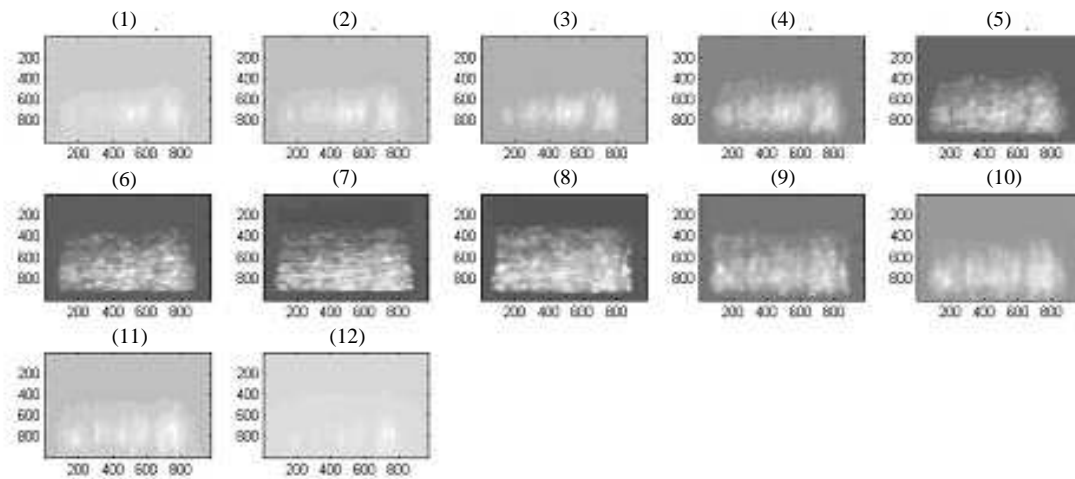


Figura 5.32. Imagens de doze planos XY com espaçamentos de $10\ \mu\text{m}$. FOV: $190\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.

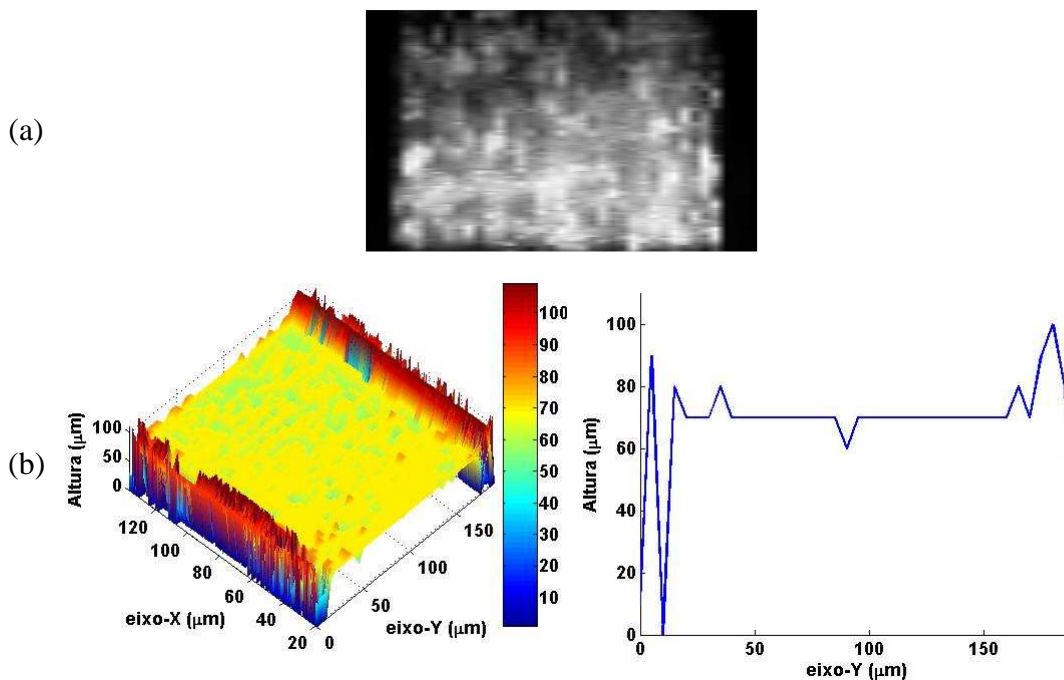


Figura 5.33. Pista de PCB paralela ao sensor: (a) Imagem *auto-focus*. FOV: $190\ \mu\text{m} \times 115\ \mu\text{m}$ (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). A imagem tem escalas iguais nos dois eixos. (b) Perfil 3D da pista e perfil 2D extraído para o pixel n .

Apesar das oscilações nos bordos da pista, que dificultam a medição da largura da pista, reduzindo a sua precisão e exactidão, foi desenvolvido um algoritmo para o seu cálculo, que consistiu nos seguintes passos:

- (1) Determinação do valor médio (h_{mean}) e desvio padrão (h_{std}) da altura $h(x_i, y_i)$ numa ROI que contém apenas pontos da pista;
- (2) Definição dos valores do limite inferior (h_{min}) e superior (h_{max}) da altura para se considerar que um ponto pertence à pista. Usaram-se os valores dados por
$$h_{min} = h_{mean} - h_{std} ;$$

$$h_{max} = h_{mean} + h_{std} ;$$
- (3) Cálculo do número de linhas (valores da posição no eixo-Y) em que a altura (h) se situa no intervalo $h_{min} \leq h \leq h_{max}$. Este cálculo foi feito para todos os pixels no interior de outra ROI, esta abrangendo todo o FOV no eixo-Y,
- (4) Determinação do valor médio e desvio padrão da largura em número de linhas e conversão para *microns* e *mils*.

O valor da altura $h(x_i, y_i)$, que se deve entender como uma posição axial mas que não traduz a altura da pista, e o da largura da pista, que resultaram da aplicação deste algoritmo, são apresentados na tabela 5.7.

Parâmetro	Média	Desvio padrão
Altura	4,2890*	0,5963*
Largura	120,40 μm	9,74 μm
	4,74 mils	0,38 mils

Tabela 5.7. Valores da média e desvio padrão da altura (posição axial) dos pontos de uma ROI definida no interior da pista da figura 5.33 (paralela ao sensor) e da largura da pista considerando outra ROI que ultrapassa os limites laterais da pista. (*) O valor da altura indica a posição axial no conjunto de doze planos axiais.

Para se medir a largura de uma pista perpendicular ao sensor, foi necessário usar-se a objectiva 20X, pois só assim se consegue visualizar a pista numa só imagem XY. Tal acontece porque, como se viu nas figuras anteriores, com a objectiva 40X o FOV efectivo na direcção paralela ao sensor é da ordem de grandeza da largura da pista.

Foi feita então a aquisição de oito planos XY com um espaçamento (no eixo-Z) de 10 μm , usando-se a objectiva 20X. A figura 5.34 mostra as oito imagens contendo uma pista PCB com a orientação paralela ao eixo-Y. O varrimento nesse eixo foi feito com uma separação de 20 μm entre linhas consecutivas.

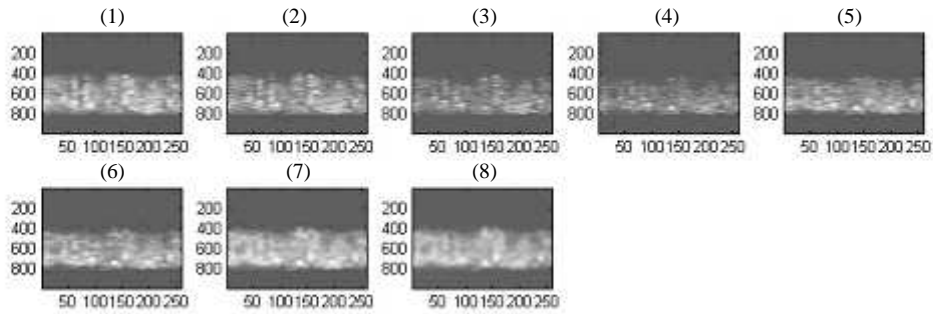


Figura 5.34. Imagens de oito planos XY com espaçamentos de 10 µm. FOV: 500 µm x 400 µm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.

Por comparação com a figura 5.32, confirma-se a muito menor capacidade de discriminação axial do sistema com esta objectiva, pelo que os mapas 3D que se conseguem obter não permitem determinar a largura da pista.

Assim, em oposição ao cálculo efectuado no caso da pista paralela ao sensor, neste mediu-se a largura da pista com base na imagem *auto-focus* que se mostra na figura 5.35.

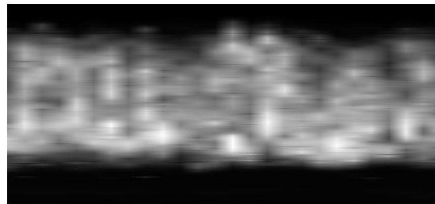


Figura 5.35. Imagem *auto-focus* referente aos oito planos XY da figura 5.34. FOV: 500 µm x 235 µm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). A imagem tem escalas iguais nos dois eixos.

Neste caso o algoritmo consistiu em:

- (1) Definir uma ROI que abrange todos os pixels do FOV na direcção paralela ao sensor;
- (2) Determinar o valor máximo (I_{max}) e mínimo (I_{min}) da intensidade na ROI;
- (3) Calcular para cada linha (valor da posição no eixo-Y) o número de pixels em que a sua intensidade (I) verifica a relação $I \geq (I_{min} + I_{max})/2$.

Na tabela 5.8 apresenta-se o valor da largura da pista obtido com este algoritmo.

Parâmetro	Média	Desvio padrão
Largura	90,70 µm	25,71 µm
	3,57 mils	1,01 mils

Tabela 5.8. Valores da média e desvio padrão da largura. Considerou-se uma ROI que ultrapassa os limites laterais da pista da figura 5.35 (perpendicular ao sensor).

Em consequência da menor capacidade de discriminação axial, a precisão é menor do que a obtida com a objectiva 40X para a pista paralela ao sensor, o que leva a que o desvio padrão seja muito elevado.

Para a determinação da espessura de uma pista foram usadas imagens da extremidade lateral de uma pista com a orientação perpendicular ao sensor (ao longo do eixo-Y), num total de 21 planos XY, espaçados de 10 μm , tendo-se usado a objectiva 40X.

Foram traçados os perfis representados na figura 5.36, que foram obtidos com um procedimento análogo ao descrito para a figura 5.33 (b). Mas, neste caso, o perfil 2D é relativo a uma imagem linear, linha n , representando-se $h(x_i, y_n)$.

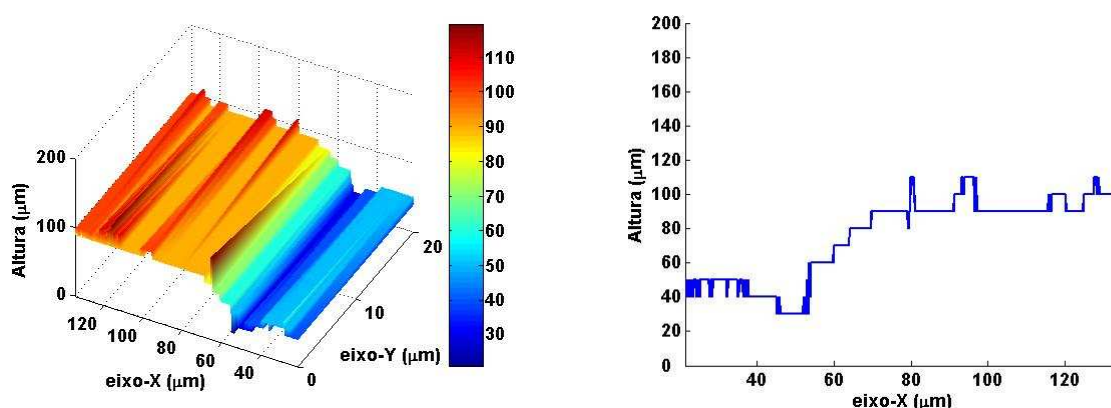


Figura 5.36. Pista perpendicular ao sensor: Perfis 3D e 2D de uma das suas extremidades laterais.

Pela comparação com os perfis da figura 5.33 (b), particularmente os 2D, é evidente a diferença na taxa de amostragem espacial. Este perfil é traçado ao longo do eixo-X, com o intervalo de amostragem definido pela largura dos pixels do sensor. Como se usou a objectiva 40X, o intervalo de amostragem é de 200 nm, em comparação com os 5 μm do eixo-Y do caso anterior.

Foi feito o cálculo da espessura da pista, que corresponde à diferença de alturas entre o plano da pista e o lateral, cujos valores se apresentam na tabela 5.9.

Altura	Média	Desvio padrão
Plano da pista	92,08 μm	4,95 μm
Plano lateral	46,29 μm	5,24 μm
Pista	45,79 μm	7,21 μm

Tabela 5.9. Valores da média e desvio padrão das alturas / posições axiais dos planos da pista e lateral e conseqüente valor da altura da pista. Consideram-se duas ROIs, uma em cada plano.

O resultado é afectado por erros¹ que derivam do referido efeito de oscilações junto aos bordos, observando-se também flutuações na altura dos planos que podem ter origem no método usado para o cálculo da altura. O intervalo de amostragem de 10 μm entre planos XY é elevado o que contribui para amplificar as oscilações.

A partir desta espessura em *micron*, $t(\mu\text{m})$, foi feita a sua determinação em oz, $t(\text{oz})$, usando a expressão (5.9), para se fazer a comparação com os valores usuais.

$$t(\text{oz}) = 3,278 \times 10^{-3} \cdot t(\mu\text{m}) \cdot \rho_{\text{cu}} \left(\text{g}/\text{cm}^3 \right) \quad (5.9)$$

em que $\rho(\text{Cu})$ é a densidade do cobre que é igual a 8,94 g/cm^3 .

Obtém-se então um valor médio da espessura igual a 1,34 oz (de cobre por *square foot*). Assumindo que a espessura da pista seria de 1 oz, tem-se assim um erro na medição que será possível reduzir tendo em conta as causas apontadas anteriormente.

Para concluir, nesta aplicação foi ainda testada outra forma de visualização da informação 3D, que consiste na construção de imagens XZ ou YZ, que se podem designar por cortes axiais. Assim, e para se exemplificar, não se apresentando quaisquer cálculos efectuados a partir dessas imagens, foi feita a aquisição de doze planos XY com espaçamentos (no eixo-Z) de 10 μm , usando-se a objectiva 40X, que se mostram na figura 5.37.

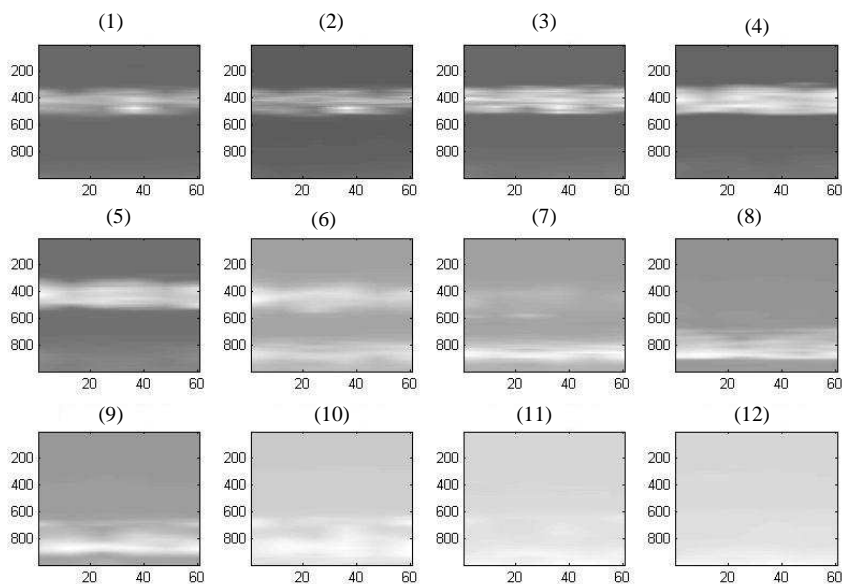


Figura 5.37. Imagens de doze planos XY com espaçamentos de 10 μm . FOV: 100 μm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Y; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.

¹ Sempre que necessário, como neste caso, aplicaram-se as expressões de propagação de erros, para se determinar o desvio padrão de uma medida que resulta da aplicação de uma expressão matemática.

Estas imagens contêm uma pista PCB com a orientação paralela ao eixo-Y. O varrimento nesse eixo foi feito com uma separação de 20 μm entre linhas consecutivas.

Na figura 5.38 apresentam-se as seis imagens XZ obtidas, pois foram adquiridas seis imagens lineares em cada posição axial. As imagens são muito semelhantes, visto que nesta ROI não existem variações significativas ao longo do eixo-Y, em cada imagem de um plano XY.

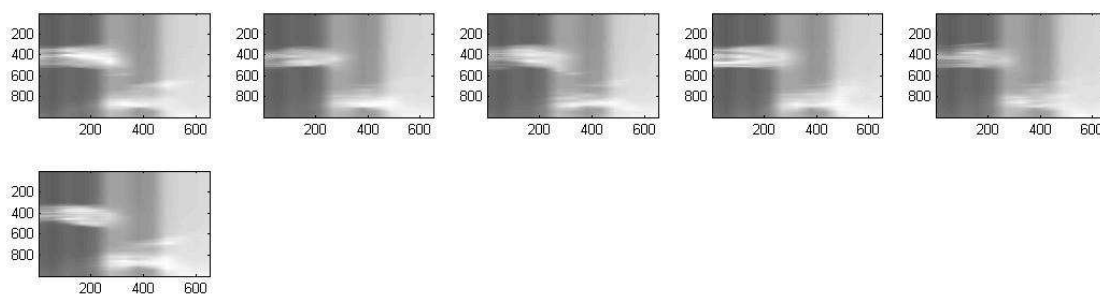


Figura 5.38. Imagens de seis cortes axiais, planos XZ, com espaçamentos de 20 μm (no eixo-Y). FOV: 120 μm x 200 μm (direcção horizontal - eixo-Z; direcção vertical - eixo-X). As imagens têm escalas diferentes nos dois eixos.

5.6.2. Conclusão

A medição da espessura e largura de pista de PCB foi afectada pelas oscilações junto às extremidades da pista, bem como por flutuações nos valores da altura dos planos horizontais. Aplicaram-se algoritmos diferentes para o cálculo, consoante o parâmetro a medir e a objectiva usada, de modo a usar, em cada caso, a forma de representação 3D que permite obter melhores resultados. Não é possível avaliar a exactidão dos resultados obtidos mas com a objectiva 40X a precisão das medidas é razoável, como se pode aferir com os valores de desvio padrão.

A necessidade de se usar a objectiva 20X 0,4NA para medir a largura de pistas perpendiculares ao sensor, resultou numa pior precisão que se traduziu em valores de desvio padrão mais elevados. Uma forma de ultrapassar esta limitação será realizando varrimentos também na direcção do eixo-X, e posterior montagem das imagens contíguas, o que permitirá usar a objectiva 40X 0,65NA, pois aumentar-se-á o FOV.

Melhores resultados serão obtidos com uma maior taxa de amostragem, nomeadamente no eixo-Z, e com aplicação de algoritmos mais exactos na determinação da altura.

Referências bibliográficas

- [1] Jordan, H-J et al, “Highly accurate non-contact characterization of engineering surfaces using confocal microscopy”, *Measurement Science and Technology*, 9, pp. 1142-1151 (1998)
- [2] Tiziani, H.J., Wegner, M. and Steudle, D., “Confocal principle for macro- and microscopic surface and defect analysis”, *Opt. Eng.*, 39 (1), pp. 32-39 (2000)
- [3] Murphy, D.B., “Fundamentals of light microscopy and electronic imaging”, Wiley-Liss (2001)
- [4] Wilson, T. Ed., “Confocal Microscopy”, Academic Press, London (1990)
- [5] Minas, G. et al., “Lab-on-a-chip for Measuring Uric Acid in Biological Fluids”, *Euroensors XVI*, pp. 66-69 (2002)
- [6] Minas, G. et al., “An array of Fabry-Perot optical-channels for biological fluids analysis”, *Sensors and Actuators A*, 115, pp. 362-367 (2004)
- [7] Tympel, V., “Three dimensional animation with a conventional light microscopy”, *Proc. SPIE*, 2984, pp. 190-198 (1997)
- [8] Correia, J.H. et al., “Load-deflection of a low-stress SiN-membrane/Si-frame composite diaphragm”, *Proc. of First Int. Conf. on Modeling and Simulation of Microsystems*, pp. 563-568 (1998)
- [9] Kong, S-H et al. “Integrated Silicon Microspectrometers”, *IEEE Instrumentation & Measurement Magazine*, pp. 34-38 (Sep 2001)
- [10] Macedo, M.P., Fernandes, A.G. and Correia, C.M., “Development and test of a profilometer based on a low-cost white-light bench microscope using a linear sensor”, *Proc. SPIE*, 5858, pp. 342-349 (2005)
- [11] Macedo, M.P., Barata, A.J., Fernandes, A.G. and Correia, C.M., “Modeling of image formation of a low-cost white-light bench microscope with a linear CMOS image sensor: its application in metrology”, *Proc. SPIE*, 6617, pp. 66170A (2007)
- [12] Benedetti, P. A., Evangelista, V., Guidarini, D. and Vestri, S., “Confocal-line microscopy”, *Journal of Microscopy*, 165 (1), pp. 119-129 (1992)
- [13] Brakhenoff, G.J. and Visscher, K., “Confocal imaging with bilateral scanning and array detectors”, *Journal of Microscopy*, 165 (1), pp. 139-146 (1992)
- [14] Macedo, M.P. and Correia, C.M., “Shape and thickness measurements using a reconstruction method for linear sensor microscopy based on improvement of lateral resolution isotropy”, *Proc. SPIE*, 8082 (2), pp. 808236 (2011)
- [15] Jones, D.L., “PCB Design Tutorial”, www.alternatezone.com (2004)

Cap. 6. Conclusões e trabalho futuro

O desenvolvimento deste protótipo laboratorial de um microscópio numa mesa óptica, estabelecendo uma plataforma de teste de métodos de reconstrução 3D, foi um trabalho multidisciplinar como é típico da área da instrumentação. Para a sua concretização foi necessário conjugar conhecimentos de diferentes áreas tais como: óptica, electrónica, software, processamento de dados e imagem.

O objectivo principal consistiu em explorar as características de um sensor de imagem linear, implementando um circuito óptico que permita, com a aplicação de algoritmos de reconstrução, extrair informação 3D. Não se focou na optimização do circuito óptico, o que levaria a soluções muito mais dispendiosas. Procurou-se aquela que, servindo os objectivos, cumpria com uma consideração importante de projecto, a da minimização do número de componentes ópticos no microscópio visto que, qualquer componente óptico introduzido no sistema, contribui para a dispersão da luz e o consequente aumento da probabilidade de luz perdida entrar no circuito óptico [1].

6.1. Conclusões

Alguns testes preliminares permitem prever que, para tempos de aquisição mais longos, da ordem dos 30 minutos, a estabilidade da iluminação (lâmpada de halogénio) pode não ser a mais adequada. Pelo contrário, indicam que a repetibilidade e *backlash* no posicionamento da plataforma do objecto não terão efeito negativo na qualidade das imagens, no caso de se usarem varrimentos com uma ordem de grandeza de alguns *microns*.

Dos resultados da avaliação da qualidade da imagem, em que se testaram e compararam as diferentes formas de iluminação, salienta-se o seguinte:

- Obteve-se uma razão de Strehl igual a 0,86 para a configuração de iluminação em linha, através da determinação experimental da MTF. Este é um valor melhor do que seria de esperar, atendendo à qualidade dos componentes ópticos do sistema, em particular o tipo de objectiva;
- Mostra-se que a iluminação em linha melhora a resolução lateral em ambas as direcções, em especial na direcção paralela ao sensor, verificando-se que essa melhoria é mais evidente para valores mais elevados da frequência espacial;

- O sistema fornece imagens de detalhes com a orientação paralela ao sensor, ao contrário do que é teoricamente demonstrado para um microscópio com uma fenda de iluminação (iluminação em linha) e uma fenda de detecção simples paralelas;
- Foi desenvolvido um método de determinação da PSF, em que, de acordo com a esperada anisotropia do processo de formação de imagem, se obteve uma PSF mais estreita na direcção perpendicular à fenda do que na direcção paralela, e com uma relação entre as suas larguras muito próxima do valor teórico de 1,4;
- Obteve-se um valor da resolução lateral de aproximadamente 350 nm na direcção perpendicular ao sensor, que é um pouco menor do que o dobro do teórico para uma fenda ideal. Resultou de se considerar metade da FWHM da curva experimental da PSF calculada a partir da ERF, ignorando o lobo lateral, como uma estimativa da resolução lateral;
- Demonstra-se que este sistema com a configuração com a fenda de iluminação perpendicular ao sensor, em oposição ao previsto pela teoria com fendas de iluminação e detecção perpendiculares, tem uma resposta axial similar à que se obtém com a fenda de iluminação paralela ao sensor. Este resultado pode ser compreendido se o sensor do tipo matriz linear for considerado um conjunto de fendas virtuais, os pixels, que são perpendiculares à direcção do próprio sensor;
- Os resultados experimentais da resposta axial do microscópio mostram uma boa concordância com as curvas simuladas numericamente, usando os valores de largura das fendas de iluminação e detecção do sistema. Considerando-se a resolução axial como metade da FWHM das curvas de resposta axial, obtiveram-se valores de 8 μm e 10 μm , com as duas configurações usadas, que são afectados pela insuficiente taxa de amostragem axial, em comparação com os valores de aproximadamente 6 μm , simulados numericamente;
- Demonstra-se também que este microscópio (com o sensor linear), usando iluminação de campo amplo, tem alguma capacidade de obter informação sobre a posição axial, em oposição ao que se verifica quando o detector é uma fenda simples.

Das diferentes aplicações do sistema, realizadas com o intuito de se alcançar o objectivo final definido para este trabalho, o da reconstrução 3D, podem ser extraídas as seguintes conclusões:

- A reconstrução das imagens de *wire-bonding*, designadas por *best-focus* e *auto-focus*, permite visualizar os contornos do fio metálico de ligação, ao longo do seu trajecto desde a *pad* do circuito integrado até pontos a uma distância de algumas centenas de *microns*, mesmo com variação da sua altura;
- Com a aplicação de um algoritmo adaptado da literatura, com uma parametrização que traduz a geometria do sensor e a amostragem nas duas direcções laterais, consegue-se obter um mapa 3D que traduz mais consistentemente as dimensões do fio de ligação;
- Os dois valores do diâmetro do fio de ligação, calculados através da imagem *auto-focus* e do mapa 3D obtido com esse algoritmo, não sendo muito consistentes, situam-se em intervalos sobreponíveis;
- Os perfis 3D obtidos para uma microestrutura de um componente micromaquinado permitem calcular, com boa exactidão, o valor da altura (540 μm medidos vs 525 μm reais) bem como uma estimativa da inclinação (53,4° vs 54,74°), mesmo com a aplicação de um algoritmo simples de cálculo da altura através da determinação do plano focal em que a intensidade em cada pixel é máxima;
- Com a reconstrução de mapas (topográficos) 3D de estruturas cunhadas numa moeda de 1-cêntimo, obtiveram-se resultados consistentes para a altura de estruturas, com orientações diferentes, oblíqua e paralela ao sensor, e da largura de estruturas paralelas ao sensor;
- A medição da espessura e largura de pistas de PCB é prejudicada por oscilações presentes nas suas extremidades. Apesar desse facto foram implementados algoritmos de cálculo, através da definição de ROIs, em que apenas no caso da pista perpendicular ao sensor se obteve um desvio padrão elevado.

A estas conclusões retiradas de cada aplicação podem-se acrescentar outras mais genéricas:

- A plataforma desenvolvida permitiu usar diversos métodos de reconstrução e representação 3D (imagens *auto-focus*, mapas 3D, cortes axiais), com diferentes configurações do circuito óptico;
- O desempenho não foi otimizado devido a dois factores:

- O circuito óptico usado limitou o FOV, não se tirando partido do sensor linear possuir 1024 pixels, o que condicionou significativamente a qualidade da reconstrução 3D em algumas aplicações;
- Uma boa taxa de amostragem espacial é essencial para se conseguir uma boa reconstrução 3D, tendo os posicionadores usados no sistema imposto uma limitação importante.
- Do estudo realizado, envolvendo as várias formas de iluminação, tais como de campo amplo e em linha, paralela e perpendicular ao sensor, pode-se concluir que esta última configuração tem também capacidade para extrair informação 3D. Refira-se que não têm sido desenvolvidos, pelo menos que seja do conhecimento do candidato, sistemas com esta configuração.

6.2. Trabalho futuro

Os sistemas com iluminação e detecção tipo fenda, genericamente designados por microscópios confocais de varrimento de fenda (*slit-scanning confocal microscopy*), têm o ponto fraco da anisotropia da imagem, que também foi estudada nesta tese, que se caracteriza por possuir valores de resolução diferentes nas duas direcções laterais. Este é um dos problemas que se deve procurar resolver no futuro. Neste contexto, os resultados deste trabalho apontam dois caminhos de continuidade:

- Eliminação ou redução significativa da anisotropia na imagem, tendo em conta que foi demonstrada uma resolução lateral melhorada na direcção do sensor, mais próxima da resolução na direcção perpendicular ao sensor.
- Evolução desta técnica no sentido de aproveitar a capacidade de extrair informação 3D com a linha de iluminação perpendicular ao sensor. Uma possibilidade é considerar um sistema de posicionamento/alinhamento, em que as duas orientações da linha de iluminação (paralela e perpendicular ao sensor linear) podem ser configuradas numa sequência programável.

Referências bibliográficas

- [1] Masters, B.R., “Confocal microscopy and multiphoton excitation microscopy”, SPIE Press, Washington (2005)

Apêndice 3.1. Especificações do sensor LIS-1024

Apresentam-se as características principais (sensibilidade, eficiência quântica, linearidade, taxa de aquisição), parâmetros de funcionamento, características eléctricas e descrição dos sinais (*pinout*), reproduzidas de *PDS0001 Rev. G “LIS-1024 High Performance Linear CMOS Image Sensor”, Panavision SVI, LLC (2004)*.

Absolute maximum ratings, T_A = 25°C unless otherwise noted, see Note 1, below. †

Supply voltage range, V _{DD} -----	0 V to 5.25 V
Digital input current range, I -----	-20 mA to 20 mA
Input signal overshoot -----	V _{DD} +0.250v (High), V _{SS} -0.25v (Low)
Operating free-air temperature range, T _A -----	0°C to 50°C
Storage temperature range -----	-20°C to 85°C
Humidity range, Rh -----	0-85%, non-condensing
Lead temperature 1.5 mm (0.06 inch) from case for 10 seconds-----	225°C

† Exceeding the ranges specified under “absolute maximum ratings” can damage the device. The values given are for stress ratings only. Operation of the device at conditions other than those indicated under “recommended operating conditions” is not implied. Exposing the device to absolute maximum rated conditions for extended periods may affect device reliability and performance.

NOTES: 1. Voltage values are with respect to the device GND terminal.

LIS-1024 Electrical Characteristics/Operating Conditions

(@T_A = 25°C, V_{DD}= I/OLEVEL = 5.0VDC, CLK_{IN} = 1 MHz, unless otherwise specified)

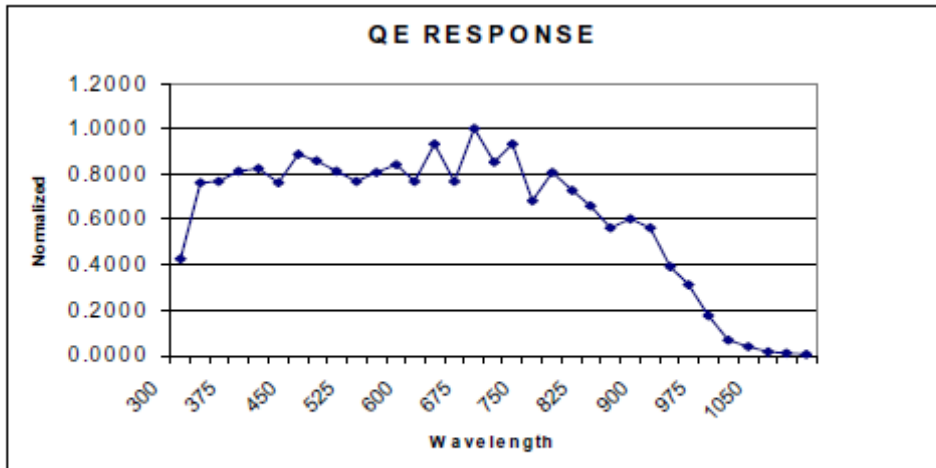
Parameter	Conditions	Min	Typ	Max	Units
Digital Signals					
Input High Logic Level (V _{IH})		V _{DD} -0.6V			V
Input Low Logic Level (V _{IL})				0.6	V
Digital Out load current (I _{out})				1.0	mA
Input Clock Freq. (CLK _{IN})	Pixel Read Rate (ERC) = CLK _{IN}	1.0	1,000	20,000	MHz
Input Clock Duty Cycle		40		60	%
t _{pcdly} - Clk to 1 st pixel	Rising edge of clock		2		ns
t _{rsh} - RST Set Up & Hold	Spec in # of Clock Cycles See Note 2	3			CLK _{IN}
t _{sdly} - Sync Out to Clk Dly.	Rising & falling edge of Sync out to rising edge of clock	1		120	ns
t _{spix} - Sync out to 1 st pixel	Falling edge of SYN. Spec in # of Clock Cycles		2		CLK _{IN}
DC					
Supply Voltage (V _{DD})	@ Supply voltages less than Sat Voltage, VO is clipped by supply, no load applied.	2.80		5.0	V
Supply Current	Including Load Resistor	8	18	50	ma
Video Output					
See Note 1					
Video Out (VO) – Ext. Load	@ Supply voltages less than Saturation Voltage, VO is clipped by supply, no load applied.	330		10k	Ohms
Output Voltage @ Saturation		2.8	3.3	4.0	V
Output Voltage @ Dark		0.64	0.74	0.84	V
Electro-optical					
See Note 1					
Pixel FPN - PRNU	Non-Uniformity 50% Sat		±0.3		% Total
Pixel FPN - DSNU	Non-Uniformity Dark		±0.3		% Total
Linearity	Pixel avg. from 5% - 75% Saturation		1.0		% SAT
Well Capacity (Full Well)			8.0		Me-
Sensitivity	From 5% - 75% Saturation. Unloaded video, values typical and may vary.		0.32		µv/e-
Quantum Efficiency	675nm		60		%

Output Due To Dark Current	At 24 °C	2	19	38	mV/s
Signal/Noise (RMS)	Temporal RMS noise @ 1 MHz etc and 500 KHz video bandwidth filter applied.		>84		db
Spectral Response Range		350		1100	nm
Environmental					
Relative Humidity Range		0		85	%
Operating Temperature Range		0	25	50	°C

- Note 1: Specs. given at pixel read rates of 1 MHz. At higher read rates, MTF and S/N begin to degrade. End pixels response may vary from nominal array characteristics. S/N values are typical and may vary. Higher S/N ratios obtainable with lower clock speed and bandwidths.
- Note 2: RST is specified to be initiated for 3 CLK_{IN} cycles to insure proper reset of pixels. Shorter pulse widths will reset the internal timing, but may not fully reset pixels.

SIGNAL DESCRIPTION & PACKAGE PINOUT

Signal	I/O type	Definition	16 Pad LCC
GND	----	Ground Reference.	1
CLK	Input	Clock	3
PRE	Input	Pixel Reset Enable	5
RMS	Input	Reset Mode Select	7
RST	Input	External Reset/Start pixel read	10
VO	Output	Video Output	12
SYN	Output	Sync Output	14
VDD	Input	Supply Voltage	16

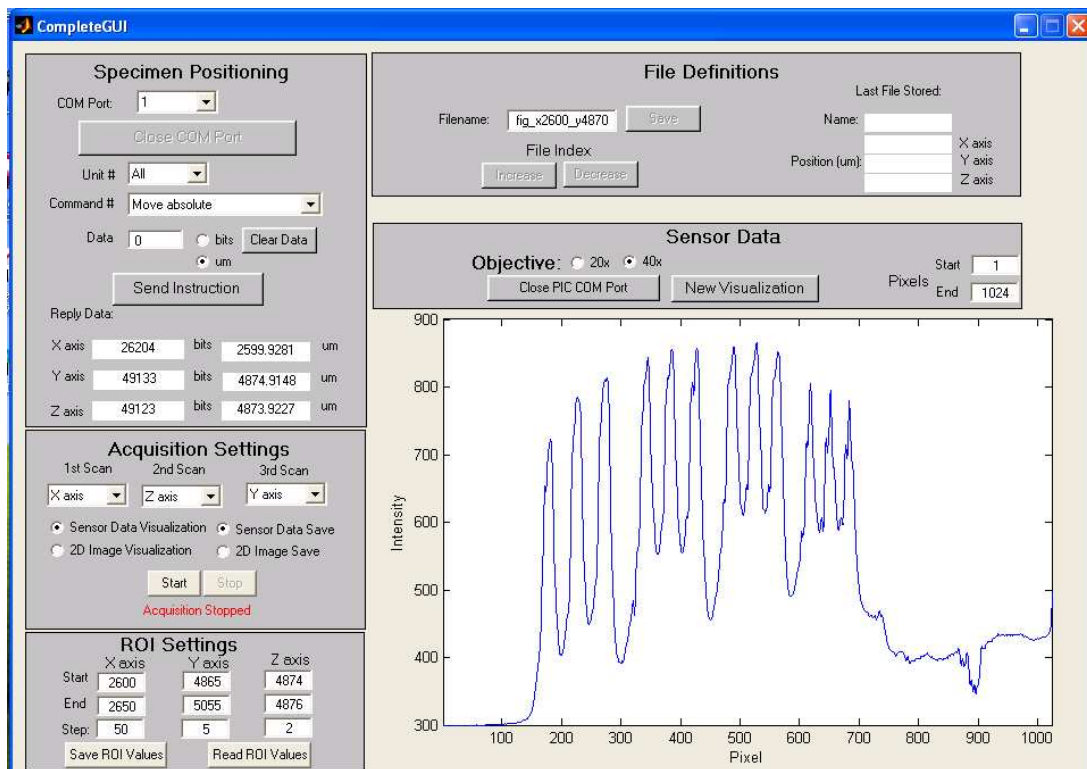


Note: Data below 350nm not measured, but device is sensitive to 200 nm. Shown for un-encapsulated device.

Apêndice 3.3. GUIs

Complete_GUI

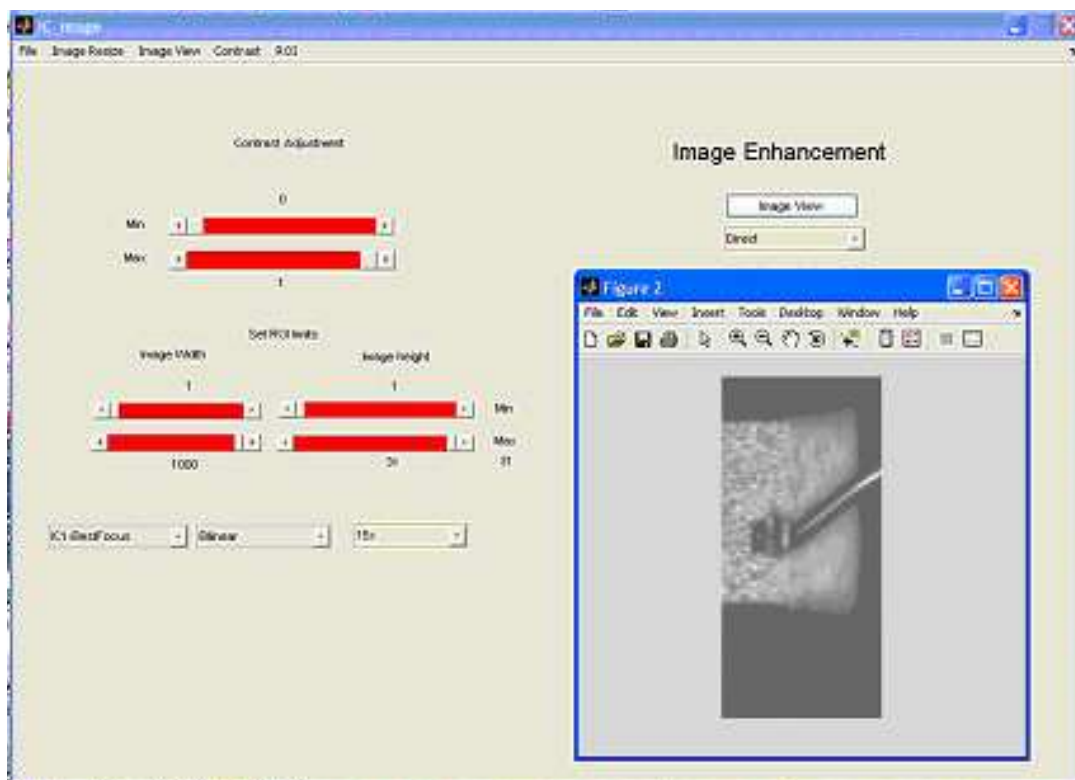
Aplicação	Tarefas
CompleteGUI	<ul style="list-style-type: none">• Envio de comandos para posicionadores (porto série)• Leitura de dados do sensor (porto série)• Visualização de cada leitura do sensor em tempo real• Criação de ficheiros de dados em formato Excel



Apêndice 3.3. GUIs

IC_Image

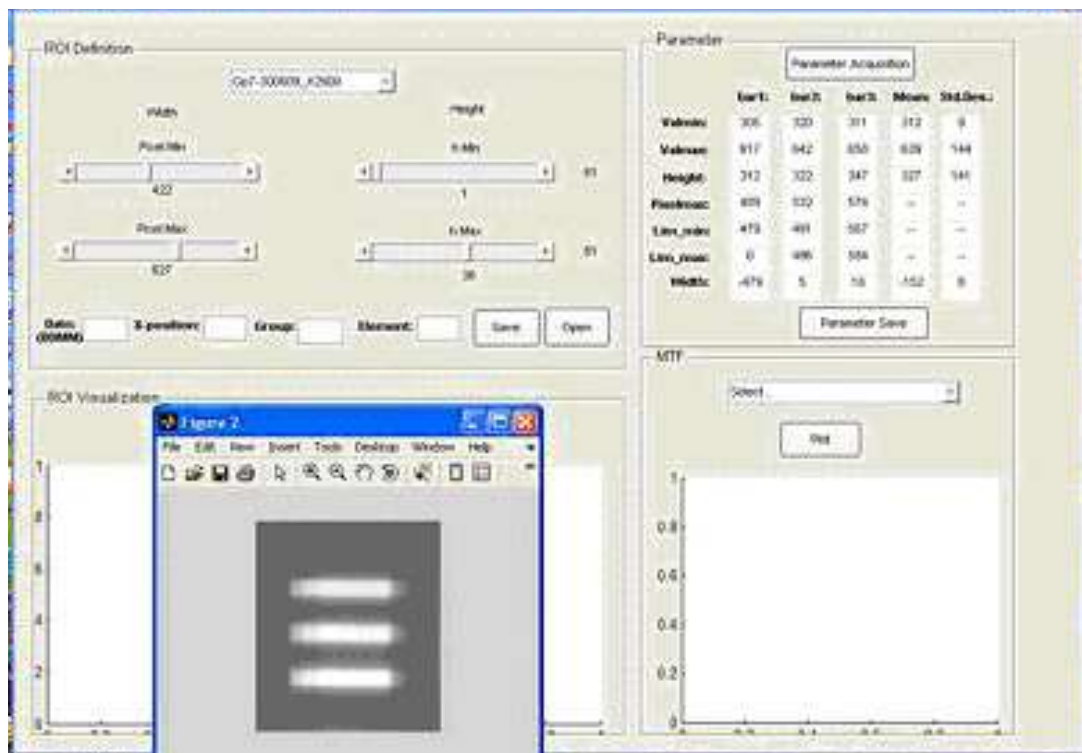
Aplicação	Tarefas
IC_image	<ul style="list-style-type: none">• Ajuste de contraste• Definição de ROIs• Definição do método e factor do <i>imresize</i>• Visualização de imagens 2D



Apêndice 3.3. GUIs

USAF_Image

Aplicação	Tarefas
USAF_image	<ul style="list-style-type: none">• Definição de ROIs• Visualização da ROI• Gravação do ficheiro imagem (formato JPG)• Aquisição parâmetros (máximo e mínimo, pixel máximo,...)



Apêndice 3.3. GUIs

Profilometry_SiFrame

Aplicação	Tarefas
Profilometry_SiFrame	<ul style="list-style-type: none">• Definição de ROIs• Selecção do modo de visualização (2D ou 3D)• Selecção do algoritmo de reconstrução 3D• Representação do perfil 3D

