

IMPACTO DA ABERTURA NUMÉRICA E MAGNIFICAÇÃO DAS OBJETIVAS NO CAMPO DE VISÃO DOS MICROSCÓPIOS ÓPTICOS DIGITAIS

Jéssica Guerreiro S Ramalho¹; Valéria Loureiro da Silva²

¹ Bolsista PD&I – EMBRAPA; jessica.ramalho@fbter.org.br

² Doutora em Física; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; valeria.dasilva@fieb.org.br

RESUMO

O campo de visão e a resolução são duas importantes especificações de microscópios ópticos digitais e estão diretamente relacionados com a escolha de componentes críticos do sistema: a objetiva e a câmera. No caso de microscópios de alta resolução, para otimizar a escolha destes componentes uma alternativa é determinar, segundo os critérios de Rayleigh e Nyquist, um sensor de imagem cuja resolução fornecida ao microscópio esteja limitada pela difração, e, a partir deste especificar uma objetiva que maximize o aproveitamento do campo de visão do conjunto. Com o objetivo de analisar esse aproveitamento em função da abertura numérica e da magnificação da objetiva, um diagrama apresentado a proporcionalidade para os campos de visão foi construído. Observou-se que a objetiva de 100X com abertura numérica de 1,49 é a que máxima o aproveitamento do campo de visão do sensor escolhido, mantendo a resolução do sistema no limite de difração. O método apresentado para a determinação desses componentes deve ser implementado para cada microscópio óptico digital em desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVE: Campo de visão, objetiva de microscopia, sensor de imagem, câmera

1. INTRODUÇÃO

Ao contrário dos microscópios tradicionais, que utilizam uma ocular para realizar a inspeção visual, os microscópios digitais utilizam câmeras para gravar e capturar imagens da amostra, proporcionando maior resolução e precisão do que o que normalmente é visto no olho humano. Existem inúmeras aplicações e configurações para esses microscópios, e dependendo do conjunto de elementos escolhido, a montagem do equipamento pode ser bastante complexa. No entanto, saber quais componentes adotar e como eles trabalham juntos torna o processo acessível para aplicações biológicas, industriais e quaisquer outras aplicações de inspeção.

Simplificadamente, os microscópios digitais são constituídos por três macro sistemas: iluminação, ampliação e imageamento. As especificações finais do microscópio, como resolução, magnificação, campo de visão e uniformidade da iluminação, são impactadas pela relação que será estabelecida entre os sistemas, e não por cada sistema isoladamente.¹

Para o sistema de iluminação, grande parte dos microscópios utiliza a iluminação da luz de fundo em comparação com a iluminação tradicional por luz direta, que comumente satura o objeto sob inspeção. Um tipo específico de iluminação de fundo difundido em várias aplicações de microscopia é a iluminação Kohler.¹

O sistema de ampliação é formado principalmente pela objetiva, que é na maior parte dos casos, o componente mais complexo de um microscópio. Disponíveis em várias categorias e tipos, como: refrativa ou reflexiva; conjugada no finito ou infinito; com correção acromática, apocromática, semi-apocromática ou plano-apocromática; de imersão a óleo, água ou ar e com magnificação que variam de 2X a 200X. Para escolher a objetiva correta, é importante conhecer e relacionar os benefícios de cada categoria com a aplicação do equipamento. Microscópios com aplicações biomédicas, industriais e para pesquisa são majoritariamente formados por objetivas de microscopia corrigida para o infinito e uma segunda lente chamada *tube lens*.

Para o sistema de imageamento, formado principalmente pelo sensor de imagem (ou câmera) a generalização comum "Quanto mais pixels, melhor" possui restrições. A solução ideal deve otimizar todos os componentes, considerando também o tamanho do pixel que atenda ao Limite de Nyquist.

Dentre as especificações relevantes de um microscópio, o campo de visão é um dos parâmetros críticos que sofre os impactos das escolhas dos componentes do sistema de ampliação e imageamento. O campo de visão desejado de um microscópio precisa ser determinado em função da aplicação do equipamento, ou seja, a dimensão de área que será inspecionada. Acoplado diretamente a resolução da imagem, esses dois parâmetros devem ser especificados prioritariamente, a fim de guiar a escolha dos componentes de cada um dos sistemas.

Neste artigo, será avaliada a relação entre o sistema de imageamento e amplificação considerando os impactos da escolha da objetiva no aproveitamento do campo de visão total.

2. METODOLOGIA

A resolução máxima resolvível no plano da imagem é igual ao o dobro do tamanho do pixel do sensor, segundo o critério de Nyquist². Dessa forma, temos uma equação geral para determinar o tamanho do pixel que o sensor deve ter para que determinada resolução seja atingida:

$$\text{Tamanho do pixel} \leq \frac{\text{Resolução desejado no objeto} \times \text{Magnificação da objetiva}}{2}$$

Para microscópios ópticos de alta resolução, por exemplo, deseja-se que a resolução alcançada pelo sensor seja limitada pela difração¹, ou seja,

$$\text{Resolução desejada no objeto} = \frac{1,22 \times \lambda}{2 \times NA}$$

em que, λ é o comprimento de onda da luz incidente e NA é a abertura numérica da objetiva.

Para esses microscópios, o sensor de imagem pode ser escolhido de tal forma que permita, para qualquer magnificação de objetiva, manter a melhor resolução limitada pela difração.

Para tanto:

- A resolução desejada deve ser calculada considerando a maior abertura numérica encontrada para objetivas comerciais $NA = 1,49$, com o um comprimento de onda que esteja no meio do espectro visível, $\lambda = 540 \text{ nm}$. Ainda que na aquisição real a abertura numérica seja menor do que esta, o tamanho máximo do pixel calculado continuará sendo suficiente para garantir o limite de Nyquist.

- O cálculo do tamanho do pixel deve adotar a menor magnificação considerada, no caso de microscópios de alta resolução, 60X. Assim, ainda que na aquisição real a magnificação seja maior, o tamanho máximo do pixel calculado também continuará sendo suficiente para garantir o limite de Nyquist.

Esse método indica que a escolha de um sensor com pixel de no máximo $6,63 \mu\text{m}$ atenderá ao limite de Nyquist para qualquer objetiva com magnificação maior que 60X, abertura numérica menor que 1,49 e com amostra iluminada majoritariamente por luz branca. O sensor comercial escolhido para seguir com a análise foi o acA2040-90uc da Basler, que possui píxeis de $5,5 \mu\text{m}$ e área quadrada com $11,3 \text{ mm}$ de lado. Será possível a partir de então, avaliar o impacto da escolha da objetiva no aproveitamento do campo de visão total.

Campo de visão é a área total de amostra que pode ser imageada pelo microscópio, incluindo o sistema de ampliação e imageamento. O sensor escolhido é quadrado e, portanto, só pode capturar uma parte do campo de visão circular completo da objetiva, fornecido pelo fabricante.

Na pesquisa entre os principais fornecedores de microscopia, foram encontradas sete objetivas de microscopia com características de abertura numérica e magnificação comuns a microscópios de alta resolução e que atendem aos critérios mencionados anteriormente. O cálculo do campo de visão do sistema com objetiva e sensor de imagem definido é dado por ³:

$$\text{Campo de visão} = \frac{\text{Tamanho do sensor}}{\text{Magnificação da objetiva}}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de comparar o aproveitamento do campo de visão de cada conjunto formado pela objetiva e sensor com relação ao campo de visão total da objetiva do conjunto foi construído o diagrama da Figura 1 a seguir. O campo de visão das objetivas representado no diagrama para as objetivas é fornecido por seu fabricante e nota-se que não há um padrão para esse parâmetro nem em função das magnificações nem em função das aberturas numéricas.

Observa-se que a objetiva de 100X com abertura numérica 1,49 apresenta o maior aproveitamento do campo de visão, 50,2%, quando associada ao sensor quadrado de $11,3 \text{ mm}$ de lateral, enquanto que a objetiva de 60X de magnificação e abertura numérica de 1,42 apresenta o menor aproveitamento, 23,2%. A objetiva de 100X e NA de 1,49 seria então a mais recomendada para esse sistema.

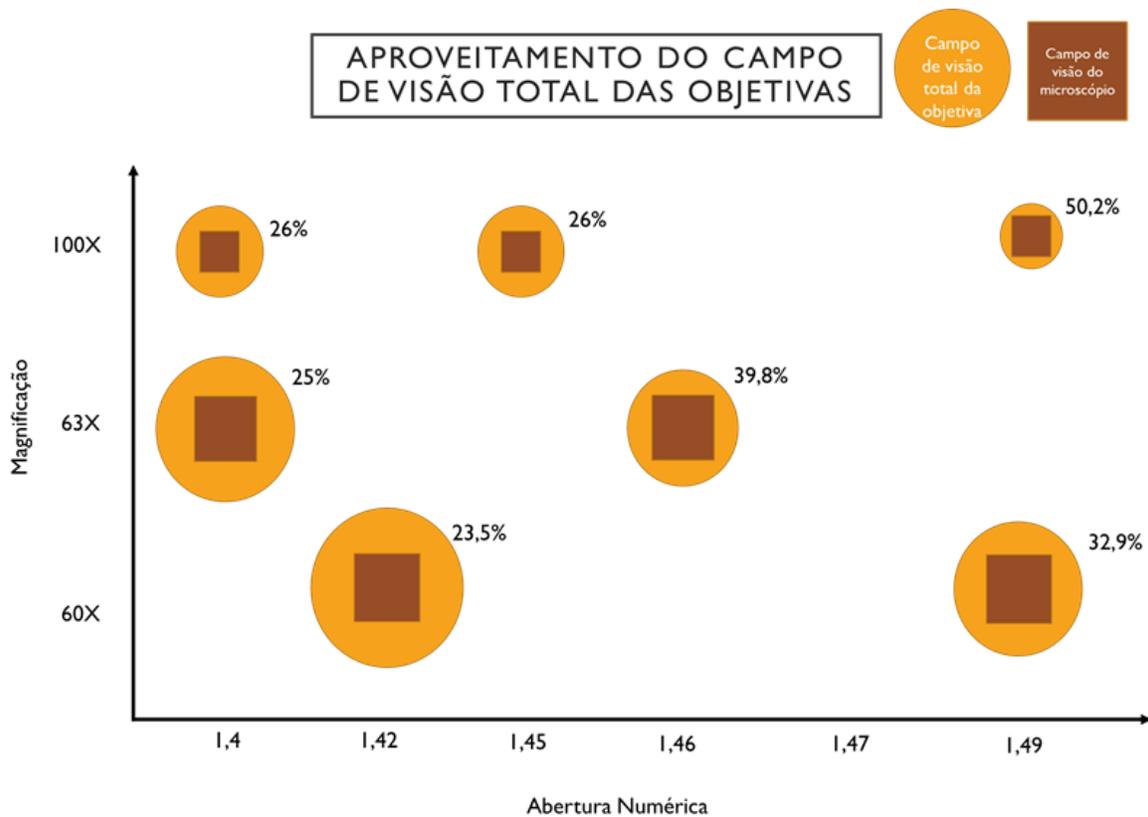


Figura 1. Aproveitamento do campo de visão total das objetivas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como na construção de qualquer equipamento a otimização dos recursos disponíveis é sempre desejável, uma análise similar a esta apresenta aqui deve ser realizada quando objetivas e sensor estiverem relacionados para a formação de uma imagem. O custo dos componentes não foi levado em consideração nesse estudo, e poderia ser um fator determinante adicional para a escolha da objetiva.

5. REFERÊNCIAS

- ¹ MURPHY, Douglas. **Fundamentals of Light Microscopy**. Wiley-Liss, Inc. 2001.
- ² HORNBERG, Alexander. **Handbook of Machine and Computer Vision**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2017.
- ³ HECHT, Eugene **Optics**, 4th ed. Addison Wesley, 2001