

**Título em Português:** Desenvolvimento de algoritmos de reconstrução de fase para microscópio óptico sem lentes

**Título em Inglês:** development of phase retrieval algorithms for lens-free optical microscope

**Autor:** Natália Portes de Oliveira

**Instituição:** Universidade de São Paulo

**Unidade:** Instituto de Física de São Carlos

**Orientador:** Sebastião Pratavieira

**Área de Pesquisa / SubÁrea:** Física Geral

**Agência Financiadora:** FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

## **Desenvolvimento de algoritmos de reconstrução de fase para microscópio óptico sem lentes**

**Natália Portes de Oliveira**

**Camila Almeida de Paula D’Almeida**

**Sebastião Prata Vieira**

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo

[nataliaportes@usp.br](mailto:nataliaportes@usp.br)

### **Objetivos**

Os microscópios ópticos holográficos sem lentes são uma alternativa aos modelos tradicionais da microscopia óptica, apresentando vantagens quanto ao campo de visão e instrumentação simples. As imagens obtidas por esse microscópio são hologramas, que passam por uma reconstrução digital após a aquisição das imagens. O processo digital desses hologramas inclui a recuperação de fase, que é perdida durante a captação da luz pelo sensor. [1]

O objetivo desse trabalho é a compreensão do funcionamento dos microscópios ópticos holográficos sem lentes e a elaboração de algoritmos que possam ser implementados em tais microscópios. Esses algoritmos foram escritos na linguagem de programação Python e são baseados no método de espectro angular para a propagação da luz, além de outros dois métodos para a recuperação de fase de imagens. Em particular, foram usados o método denominado “Multialturas”, que utiliza imagens obtidas com múltiplas distâncias entre amostra-sensor, e o “Multiespectral” que utiliza múltiplos comprimentos de onda para formação dos hologramas. Todos os algoritmos foram executados no microscópio óptico holográfico sem lentes que está em desenvolvimento no grupo de pesquisa do qual o projeto faz parte.

### **Métodos e Procedimentos**

O processamento envolvido pode ser dividido em propagação da luz e reconstrução de fase. Na primeira parte, a luz é modelada computacionalmente com o intuito de representar virtualmente o que aconteceria no meio físico. Para tal, usamos o método do espectro angular, que é baseado na óptica de Fourier. A descrição do campo óptico tridimensional é tida como uma somatória de ondas planas. Por esse método, a partir da informação de fase e amplitude do campo elétrico num plano inicial, conseguimos calcular a propagação do mesmo em outros planos paralelos a ele. [1]

Após a modulação da luz, a próxima etapa é a recuperação de fase. O método Multialturas usa informações de diferentes planos do campo elétrico. São usados 6 planos, o equivalente a 6 hologramas, de uma mesma amostra obtidos a 6 diferentes distâncias do sensor. As informações dos diferentes planos entram com o propósito de convergir os valores de fase ao fim do processamento. Portanto, ao final desse algoritmo, espera-se obter um sinal de fase aproximada suficiente para uma reconstrução apropriada.[1] No multiespectral, são obtidos hologramas de uma mesma amostra com múltiplos comprimentos de onda. Os hologramas capturados são, então, individualmente propagados para o plano da amostra onde temos a imagem final. [2]

Além dos métodos descritos anteriormente, é incluindo o algoritmo para achar o foco

automaticamente, já que as imagens captadas se formam no plano do sensor. [3]

## Resultados

Imagens do padrão USAF-1951 foram usadas de amostra teste e avaliadas através da análise do perfil de intensidade, onde a forma desse perfil evidencia a qualidade do contraste dos elementos da amostra com o plano de fundo da imagem. Foram adquiridos também hologramas de amostras biológicas (fibroblastos, *Candida albicans* e microalgas).

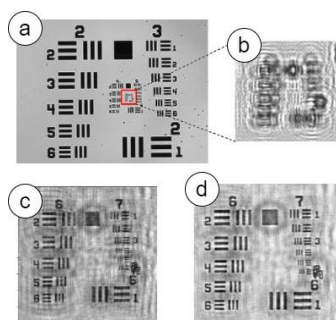


Figura 1: a) Holograma adquirido pelo sensor; b) Detalhe da seleção em vermelho; c) Holograma em foco; d) Holograma processado pelo método do Multialturas.

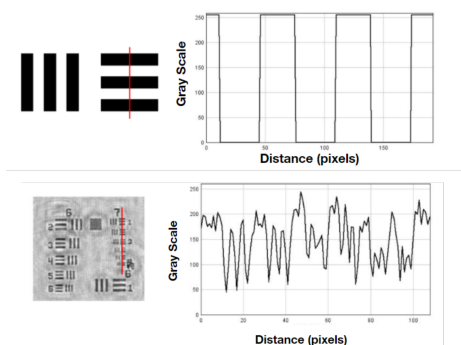


Figura 2: o perfil de intensidade de pixel. Resultado para processamento de alturas múltiplas. A linha vermelha corresponde à região analisada, para cada pixel há um valor de escala de cinza correspondente.

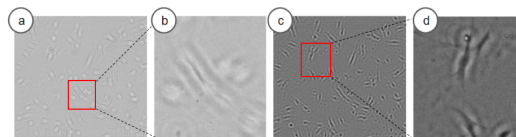


Figura 3: Cultura de Fibroblastos pelo Multiespectral. a) Área processada. b) Detalhe da área processada. c) Imagem de fase da área processada. d) Detalhe da imagem de fase da área processada.

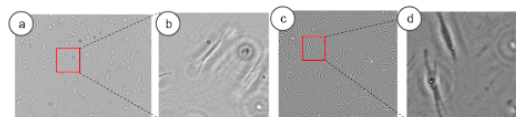


Figura 4: Cultura de Fibroblastos pelo Multialtura. a) Área processada. b) Detalhe da área processada. c) Imagem de fase da área processada. d) Detalhe da imagem de fase da área processada

## Conclusões

Os métodos de reconstrução de fase foram implementados e testados. Foi usado a amostra padrão USAF-1951, que serviu de referência para análise de qualidade do processamento aplicado. Depois foram processadas imagens de culturas biológicas, (fibroblastos, *Candida albicans* e microalgas). Ambos os métodos obtiveram desempenho semelhante, optando-se por utilizar o método multialturas no sistema, por oferecer maior facilidade de aprimoramento para aumentar a resolução. O sistema atual tem um campo de visão de 30mm<sup>2</sup> e resolução de é de aproximadamente 4µm.

## Referências Bibliográficas

- [1] GREENBAUM, A.; OZCAN, A. Maskless imaging of dense samples using pixel super-resolution based multiheight lensfree on-chip microscopy. *Optics Express*, v. 20, n. 3, p. 3129-3143, 2012.
- [2] ALLIER, C. et al. Imaging of dense cell cultures by multiwavelength lens-free video microscopy. *Cytometry A*, v. 91, n. 5, p. 433-442, 2007
- [3] TAMAMITSU, M. et al. Comparison of Gini index and Tamura coefficient for holographic autofocus based on the edge sparsity of the complex optical wavefront. 2017. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/1708.08055>. Acesso em: 6 out.2020

## **Development of phase retrieval algorithms for lens-free optical microscope**

**Natália Portes de Oliveira**

**Camila Almeida de Paula D'Almeida**

**Sebastião Pratavieira**

São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo

nataliportes@usp.br

### **Objectives**

Lensless holographic optical microscopes are an alternative to traditional models of optical microscopy, offering advantages in terms of field of view and simple instrumentation. The images obtained by this microscope are holograms, which undergo a digital reconstruction after image acquisition. The digital process of these holograms includes the phase recovery, which is lost during the light capture by the sensor.[1]

The objective of this work is to understand how lensless holographic optical microscopes work and to develop algorithms that can be implemented in such microscopes. These algorithms were written in the Python programming language and are based on the angular spectrum method for light propagation, in addition to two other methods for image phase recovery. In particular, the method called "Multiheight", which uses images obtained with multiple distances between sample-sensor, and the "Multispectral" method, which uses multiple wavelengths to form the holograms, were used. All algorithms were executed in the lensless holographic optical microscope that is under development in the research group of which the project is part.

### **Materials and Methods**

The image processing involved can be divided into light propagation and phase reconstruction.

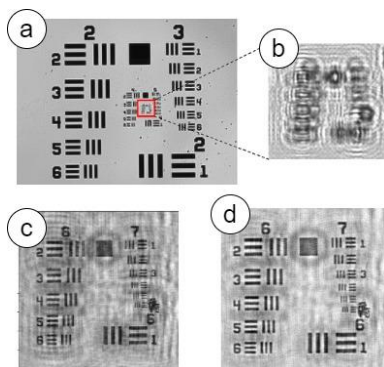
In the first part, light is computationally modeled in order to virtually represent what would happen in the physical domain. To do so, we use the angular spectrum method, which is based on Fourier optics. The description of the three-dimensional optical field is taken as a summation of plane waves. By this method, from the information of the phase and amplitude of the electric field in an initial plane, we were able to calculate its propagation in other planes parallel to it.[1]

After light modulation, the next step is phase recovery. The Multi-height method uses information from different planes of the electric field. 6 planes are used, equivalent to 6 holograms, of the same sample obtained at 6 different distances from the sensor. Information from different planes is entered for the purpose of converging the phase values at the end of processing. Therefore, at the end of this algorithm, it is expected to obtain a sufficient approximate phase signal for a proper reconstruction.[1] In multispectral, holograms of the same sample with multiple wavelengths are obtained. The captured holograms are then individually propagated to the sample plane where we have the final image.[2]

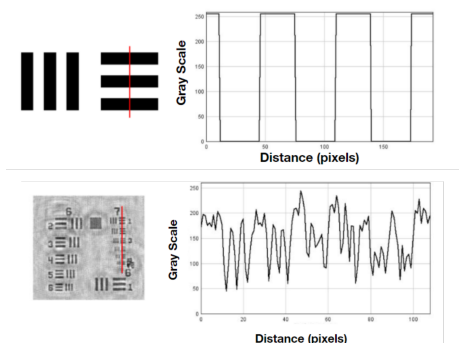
In addition to the methods described above, the algorithm to automatically find the focus is included, since the captured images are formed in the sensor plane.[3]

## Results

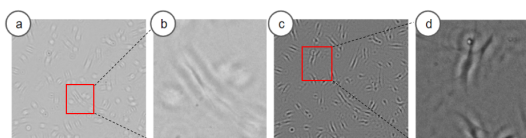
Images of the USAF-1951 chart were used as a test sample and evaluated through the analysis of the intensity profile, where the shape of this profile highlights the contrast quality of the sample elements with the background of the image. Holograms of biological samples (fibroblasts, *Candida albicans* and microalgae) were acquired too.



Picture 1: a) Hologram acquired by the sensor; b) Selection detail in red; c) Hologram in focus; d) Hologram processed by the multiheight method

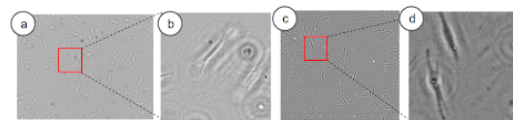


Picture 2: the pixel intensity profile. Result for multiheight processing. The red line corresponds to the analyzed region, for each pixel there's a corresponding grayscale value.



Picture 3: Fibroblast Culture by Multispectral. a) Area processed. b) Detail of the processed area. c) Phase

image of the processed area. d) Detail of the phase image of the processed area.



Picture 4: Fibroblast Culture by Multi Altura. a) Area processed. b) Detail of the processed area. c) Phase image of the processed area. d) Detail of the phase image of the processed area.

## Conclusions

Phase reconstruction methods were implemented and tested. First, the standard sample USAF-1951 was used, which served as a reference for quality analysis of the applied processing. Then images of biological cultures (fibroblasts, candida and microalgae) were processed.

Both methods achieved similar performance. Therefore, the multi-height method was chosen to be used in the system, as it offered resolution improvement opportunities.

The current system has a field of view of 30mm<sup>2</sup> and resolution is approximately 4μm.

## References

- [1] GREENBAUM, A.; OZCAN, A. Maskless imaging of dense samples using pixel super-resolution based multiheight lensfree on-chip microscopy. *Optics Express*, v. 20, n. 3, p. 3129-3143, 2012.
- [2] ALLIER, C. et al. Imaging of dense cell cultures by multiwavelength lens-free video microscopy. *Cytometry A*, v. 91, n. 5, p. 433-442, 2007
- [3] TAMAMITSU, M. et al. Comparison of Gini index and Tamura coefficient for holographic autofocusing based on the edge sparsity of the complex optical wavefront. 2017. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/1708.08055>. Acesso em: 6 out.2020