Priscila Braga Calíope

Caracterização de nanofibras através de técnicas de processamento de imagens

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Engenharia Elétrica.

São Paulo
2009

Priscila Braga Calíope

Caracterização de nanofibras através de técnicas de processamento de imagens

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Engenharia Elétrica.

Área de concentração:
Sistemas Eletrônicos

Orientador:
Prof. Dr. Livre-Docente
Emilio Del Moral Hernandez

São Paulo
2009

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, de de 200

Assinatura do autor

Assinatura do orientador

FICHA CATALOGRÁFICA

Calíope, Priscila Braga

**Caracterização de nanofibras através de técnicas de processamento de imagens / P.B. Calíope. – ed. rev.– São Paulo, 2009.
150 p.**

Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

1.Materiais nanoestruturados 2.Microscopia eletrônica de varredura 3.Processamento de imagens I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos II.t.

A Fátima, Paloma, Daniele e Alex com amor

Agradecimentos

Aos meus pais, meus eternos agradecimentos pela sólida formação dada até minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada ao doutorado. Mãe, obrigada pelo seu zelo, pela sua fortaleza e alegria e por nunca descuidar da minha saúde afetiva.

À minha sobrinha linda Dani. Pelo aconchego da voz rouca suave, pela doçura e alegria que sempre me trazem serenidade.

À minha irmã Paloma. Por ao me deparar com banalidades, egoísmo e outros sentimentos superficiais não me fazer esquecer dos valores do afeto e da educação dados pelos nossos pais.

Ao meu querido Alex por me fazer apreciar com menos ilusões, consentir com menos sofrimento e entender com mais tranquilidade. Obrigada pelo apoio de sempre.

Ao meu querido tio Machado. No que se vê, no que se ouve e no que se sente, quando perto de você, traduz-se no mais sublime amor. É uma benção ter você na minha vida.

Ao meu orientador professor Emilio Del Moral Hernandez pela disponibilização do ambiente de trabalho e pelos contatos estabelecidos com professores e colegas na USP, que me facilitaram o acesso a uma pesquisa enriquecedora. Obrigada por suas contribuições e incentivo na elaboração de trabalhos e pelas criteriosas discussões e revisões para conclusão desta tese.

À professora Ana Neilde Rodrigues da Silva com quem partilhei diversos interesses comuns, pelas discussões de microeletrônica nos cafés à tarde e pelas imagens disponibilizadas para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos pela sua participação na banca de qualificação que, com certeza, contribuiu para ampliar a qualidade desta tese.

À professora Fátima Sombra sou imensamente grata pelas inúmeras discussões e sugestões e pela orientação que transcende o desenvolvimento desta tese. Agradeço, sobretudo, à última acolhida no Laboratório de Visão, Imagens e Sinais da Universidade Federal do Ceará (LABVIS-UFC) que permitiu a finalização de um artigo, discussões com

os amigos do Grupo de Processamento de Imagens (GPI) e conduzir as conclusões desta tese.

Ao professor Roberto Hirata pela sua permanente solicitude em discussões em todas as fases deste trabalho, bem como por seus questionamentos e contribuições na etapa da qualificação, mesmo se alguns deles não pude (ou soube) aproveitar devidamente.

A todos os amigos da dança, Dri, Vivi, Anderson, Fabinho, Beth, Nalvinha, Ana, Francisco, Jo, Cris, Filó, Nívea e Fernando pela alegria compartilhada às sextas e sábados e nos bailes. Por último, não menos importante, gostaria de agradecer especialmente ao querido amigo e professor Ricardo Fernandes por não deixar morrer o verdadeiro sentido da dança... o da inclusão. Dançar é expressar emoções por meio do corpo e não deve ser restrito a alguns. Obrigada pelo exemplo de vida, pelo sorriso largo e por despertá-lo nos outros, por fazer sonhar com os pés no chão.

À uma família muito especial que mais merece uma homenagem que agradecimentos. Primeiramente, gostaria de agradecer à responsável por me apresentá-la e de dedicar também este trabalho a ela. À minha amada amiga Janaina Vasconcelos pela amizade generosa de sempre. Jana, você dá real sentido à palavra amizade e sou imensamente grata por tê-la na minha vida. Agradeço à minha amada Dona Dilma linda por sempre me receber com tanto carinho na sua casa, à alegria da Ju e da Rosa, e aos cuidados do querido Zé Júlio e da Cleo.

Aos meus queridos amigos Angélica, Cristian, Helena e Sérgio pelo carinho e companheirismo, por serem minha família por aqui. Pelas tarefas que realizamos na USP, pelas idas à Kadalora, pelas batidas de milho brindadas e por todos os momentos que dividimos.

A minha querida amiga Paola Simoni por me aquietar quando me encontrava em total e completo desassossego, pela amabilidade inestimável traduzida sempre em longas conversas e por entender minha ausência em momentos especiais. Sou imensamente grata por seu afeto e apoio.

Ao querido amigo Regis Marques pela amizade, pelas dicas, pelo apoio e auxílios incondicionais que transpuseram a distância que nos separa. Meus sinceros agradecimentos.

Ao amigo Geraldo Ramalho do LabVis. Geraldo, muito obrigada pela importante colaboração a esta tese por meio de inúmeros mails trocados e em meio à tantas outras tarefas e responsabilidades que lhe tomam tanto tempo. Sua contribuição foi valiosa para aumentar a qualidade deste trabalho.

Sem pretensão de ser representante de regionalismos, apenas de viver e de proporcionar felicidade aos que me são importantes, gostaria de agradecer aos amigos Dudu e Jana Morena, por reciclar meu sotaque e por reavivar as peculiaridades alegres da minha terra.

Ao amigo Daniel Scodeler pelas inúmeras dicas de como não desperdiçar oportunidades e de sempre atentar-me para aperfeiçoar e adquirir conhecimentos.

Aos professores Henrique Del Nero, Ivette Oppenheim, Marco Túlio de Andrade, Aquiles Grimoni, Zsolt Kovacs e Cristina Borba responsáveis pela minha formação durante o doutorado. Muito obrigada por bem dosarem críticas e discussões com sugestões e comentários de incentivo.

Um agradecimento especial deve ser feito ao Adir Moreira do LSI-EPUSP, pelo fornecimento das imagens SEM e pela sua disponibilidade de sempre em prestar maiores esclarecimentos a respeito das mesmas.

Gostaria de agradecer ao suporte financeiro através da bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq - Programa Nacional de Microeletrônica. Ao Grupo de Inteligência Computacional, Modelagem e Neurocomputação do Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (grupo ICONE-LSI-EPUSP), por fornecer a infra-estrutura necessária para a realização dos diversos experimentos desenvolvidos para elaboração desta tese. Em especial gostaria de agradecer os amigos Maria Cecília e Edson Kitani pelas agradáveis conversas, pelas discussões e sugestões valiosas.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

O *electrospinning* (deposição eletrostática) representa um método simples e conveniente para preparar fibras poliméricas e fibras cerâmicas com interiores sólidos ou ocos, excepcionalmente longos em comprimento, uniformes no diâmetro, variando no intervalo de dezenas de nanômetros a vários micrômetros, com diversificadas composições. Apesar da potencialidade e versatilidade da Microscopia Eletrônica de Varredura existe um grande problema de caracterizar nanofibras, já que este processo não é feito automaticamente. Este trabalho apresenta uma nova metodologia para extração automática de medidas em imagens SEM, como uma alternativa eficiente em relação aos *softwares* semi-automáticos propostos na literatura. A metodologia proposta envolve o processamento das imagens SEM usando Morfologia Matemática e os resultados obtidos são discutidos e comparados àqueles processados por Redes Neurais Celulares e pelo método de Otsu. Imagens coletadas do microscópio foram analisadas por técnicas de processamento de imagens para determinação do diâmetro das nanofibras. Os resultados mostraram boa concordância entre as metodologias estudadas e o método padrão-ouro indicando que os mesmos podem substituí-lo para constituir uma alternativa automática na caracterização de nanofibras.

Abstract

The electrospinning technique represents a simple and convenient process to provide polymers and ceramics fibers with both solid and hollow interiors that are exceptionally long in length, uniform in diameter, varying within the interval of few nanometers to several microns, and diversified in composition. Despite the versatility and potentially the scanning electron microscopy (SEM) there is a serious problem to characterize nanofibers, as it is not made automatically. This work presents novel methodology software for automatic measurement in SEM images, as an efficient alternative in comparison with semi-automatic softwares proposed in literature. The proposed methodology involves the image processing SEM using Mathematical Morphology and the obtained results are argued and compared with those processing for Cellular Neural Network and Otsu method. The microscope images were assessed and analysed by imagery processing techniques to determinate diameters of nanofibers. The results has shown good agreement between the investigated and gold standard methods suggesting that the same ones can substitute it to constitute an automatic alternative in the nanofibers characterization.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

1	Introdução	1
1.1	Motivação	4
1.2	Objetivo	7
1.3	Contribuições	7
1.4	Organização do trabalho	8
2	Produção de Nanofibras e Métodos de Aquisição de Imagens	9
2.1	O <i>setup</i> básico para o <i>eletrospinning</i>	10
2.2	Como controlar a deposição eletrostática das nanofibras	12
2.3	Características e aplicações	14
2.3.1	Características únicas das nanofibras eletrodepositadas	14
2.3.2	Aplicações das nanofibras eletrodepositadas	15
2.4	Princípios de funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM)	19
2.5	Considerações finais	21
3	Principais Ferramentas para Segmentação e Caracterização de Imagens de Nanofibras	22

3.1	Redes Neurais Celulares	24
3.1.1	A arquitetura de Redes Neurais Celulares	24
3.1.2	Aplicações de Redes Neurais Celulares para processamento de imagens	29
3.2	Processamento morfológico de imagens	30
3.3	Método de Otsu	35
3.4	Transformada de Hough	36
3.5	Medidas para avaliação da segmentação	38
3.6	Análise da caracterização	42
3.7	Considerações finais	47
4	Metodologia Proposta	48
4.1	Procedimento experimental	48
4.2	Segmentação das imagens	49
4.2.1	Redes Neurais Celulares	49
4.2.2	Processamento morfológico	51
4.3	Extração de diâmetros por processamento morfológico	52
4.4	Solução de problemas das imagens de nanofibras	53
4.5	Análise de concordância entre métodos	55
4.6	Considerações finais	57
5	Resultados Experimentais	59
5.1	Resultados e discussões	60
5.2	Resultados para nanofibras sem regiões de entrecruzamento	61
5.2.1	Resultados para a imagem da Figura 5.2(a)	61
5.2.2	Resultados para a imagem da Figura 5.2(b)	68
5.3	Resultados para nanofibras com regiões de entrecruzamento	73
5.3.1	Resultados para a imagem da Figura 5.11(a)	74

5.3.2	Resultados para a imagem da Figura 5.11(b)	82
5.4	Considerações finais	88
6	Conclusão	89
6.1	Conclusões gerais	89
6.2	Contribuições futuras	91
	Referências	93
	Anexo A – Publicações acadêmicas	100
	Anexo B – Resultados de aplicação do algoritmo	101
	Anexo C – Algoritmos	122
	Apêndice A – Intervalos de confiança para média de população	127
	Apêndice B – Intervalos de confiança para desvio padrão da população	128

Lista de Figuras

1.1	Imagem de nanofibras com demarcações de alguns diâmetros realizadas por especialista.	6
2.1	Imagem de nanofibras com gotas.	14
3.1	Uma rede neural celular bidimensional com matriz 4x4. Figura adaptada de (CHUA; YANG, 1988b).	25
3.2	Um exemplo de um circuito de uma célula. Figura adaptada de (CHUA; YANG, 1988b).	25
3.3	A característica da fonte controlada não-linear. Figura adaptada de (CHUA; YANG, 1988b).	26
3.4	Processamento morfológico (a) imagem original (b) imagem limiarizada (c) imagem erodida e (d) imagem dilatada.	32
3.5	Processamento morfológico (a) imagem ruidosa (b) processamento do filtro τ -abertura para supressão de ruído cuja área seja menor que 5 <i>pixels</i> (c) processamento do filtro τ -abertura para supressão de ruído cuja área seja menor que 50 <i>pixels</i> e (d) imagem do esqueleto.	33
3.6	Transformada de Hough para a detecção de retas.	37
3.7	Espaço de parâmetros da transformada de Hough para os três pontos colineares representados na Figura 3.6.	37
3.8	Processamento da transformada de Hough nas imagens de nanofibras: (a) imagem original (b) esqueletonização da imagem (c) espaço de parâmetros da transformada de Hough (d) reconstrução da imagem do esqueleto. . . .	39
3.9	Imagem Nanoc013.	44
3.10	Relação de diâmetros manuais e automáticos para a imagem Nanoc013. . .	45

3.11	Análise Bland Altman para a imagem Nanoc013 (a) relação entre média e diferenças entre diâmetros manuais e automáticos (b) histograma da diferença de diâmetros entre os métodos.	46
4.1	Foto do aparato para a deposição eletrostática. Figura extraída de (MENDES, 2004).	49
4.2	Detalhe da eskeletonização e do contorno de uma parte da nanofibra e da centralização da janela para análise de diâmetros em um <i>pixel</i> do esqueleto.	53
4.3	(a) Imagem original com região de sobreposição destacada em amarelo (b) processamento morfológico e (c) detalhe da imagem processada, com detecção de bordas e esqueleto, na região de sobreposição de nanofibras.	54
4.4	Imagem detalhe da eskeletonização para nanofibras que se interceptam.	55
4.5	Diagrama de blocos do procedimento realizado para caracterização das imagens de nanofibras.	57
5.1	Versão limiarizada da imagem da Figura 5.2(b).	60
5.2	Imagens originais (a) Nanoc013 e (b) Nanoc008.	61
5.3	Imagem processada pelo algoritmo de Otsu: (a) imagem segmentada (b) imagem esqueleto e (c) seu respectivo histograma.	63
5.4	Imagens processadas pelos algoritmos de segmentação: (a) CNN (b) Morfologia, suas respectivas eskeletonizações em (c) e (e) e seus respectivos histogramas em (d) e (f).	64
5.5	Histograma de diâmetros para as medidas extraídas pelo Photoshop.	65
5.6	Análise de concordância para a imagem da Figura 5.2(a) entre os métodos padrão e (a) CNN e (b) seu respectivo histograma das diferenças e (c) morfologia e (b) seu respectivo histograma das diferenças.	67
5.7	Imagem processada pelo algoritmo de Otsu: (a) imagem segmentada (b) imagem esqueleto e (c) seu respectivo histograma.	69
5.8	Imagens processadas pelos algoritmos de segmentação: (a) CNN e (b) Morfologia, suas respectivas imagens de esqueleto em (c) e (e) e seus respectivos histogramas em (d) e (f).	70
5.9	Histograma de diâmetros para as medidas extraídas pelo Photoshop.	71

5.10	Análise de concordância para a imagem da Figura 5.2(b) entre os métodos padrão e (a) CNN e (b) seu respectivo histograma das diferenças e (c) morfologia e (b) seu respectivo histograma das diferenças.	72
5.11	Imagens originais (a) Nanod003 e (b) Nanoc014.	74
5.12	Imagem processada pelo algoritmo de Otsu: (a) imagem segmentada (b) imagem esqueleto e (c) seu respectivo histograma.	76
5.13	Histograma de diâmetros para as medidas extraídas pelo Photoshop para a imagem da Figura 5.11(a)	76
5.14	Imagem processada pelos algoritmo de segmentação CNN e transformada de Hough: (a) imagem segmentada resultante (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto processada pela transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	78
5.15	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico e transformada de Hough: (a) imagem segmentada resultante (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto processada pela transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	80
5.16	Análise de concordância para a imagem da Figura 5.11(a) entre os métodos padrão e (a) CNN e (b) seu respectivo histograma das diferenças e (c) morfologia e (b) seu respectivo histograma das diferenças.	81
5.17	Imagem processada pelo algoritmo de Otsu: (a) imagem segmentada (b) imagem esqueleto e (c) seu respectivo histograma.	83
5.18	Histograma de diâmetros para as medidas extraídas pelo Photoshop para a imagem da Figura 5.11(b)	83
5.19	Imagem processada pelos algoritmo de segmentação CNN e transformada de Hough: (a) imagem segmentada resultante (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto processada pela transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	85

5.20	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico e transformada de Hough: (a) imagem segmentada resultante (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto processada pela transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	86
5.21	Análise de concordância para a imagem da Figura 5.11(b) entre os métodos padrão e (a) CNN e (b) seu respectivo histograma das diferenças e (c) morfologia e (d) seu respectivo histograma das diferenças.	87
B.1	(a) Imagem original (b) imagem segmentada pelo método de Otsu (c) imagem esqueleto e (d) seu respectivo histograma.	102
B.2	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação (a) CNN e (b) morfológico (c) imagem do esqueleto para a abordagem CNN e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto para a abordagem morfológica e (e) seu respectivo histograma.	103
B.3	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.	104
B.4	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	105
B.5	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.	106
B.6	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	107

B.7	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.	108
B.8	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	109
B.9	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.	110
B.10	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	111
B.11	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.	112
B.12	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	113
B.13	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.	114
B.14	Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	115

B.15 Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.	116
B.16 Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	117
B.17 Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.	118
B.18 Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	119
B.19 Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.	120
B.20 Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.	121

Lista de Tabelas

4.1	Tabela com especificações das nanofibras.	50
4.2	Tabela dos procedimentos manuais e automáticos das metodologias investigadas.	57
5.1	Resultados das medidas de avaliação dos algoritmos de segmentação de Otsu, CNN e Morfologia.	62
5.2	Resultados das medidas de avaliação dos algoritmos de segmentação de Otsu, CNN e Morfologia.	75

Lista de Abreviaturas

CNN Rede Neural Celular em inglês *Cellular Neural Network*

MRI Imageamento por Ressonância Magnética em inglês *Magnetic Resonance Imaging*

VLSI Integração em Larga Escala em inglês *Very-Large Scale Integration*

RAE Erro de Área Relativa à Objetos em inglês *Relative Foreground Area Error*

SNR Razão Sinal-Ruído em inglês *Signal to Noise Ratio*

ND Discrepância Normalizada em inglês *Normalized Discrepancy*

MI Erro Multi-Classe tipo I em inglês *Multi-Class Type I Error*

SEM Microscopia Eletrônica de Varredura em inglês *Scanning Electronic Microscope*

FESEM Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo em inglês *Field Emission Scanning Electronic Microscope*

AFM Microscopia de Força Atômica em inglês *Atomic Force Microscope*

TEM Microscopia Eletrônica de Transmissão em inglês *Transmission Electron Microscope*

TH Transformada de Hough

PEO Poli-Etileno

PAN Poliacrilonitrila

DMF Dimetilformamida

ES Elemento Estruturante

OM Operador Morfológico

Lista de Símbolos

Os seguintes símbolos serão utilizados:

- $C(i, j)$ célula da rede neural celular presente na i -ésima linha e j -ésima coluna;
- $C(k, l)$ célula da rede neural celular presente na k -ésima linha e l -ésima coluna;
- $N_r(i, j)$ vizinhança- r de uma célula $C(i, j)$, em que r é um número inteiro positivo;
- M número de linhas da rede CNN ;
- N número de colunas da rede CNN ;
- v_{xij} , v_{uij} , v_{yij} tensões de estado, entrada e saída da célula ij , respectivamente;
- E_{ij} fonte de tensão independente;
- I fonte de corrente independente;
- C_x capacitor linear;
- R_x e R_y resistores lineares;
- $I_{xy}(i, j, k, l)$ e $I_{xu}(i, j, k, l)$ fontes de corrente controladas por tensão;
- $A(i, j, k, l)$ e $B(i, j, k, l)$ máscaras de *feedback* e de controle, respectivamente;
- $f(\cdot)$ função parcialmente linear da equação de saída da célula;
- $A \cup B$ união entre dois conjuntos;
- A^c complemento de A ;
- $A \ominus B$ erosão de A por B ;
- $A \oplus B$ dilatação de A por B ;
- $A \circ B$ abertura de A por B ;
- $\psi(\cdot)$ filtro τ -abertura;

- $\check{A}$ reflexão de A ;
- $Skel(S)$ esqueleto de S ;
- ρ é a distância normal entre a linha reta e a coordenada da origem;
- θ é o ângulo entre a linha normal e o eixo-x;
- p_l função distribuição de probabilidade;
- n_l número de *pixels* com intensidade l ;
- C_0 classe de *pixels* de fundo;
- C_1 classe de *pixels* do objeto;
- ω_0 e ω_1 probabilidades das classes C_0 e C_1 , respectivamente;
- μ_0 e μ_1 médias das classes C_0 e C_1 , respectivamente;
- Z matriz de confusão;
- N_c número de classes de *pixels*;
- N_e número de *pixels* classificados incorretamente;
- A_R número de *pixels* do objeto na imagem de referência;
- A_S número de *pixels* do objeto na imagem segmentada;
- I_R imagem de referência;
- I_S imagem segmentada;
- $\bar{d}$ média das diferenças entre métodos;
- s desvio padrão das diferenças entre métodos;

1 Introdução

Este trabalho apresenta uma nova metodologia para extração automática de medidas em imagens de nanofibras provenientes de microscopia eletrônica. Os diâmetros das fibras obtidas por métodos convencionais apresentam-se na faixa de 5 a 500 μm (LEE et al., 2003). O *electrospinning* (deposição eletrostática) é uma técnica simples e versátil para gerar fibras ultrafinas, com diâmetros cem vezes menores do que os métodos convencionais (LIU et al., 1999; MA; ZHANG, 1999; MARTIN, 1996; ONDARCUHU; JOACHIM, 1998), a partir de uma grande variedade de materiais que inclui polímeros, compostos e cerâmicas. Fibras de polímero encontraram uso em importantes campos da pesquisa e tecnologia, tais como a fabricação de material para dispositivos nanoeletrônicos mais complexos (HUANG et al., 2003; YARIN; KOOMBHONGSE; RENEKER, 2004).

As técnicas comumente utilizadas para a produção de nanofibras são automontagem (*self-assembly*), molde estrutural (*template synthesis*), separação de fase (*phase separation*) e deposição eletrostática (*electrospinning*) (HUANG et al., 2003). Dentre estas técnicas, o *electrospinning* mostra-se a escolha mais adequada para a produção de nanofibras de composição polimérica diversificada, com interiores sólidos ou ocos, excepcionalmente longas em comprimento, uniformes no diâmetro, variando no intervalo de dezenas de nanômetros a vários micrômetros (YARIN; KOOMBHONGSE; RENEKER, 2004).

Quando os diâmetros das nanofibras são reduzidos de micrômetros a nanômetros, características excepcionais, como o desempenho mecânico superior e grande área de superfície em relação ao volume, fazem das nanofibras a escolha mais adequada para as mais diversas aplicações. Essas características, associadas ao modo fácil de se obter as fibras,

fazem delas boas escolhas para o uso em tecnologia de sensores. O *electrospinning* é um processo fácil e de baixo custo e tem se tornado muito popular na preparação de fibras poliméricas, tanto na forma de fibras individuais como em camadas de fibras trançadas (DOSHI; RENEKER, 1995; BERGADANO; CUTELLO, 1998; SILVA et al., 2003; MACDIARMID et al., 2001).

Valores de diâmetros, bem como orientação e morfologia da fibra, podem ser obtidos usando Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FESEM), Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM) (HUANG et al., 2003). O Microscópio Eletrônico de Varredura é um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. A elevada profundidade de foco, a facilidade de preparação das amostras e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica com relação às demais.

Apesar da potencialidade e versatilidade da Microscopia Eletrônica de Varredura, existe um grande problema em caracterizar nanofibras, já que isto não é feito automaticamente. A caracterização das nanofibras eletrodepositadas, observadas através do microscópio eletrônico de varredura, é usualmente realizada por *softwares* semi-automáticos, a saber: Image Pro (BADAMI et al., 2006), Image Pro Plus (BASHUR; A.; GOLDSTEIN, 2006; BAKER et al., 2006; LEE et al., 2003), UTHSCSA Image Tool 3.0 (AYRES et al., 2006), Adobe Photoshop 7.0 (DING et al., 2004), Scope Eye II (PARK et al., 2006), Scion Image NIH image *software* (LI et al., 2006) e outros (ZHANG et al., 2007; JIA et al., 2007; GUPTA; WILKES, 2003; NUANSING et al., 2006; KIM et al., 2007; DEITZEL et al., 2001). A incerteza da demarcação manual realizada pelo especialista e a pequena amostra de diâmetros quantificados são algumas desvantagens dos métodos padrões atuais, como veremos na seção seguinte. Particularmente, para a extração do diâmetro ao longo dessas nanoestruturas, um método mais preciso e mais rápido que o procedimento semi-automático disponível é altamente desejável.

Através de um método automático, a caracterização de nanofibras tornar-se-ia praticável e melhoraria a qualidade de qualquer investigação para a obtenção de nanofibras. A partir de um histograma de diâmetros fornecido pelas metodologias sugeridas, manipulava-se os parâmetros do material e do processo para reprodução de resultados, adquirindo nanofibras com diâmetros dentro de um intervalo de valores específicos desejado.

Dessa forma, este trabalho propõe novas abordagens automáticas para caracterização de nanofibras usando técnicas de processamento de imagens. Desde que nenhum dos algoritmos de segmentação propostos são geralmente aplicáveis a todas as imagens e diferentes algoritmos não são igualmente apropriados para uma aplicação particular, a avaliação de desempenho dos algoritmos de segmentação torna-se indispensável. Em razão dessa necessidade, as técnicas de segmentação propostas são avaliadas através de medidas quantitativas.

Para justificar o acréscimo de novas metodologias e verificar erros de medidas, frequentemente essas metodologias são comparadas com técnicas padrões e o que se busca é alcançar o grau de concordância entre elas. A diagnose consensual de vários especialistas é comumente considerada como padrão ouro (*gold standard*) e usada na avaliação do desempenho diagnóstico de um sistema especialista (GEORGAKIS; GEORGAKIS, 1992). Nesta tese o *software* adotado como padrão ouro foi o Adobe Photoshop CS4, devido a sua utilização para extração de diâmetros (DING et al., 2004) e a sua disponibilidade à comunidade científica. Com o auxílio do método padrão ouro adotado, extraiu-se 100 valores de diâmetros para cada imagem avaliada e comparou-se com as medidas obtidas pelas metodologias avaliadas nesta tese.

Com base nessas medidas extraídas, as metodologias propostas foram analisadas através da abordagem de Bland e Altman (1987) para averiguar quão próximas estão daquelas obtidas pelo método padrão. A abordagem mostrou boa concordância entre as metodologias avaliadas e o *software* padrão, sugerindo que a metodologia proposta pode substituir a técnica padrão.

1.1 Motivação

A comunidade de microeletrônica carece de um sistema que automaticamente caracterize imagens comumente obtidas pelas técnicas, a saber: SEM, FESEM, TEM e AFM. A identificação e quantificação manual de medidas nessas imagens, particularmente a extração do diâmetro das nanofibras, é uma tarefa laboriosa, subjetiva e sujeita a erros. Com a identificação e quantificação dessas medidas automaticamente, a caracterização das imagens consumiria um tempo menor de trabalho do especialista.

Adicionalmente, a maioria das aplicações são afetadas pelo diâmetro das nanofibras. O diâmetro da fibra determina propriedades da matriz de fibras eletrodepositadas tais como propriedades mecânica, elétrica e ótica. Uma aplicação importante em que o método proposto auxiliaria no controle de diâmetros seria na área de engenharia de tecidos. A engenharia de tecidos investiga e desenvolve, a partir de um conjunto de conhecimentos e técnicas, a reconstrução de novos órgãos e tecidos vivos. A conjugação de técnicas recruta tecido do próprio paciente, que será dissociado em células e estas cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc), para então serem reinseridos no paciente (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). O primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa a seleção do suporte para crescimento das células.

Dentre os materiais utilizados como suportes, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes às dos materiais biológicos (GRIFFITH, 2000). A seleção do material leva em consideração tanto o tipo, local da lesão, como a sua extensão. Segundo Pourrezaei (2001) os suportes constituídos de nanofibras são as únicas estruturas capazes de imitar as propriedades de um tecido vivo. Outras pesquisas mostraram que os fatores topográficos em suportes para células podem regular a orientação e a proliferação de células osteoblásticas¹, e o controle do diâmetro fez-se importante para essa regular-

¹São as células responsáveis pela sintetização da parte orgânica (colágeno tipo I e glicoproteínas) da matriz óssea, ou seja, responsáveis pela formação do tecido ósseo.

ização (BADAMI et al., 2006). De acordo com Kwon, Kidoaki e Matsuda (2004), a força e a condutividade da matriz de nanofibras produzidas pelo *electrospinning* são sensíveis ao diâmetro da fibra.

Sendo assim, é importante controlar os parâmetros do processo e do material para a obtenção de nanofibras com diâmetros específicos, ilustrados por um histograma. A partir do histograma de diâmetros e do conhecimento *a priori* desses parâmetros reproduz-se resultados, ou seja, obtém-se um emaranhado de nanofibras desejado.

A morfologia das nanofibras eletrodepositadas e observadas através do microscópio eletrônico de varredura são usualmente realizadas por *softwares* semi-automáticos. A extração de diâmetros por estes *softwares* requer uma prévia habilitação e inspeção do especialista na região da imagem onde deseja-se fazer a extração. Em seguida o diâmetro é demarcado manualmente no local desejado e o *software* calcula o diâmetro, como mostra a Figura 1.1.

A demarcação deslocada do diâmetro na Figura 1.1 ocorre devido ao processo de varredura da imagem para sua gravação. Devido à avaliação subjetiva do especialista, as medidas dos objetos de interesse podem sofrer alterações, comprometendo a interpretação das imagens. Outra desvantagem dos métodos atuais é que apenas uma pequena amostra dos diâmetros é quantificada, o que não assegura uma boa representação estatística dos diâmetros das nanofibras. Dessa forma, o uso do método automático auxiliaria pesquisadores no uso de soluções poliméricas apropriadas para obtenção de nanofibras com diâmetro desejável (LEE et al., 2003).

Este trabalho tem por metas desenvolver algoritmos e metodologias que superem as desvantagens dos *softwares* atuais de caracterização de nanofibras, processem estas imagens obtidas pelo SEM e calculem automaticamente os diâmetros ao longo dessas nanoestruturas. Os algoritmos apresentam as seguintes características:

- prover meios apropriados para o correto processamento e caracterização de imagens de nanofibras por meio do SEM;

Figura 1.1: Imagem de nanofibras com demarcações de alguns diâmetros realizadas por especialista.

- segmentar as imagens, isto é, distinguir nas imagens regiões que correspondam às nanofibras das não-nanofibras;
- calcular com precisão os diâmetros ao longo das nanofibras.

1.2 Objetivo

O objetivo principal deste trabalho é apresentar uma alternativa automática para a medição dos diâmetros ao longo das nanofibras usando técnicas de processamento de imagens. Este objetivo subdivide-se em:

- implementar técnicas de processamento de imagens usando morfologia matemática para a extração de características e geração de resultados coerentes e fidedignos destas imagens;
- avaliar quantitativamente a técnica de segmentação proposta, comparando-a com outras técnicas, baseadas em redes neurais celulares e pela limiarização de Otsu;
- comparar os diâmetros obtidos pelas metodologias apresentadas com diâmetros obtidos com o auxílio do *software* Adobe Photoshop CS4 através da abordagem proposta por Bland e Altman (1987).

1.3 Contribuições

As contribuições do trabalho podem ser resumidas nos seguintes tópicos:

- disponibilização de um sistema de processamento automático para extração dos diâmetros por toda extensão das nanofibras;
- proposta de uma metodologia baseada em Morfologia Matemática para a extração de medidas de diâmetros em nanofibras com maior precisão. Com esta nova metodologia, espera-se obter melhor segmentação das imagens de nanofibras para uma correta detecção de diâmetros ao longo das mesmas.

1.4 Organização do trabalho

A tese proposta está organizada em 6 capítulos. O capítulo 2 introduz a técnica utilizada para fabricação de nanofibras, o *electrospinning*, e os princípios da técnica de microscopia eletrônica de varredura para a caracterização de materiais. Os capítulos 3 e 4 apresentam respectivamente as principais ferramentas utilizadas para segmentação e detecção de características em imagens de nanofibras e a metodologia proposta. Os resultados experimentais são discutidos no capítulo 5. Por fim, no capítulo 6 estão as conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros.

A seguir são apresentados os resumos dos capítulos.

Capítulo 1: Apresenta conceitos introdutórios relevantes para o desenvolvimento e entendimento dos principais aspectos motivadores, as metas a serem atingidas bem como a organização da tese.

Capítulo 2: Apresenta a técnica de produção de nanofibras, o *electrospinning* e descreve os princípios básicos de funcionamento da Microscopia Eletrônica de Varredura e a revisão bibliográfica realizada.

Capítulo 3: Discute as principais ferramentas utilizadas neste trabalho para a segmentação e extração de características das imagens de nanofibras.

Capítulo 4: Apresenta a formulação proposta neste trabalho para segmentação das imagens e extração de características através de processamento morfológico.

Capítulo 5: Discute os resultados experimentais obtidos.

Capítulo 6: São apresentadas discussões e contribuições da tese sobre caracterização de imagens de nanofibras para trabalhos futuros.

2 Produção de Nanofibras e Métodos de Aquisição de Imagens

O *electrospinning* (deposição eletrostática) é uma técnica simples e versátil para gerar fibras ultrafinas a partir de uma grande variedade de materiais que inclui polímeros, compostos e cerâmicas. Nanoestruturas unidimensionais têm sido objetos de pesquisa devido suas propriedades únicas e aplicações nas mais diversas áreas. Quando os diâmetros das nanofibras são reduzidos de micrômetros a nanômetros, características excepcionais, tais como, desempenho mecânico superior (maior rigidez e força de tensão) e grande área de superfície em relação ao volume, fazem das nanofibras a escolha mais adequada para as mais diversas aplicações.

Entre os métodos para gerar nanoestruturas na forma de fibras, o *electrospinning* fornece a abordagem mais simples para formar nanofibras longas, com o interior sólido ou oco, com diâmetro uniforme e composição diversificada. Contrariamente a outras técnicas, a formação da nanofibra por *electrospinning* é baseada no esticamento uniaxial de um jato viscoelástico derivado de uma solução polimérica ou polímero fundido (LI; XIA, 2004).

No processo de *electrospinning*, um campo eletrostático de alta voltagem é usado para depositar fibras poliméricas finas de uma mistura polimérica ou uma solução polimérica (BERGADANO; CUTELLO, 1998). A primeira patente desta técnica foi publicada em 1938 e descrevia um *setup* experimental para a produção de filamentos poliméricos usando força eletrostática (FORMHALS, 1938; HUANG et al., 2003). A solução polimérica de acetato de celulose foi submetida a um campo eletrostático. Os filamentos poliméricos formaram-se

a partir da solução, entre dois eletrodos de cargas elétricas opostas. Um dos eletrodos foi colocado na solução e o outro no coletor. Uma vez ejetado da agulha, o jato da solução carregada formava fibras que eram depositadas no coletor.

Até 1993, poucas publicações trataram do uso do *electrospinning* para fabricação de fibras finas (LI; XIA, 2004). Posteriormente, vários grupos de pesquisa reavivaram o interesse pela técnica demonstrando a fabricação de fibras finas através de vários polímeros orgânicos (RENEKER; CHUN, 1996; SRINIVASAN; RENEKER, 1995) . O número de publicações tratando da técnica aumentou exponencialmente em poucos anos. Isto se deve, em parte, ao interesse em nanotecnologia, já que a fabricação de fibras ultrafinas a partir de vários polímeros com diâmetros na ordem de nanômetros é facilmente realizada.

2.1 O *setup* básico para o *electrospinning*

Existem três componentes básicos que realizam o *electrospinning*: uma fonte de alta tensão, um *spinneret* (um tubo capilar com uma pipeta ou uma agulha metálica de diâmetro pequeno) e uma tela coletora de metal. A alta tensão é usada para ejetar da agulha um fio, constituído da solução polimérica ou polímero fundido, eletricamente carregado (HUANG et al., 2003). Uma seringa, que conterá a solução polimérica ou polímero fundido, é conectada ao *spinneret*. Com o auxílio de uma bomba para a seringa, a solução polimérica é fornecida ao *spinneret* a uma taxa constante e controlável (LI; XIA, 2004). Quando a alta voltagem (na ordem de kV) é aplicada, a gota da solução polimérica pendente na ponta da agulha torna-se altamente eletrificada. Sob a ação do campo elétrico e da repulsão eletrostática entre as cargas de superfície da gota, esta deforma-se tomando a forma de um cone, conhecido como cone de Taylor. Uma vez que a força de superfície ultrapassa um valor limiar, as forças eletrostáticas superam a tensão de superfície da solução polimérica e assim incitam a ejeção de um jato líquido da agulha. Este jato eletrificado é esticado e ricocheteado, formando um longo fio fino. Como o jato líquido é continuamente esticado e o solvente é evaporado, o diâmetro da fibra pode ser reduzido de dezenas de micrômetros a dezenas de nanômetros. Atraída pela tela coletora sob o *spinneret*, a fibra carregada é

depositada de forma aleatória formando uma rede de fibras interconectadas.

Com o uso desta técnica simples, mais de 50 tipos diferentes de polímeros orgânicos têm sido eletrodepositados em fibras ultrafinas com diâmetros na ordem de dezenas de nanômetros a poucos micrômetros. A maioria dos polímeros é dissolvida em alguns solventes antes do *electrospinning*. Porém, polímeros fundidos a altas temperaturas também podem ser utilizados para produzir nanofibras. Diferentemente do caso da solução polimérica, o processo de *electrospinning* para polímeros fundidos tem sido realizado em condições de vácuo (LARRONDO; MANLEY, 1981a; LARRONDO; MANLEY, 1981b; LARRONDO; MANLEY, 1981c).

Segundo Li e Xia (2004), até os anos 90, acreditava-se que a formação das fibras ultrafinas por *electrospinning* advinha da divisão ou espalhamento do jato eletrificado, como um resultado da repulsão das cargas de superfície. No entanto, experimentos recentes constataram que o afinamento do jato durante o *electrospinning* era causado, principalmente, pela instabilidade associada ao jato eletrificado. Obviamente, o jato é uma linha reta no início e, então, torna-se instável. Supõe-se que a forma cônica, isto é, a região de instabilidade, é composta de múltiplos jatos. Contudo, examinando de perto através de uma fotografia em alta-velocidade, a forma cônica é tão somente um simples fio ricocheteado rapidamente. A frequência de ricocheteamento é tão alta que uma fotografia convencional é incapaz de capturar o fenômeno, dando a impressão de que o jato líquido original divide-se em múltiplos fios em direção ao coletor (LI; XIA, 2004).

O *setup* básico para o *electrospinning* é simples o suficiente para que vários laboratórios de pesquisa usem a técnica para a obtenção das nanofibras. Todavia, vários estudos propuseram modificações no *setup* (em particular, no coletor e no *spinneret*) para obter maior controle do processo de *electrospinning*. Um estudo realizado por Whitesides e Laibinis (1990) propôs um *array* de múltiplas agulhas para solucionar o processo de baixa produtividade de nanofibras ultrafinas, visto que, em uma configuração básica, a solução polimérica é alimentada a taxas relativamente baixas. Acredita-se que a adoção de um *array* de agulhas pode aumentar significativamente a taxa de produção enquanto

aumenta simultaneamente as complexidades estruturais e de composição das nanofibras eletrodepositadas, que exibirão várias combinações de funcionalidades únicas.

No *setup* convencional para o *electrospinning*, o *spinneret* gera fibras com apenas uma composição particular a cada ciclo de produção. Para contornar esta limitação, vários projetos têm sido propostos. Gupta e Wilkes (2003) e Madhugiri et al. (2003) mostraram que um *spinneret* contendo duas agulhas poderia ser usado para depositar nanofibras compostas. Em outra abordagem, vários grupos adotaram um *spinneret* consistindo de dois capilares coaxiais para obter nanofibras com estruturas ocas (SUN et al., 2003; LOSCER-TALES et al., 2004). Larsen, Spretz e Velarde-Ortiz (2004) demonstraram que o uso de um *spinneret* coaxial fornece um bom controle sobre a estrutura e a morfologia das nanofibras resultantes, e previne a obstrução da agulha com o uso de um solvente apropriado no capilar externo durante o processo de eletrodeposição.

2.2 Como controlar a deposição eletrostática das nanofibras

De acordo com Huang et al. (2003), alguns parâmetros podem influenciar a transformação das soluções poliméricas em nanofibras através do *electrospinning* e são eles: (a) propriedades da solução, tais como, viscosidade, elasticidade, condutividade e tensão de superfície; (b) condições operacionais, a saber, pressão hidrostática no tubo capilar, a força do campo elétrico aplicado, a distância entre o *spinneret* e o coletor e a taxa de alimentação da solução polimérica e (c) parâmetros ambientais, tais como, temperatura da solução, umidade e velocidade do ar na câmara do *electrospinning* (LI; XIA, 2004; HUANG et al., 2003).

Considerando que o polímero é apropriado para formar nanofibras, as características ideais que elas devem apresentar são: (1) diâmetros com valores estáveis e controláveis; (2) superfície da fibra livre de defeitos ou com defeitos controláveis e (3) nanofibras coletadas contínuas.

Uma das grandezas mais importantes relacionadas ao *electrospinning* é o diâmetro

da nanofibra. Visto que as nanofibras resultam da evaporação ou solidificação dos jatos poliméricos, os diâmetros das mesmas dependerão primariamente dos tamanhos dos jatos bem como da quantidade de polímero no jato. Durante a viagem do jato da agulha ao coletor, o jato primário pode dividir-se ou não em múltiplos jatos, resultando em nanofibras de diâmetros diversos (BERGSHOEF; VANCISO, 1999; DEITZEL; KLEINMEYER; HIRVONEN, 2001; HOHMAN et al., 2001a; HOHMAN et al., 2001b; RENEKER et al., 2000; YARIN; KOOMBHONGSE; RENEKER, 2001a; YARIN; KOOMBHONGSE; RENEKER, 2001b) .

Desconsiderando a possibilidade de divisão do jato, um dos parâmetros mais importantes que influencia o diâmetro da nanofibra é a viscosidade da solução. A alta viscosidade resulta em nanofibras com diâmetros maiores (DOSHI; RENEKER, 1995; HUANG et al., 2003). Portanto, quando um polímero sólido é dissolvido em um solvente, a viscosidade da solução é proporcional à concentração polimérica. Outro parâmetro que influencia o diâmetro da nanofibra é a tensão elétrica aplicada.

O diâmetro das nanofibras ainda pode ser afetado pela condutividade elétrica da solução, a força do campo elétrico e a taxa de alimentação da solução. Se a condutividade da solução aumenta com a adição de sais, os diâmetros das fibras resultantes podem ser significativamente reduzidos. Em geral, uma tensão elétrica mais alta ejeta mais fluido em um jato, resultando em uma nanofibra com diâmetro maior. (LI; XIA, 2004).

Um desafio adicional no processo de *electrospinning* é o controle de gotas e poros que podem surgir nas nanofibras, como mostra a Figura 2.1. A formação de gotas pode ser atribuída à ação de ao menos três forças: a tensão de superfície, que tende a converter o jato líquido em uma ou muitas gotas esféricas; a repulsão eletrostática entre cargas na superfície do jato, que tende a aumentar a área de superfície e assim favorecer a constituição de um jato fino com gotas; e a força viscoelástica, que resiste a rápidas mudanças na forma e suporta a constituição de fibras com superfícies lisas. Em geral, a formação de gotas pode ser eliminada quando a influência da tensão de superfície é suprimida pelas duas últimas forças.

Como demonstrado por Li e Xia (2004), a densidade de gotas em nanofibras de óxido

Figura 2.1: Imagem de nanofibras com gotas.

de poli-etileno (PEO) diminui ou desaparece caso soluções mais viscosas (altas concentrações de PEO) sejam usadas. O uso de solventes com tensões de superfície mais baixas pode levar a eliminação efetiva de gotas.

No estudo de Deitzel et al. (2001), associou-se a formação de gotas nas fibras à tensão elétrica. O aumento da tensão influencia tanto na forma da gota pendente na agulha que a estabilidade do jato ejetado pode não ser alcançada, levando a um aumento da densidade de gotas nas fibras eletrodepositadas.

2.3 Características e aplicações

2.3.1 Características únicas das nanofibras eletrodepositadas

As nanofibras exibem inúmeras características e propriedades notáveis que distinguem-nas de estruturas unidimensionais fabricadas por outras técnicas. Por exemplo, depois de ejetada da agulha, a nanofibra eletrodepositada está altamente carregada, sendo possível controlar eletrostaticamente sua trajetória aplicando um campo elétrico externo.

Comparadas com as nanoestruturas sintetizadas usando outros métodos físicos ou químicos, as nanofibras eletrodepositadas são extremamente longas (RENEKER; CHUN, 1996). Como o *eletrospinning* é um processo contínuo, as fibras poderiam ser tão longas quanto vários quilômetros. Esta escala de comprimento é comparável àquelas fibras fabricadas por técnicas convencionais de *drawing* e *spinning*. No processo de *eletrospinning*, estas fibras longas podem ser arranjadas aleatoriamente em uma matriz tridimensional, como resultado do ricocheteamento do jato da solução.

As fibras eletrodepositadas têm diâmetros mais finos e maior razão área por volume em relação às fibras fabricadas usando processos de deposição ou de extrusão mecânica convencional (LI; XIA, 2004). A alta densidade dos poros pode ser resultante do emaranhado das nanofibras. Embora a área de superfície específica das fibras depositadas seja mais baixa do que aquela de materiais mesoporosos tais como, peneiras moleculares, os poros em uma matriz eletrodepositada são relativamente largos em tamanho e todos os poros são completamente interconectados, formando uma rede tridimensional. Além disso, as áreas de superfície das nanofibras podem aumentar com a formação de poros muito menores na superfície de cada fibra individual através do controle das soluções e dos parâmetros para o *eletrospinning*.

O *eletrospinning* envolve um rápido esticamento do jato eletrificado e uma rápida evaporação do solvente. As cadeias poliméricas experimentam uma forte força de cisalhamento durante o processo de eletrodeposição. Esta força de cisalhamento e a rápida solidificação pode prevenir as cadeias poliméricas de voltar às suas condições de equilíbrio. Como resultado, a cristalinidade e a conformação da cadeia das nanofibras poliméricas resultantes devem ser diferentes dos produtos obtidos por processos de solução *casting* ou *spinning* convencional.

2.3.2 Aplicações das nanofibras eletrodepositadas

A simplicidade da fabricação de nanofibras, a diversidade de materiais apropriados para o uso no *electrospinning*, bem como as características únicas associadas com nanofibras

eletrodepositadas, fazem do *electrospinning* e de suas estruturas resultantes um atrativo para um grande número de aplicações (LI; XIA, 2004). Aplicações típicas de nanofibras eletrodepositadas são aquelas cuja alta razão entre área de superfície por volume é importante. Nanofibras eletrodepositadas são, portanto, freqüentemente usadas como filtros (BERGADANO; CUTELLO, 1998). Outras aplicações possíveis das nanofibras são as próteses médicas, principalmente enxertos e válvulas sangüíneas.

2.3.2.1 Aplicações das nanofibras em filtros de agentes biológicos e químicos

A eficiência da filtração, a qual está associada à espessura das fibras, é uma das principais metas para obter um filtro com bom desempenho. Os canais e elementos estruturais do filtro devem estar arrançados de tal forma que capturem partículas ou gotas; uma forma de desenvolver um filtro eficiente é usar fibras nanométricas na estrutura do filtro. Em geral, devido à área de superfície elevada em relação ao volume, as partículas menores de $0,5\ \mu\text{m}$ podem ser facilmente retidas pelas fibras produzidas por *electrospinning*, melhorando sua eficiência (HUANG et al., 2003).

As nanofibras possuem uma enorme vantagem para serem utilizadas em filtros, pois oferecem uma alta eficiência de filtração e baixa resistência ao ar que são associadas à espessura da fibra. Na indústria, fibras de pequenos diâmetros são estudadas para produzir filtros para ar comprimido. Estes meios filtrantes são desenvolvidos para reter gotas de óleo pequenas na ordem de $0,3\ \mu\text{m}$. Alguns estudos na área de *electrospinning*, são voltados para obtenção de fibras utilizadas para remoção de partículas de ordem sub-micrométrica.

Atualmente, um dos maiores mercados para as fibras obtidas a partir da deposição eletrostática é o seu uso em sistemas que precisam de uma alta eficiência de filtração como por exemplo, as salas limpas (MENDES, 2004). Neste caso, a facilidade destas fibras de reter partículas é tão grande que os filtros podem ser usados para detectar agentes químicos e biológicos.

2.3.2.2 Aplicações das nanofibras em biomedicina

Do ponto de vista biológico, quase todos os órgãos e tecidos humanos são caracterizados por estruturas fibrosas organizadas em escala nanométrica. Alguns exemplos são: ossos, dentes, colágenos, cartilagem e pele (HUANG et al., 2003). Devido às estruturas peculiares das nanofibras poliméricas, as pesquisas que tratam deste assunto têm sido focadas em várias áreas biomédicas, tais como, tratamento de feridas, próteses médicas e engenharia de tecidos.

Para o tratamento de tecidos ou órgãos que apresentam alguma disfunção, um dos desafios da área de engenharia de tecidos é produzir matrizes ou suportes ideais que imitem funções biológicas de suportes naturais. Suportes naturais para crescimento de tecidos são redes tridimensionais de nanofibras feitas de várias proteínas. O sucesso da engenharia de tecidos biológicos está associado com a produção de suportes artificiais equivalentes aos naturais em termos de composição química e morfologia. O emaranhado de nanofibras eletrodepositadas é conhecido pela sua estrutura porosa, tridimensional e interconectada, e as áreas de superfície relativamente largas. Elas provêm de uma classe de material ideal para imitar o suporte requerido para a formação do tecido. As matrizes de nanofibras também são úteis como suportes para entrega de drogas medicinais devido às suas grandes áreas de superfície.

As nanofibras poliméricas podem ser utilizadas em próteses de tecidos humanos, para a reconstituição de válvulas sangüíneas, por exemplo. As nanofibras poliméricas biocompatíveis produzidas por *electrospinning* podem também ser depositadas como um filme fino poroso sobre uma prótese médica a ser implantada no corpo humano. O tecido de nanofibras, depositado eletrostaticamente sobre a prótese, serve como interface entre a mesma e o tecido do paciente para reduzir a rejeição entre o tecido humano e a prótese após a implantação.

As nanofibras de polímeros biocompatíveis podem ser usadas no tratamento de feridas ou queimaduras da pele humana. Com um dispositivo especial, as nanofibras podem ser diretamente eletrodepositadas na ferida, estimulando o crescimento normal da pele e assim

eliminar a formação do tecido da cicatriz, como ocorre num tratamento tradicional. As matrizes de nanofibras para tratamento de feridas apresentam tamanhos de poros que podem variar entre 500 nm e 1 mm, dimensões pequenas o bastante para proteger a ferida da penetração de bactérias.

2.3.2.3 Outras aplicações

Roupas de proteção militar atuais contêm absorventes de carvão de lenha e conseqüentemente essas roupas aumentam seus pesos devido às suas limitações da permeabilidade da água. Devido à grande área de superfície, as matrizes de nanofibras são capazes de neutralizar agentes químicos, sem impedir a permeabilidade do vapor do ar e de água à roupa. Essas características tornam as nanofibras candidatas promissoras para a fabricação de roupas militares ideais.

Estruturas baseadas em nanofibras eletrodepositadas, com espessura de membrana controlável e diversidade de material, e grande área de superfície são estruturas ideais para fabricação de sensores. As nanofibras podem ser utilizadas em sensores ópticos altamente sensíveis, baseados em películas fluorescentes. As pesquisas feitas por Huang et al. (2003) indicam que a sensibilidade das nanofibras pode detectar íons férricos e de mercúrio, sendo mais eficazes do que os sensores obtidos por película fina.

Outras pesquisas são voltadas para sensores de nanofibras que contêm um indicador fluorescente como componente ativo. As sensibilidades de tais dispositivos a íons metálicos (Fe^{3+} ou Hg^{2+}) e 2,4- dinitrotolueno foram de duas a três vezes maior que aquelas baseadas em filmes finos. O melhor desempenho deve-se principalmente à grande área de superfície e do transporte relativamente fácil do indicador aos sítios ativos em cada nanofibra (LI; XIA, 2004).

Wang, Ramos e Santiago-Aviles (2007) fabricaram sensores de gás para detecção de umidade e metanol usando nanofibras de SnO_2 produzidas por *electrospinning* e deposição metalorgânica. Os sensores mostraram alta sensibilidade a ambos os gases com tempos de resposta de detecção de 108-150s para umidade e de 10-38s para gás metanol,

respectivamente.

2.4 Princípios de funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM)

Durante a fase de produção ou análise de materiais, quase sempre é necessário analisar suas microestruturas. Esta análise microestrutural é muito importante pois permite entender as correlações de microestrutura - defeitos - propriedades; e prever as propriedades do material quando estas correlações são estabelecidas (LYMAN et al., 1990; REED, 1996).

As técnicas mais utilizadas para este tipo de análise são a Microscopia Ótica e Eletrônica. A microscopia eletrônica de varredura se apresenta como a técnica mais adequada, pois permite alcançar aumentos muito superiores ao da microscopia ótica. Dependendo do material o aumento pode atingir até 900 000 vezes, mas para a análise de materiais normalmente o aumento é da ordem de 10 000 vezes. Em contrapartida, o aumento máximo conseguido pela microscopia ótica fica em torno de 2000 vezes. No caso da microscopia eletrônica a área ou o microvolume a ser analisado é irradiado por um fino feixe de elétrons ao invés da radiação da luz. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação.

Entretanto, não são apenas estas características que fazem do SEM uma ferramenta tão importante e tão usada na análise dos materiais. A elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica.

Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, uma série de radiações são emitidas tais como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios-X característicos, elétrons Auger, fótons, etc. Estas radiações quando captadas corretamente irão fornecer informações características sobre a amostra (topografia da superfície, composição, cristalografia, etc.).

Na microscopia eletrônica de varredura os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados (LYMAN et al., 1990). À medida que o feixe de elétrons primários varrem a amostra, estes sinais sofrem modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição.

O SEM consiste basicamente da coluna óptico-eletrônica (canhão de elétrons e sistema de demagnificação), da unidade de varredura, da câmara de amostra, do sistema de detectores e do sistema de visualização da imagem.

Na coluna óptico-eletrônica ficam localizados o canhão de elétrons, que gera os elétrons primários, as lentes condensadoras, que colimam o feixe de elétrons primários, as bobinas, que promovem a deflexão do feixe de elétrons primários no sentido horizontal e vertical sobre uma dada região da amostra, e ainda as bobinas que fazem as correções de astigmatismo. Toda a coluna deve estar sob vácuo durante a emissão do feixe de elétrons primários.

A varredura do feixe de elétrons pelas bobinas defletoras é também acompanhada pela deflexão de sua imagem no vídeo. O aumento da varredura da imagem é simplesmente a relação entre o tamanho da imagem no vídeo pelo tamanho da área varrida na amostra. Como o tamanho da imagem do vídeo não varia, as bobinas de deflexão serão as responsáveis pelo aumento da amostra. Quanto maior o aumento, menor a região varrida e menor a deflexão do feixe.

O tamanho do feixe considerado ideal, para um determinado aumento, é aquele cujas bordas do feixe tocam levemente a linha anteriormente varrida. Se o diâmetro do feixe é muito grande, ocorre uma sobreposição das linhas varridas e o resultado é uma imagem fora de foco.

A outra situação é quando o diâmetro do feixe é muito pequeno. Neste caso ao se reduzir o diâmetro do feixe pelo ajuste da corrente nas lentes condensadoras, o número

de elétrons no feixe, e, conseqüentemente, o número de elétrons que irá interagir com a amostra é também reduzido. Isto significa que para obter o mesmo brilho na imagem, como seria com o feixe ideal, o sinal reduzido precisa ser amplificado, resultando em aumento de ruído eletrônico. Outra conseqüência do tamanho do feixe muito pequeno é que algumas áreas da amostra, onde as bordas do feixe não se encontram não serão varridas pelo feixe de elétrons.

A emissão e a velocidade aleatória dos elétrons do cátodo dão origem ao ruído *shot* nas imagens SEM (MIDOH et al., 2005). Na prática, existem outras fontes de ruído nas imagens SEM tais como, ruído de emissão secundária e ruído devido à elétrons retroespalhados. O ruído *shot* obedece uma função distribuição Gaussiana. O desvio padrão da distribuição é proporcional ao nível de sinal. O valor de um *pixel* (x, y) é:

$$f(x, y) = \text{sinal}(x, y) + \text{ruído}(x, y); \quad \text{ruído}(x, y) \sim N(0, K_n \text{sinal}(x, y)). \quad (2.1)$$

em que, $\text{sinal}(x, y)$ e $\text{ruído}(x, y)$ são os níveis de sinal e ruído respectivamente.

2.5 Considerações finais

Neste capítulo foram tratados os principais aspectos referentes à produção de nanofibras e à técnica de aquisição de suas imagens investigadas nesta tese. O *electrospinning* é um processo econômico e simples para a obtenção de fibras em escala nanométrica. O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento versátil que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas. Apesar da potencialidade e versatilidade do SEM, existe um grande problema em caracterizar nanofibras, já que elas são muito pequenas e a caracterização é tipicamente manual ou semi-automática. No capítulo a seguir serão apresentadas as técnicas de processamento de imagem sugeridas para extração automática de diâmetros de nanofibras em imagens SEM.

3 Principais Ferramentas para Segmentação e Caracterização de Imagens de Nanofibras

A etapa de segmentação de imagens é uma das mais importantes em análise de imagens. A segmentação particiona uma imagem em regiões que são similares sob algum aspecto pré-definido ou critério, permitindo assim que conjuntos de *pixels* sejam localizados e separados para a identificação de objetos na cena. Ou seja, a segmentação permite a detecção e separação de conjuntos de *pixels* que constituem os objetos sob análise (GONZALEZ; WOODS, 1992; PARK et al., 2002; COSTA; JÚNIOR, 2001). Várias técnicas de segmentação têm sido propostas, algumas delas baseadas em classificação de *pixels* usando redes neurais celulares (DOHLER et al., 2008; LIU et al., 1999) e outras que empregam operadores morfológicos (EHO; QIAN, 1997).

Redes Neurais Celulares têm sido aplicadas em várias etapas de processamento de imagens tais como, realce (HUANG, 2006), classificação de imagens de ressonância magnética (*MRI*) e de textura (DOHLER et al., 2008; LIU et al., 1999), segmentação de objetos de vídeo e de imagens de válvulas sanguíneas (GAOBO, 2003; VILARINO et al., 2003) e detecção de lesões em imagens de mamografias (ERTAS et al., 2008). As razões principais para seu uso estão relacionadas à sua estrutura paralela constituída por células acopladas localmente e à sua capacidade de processamento de sinais analógicos. Dohler e seus colaboradores (DOHLER et al., 2008) usaram uma rede neural celular para classificar imagens *MRI* com respeito à ausência ou presença de esclerose mesial temporal. Ertas e seus colaboradores (ERTAS et al., 2008) desenvolveram um sistema automático para detecção

de lesões em imagens mamográficas de ressonância magnética usando uma rede neural celular. Todas as lesões foram detectadas corretamente (sensibilidade de detecção igual a 100%), no entanto ocorreram alguns falso-positivos (31% por lesão, 10% por fatia) devido a segmentação de alguns artefatos encontrados nas imagens avaliadas.

A morfologia matemática é o estudo da forma e da estrutura de um conjunto de *pixels*, cujo principal objetivo é revelar a estrutura dos objetos formados pelos pontos através da transformação dos conjuntos que o modelam. Isto é realizado através de operadores morfológicos (OMs). Dessa relação com a forma, a morfologia matemática torna-se uma ferramenta propícia para o processamento de imagens (ALVARENGA, 2003). Eiho e Qian propuseram em (EIHO; QIAN, 1997) um método de detecção de artérias coronárias usando operadores morfológicos. Nesta metodologia foram usados: um operador *top-hat* para realçar a forma das válvulas; a erosão morfológica seguida por operações de limiarização para remoção de áreas que não correspondem a válvulas; em seguida as válvulas são extraídas; os esqueletos das válvulas são obtidos por processos de afinamento; finalmente as bordas são extraídas aplicando a transformada *watershed* na imagem binária obtida de uma operação de dilatação no esqueleto.

Neste capítulo serão discutidas as principais técnicas de segmentação apresentadas neste trabalho, a saber: limiarização por Otsu, abordagem usando morfologia matemática e uso de redes neurais celulares. O desempenho da metodologia proposta usando morfologia matemática será avaliado e comparado com as demais técnicas através de medidas quantitativas. Ao realizar o processamento morfológico para mensuração dos diâmetros, observou-se que para imagens com fibras que se interceptam, os valores dos diâmetros não são calculados corretamente. Para contornar este problema, a transformada de Hough foi incorporada no algoritmo proposto para solução de regiões de entrecruzamento de nanofibras. Em seguida, medidas obtidas pela metodologia automática proposta e a metodologia padrão serão analisadas através de uma técnica de regressão adequada que evidencia limites de concordância de 95% entre as técnicas.

3.1 Redes Neurais Celulares

Vários problemas computacionais complexos podem ser resolvidos através do uso de matrizes de larga escala celulares homogêneas de circuitos simples, dedicadas para tarefas de processamento de imagens. A Rede Neural Celular (CNN), introduzida por Chua e Yang (1988a), é um paradigma para esse tipo de matriz.

Ao contrário de autômatos celulares esta arquitetura tem interações analógicas e processadores analógicos e, devido à dinâmica de propagação, não só os vizinhos próximos estão nas interações. Diferentemente das redes neurais convencionais, as células desta arquitetura capturam propriedades geométricas, não-lineares e de atraso. Redes Neurais Celulares compartilham as melhores características dessas categorias: sua característica de tempo contínuo permite o processamento do sinal em tempo real; e sua interconexão local torna possível a implementação VLSI.

3.1.1 A arquitetura de Redes Neurais Celulares

A unidade de circuito básica de uma rede neural celular é uma célula que contém elementos de circuito lineares e não lineares tais como, capacitores lineares (C), resistores lineares (R), fontes controladas lineares e não-lineares e fontes independentes (CHUA; YANG, 1988a). A estrutura de uma rede neural celular é similar àquela encontrada em autômatos celulares, já que cada célula da rede é conectada com suas células vizinhas. Dessa forma, células adjacentes podem interagir com suas células vizinhas e células não-conectadas diretamente são afetadas indiretamente por causa dos efeitos de propagação da dinâmica da rede. Um exemplo de CNN bi-dimensional é ilustrado na Figura 3.1. A célula da i -ésima linha e j -ésima coluna é indicada como $C(i, j)$. A vizinhança- r de uma célula $C(i, j)$ em uma rede neural celular é definida por:

$$N_r(i, j) = \{C(k, l) \mid \max\{|k - i|, |l - j|\} \leq r, \quad 1 \leq k \leq M; \quad 1 \leq l \leq N\} \quad (3.1)$$

em que r é um número inteiro positivo e $M \times N$ é o tamanho da rede neural celular,

com células arranjadas em M linhas e N colunas. Usualmente, chamamos a vizinhança $r=1$ de vizinhança 3×3 . A vizinhança definida acima exibe uma propriedade de simetria, já que $C(i, j) \in N_r(k, l)$, então $C(k, l) \in N_r(i, j)$, para todo $C(i, j)$ e $C(k, l)$ em uma rede neural celular.

Figura 3.1: Uma rede neural celular bidimensional com matriz 4×4 . Figura adaptada de (CHUA; YANG, 1988b).

A Figura 3.1 ilustra uma célula de processamento $C(i, j)$ de uma rede CNN. Os sufixos u , x e y denotam entrada, estado, e saída da célula, respectivamente. As fontes de corrente (I) controladas conectadas por linhas pontilhadas representam as interações dentro da vizinhança N_r . Os nós de tensão V_{xij} , V_{uij} , V_{yij} são denominados estado, entrada e saída da célula $C(i, j)$, respectivamente.

Figura 3.2: Um exemplo de um circuito de uma célula. Figura adaptada de (CHUA; YANG, 1988b).

Observa-se da Figura 3.2 que cada célula $C(i, j)$ contém uma fonte de tensão independente E_{ij} , uma fonte de corrente independente I , um capacitor linear C_x , dois resistores lineares R_x e R_y e $2m$ fontes de corrente lineares controladas por tensão acopladas às suas células vizinhas através da tensão de entrada de controle V_{ukl} e a tensão *feedback* de

saída V_{ykl} de cada célula vizinha $C(k, l)$, em que m é igual ao número de células vizinhas. Particularmente, $I_{xy}(i, j, k, l)$ e $I_{xu}(i, j, k, l)$ são fontes de corrente controladas por tensão com as características $I_{xy}(i, j, k, l) = A(i, j, k, l)V_{ykl}$ e $I_{xu}(i, j, k, l) = B(i, j, k, l)V_{ukl}$ para todo $C(k, l) \in N_r(i, j)$. O único elemento não-linear em cada célula é a fonte de corrente controlada por tensão parcialmente linear $I_{yx} = (1/R_y)f(V_{xij})$ com característica $f(\cdot)$ como ilustra a Figura 3.3.

Figura 3.3: A característica da fonte controlada não-linear. Figura adaptada de (CHUA; YANG, 1988b).

Considerando uma rede neural celular $M \times N$, com células arranjadas em M linhas e N colunas, e aplicando as leis de Kirchhoff no circuito da Figura 3.2, as equações deste arranjo são facilmente derivadas e especificadas a seguir. A equação do estado é definida por:

$$\begin{aligned}
 C_x (dV_{xij}(t)/dt) = & - (1/R_x) V_{xij}(t) + \sum_{C(k,l) \in N_r(i,j)} A(i, j; k, l) V_{ykl}(t) \\
 & + \sum_{C(k,l) \in N_r(i,j)} B(i, j; k, l) V_{ukl} + I, \\
 & 1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N
 \end{aligned} \tag{3.2}$$

A condição inicial do estado da célula V_{xij} tem magnitude menor ou igual a 1, ou seja, $|V_{xij}(0)| \leq 1$. A equação de saída é dada por:

$$V_{yij}(t) = \frac{1}{2} (|V_{xij}(t) + 1| - |V_{xij}(t) - 1|) \quad 1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N \tag{3.3}$$

O nó de tensão V_{uij} é definido como a entrada de $C(i, j)$ e sua equação é dada por:

$$V_{uij} = E_{ij}, \quad 1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N; \quad (3.4)$$

cuja condição inicial é constante e tem magnitude menor ou igual a 1, ou seja, $|V_{uij}| \leq 1$.

Os parâmetros da equação 3.2 são definidos por:

$$A(i, j; k, l) = A(k, l; i, j), \quad 1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N; \quad (3.5)$$

$$C_x > 0, R_x > 0. \quad (3.6)$$

em que ij refere-se à célula $C(i, j)$ e $kl \in N_r(i, j)$ refere-se à célula $C(k, l)$ na vizinhança dentro de um raio r da célula $C(i, j)$. A e B são máscaras (*templates*) denominadas operador *feedback* e operador de controle, respectivamente. Os valores dos elementos do circuito podem ser escolhidos convenientemente na prática. R_x e R_y determinam a potência dissipada no circuito e usualmente têm valores entre $1k\Omega$ e $1M\Omega$. $C_x R_x$ é a constante de tempo da dinâmica do circuito e usualmente tem valores entre 10^{-8} e 10^{-5} s.

Para garantir que as equações do circuito acima (3.2 a 3.6) sejam válidas para todas as redes neurais celulares, Chua e Yang (1988a) provaram o seguinte teorema que pode ser usado para determinar o intervalo dinâmico de todos os nós de tensão na rede:

Teorema I O estado V_{xij} de cada célula em uma CNN é limitada para todo o tempo $t > 0$ e o V_{max} pode ser calculado pela seguinte fórmula para qualquer rede neural celular:

$$V_{\max} = 1 + R_x |I| + R_x \max_{1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N} \left[\sum_{C(k, l) \in N_r(i, j)} (|A(i, j; k, l)|) + (|B(i, j; k, l)|) \right]. \quad (3.7)$$

A função básica da rede neural celular em processamento de imagens é transformar uma imagem de entrada em uma imagem de saída. A rede deve sempre convergir para valores iguais a 1 ou -1 resultando em uma imagem binária. Por outro lado, as imagens de entrada podem ter múltiplos níveis de cinza desde que atendam à condição inicial da equação de entrada. Isto significa que a rede neural celular para processamento de imagens deve

sempre convergir para um estado constante, seguindo um regime transiente, inicializado por uma dada imagem de entrada.

Maiores detalhes sobre a análise das propriedades de convergência da CNN são encontradas em (CHUA; YANG, 1988b). Para que a convergência da rede neural celular seja garantida, algumas condições e restrições são resumidas e discriminadas a seguir.

Teorema 2 Após decorrido o estado transiente, uma rede neural celular sempre se aproxima de um dos seus pontos de equilíbrio estável. Em outras palavras tem-se:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} V_{xij}(t) = \alpha, \quad 1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N \quad (3.8)$$

em que α é uma constante qualquer, ou tem-se:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \frac{dV_{xij}(t)}{dt} = 0, \quad 1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N \quad (3.9)$$

Teorema 3 Se os parâmetros do circuito satisfazem:

$$A(i, j; k, l) > \frac{1}{R_x} \quad (3.10)$$

então,

$$\lim_{t \rightarrow \infty} |V_{xij}(t)| \geq 1, \quad 1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N \quad (3.11)$$

ou equivalentemente,

$$\lim_{t \rightarrow \infty} V_{yij}(t) = \pm 1, \quad 1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N. \quad (3.12)$$

O teorema 3 garante através da equação 3.12 que a rede CNN apresentará saída binária e implicará que o circuito não oscilará ou se tornará caótico. Esta propriedade é fundamental para solucionar problemas de classificação que envolvem aplicações de processamento de imagens.

3.1.2 Aplicações de Redes Neurais Celulares para processamento de imagens

Para verificar a utilização de redes neurais celulares em processamento de imagens digitais, aproxima-se a equação diferencial 3.2 por uma equação de diferenças. Fazendo $t = nh$, em que h é um passo de tempo constante e aproximando a derivada de V_{xij} pela sua correspondente equação de diferenças, tem-se que:

$$(C_x/h) [V_{xij}((n+1)h) - V_{xij}(nh)] = (-1/R_x) V_{xij}(nh) + \sum_{C(k,l) \in N_r(i,j)} A(i,j;k,l) V_{ykl}(nh) + I_{ij}, \quad (3.13)$$

e

$$V_{yij}(nh) = 0.5R_y(|V_{xij}(nh) + 1| - |V_{xij}(nh) - 1|) \equiv f(V_{xij}(nh)), \quad (3.14)$$

em que,

$$I_{ij} = \sum_{C(k,l) \in N_r(i,j)} B(i,j;k,l) V_{ukl}(nh) + I, \quad 1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N. \quad (3.15)$$

Reformulando a equação 3.13, tem-se:

$$V_{xij}(n+1) = V_{xij}(n) + (h/C_x) [(-1/R_x) V_{xij}(n)] + (h/C_x) \left[\sum_{C(k,l) \in N_r(i,j)} A(i,j;k,l) V_{ykl}(n) + I_{ij} \right], \quad (3.16)$$

em que o termo h de nh foi suprimido para simplificação. Por exemplo, $V_{xij}(n) \equiv V_{xij}(nh)$ e $V_{yij}(n) \equiv V_{yij}(nh)$.

Substituindo a equação 3.14, para $V_{ykl}(n)$, na equação 3.16, obtém-se:

$$V_{xij}(n+1) = V_{xij}(n) + (h/C_x) [(-1/R_x) V_{xij}(n)] + (h/C_x) \left[\sum_{C(k,l) \in N_r(i,j)} A(i,j;k,l) f(V_{xkl}(n)) + I_{ij} \right], \quad (3.17)$$

$$1 \leq i \leq M; 1 \leq j \leq N.$$

A equação 3.17 pode ser interpretada como um filtro bidimensional que transforma uma imagem $V_x(n)$ em uma outra $V_x(n+1)$. O filtro é não linear pois $f(V_{xkl}(n))$ na equação 3.17 é uma função não linear. O ajuste dos parâmetros desta rede para encontrar uma

transformação de imagem desejada consiste no principal tema de pesquisa atualmente. A principal vantagem desta rede é a sua versatilidade já que *templates* variantes no espaço ou no tempo, não-linearidades especiais, múltiplas camadas ou células de alta-ordem e muitas outras propriedades podem ser ajustadas para obter um resultado desejado (CROUNSE; CHUA, 1995). Dessa forma, a CNN é utilizada para obter uma transformação dinâmica de uma imagem inicial em qualquer tempo t . No caso especial, quando $t \rightarrow \infty$, a variável estado V_{xij} tende a uma constante e a saída tende aos valores +1 ou -1 como afirmam os Teoremas 2 e 3.

3.2 Processamento morfológico de imagens

A morfologia matemática, originalmente desenvolvida pelos matemáticos franceses Matheron (1975) e Serra (1982), é um ramo da área de análise e processamento não-linear de imagens, que se concentra na estrutura geométrica de uma imagem. É o estudo da forma de um conjunto de *pixels*, cujo principal objetivo é revelar a estrutura dos objetos formados pelos pontos através da transformação dos conjuntos que o modelam. Dessa relação com a forma, a morfologia matemática torna-se uma ferramenta propícia para problemas tais como, filtragem de ruído, segmentação, detecção e decomposição de formas, análise de texturas, geração de características, compressão, esqueletonização e afinamentos em geral (COSTA; JÚNIOR, 2001; DOUGHERTY; LOTUFO, 2003; SOILLE, 1999; ALVARENGA, 2003).

Nas aplicações mais simples, os operadores morfológicos (OMs) utilizam-se apenas da imagem em estudo e de um elemento estruturante (ES). O ES é formado por um determinado conjunto de *pixels* e é usado para identificar o objeto da cena durante a aplicação do OM. Caso o ES coincida com alguma estrutura da imagem, uma transformação é realizada ou não, dependendo do operador aplicado. A idéia básica é varrer uma imagem com um elemento estruturante e quantificar a adequação ou não do ES dentro da imagem. Marcando os locais nos quais o elemento estruturante adegue-se dentro da imagem, derivamos informações estruturais da mesma.

A seguir, trataremos dos operadores morfológicos utilizados nesta tese para extração de características nas imagens de nanofibras.

A translação de um conjunto A por um ponto x é denotada por A_x e é definido por:

$$A_x = a + x : a \in A \quad (3.18)$$

Geometricamente A_x corresponde a uma versão de A transladada ao longo do vetor x .

Os operadores morfológicos são construídos a partir de dois operadores fundamentais: a erosão e a dilatação. A erosão de um conjunto A por um conjunto B é denotada por $A \ominus B$ e é definida por:

$$A \ominus B = x : B_x \subset A, \quad (3.19)$$

em que $\subset$ denota a relação de subconjunto, A representa a imagem de entrada e B é o elemento estruturante. $A \ominus B$ consiste de todos os pontos x para os quais a translação de B por x adequa-se dentro de A (DOUGHERTY; LOTUFO, 2003). O segundo operador básico da morfologia matemática é a dilatação. Esta operação é o dual da erosão, o que significa que ela é definida pela erosão de um complemento de conjunto. A dilatação de um conjunto A por B é denotado por $A \oplus B$ e é definido por:

$$A \oplus B = (A^c \ominus \check{B})^c, \quad (3.20)$$

em que A^c denota o complemento de A . Assim, para dilatar A por B , B é rotacionado em torno da origem para obter $\check{B}$, A^c é erodido por $\check{B}$, e então o complemento da erosão é tomado.

O efeito prático da erosão da imagem é a contração das formas contidas na imagem original, como mostra a Figura 3.4(c). O efeito da dilatação é diminuir ou completar pequenos buracos e protusões de uma determinada imagem dependendo do tamanho,

tipo e ponto de referência do elemento estruturante; e de expandir as formas da imagem original como mostra a Figura 3.4(d).

Figura 3.4: Processamento morfológico (a) imagem original (b) imagem limiarizada (c) imagem erodida e (d) imagem dilatada.

A abertura de uma imagem A por um elemento estruturante B é denotada por $A \circ B$ e é definida como uma composição da erosão e dilatação dada por:

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B. \quad (3.21)$$

Uma fórmula equivalente para a equação 3.21 do operador morfológico abertura é dada por:

$$A \circ B = \bigcup B_x : B_x \subset A. \quad (3.22)$$

A abertura resulta da união de todas as translações do elemento estruturante que se adequam dentro da imagem de entrada. O efeito da abertura de uma imagem por um elemento estruturante do tipo disco é um filtro que suaviza cantos, isto é, a abertura elimina estruturas na imagem que não podem conter o elemento estruturante.

O operador abertura tem como resultado porções da imagem que se conformam com

o elemento estruturante. Supondo agora que desejemos obter porções da imagem que se conformem a um número qualquer de formas primitivas e não só a uma simples forma primitiva. Este efeito pode ser alcançado usando um filtro compreendido de um número de aberturas, uma para cada forma primitiva desejada. A saída final do filtro é a união das aberturas individuais. Um filtro ψ é chamado τ -abertura se existe alguma classe $\mathbf{B} = B_1, B_2, \dots, B_n$ de elementos estruturantes de base tal que:

$$\psi(A) = \bigcup_{k=1}^n A \circ B_k. \quad (3.23)$$

em que $\mathbf{B}$ é a base para ψ .

Um filtro τ -abertura que é um operador conectado é o filtro *area open*. Neste caso, a base é composta de todos os elementos estruturantes E -conectados cuja área seja igual a α . A área de cada componente conectado C é medida e removida se for menor que α :

$$A \circ (\alpha)_E = \bigcup C_i, \quad \text{area} C_i \geq \alpha. \quad (3.24)$$

Figura 3.5: Processamento morfológico (a) imagem ruidosa (b) processamento do filtro τ -abertura para supressão de ruído cuja área seja menor que 5 *pixels* (c) processamento do filtro τ -abertura para supressão de ruído cuja área seja menor que 50 *pixels* e (d) imagem do esqueleto.

A Figura 3.5 ilustra o processamento de uma imagem por um filtro τ -abertura. A Figura 3.5(a) ilustra uma imagem contaminada por ruído. As Figuras 3.5(b) e (c) mostram o processamento por um filtro τ -abertura para eliminação de áreas de *pixels* conectados abaixo de 5 *pixels* e abaixo de 50 *pixels*, respectivamente.

Outro procedimento comumente utilizado para a extração de características é a esqueletonização. Esta operação consiste em representar imagens através de uma fina linha representativa, resultando nos *pixels* essenciais para composição de segmentos lineares com comprimento, tamanho e direção (DOUGHERTY; LOTUFO, 2003; SOILLE, 1999). Existem várias definições formais para a esqueletonização; uma delas é baseada no conceito de discos máximos.

Um disco D é máximo em um objeto S se não existe nenhum outro disco maior que D contido em S com o mesmo centro. Os centros de todos os discos máximos compreendem o esqueleto (ou eixo medial) do objeto S . Para um objeto S , o esqueleto é denotado por $Skel(S)$, E é o elemento estruturante e nE é a dilatação iterativa de E dada por $nE = E \oplus E \oplus \dots \oplus E$.

Para $n = 0, 1, \dots$, define-se subconjunto de esqueletonização $Skel(S; n)$ como o conjunto de todos os *pixels* x em S tal que x é o centro de um disco máximo nE . Dessa forma, o esqueleto é a união dos subconjuntos esqueléticos:

$$Skel(S) = \bigcup_{n=0}^{\infty} Skel(S; n); \quad (3.25)$$

em que os subconjuntos esqueléticos são dados por:

$$Skel(S; n) = (S \ominus nE) - [(S \ominus nE) \circ E]; \quad (3.26)$$

As equações 3.25 e 3.26 produzem a seguinte equação do esqueleto:

$$Skel(S) = \bigcup_{n=0}^{\infty} (S \ominus nE) - [(S \ominus nE) \circ E]. \quad (3.27)$$

Neste trabalho a esqueletonização foi utilizada para a extração de diâmetros ao longo das nanofibras. A Figura 3.5(d) ilustra a imagem esqueleto da imagem binária na Figura 3.4(b).

3.3 Método de Otsu

O método de Otsu (OTSU, 1979) consiste em uma limiarização global comumente usada na segmentação de imagens e baseada na forma de seus histogramas.

O método baseia-se no histograma de nível de cinza normalizado, considerado como uma função distribuição de probabilidade da seguinte maneira:

$$p_l = \frac{n_l}{N} \quad p_l \geq 0, \quad \sum_{l=0}^{L-1} p_l = 1. \quad (3.28)$$

em que n_l é o número de *pixels* que têm intensidade l , N é o número total de *pixels* na imagem e L é o número total de possíveis níveis de intensidade na imagem. É escolhido um limiar de valor k (em que $C_0 = [0, 1, \dots, k]$ é a classe de *pixels* de fundo com níveis entre $[0, k]$ e $C_1 = [k + 1, \dots, L - 1]$ é a classe de *pixels* do objeto com níveis entre $[k + 1, L - 1]$) que maximiza a variância entre classes σ_B^2 , que é definida como:

$$\sigma_B^2 = \omega_0 (\mu_0 - \mu_T)^2 + \omega_1 (\mu_1 - \mu_T)^2 \quad (3.29)$$

em que as probabilidades e as médias das classes C_0 e C_1 (ω_0 , ω_1 , μ_0 e μ_1 , respectivamente) são dadas por:

$$\begin{aligned} \omega_0 &= \sum_{l=0}^k p_l; & \omega_1 &= 1 - \omega_0; \\ \mu_0 &= \mu_k / \omega_0; & \mu_1 &= (\mu_T - \mu_k) / (1 - \omega_0); \\ \mu_k &= \sum_{l=0}^k l p_l; & \mu_T &= \sum_{l=0}^{L-1} l p_l. \end{aligned} \quad (3.30)$$

Em essência, o algoritmo de Otsu busca maximizar a variância entre classes analisando, para todos os valores de k possíveis, uma divisão de tons tal que maximize a

variância entre classes, ou seja, o método busca ou identifica um parâmetro de limiarização que é função exclusiva da própria imagem. A abordagem clássica do método de Otsu foi usada neste trabalho para comparar seu desempenho com os demais algoritmos de segmentação investigados na tese.

3.4 Transformada de Hough

Esta transformada foi proposta por Hough (1960) com o objetivo de achar subconjuntos de pontos na imagem que estejam alinhados em uma reta. Na Transformada de Hough (TH) é realizada uma parametrização normal das linhas retas, que envolvem a distância normal entre a linha reta e a coordenada da origem ρ e o ângulo normal θ entre a linha normal e o eixo- x . Uma linha reta com este par de parâmetros corresponde a um conjunto de pontos no plano satisfazendo a equação $\rho = x\cos(\theta) + y\sin(\theta)$.

Dessa forma M pontos colineares de uma linha $\rho(i) = x\cos(\theta(i)) + y\sin(\theta(i))$ levam a M curvas senoidais que se interceptam em $(\rho(i), \theta(i))$ no espaço de parâmetros, sendo que o i refere-se à célula i no espaço de parâmetros. A TH mapeia cada *pixel* de objeto da imagem original de coordenadas (x, y) na senóide no espaço do parâmetro normal e os pontos (x, y) colineares são levados a pontos em senóides que se cruzam no mesmo ponto (ρ, θ) e estes pontos podem ser utilizados para recuperar retas que ligam pontos colineares.

A Figura 3.6 ilustra um exemplo de parametrização normal (ou polar) de retas. As linhas sólidas para cada ponto na Figura 3.6 são as retas traçadas em diferentes ângulos, correspondentes ao intervalo de valores de θ . Em seguida, para cada linha sólida é traçada uma linha perpendicular a ela que intercepta a origem. São as linhas pontilhadas, que correspondem aos valores de ρ . O ângulo e comprimento das linhas pontilhadas são medidos. O procedimento é repetido para cada ponto. Seus valores estão disponíveis na tabela da Figura 3.6. O gráfico de ρ versus θ , o espaço de Hough, é então, criado, como mostra a Figura 3.7.

Figura 3.6: Transformada de Hough para a detecção de retas.

Figura 3.7: Espaço de parâmetros da transformada de Hough para os três pontos colineares representados na Figura 3.6.

A transformada Hough divide o espaço de parâmetros em células, pela quantização das dimensões ρ e θ em um número fixo de intervalos, gerando uma matriz acumuladora (MEDEIROS, 1999). Valores de pico nesta matriz representam linhas potenciais na imagem de entrada. Assim, cada ponto do espaço da imagem adiciona um voto nas células do espaço acumulador por onde passa a reta a ela associada. A partir da matriz acumuladora obtida faz-se a detecção de retas na imagem original, desconsiderando picos mais baixos na matriz acumuladora correspondentes a ruídos e retas indesejadas como aquelas das regiões de interseção de nanofibras. Para detecção das retas desejadas calcula-se os valores de x e y , fazendo o mapeamento dos senóides no espaço dos parâmetros, para os pontos no espaço da imagem, obtendo ao final as retas da imagem original, porém sem o ruído.

Neste trabalho a TH foi utilizada para detecção de retas no processo de esqueletonização da imagem, como ilustra a Figura 3.8. A esqueletonização das imagens de nanofibras apresenta, nas regiões de entrecruzamento, retas que não correspondem àquelas para o cálculo correto dos valores dos diâmetros, ilustrada na Figura 3.8(b). Assim a transformada de Hough foi utilizada para detecção das retas do processo de esqueletonização, desconsiderando neste processo retas de regiões de entrecruzamento de nanofibras, como mostra a Figura 3.8(d). Na esqueletonização são detectados também alguns sinais ruidosos, Figura 3.8(b), provenientes da etapa de segmentação das nanofibras, particularmente das regiões de bordas que apresentam um aspecto serrilhado. Eles também são desconsiderados pela transformada de Hough e, portanto, não contabilizados no processo de extração de diâmetros.

3.5 Medidas para avaliação da segmentação

A segmentação de uma imagem é uma das etapas mais críticas de processamento de imagens. Esta etapa consiste em subdividir a imagem em suas partes constituintes e extrair as partes de interesse (objetos). Desde que nenhum dos algoritmos de segmentação propostos são geralmente aplicáveis a todas as imagens e diferentes algoritmos não são igualmente apropriados para uma aplicação particular, a avaliação de desempenho dos

Figura 3.8: Processamento da transformada de Hough nas imagens de nanofibras: (a) imagem original (b) esqueletonização da imagem (c) espaço de parâmetros da transformada de Hough (d) reconstrução da imagem do esqueleto.

algoritmos de segmentação é indispensável (ZHANG, 1995).

Os algoritmos de segmentação podem ser avaliados analítica ou empiricamente, assim os métodos de avaliação podem ser classificados como: métodos analíticos e métodos empíricos.

Os métodos analíticos examinam os algoritmos de segmentação analisando seus princípios, requerimentos, utilidades, complexidade e outras propriedades. Ao contrário dos métodos de avaliação empíricos, os métodos analíticos dispensam a implementação dos algoritmos de segmentação a serem avaliados. As propriedades obtidas por esses métodos ajudam na escolha dos algoritmos de segmentação apropriados para aplicações específicas. Por exemplo, a estratégia de processamento dos algoritmos de segmentação pode ser paralela, sequencial, iterativa ou mista. Os algoritmos paralelos são mais apropriados para implementações que requeiram menor tempo de processamento.

Os métodos empíricos avaliam o desempenho dos algoritmos de segmentação pela qualidade das imagens segmentadas obtidas. A maioria dos métodos empíricos pode ser classificada ainda em: métodos de qualidade e métodos de discrepância (ZHANG, 1995).

Na primeira categoria, algumas propriedades desejadas das imagens segmentadas, frequentemente estabelecidas de acordo com a intuição humana, são medidas por parâmetros de qualidade. As medidas de qualidade são calculadas a partir da imagem segmentada sem um conhecimento *a priori* da imagem segmentada ideal (ou imagem de referência).

Na segunda categoria, a avaliação dos algoritmos de segmentação é obtida através de medidas utilizando a imagem segmentada real e a imagem segmentada ideal. A imagem segmentada ideal é aquela que consiste no melhor resultado de segmentação, tais como a obtida manualmente, com objetos e bordas preservados. A imagem segmentada real ou imagem resultante do algoritmo de segmentação, é comparada com a imagem de referência/ideal e suas diferenças são contabilizadas. Medidas de discrepância de valores mais altos implicam em um erro maior da imagem segmentada real com relação à imagem de referência, indicando baixo desempenho do algoritmo de segmentação avaliado (ZHANG, 1995).

Segundo Zhang (1995), a medida de discrepância erro multi-classe tipo I, M_I , baseia-se no número de *pixels* classificados incorretamente. Supondo que uma imagem consiste de N_c classes de *pixels*, uma matriz de confusão Z de dimensão N_c pode ser contabilizada, em que cada posição na matriz Z_{ij} representa o número de *pixels* da classe j segmentado como da classe i pelo algoritmo de segmentação avaliado. O erro multi-classe tipo I é definido como (ZHANG, 1995):

$$M_I^{(k)} = 100 \times \frac{\left[\left(\sum_{i=1}^{N_c} Z_{ik} \right) - Z_{kk} \right]}{\left[\sum_{i=1}^{N_c} Z_{ik} \right]} \quad (3.31)$$

em que o numerador representa o número de *pixels* da classe k não classificados como da classe k e o denominador é o número total de *pixels* da classe k . Adotando $k = 1$ como a classe de *pixels* relativa a objetos e $k = 2$ como a classe de *pixels* relativa a fundo tem-se que o erro M_I para $k = 2$ é dado por:

$$M_I^2 = 100 \times \frac{Z_{12} - Z_{22}}{Z_{12}}. \quad (3.32)$$

Outra forma de avaliar o desempenho do algoritmo de segmentação é através de medidas de discrepância baseadas na posição do *pixel* segmentado erroneamente. Uma alternativa seria usar a distância entre o *pixel* classificado incorretamente e o *pixel* mais próximo da classe a qual aquele *pixel* deveria pertencer. Seja N_e o número de *pixels* classificados incorretamente e $d(i)$ seja a distância entre o i -ésimo *pixel* mal classificado e o *pixel* mais próximo pertencente à classe do *pixel* mal segmentado. A medida de discrepância D baseada na distância é definida como (ZHANG, 1995):

$$D = \sum_{i=1}^{N_e} d^2(i) \quad (3.33)$$

Esta medida é normalizada para isentá-la da influência do tamanho da imagem. Assim a medida de discrepância normalizada (ND) pode ser calculada como:

$$ND = 100 \times \sqrt{D}/A \quad (3.34)$$

em que A é o número total de *pixels* na imagem.

Para prover uma análise quantitativa dos resultados de segmentação, adotou-se também a medida de erro de área relativa aos objetos da imagem (relative foreground area error - RAE) (ARIFIN; ASANO, 2006), dada por:

$$RAE = \frac{|A_S - A_R|}{\max(A_S, A_R)} \quad (3.35)$$

em que A_R é a área (número de *pixels*) do objeto na imagem de referência e A_S é a área do objeto na imagem segmentada. RAE mede a discrepância da imagem segmentada em relação à imagem de referência. Nesta tese, a imagem segmentada manualmente foi adotada como a imagem de referência. Quando o valor desta medida está próximo de zero significa que a imagem segmentada resultante se ajusta bem com a imagem de referência.

Adicionalmente, a razão sinal-ruído contabiliza o ruído da imagem segmentada resultante. Esta relação é obtida por (ARIFIN; ASANO, 2006):

$$SNR = 10 \log \left[\frac{\sum_{x=1}^{N_x} \sum_{y=1}^{N_y} I_R^2(x, y)}{\sum_{x=1}^{N_x} \sum_{y=1}^{N_y} (I_R(x, y) - I_S(x, y))^2} \right] \quad (3.36)$$

em que $I_R(x, y)$ é a segmentação de referência e $I_S(x, y)$ é a segmentação a ser investigada. O número de linhas e o número de colunas da imagem são denotados por N_x e N_y , respectivamente.

3.6 Análise da caracterização

A comparação de medidas entre uma nova metodologia e uma técnica padrão é necessária para certificar-se que a concordância entre elas é suficiente para que ocorra a adoção desta

nova. Tais investigações são frequentemente analisadas inapropriadamente, particularmente pelo uso do coeficiente de correlação, já que este induz a conclusões equivocadas. Essas conclusões serão tratadas na seção a seguir. Uma abordagem alternativa foi usada neste trabalho, proposta por Bland e Altman (1987). A técnica de segmentação proposta será avaliada e comparada à técnica comumente utilizada, através de cálculos e gráficos simples (BLAND; ALTMAN, 2003).

A precisão de medidas é um tema bastante discutido na literatura de processamento de imagens (CORTEZ-COOPER; TANAKA, 2003; AMEROM et al., 2009; BURLING et al., 2007; GIESEL et al., 2008; LU; TAN; FLOYD, 2005; MAGAGNIN et al., 2006). Especialistas frequentemente desejam ter dados das imagens de nanofibras, tais como, diâmetro ou área ocupada, em que a mensuração direta sem efeitos adversos é difícil ou impossível. Os valores verdadeiros permanecem desconhecidos. Os métodos indiretos, por sua vez, são usados e uma nova metodologia deve ser avaliada comparando-a a uma técnica padrão.

Alguns estudos sugerem a comparação pelo uso do coeficiente de correlação r entre os resultados dos dois métodos como um indicador de concordância. Por exemplo, Bakker et al. (1999) investigaram a concordância entre medidas de volume dos rins em imagens de ultra-som e em imagens de ressonância magnética. Os dados mostraram uma diferença em torno de 25% entre os métodos que foi ignorada pelo coeficiente de correlação. Dessa forma, uma correlação alta entre métodos não significa que os dois métodos concordem, pelas seguintes razões (BLAND; ALTMAN, 1987):

- r mede a força da relação entre duas variáveis, não a concordância entre elas. Tem-se uma perfeita correlação para qualquer relação linear entre as medidas enquanto que uma perfeita concordância ocorrerá somente se as medidas entre os dois métodos são coincidentes.
- uma mudança na escala da medida não afeta a correlação, mas certamente afetará a concordância. Por exemplo, se traçássemos a relação das medidas dos diâmetros *versus* a metade das medidas dos diâmetros, encontrar-se-ia uma reta perfeita com inclinação igual a 2. A correlação seria igual a 1, mas as duas medidas não concor-

dariam.

- a correlação depende do tamanho da amostra. Por exemplo, nos experimentos realizados foram tomadas duas amostras de 100 valores de diâmetros: uma extraída pelo Photoshop e outra obtida por processamento morfológico para a imagem da Figura 3.9. O coeficiente de correlação para as 50 primeiras medidas dos dois métodos avaliados é igual a 0,7665 ao passo que o coeficiente para as 100 medidas dos dois métodos avaliados é 0,8566. O coeficiente de correlação tende a ser maior para amostras maiores, logo uma correlação alta quase sempre é garantida.

Figura 3.9: Imagem Nanoc013.

É improvável que diferentes métodos concordem exatamente, dando um resultado idêntico para todos os indivíduos. No entanto, é possível avaliar o quanto o novo método difere do padrão: se isto for suficiente para não causar problemas nas interpretações do especialista pode-se substituir o método padrão pelo novo ou permutar o uso dos dois.

Um simples gráfico de medidas obtidas por um método *versus* o outro pode ajudar na visualização da concordância entre as medidas, como mostra a Figura 3.10. No entanto, é difícil analisar neste gráfico a diferença entre os métodos. Um gráfico da diferença entre os métodos *versus* a média entre eles, como mostra a Figura 3.11(a), pode ser mais informativo, pois permite investigar quaisquer possíveis relações entre erro de medida e o valor verdadeiro. Como não se sabe o valor verdadeiro, a média das medidas é a melhor estimativa que se tem (BLAND; ALTMAN, 1987).

Figura 3.10: Relação de diâmetros manuais e automáticos para a imagem Nanoc013.

A Figura 3.11(a) mostra considerável concordância entre os métodos manual e automático para diferenças até $60nm$ e discrepância para valores acima deste limiar, como mostra o histograma da Figura 3.11(b). Essas diferenças não são tão perceptíveis na Figura 3.10. Se as diferenças obtidas não causarem problemas na interpretação do especialista, pode-se substituir a metodologia padrão pela metodologia proposta. Como ilustração admitamos que se a diferença requerida entre as metodologias não deva ultrapassar $120nm$, pode-se recolocar a metodologia proposta pela padrão já que diferenças menores que esta não afetarão o diagnóstico do especialista. Por outro lado se as diferenças não puderem ultrapassar o valor de $60nm$, a metodologia proposta é insatisfatória ou inadequada.

Pode-se resumir a concordância entre os métodos calculando o desvio (*bias*), estimado pela média das diferenças $\bar{d}$ e o desvio padrão das diferenças s . Se existe um *bias* é possível ajustá-lo subtraindo a média das diferenças do novo método. Para as amostras supracitadas, obtidas pelo Photoshop e por processamento morfológico, a média das diferenças entre as medidas manual e automática é $-2,41nm$ e o desvio padrão é $34,20nm$. Espera-se, portanto, que a maioria das diferenças estejam entre $\bar{d} - 2s$ e $\bar{d} + 2s$ como ilustra a Figura 3.11(a), em que a média e os limites de concordância estão destacados em vermelho.

Se a distribuição das diferenças é aproximadamente normal, 95% das diferenças encontrar-se-ão dentro desses limites (ou mais precisamente, entre $\bar{d} - 1,96s$ e $\bar{d} + 1,96s$).

Figura 3.11: Análise Bland Altman para a imagem Nanoc013 (a) relação entre média e diferenças entre diâmetros manuais e automáticos (b) histograma da diferença de diâmetros entre os métodos.

Tais diferenças seguem uma distribuição aproximadamente normal, como mostra o histograma da Figura 3.11(b). Segundo Bland e Altman (2003) as medidas obtidas pelos métodos não precisam seguir uma distribuição normal, e frequentemente não seguem.

Os limites de concordância são somente estimativas dos valores que se aplicam à população inteira. Uma segunda amostra resultaria em limites diferentes. Algumas vezes faz-se necessário usar intervalos de confiança para ver quão precisas são as estimativas, dado que as diferenças seguem uma distribuição aproximadamente Normal. Intervalos de confiança para amostras maiores que 30 elementos podem ser calculados encontrando o valor apropriado z da distribuição Normal (FREUND; LIVERMORE; MILLER, 1960), como detalhado nos Apêndices A e B. Para intervalos de confiança de 95% o valor de z é 1,96. O intervalo de confiança de 95% para a média das diferenças está entre $\bar{d} - 1,96 (s/\sqrt{n})$ e $\bar{d} + 1,96 (s/\sqrt{n})$, em que n é o tamanho da amostra. O intervalo de confiança de 95% para o desvio padrão das diferenças está entre $s / (1 + (1,96/\sqrt{n}))$ e $s / (1 - (1,96/\sqrt{n}))$.

Portanto o intervalo de confiança para a média das diferenças para as amostras obtidas pelo Photoshop e por processamento morfológico será de $-2,41 - (1,96 \times 3,42)$ à $-2,41 + (1,96 \times 3,42)$ resultando em $-9,11nm$ à $4,29nm$. O intervalo de confiança para o limite inferior $\bar{d} - 2s = -70,82nm$ será $-82,21nm$ à $-62,20nm$ e para o limite superior $\bar{d} + 2s = 65,98nm$ será $57,95nm$ à $76,60nm$. Estes intervalos são amplos o que reflete uma

grande variação das diferenças. Apesar dos resultados otimistas dos intervalos de confiança existem consideráveis discrepâncias entre as amostras e o grau de concordância entre elas não é aceitável.

3.7 Considerações finais

Neste capítulo foram apresentadas as ferramentas para melhoria da segmentação e extração de características utilizadas no desenvolvimento desta tese. Várias características das redes neurais possibilitam a sua utilização em segmentação de objetos em imagens, tais como, a rapidez na execução através do processamento paralelo e a capacidade de classificação de padrões. Adicionalmente, o processamento morfológico extrai informações geométricas de uma imagem através da utilização da transformação de uma outra imagem completamente definida (elemento estruturante) para ressaltar aspectos específicos das formas permitindo que estas sejam contadas ou reconhecidas. A análise comparativa entre as técnicas avaliadas através de medidas quantitativas visa identificar a adequação da metodologia proposta para a extração de diâmetros. A análise de caracterização foi realizada pela abordagem proposta por Bland e Altman (1987), em que evidencia os limites de concordância entre métodos. No capítulo a seguir será detalhado o procedimento experimental bem como a metodologia proposta.

4 Metodologia Proposta

Neste capítulo será descrito o procedimento para produção e aquisição de imagens de nanofibras bem como o método de caracterização realizado nas imagens. Em seguida serão discutidas as técnicas de processamento de imagens investigadas na tese visando a extração de diâmetros ao longo dessas nanoestruturas. Por fim será discutida a análise comparativa realizada entre os diâmetros obtidos pelo *software gold standard* Photoshop e aqueles obtidos pelas abordagens investigadas.

4.1 Procedimento experimental

No procedimento executado, as fibras foram eletrodepositadas usando um aparato experimental, desenvolvido localmente no Laboratório de Sistemas Integráveis - Divisão de Microsistemas Integrados, ilustrado na Figura 4.1, composto de uma fonte de tensão (Gamma High Voltage Research Inc., 0 – 30kV), uma seringa (3cm³, agulha do tipo 26G^{5/8}) e uma tela coletora que sustenta o substrato (silício, < 100 >, área: 1,5cm x 1,5cm). Para garantir a reprodutibilidade, as amostras de silício foram posicionadas no centro da tela coletora. A seringa foi montada a 15° com o eixo horizontal do plano *xy*, mantendo-se uma gota pendente na agulha. Foi aplicada uma diferença de potencial fixa de 15kV entre a agulha e a tela coletora e as soluções poliméricas foram preparadas com 600mg de poliácridonitrila (PAN) e 10ml de N,N-dimetilformamida (DMF), com exceção das amostras 5KCL_023 e Pan6K_027 preparadas com a adição de 5% e 3% de cloreto de potássio, respectivamente. (VERDONCK et al., 2006; CALÍOPE et al., 2005).

As micrografias SEM foram obtidas pelo microscópio Nova 400 NanoSEM. As imagens

Figura 4.1: Foto do aparato para a deposição eletrostática. Figura extraída de (MENDES, 2004).

das amostras foram obtidas sem qualquer inclinação, ou seja, olhando perpendicularmente a amostra, com magnificações especificadas na Tabela 4.1. As colunas da tabela mostram o nome da imagem, a data de aquisição das amostras, a magnificação das imagens, a régua e o tipo de solução polimérica, respectivamente. A coluna denominada régua indica o valor em nanômetros de uma parte da imagem, para uma mudança de escala apropriada para *pixels* para o processamento das imagens.

4.2 Segmentação das imagens

4.2.1 Redes Neurais Celulares

Ao processo de extração do diâmetro da nanofibra é necessário, primeiramente, filtrar o ruído intrínseco às imagens advindas do SEM. O ruído inerente a uma imagem SEM é denominado ruído *shot*, o qual obedece uma função densidade de probabilidade Gaussiana (MIDOH et al., 2005). Em processamento de imagens, o método mais simples de redução ruído é através de um operador da média. Assim, foi escolhida uma máscara (*template*) da média como regra dinâmica da nossa rede neural celular para redução de ruído.

Tabela 4.1: Tabela com especificações das nanofibras.

Nome da Imagem	Data de Aquisição	Magnificação	Régua	Tipo
5KCl_023	08/08/2007	10K	5um	PAN+5% KCl
As1_004	19/06/2007	3K	20um	PAN
Aw1_012	19/06/2007	11K	4um	PAN
Pan6k_027	08/08/2007	10K	5um	PAN+3% KCl
Nano 013	22/01/2007	3K	1um	PAN
Nanoc 001	22/01/2007	20K	200nm	PAN
Nanoc 002	22/01/2007	10K	1um	PAN
Nanoc 003	22/01/2007	10K	1um	PAN
Nanoc 007	22/01/2007	10K	1um	PAN
Nanoc 008	22/01/2007	10K	1um	PAN
Nanoc 013	22/01/2007	10K	1um	PAN
Nanoc 014	22/01/2007	10K	1um	PAN
Nanod 002	22/01/2007	10K	1um	PAN
Nanod 003	22/01/2007	20K	200nm	PAN
Nanod 014	22/01/2007	20K	200nm	PAN
Nanoe 007	22/01/2007	10K	1um	PAN
Nanof 007	22/01/2007	20K	200nm	PAN

Os parâmetros dos elementos do circuito de uma célula $C(i, j)$ usados foram:

$$\begin{aligned}
 C_x &= 10^{-9} F; & R_x &= 10^3 \Omega; & I &= 0; \\
 A &= 10^{-3} \begin{bmatrix} 0.5 & 1 & 0.5 \\ 1 & 4 & 1 \\ 0.5 & 1 & 0.5 \end{bmatrix} \Omega^{-1} \\
 B(i, j; k, l) &= 0,
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

dados que $C(k, l) \in N_r(i, j)$ com $r = 1$, ou seja, para uma janela 3x3. Como $B(i, j; k, l) = 0$, somente os coeficientes da máscara $A(i, j; k, l)$ determinam o comportamento transiente da rede neural celular.

As equações dinâmicas da CNN correspondentes aos parâmetros acima, explanadas na Seção 3.1, são dadas por:

$$\frac{dv_{xij}(t)}{dt} = 10^6 \begin{bmatrix} -v_{xij}(t) + 0.5v_{yi-1j-1}(t) + v_{yi-1j}(t) + 0.5v_{yi-1j+1}(t) \\ +v_{yij-1}(t) + 4v_{yij}(t) + v_{yij+1}(t) \\ +0.5v_{yi+1j-1}(t) + v_{yi+1j}(t) + 0.5v_{yi+1j+1}(t) \end{bmatrix} \tag{4.2}$$

e

$$v_{yij}(t) = (|v_{xij}(t) + 0.9| - |v_{xij}(t) - 0.1|). \quad (4.3)$$

A rede CNN utilizada realiza um processo de classificação de *pixels* resultando em uma imagem segmentada. Dessa forma, a imagem de saída obtida é uma imagem binária cujos *pixels* são classificados como nanofibra ou não-nanofibra, resultando em uma imagem segmentada. A rede usada tem as mesmas propriedades de um filtro bidimensional passa-baixa, assim ele é efetivo para suavização de ruído em imagens com objetos largos e poucos cantos. Na imagem resultante filtrada e segmentada pela CNN, algumas regiões das nanofibras não são classificadas corretamente, resultando em algumas partes perdidas. Esses resultados estão refletidos na avaliação quantitativa que será discutida no Capítulo ??.

4.2.2 Processamento morfológico

Para processamento morfológico das imagens é preciso inicialmente aplicar uma limiarização nas imagens de modo que seja obtida uma imagem binária. Basicamente os *pixels* com valor menor que o limiar são transformados em pretos (fundo) e os *pixels* com valor maior ou igual ao limiar são transformados em brancos (nanofibras).

Dentre as técnicas de limiarização, a mais simples consiste no particionamento do histograma da imagem por um limiar único T . A segmentação é então efetuada, varrendo-se a imagem, *pixel* a *pixel*, e rotulando-se cada *pixel* como sendo do objeto ou do fundo, dependendo se o nível de cinza daquele *pixel* estiver acima ou abaixo do limiar T . O sucesso desse método depende do histograma da imagem, ou seja, da presença de modas (bimodal ou multimodal).

Em seguida foi utilizado um filtro τ -abertura para redução do ruído remanescente do processo de binarização.

4.3 Extração de diâmetros por processamento morfológico

No procedimento de extração de características das imagens de nanofibras utilizou-se o processamento morfológico (DOUGHERTY; LOTUFO, 2003; SOILLE, 1999). A Figura 4.2 mostra o processo detalhado. Para a detecção de bordas das nanofibras, subtraiu-se a imagem obtida na etapa da segmentação pela imagem erodida. A imagem erodida foi obtida por um elemento estruturante do tipo disco. A partir da imagem original, obteve-se o esqueleto ou eixo medial da imagem através do processo de esqueletonização. A esqueletonização pode ser compreendida como a forma de representar imagens através da extração de suas características pelo processo de afinamento, resultando nos *pixels* essenciais para composição de segmentos lineares com comprimento, tamanho e direção.

Para todos os *pixels* do eixo medial, calculou-se o raio da nanofibra. Nesta etapa, uma janela suficientemente grande (121x121) foi centrada em cada *pixel* do eixo medial, para abranger todos os *pixels* do contorno possíveis de serem aquele de menor distância para o *pixel* do eixo medial em questão. A escolha do tamanho da janela foi investigada visualmente, isto é, para as imagens estudadas constatou-se aquelas que apresentavam nanofibras com diâmetros maiores. Para uma melhor visualização do esqueleto e dos contornos extraídos das nanofibras ilustra-se na Figura 4.2 uma parte da nanofibra para uma melhor compreensão do processo. Em vermelho está caracterizada a esqueletonização e em branco o contorno. Para cada *pixel* de contorno nessa janela, foi calculada a distância com relação ao *pixel* do eixo medial em questão e foi escolhida a menor distância, no caso, o raio. A partir do raio obtém-se o diâmetro já que seu valor é igual ao dobro do raio.

O procedimento para a extração de nanofibras apresenta bom desempenho nas imagens de nanofibras dispostas em paralelo e pouco contaminadas por ruído. Por outro lado, imagens que apresentam nanofibras sobrepostas ou com regiões de entrecruzamento requerem um processamento adicional, para o tratamento ou eliminação dessas regiões nas imagens, que será discutido na seção a seguir.

Figura 4.2: Detalhe da esqueletonização e do contorno de uma parte da nanofibra e da centralização da janela para análise de diâmetros em um *pixel* do esqueleto.

4.4 Solução de problemas das imagens de nanofibras

Para imagens de baixa resolução, as análises feitas pelo especialista e pela metodologia proposta na Seção 4.3 resulta em um diagnóstico impreciso dos diâmetros das nanofibras. Para o especialista é difícil delimitar o diâmetro manualmente e estimar o diâmetro médio da fibra. As principais dificuldades previstas no processamento proposto são listadas a seguir:

- A imagem pode apresentar sobreposição de nanofibras, como mostra a Figura 4.3(a), na parte superior direita. O algoritmo considera erroneamente as duas fibras sobrepostas como uma única, de diâmetro grande, comprometendo todo o processamento posterior de extração do eixo medial e de bordas das nanofibras. Esta dificuldade é parcialmente atenuada com o uso da transformada de Hough, como será discutido em seguida.
- Outra dificuldade do método proposto está relacionada ao tratamento de regiões de entrecruzamento, como ilustrado na Figura 4.4. Observa-se que para os *pixels* do eixo medial dessa região, a metodologia de extração descrita anteriormente detectará como menor distância um valor que não corresponderá ao raio da nanofibra. O problema é mais evidente para interseções com mais fibras e para fibras mais finas. Isto ocorre porque o processamento de segmentação considera a região de entrecruzamento como de um único objeto na imagem. A solução encontrada para

Figura 4.3: (a) Imagem original com região de sobreposição destacada em amarelo (b) processamento morfológico e (c) detalhe da imagem processada, com detecção de bordas e esqueleto, na região de sobreposição de nanofibras.

contornar esse problema utiliza a transformada de Hough aplicada ao esqueleto. A solução proposta usa como imagem de entrada a imagem do esqueleto, obtida pelo processamento morfológico da imagem segmentada. A transformada foi utilizada para detectar retas correspondentes ao esqueleto desconsiderando as retas das regiões de entrecruzamento, eliminando assim sua influência no cálculo do diâmetro e na geração do histograma. Nota-se que o esqueleto, obtido pelo processo de esqueletonização ou afinamento, frequentemente contém sinais espúrios que podem ser desconsiderados com o uso da transformada de Hough também.

Figura 4.4: Imagem detalhe da esqueletonização para nanofibras que se interceptam.

4.5 Análise de concordância entre métodos

O procedimento manual para extração de diâmetros realizado neste trabalho foi conduzido para comparar seus dados com aqueles obtidos pelo uso combinado das metodologias de segmentação e processamento morfológico para extração de diâmetros (ou seja, método de Otsu + processamento morfológico para extração de diâmetros, rede neural celular + processamento morfológico para extração de diâmetros e processamento morfológico para segmentação e extração de diâmetros). As amostras manuais consistem de 100 medidas usando o *software* Adobe Photoshop CS4 Extended Versão 11.0 escolhidos aleatoriamente nas imagens de nanofibras. Como este *software* é comumente utilizado pela comunidade científica para fazer caracterização de tais imagens (DING et al., 2004), as amostras levantadas por ele foram adotadas como padrão ouro. As medidas manuais foram obtidas

demarcando-se o diâmetro na imagem, assim os *pixels* entre duas bordas da fibra são contados. O número de *pixels* é então convertido para nanômetros, usando a régua pertinente para cada imagem, e o diâmetro resultante é gravado. Para avaliar a concordância entre a metodologia manual e cada metodologia proposta, 100 medidas realizadas pela metodologia automática foram obtidas aleatoriamente a partir do histograma resultante. A partir das amostras manual e automática obtidas, o diagrama da dispersão das médias pelas diferenças é gerado, bem como os limites de concordância entre as metodologias e a média das diferenças amostrais.

A Figura 4.5 mostra a representação gráfica do procedimento utilizado nesta tese para a caracterização de nanofibras. A etapa referente ao processo manual diz respeito à produção de nanofibras através da técnica de *electrospinning* e à geração de imagens com o uso do microscópio eletrônico, realizados no Laboratório de Sistemas Integráveis - Divisão de Microssistemas Integrados - da USP. As etapas representadas pelas fases que seguem esta etapa manual, ilustrada na Figura 4.5 são os objetos desta tese. Após a aquisição das imagens de nanofibras, estas são processadas pelos métodos de Otsu, CNN e morfológico. As imagens segmentadas resultantes da etapa precedente são esqueletonizadas usando o processamento morfológico. De posse dessas imagens, a transformada de Hough foi utilizada apenas para processar as imagens com regiões de entrecruzamento de nanofibras, eliminando a influência dessas regiões no histograma de diâmetros. Devido a segmentação ineficiente resultante do método de Otsu, como será visto no capítulo de resultados experimentais, a Transformada de Hough não foi utilizada para processar as imagens do esqueleto resultantes. Por fim, os métodos estudados foram comparados ao método padrão ouro através da análise Bland Altman para verificar se os mesmos podem substituir o método padrão.

A Tabela 4.2 ilustra os procedimentos investigados na tese ressaltando os procedimentos predominantemente manuais (aqueles que necessitam de ajustes de parâmetros) e os procedimentos automáticos. Os pseudocódigos desses procedimentos encontram-se no Anexo C.

Figura 4.5: Diagrama de blocos do procedimento realizado para caracterização das imagens de nanofibras.

Tabela 4.2: Tabela dos procedimentos manuais e automáticos das metodologias investigadas.

Procedimento	Manual	Automático
Otsu		X
CNN	X	
Limiarização	X	
Filtro τ	X	
Extração de diâmetros		X
Hough	X	

4.6 Considerações finais

Neste capítulo foi apresentada a metodologia proposta para a extração automática de diâmetros. As amostras poliméricas foram geradas usando o processo de *electrospinning* e suas imagens foram adquiridas pelo microscópio eletrônico de varredura. Na etapa seguinte as imagens são processadas pelos algoritmos de segmentação usando o método de Otsu, redes neurais celulares e morfologia matemática. Para a extração de diâmetros, usou-se o processamento morfológico para obter a imagem do eixo medial e assim computar os valores dos diâmetros. Na etapa seguinte, para desconsiderar regiões de entrecruzamento nas imagens, foi incorporada a transformada de Hough à metodologia, para

obtenção de um histograma isento da influência de diâmetros calculados erroneamente. No capítulo seguinte serão explanados os resultados experimentais obtidos a partir dos algoritmos investigados na tese.

5 Resultados Experimentais

Este capítulo apresenta e discute os resultados obtidos a partir dos algoritmos investigados na tese e compara-os aos resultados obtidos de outro algoritmo de segmentação escolhido da literatura. Particularmente, os resultados obtidos com o processamento usado pela rede neural celular e aqueles obtidos com o processamento morfológico são comparados aos resultados da segmentação por limiarização de Otsu. O método de Otsu foi escolhido dentre os demais disponíveis na literatura por ser um método simples e eficiente (WEI, 2008), e amplamente utilizado em tarefas de limiarização automática nas mais diversas aplicações tais como, segmentação de documentos, segmentação para imagens em tempo real e limiarização progressiva adaptativa para segmentação de imagens de endoscopia (TIAN S. K. LAM, 2003). São avaliadas também as vantagens e limitações das metodologias, suas contribuições e importância para caracterização de imagens de nanofibras.

As medidas quantitativas para avaliação do desempenho dos algoritmos são apresentadas em tabelas dispostas nas seções seguintes. Para eliminar regiões de entrecruzamento e amenizar os efeitos das regiões de sobreposição de nanofibras, utilizou-se a transformada de Hough, para a redução dos problemas com o processamento das imagens de nanofibras. As imagens resultantes deste processamento e aquelas obtidas sem a incorporação da transformada de Hough são discutidas através da comparação de seus histogramas.

Neste capítulo de resultados são apresentadas apenas amostras com imagens exemplo mais relevantes. As demais imagens processadas pelos algoritmos investigadas na tese encontram-se no Anexo B. A distribuição de diâmetros obtida para cada metodologia é comparada àquela da metodologia padrão-ouro e os limites de concordância de 95% entre

os métodos são avaliados através da abordagem de Bland e Altman.

5.1 Resultados e discussões

Nas seções seguintes serão apresentados os conjuntos de imagens de nanofibras, processadas pelas metodologias propostas, que apresentam ou não interseções de nanofibras. As imagens processadas pelos algoritmos de segmentação usando limiarização por Otsu, redes neurais celulares e processamento morfológico estão nas Figuras 5.3, 5.7, 5.4 e 5.8. A fim de detalhar o processamento morfológico, na Figura 5.1 é ilustrado apenas o efeito da limiarização simples. O valor de limiar para obter a imagem binária foi de 75. Como podemos observar, o processamento detecta como objeto sinais espúrios, ou ruído, que não correspondem às nanofibras, devido à limiarização grosseira aplicada à imagem original. Com o filtro τ -abertura é possível eliminar áreas na imagem (ou agregados de *pixels*) menores que um determinado valor. Através de um valor de limiar adequado para o filtro τ -abertura é possível suprimir essas áreas ruidosas e preservar áreas de nanofibras, como mostram as Figuras 5.4(b) e 5.8(b).

Figura 5.1: Versão limiarizada da imagem da Figura 5.2(b).

5.2 Resultados para nanofibras sem regiões de entrecruzamento

Nesta seção serão apresentados os conjuntos das imagens processadas pelas metodologias investigadas na tese, particularmente para imagens sem interseções de nanofibras. As Figuras 5.2(a) e 5.2(b) mostram dois exemplos de imagens SEM de nanofibras. Os valores normalizados de limiarização de Otsu encontrados para essas imagens foram de 0,43137 e 0,36863, respectivamente. As equações usadas para obter a imagem segmentada por CNN foram as equações 4.2 e 4.3. Os valores de limiarização para a obtenção das imagens binárias foram, respectivamente, 80 e 75. Com respeito ao processamento morfológico, os valores de limiarização para o filtro τ -abertura para essas imagens foram, respectivamente, 100 e 250; ou seja, agregados de pixels abaixo desses valores, respectivamente, foram suprimidos dessas imagens. As imagens resultantes deste processamento estão ilustradas nas Figuras 5.4(b) e 5.8(b). O aumento de cada uma dessas imagens é de 10000 vezes para propósito de visualização. Outra imagem que foi submetida ao mesmo processamento, apresentado nesta seção, está ilustrada na Figura B.1(a) e seus conjuntos de imagens processadas encontram-se nas Figuras B.1 e B.2 no Anexo B.

Figura 5.2: Imagens originais (a) Nanoc013 e (b) Nanoc008.

5.2.1 Resultados para a imagem da Figura 5.2(a)

Nesta seção são apresentados os conjuntos das imagens processados pelas metodologias para a imagem da Figura 5.2(a). Para esta imagem o processamento pelo método de Otsu

não foi eficiente, o que pode ser constatado pelos resultados das medidas de avaliação dos algoritmos na Tabela 5.1 e pelo conjunto de imagens da Figura 5.3. O valor da medida M_I revelou-se maior para a segmentação por Otsu, com relação aos demais métodos, indicando um número maior de *pixels* mal classificados. A medida ND , ao contrário da medida M_I , leva em consideração a informação espacial do *pixel* mal classificado. Seu valor maior com relação aos demais métodos, igual a $1,19 \times 10^7$, evidencia a perda de partes das nanofibras resultantes deste processamento.

Por outro lado, os resultados obtidos pelos processamentos CNN e morfológico foram melhores, como pode ser constatado pelas imagens resultantes nas Figuras 5.4(a) e (b), o que também foi revelado nos valores resultantes das medidas M_I e ND . Quando o valor da medida RAE é alto, isto indica que a imagem processada pelo algoritmo considerado não se adequa bem à imagem de referência. Como esperado, esse valor é alto para o processamento por Otsu e menor para os processamentos pela CNN e por morfologia, $1,19 \times 10^7$, $2,18 \times 10^6$ e $3,15 \times 10^6$, respectivamente.

Tabela 5.1: Resultados das medidas de avaliação dos algoritmos de segmentação de Otsu, CNN e Morfologia.

Imagens	Medidas	Otsu	CNN	Morf.
Nanoc013	M_I	1,72	0,10	0,09
	ND	1,19E+07	2,18E+06	3,15E+06
	RAE	0,1423	0,0083	0,0072
	SNR	19,47	41,31	42,34
Nanoc008	M_I	1,01	0,06	0,08
	ND	8,07E+06	2,95E+06	4,68E+05
	RAE	0,1147	0,0064	0,0091
	SNR	21,30	38,12	45,89

A medida SNR apresentou-se melhor para a imagem processada por morfologia, revelando que este processamento suprime o ruído *shot* presente nas imagens SEM. A razão sinal-ruído para a imagem processada pela CNN foi menor que àquela obtida por processamento morfológico, indicando que o processamento não foi tão eficaz para a redução do ruído *shot*, como mostra a imagem segmentada na Figura 5.4(b). O processo de esqueletonização desta imagem encontra-se na Figura 5.4(c) e revela a presença de ruído

remanescente do processo de segmentação. A influência desse ruído pode ser constatada também pela incidência de diâmetros de valores pequenos, abaixo de 50nm, no histograma da Figura 5.4(d). Por outro lado, a CNN preservou bem os *pixels* correspondentes às nanofibras, indicados também pelos valores obtidos pelas medidas de avaliação, M_I e ND .

Figura 5.3: Imagem processada pelo algoritmo de Otsu: (a) imagem segmentada (b) imagem esqueleto e (c) seu respectivo histograma.

Para cada algoritmo de segmentação, extraiu-se os valores dos diâmetros usando o processamento morfológico detalhado na Seção 4.3, e seus resultados são ilustrados nas Figuras 5.3(c) e 5.4(d) e (f). A fim de comparar os valores obtidos pelo algoritmo de extração de diâmetros adicionado a cada metodologia de segmentação investigada, foram extraídos 100 valores de diâmetros nas imagens usando o Photoshop e adotou-se tais resultados como sendo padrão ouro. Os resultados obtidos pelo Photoshop foram usados para avaliar o desempenho do algoritmo de extração de diâmetros e a distribuição de

Figura 5.4: Imagens processadas pelos algoritmos de segmentação: (a) CNN (b) Morfologia, suas respectivas esqueletonizações em (c) e (e) e seus respectivos histogramas em (d) e (f).

diâmetros manualmente obtidos é mostrada na Figura 5.5. A média de diâmetros bem como o valor mais frequente para a amostra obtida pelo Photoshop foi em torno de $406nm$.

Figura 5.5: Histograma de diâmetros para as medidas extraídas pelo Photoshop.

Dentre os histogramas obtidos para imagens processadas por cada algoritmo de segmentação, dois diferentes parâmetros foram definidos: a frequência máxima e o seu respectivo diâmetro. O eixo das ordenadas refere-se às frequências com que os diâmetros ocorrem nas nanofibras avaliadas em cada imagem. O histograma resultante do processamento pelo método de Otsu e o algoritmo de extração de diâmetros, na Figura 5.3(c), nos mostra uma distribuição aproximadamente unimodal, cujo valor mais frequente é de $15nm$. No entanto, constata-se pelo histograma na Figura 5.5 que este valor não condiz com o valor médio e o mais frequente daqueles obtidos manualmente, ou seja, pelo método padrão ouro. Este resultado era esperado, já que o método de Otsu não apresentou bom desempenho, como revelado pelas medidas de avaliação, comprometendo assim todo o processamento posterior para extração de diâmetros. Devido ao resultado obtido pelo método de Otsu, a análise de concordância entre este método e o método padrão não foi realizada.

Observa-se por outro lado que o histograma resultante da imagem processada pela CNN é bimodal e apresenta valores mais frequentes em torno de $15nm$ e $405nm$, como mostra a Figura 5.4(d). Como discutido anteriormente, o processamento CNN deixou

ruído remanescente refletindo-se, assim, na presença de diâmetros pequenos no histograma resultante. Com respeito à outra moda de $405nm$, esta é bem próxima do valor de diâmetro mais frequente daquele da amostra manual, $406nm$, indicando que o histograma resultante, quando desconsideramos seus valores mais extremos, revela que o processamento da rede para segmentação e o processamento morfológico para extração dos valores dos diâmetros das nanofibras comportam-se tão bem quanto o Photoshop.

A dispersão das médias das medidas entre os dois métodos versus a diferença das medidas está ilustrada na Figura 5.6(a). A esse gráfico, bem como nos demais que serão avaliados a seguir, adicionou-se os limites de 95% de concordância entre os métodos e a diferença média entre métodos. A média das diferenças encontrada está em torno de $-12nm$ com limites de concordância entre $-28,9nm$ e $4,95nm$. A Figura 5.6(b) mostra um histograma das diferenças entre os métodos pela frequência em que elas aparecem nas amostras. O histograma das diferenças na Figura 5.6(b) foi utilizado para revelar o tamanho das amostras consideradas, no caso 100 exemplares, já que ao visualizar o gráfico da dispersão na Figura 5.6(a) vê-se apenas 23 diferenças representadas pelos asteriscos. No gráfico da dispersão espera-se que 95% dos indivíduos estejam entre os limites de concordância, para que o algoritmo proposto possa ser usado no lugar do método padrão. Na Figura 5.6(a) tem-se que 96% das amostras estão entre os limites de concordância. Pode-se constatar também pelo histograma da Figura 5.6(b) que o total de amostras com diferenças abaixo de $-28,9nm$, ou seja abaixo do limite de concordância inferior como mostra a Figura 5.6(a), foi de 4 amostras. Dessa forma, a avaliação através dos limites de concordância revela que o algoritmo investigado pode ser usado para extração de diâmetros em imagens SEM.

O histograma resultante do processamento morfológico tem um intervalo de valores mais frequentes de diâmetros em torno de $345nm$ e $405nm$, valores próximos àqueles encontrados pela metodologia padrão, como ilustrado na Figura 5.4(f). O processamento morfológico foi mais eficiente na suavização do ruído *shot* na imagem, por essa razão existe uma menor incidência de diâmetros pequenos no histograma. Isto pode ser consta-

Figura 5.6: Análise de concordância para a imagem da Figura 5.2(a) entre os métodos padrão e (a) CNN e (b) seu respectivo histograma das diferenças e (c) morfologia e (d) seu respectivo histograma das diferenças.

tado também pelo pequeno número de sinais espúrios detectados na imagem do esqueleto ilustrado na Figura 5.4(e). A razão para esta incidência de diâmetros pequenos, detectados pelo algoritmo morfológico para a extração de diâmetros, se deve também a pequenas variações nas bordas das imagens segmentadas (aspecto serrilhado).

A avaliação de concordância entre os métodos é mostrada na Figura 5.6(c) e (d). O gráfico da dispersão da média de medidas entre os métodos pela diferença entre as medidas está ilustrado na Figura 5.6(c) e revela que a média das diferenças está em torno de $-2,33nm$ com limites de concordância entre $-70,4nm$ e $65,7nm$. Como podemos constatar no histograma da Figura 5.6(d) e no gráfico da dispersão da Figura 5.6(c), 6% das amostras apresentaram diferenças acima do limite de concordância superior. Isto revela que o processamento morfológico não apresenta tão boa concordância com o método padrão ouro quanto CNN.

5.2.2 Resultados para a imagem da Figura 5.2(b)

Os resultados dos algoritmos de segmentação para a imagem da Figura 5.2(b) encontram-se nas Figuras 5.7 e 5.8. A distribuição dos diâmetros obtida pelo método padrão ouro é ilustrada na Figura 5.9. O valor médio de diâmetros para essa amostra foi em torno de $452nm$ e o valor mais frequente foi de $465nm$.

Constatando visualmente e como revelado pelos resultados das medidas de avaliação na Tabela 5.1, o algoritmo de Otsu não foi efetivo na redução do ruído *shot*. As medidas M_I e ND exibem valores de discrepância elevados revelando assim um maior número de *pixels* mal classificados com relação aos demais algoritmos. Devido a má segmentação dos *pixels* espera-se também que a imagem resultante não se assemelhe com a imagem de referência, como podemos constatar pelas medidas RAE e SNR . Os algoritmos de segmentação usando CNN e morfologia apresentaram melhor desempenho pois preservaram mais detalhes das nanofibras, sendo mais efetivos na suavização do ruído, como constatado pelas medidas mostradas na Tabela 5.1.

A maior ocorrência de valores de diâmetros da abordagem usando Otsu está em torno

Figura 5.7: Imagem processada pelo algoritmo de Otsu: (a) imagem segmentada (b) imagem esqueleto e (c) seu respectivo histograma.

Figura 5.8: Imagens processadas pelos algoritmos de segmentação: (a) CNN e (b) Morfologia, suas respectivas imagens de esqueleto em (c) e (e) e seus respectivos histogramas em (d) e (f).

Figura 5.9: Histograma de diâmetros para as medidas extraídas pelo Photoshop.

de $15nm$ a $300nm$. No entanto, o intervalo de valores de diâmetros do método padrão ouro está entre $380nm$ e $520nm$, cujos valores médio e mais frequente são, respectivamente, $452nm$ e $465nm$, revelando assim o baixo desempenho da segmentação obtida por esta abordagem. Devido a esse resultado a avaliação de concordância entre o método de Otsu e o método padrão não foi realizada.

Em contrapartida, o processamento pela CNN revelou como diâmetro mais frequente um valor de $465nm$ em um histograma aproximadamente unimodal, com uma incidência maior de diâmetros no intervalo de $300nm$ à $600nm$, valores próximos àqueles obtidos pela metodologia padrão mostrados no histograma da Figura 5.9.

A avaliação de concordância entre os métodos é mostrada na Figura 5.10(a) e (b). O gráfico da dispersão da média de medidas entre os métodos pela diferença entre as medidas está ilustrado na Figura 5.6(a) e revela que a média das diferenças está em torno de $-0,65nm$ e limites de concordância entre $-22,5nm$ e $21,2nm$, assim espera-se que 95% das médias das medidas estejam neste intervalo. Constata-se pelo histograma das diferenças, na Figura 5.10(b), que o número de amostras abaixo do limite inferior é de 2 e o número de amostras acima do limite superior é de 3, totalizando 5% de amostras que excedem os limites de concordância entre os métodos. Concluímos portanto que houve uma boa concordância entre os métodos para extração de diâmetros.

Figura 5.10: Análise de concordância para a imagem da Figura 5.2(b) entre os métodos padrão e (a) CNN e (b) seu respectivo histograma das diferenças e (c) morfologia e (d) seu respectivo histograma das diferenças.

Para a abordagem morfológica, os resultados da imagem segmentada, a imagem do esqueleto e seu histograma encontram-se nas Figuras 5.8 (b),(e) e (f), respectivamente. O histograma apresenta maior incidência de valores de diâmetros no intervalo de $300nm$ à $600nm$, como foi encontrado na abordagem usando CNN e na amostra de diâmetros obtida pelo método padrão ouro. O bom desempenho da abordagem puramente morfológica, para segmentação e extração de diâmetros, foi também explorado e discutido em Calíope, Hernandez e Silva (2008), Verdonck et al. (2006), Calíope et al. (2005).

A análise de concordância entre a abordagem morfológica e o método padrão está ilustrada na Figura 5.10(c) e o histograma das diferenças entre métodos na Figura 5.10(d). A média das diferenças encontrada para este caso foi de $-9,258nm$ e os limites de concordância são de $-26,39nm$ e $7,8722nm$. Observa-se pelas Figuras 5.10(c) e (d) que 98% das médias das medidas encontram-se dentro destes limites evidenciando a boa concordância entre os métodos. Conclui-se, portanto, que a abordagem CNN e abordagem morfológica podem substituir a metodologia padrão ouro.

5.3 Resultados para nanofibras com regiões de entrecruzamento

As imagens mostradas a seguir apresentam regiões de entrecruzamento e a influência dessas regiões nos histogramas resultantes será discutida e resolvida incorporando-se a transformada de Hough após a extração do esqueleto das imagens. As Figuras 5.11(a) e 5.11(b) mostram dois exemplos de imagens SEM de nanofibras com regiões de entrecruzamento. As imagens processadas pelos algoritmos de segmentação usando limiarização por Otsu, redes neurais celulares e processamento morfológico estão nas Figuras 5.12, 5.17, 5.14(a), 5.19(a), 5.15(a), 5.20(a), respectivamente. Os valores normalizados de limiarização de Otsu encontrados para essas imagens foram de 0,42353 e 0,35294, respectivamente. As equações usadas para obter a imagem segmentada pela abordagem CNN foram as equações 4.2 e 4.3. Com respeito ao processamento morfológico, os valores de limiarização para a obtenção das imagens binárias foram, respectivamente, 70 e 75. Para redução do ruído

nas imagens usando a abordagem morfológica foram usados valores de limiarização para o filtro τ -abertura de 100 e 50, respectivamente. O aumento de cada uma dessas imagens é de 20000 e 10000 vezes, respectivamente, para propósito de visualização.

Figura 5.11: Imagens originais (a) Nanod003 e (b) Nanoc014.

5.3.1 Resultados para a imagem da Figura 5.11(a)

Das medidas de avaliação dos algoritmos de segmentação disponíveis na Tabela 5.2, constata-se que o desempenho do algoritmo de Otsu foi inferior aos demais investigados. Isto revela-se também nas imagens obtidas pelo método de Otsu apresentadas na Figura 5.12(a) e pelos valores elevados das medidas de discrepância M_I e ND , permitindo concluir que essa abordagem é a que fornece uma imagem resultante com um número maior de *pixels* mal classificados. Por outro lado, as abordagens CNN e morfológica apresentaram melhor reconstituição das suas respectivas imagens segmentadas de referência, como mostram as medidas RAE e SNR na Tabela 5.2.

O histograma da imagem apresentada na Figura 5.12(a) está mostrado na Figura 5.12(c), sendo que o valor de diâmetro mais frequente está em torno de $175nm$. No entanto, o procedimento contabiliza um grande número de diâmetros que não correspondem aos valores de diâmetros das nanofibras, resultantes dos *pixels* mal classificados na segmentação e detectados pelo processo de esqueletonização, como ilustrado na Figura 5.12(b). Isto pode ser constatado comparando-se o histograma da Figura 5.12(a) e aquele obtido pelo método padrão ouro na Figura 5.13. O valor médio para a amostra

Tabela 5.2: Resultados das medidas de avaliação dos algoritmos de segmentação de Otsu, CNN e Morfologia.

Imagens	Medidas	Otsu	CNN	Morf.
Nanod003	M_I	0,68	2,65E-03	0,05
	ND	5,84E+06	1,46E+06	1,52E+06
	RAE	9,92E-02	3,87E-04	7,26E-03
	SNR	23,11	42,92	39,56
Nanoc014	M_I	1,81	0,01	0,12
	ND	1,16E+07	6,59E+05	1,02E+06
	RAE	7,83E-02	2,68E-04	5,02E-03
	SNR	25,47	74,41	50,54

de diâmetros do método padrão ouro foi em torno de $211nm$ e o valor mais frequente, $190nm$. O intervalo de valores de diâmetros para a amostra obtida pelo Photoshop está entre $160nm$ a $260nm$. Todavia a maior incidência de valores de diâmetros para o método de Otsu encontra-se em torno de $15nm$ e $200nm$. Apesar do valor mais frequente no método de Otsu, em torno de $175nm$, ser próximo àquele da amostra padrão ouro, $190nm$, o histograma de diâmetros para essa amostra não apresenta valores de diâmetros abaixo de $160nm$ como aqueles encontrados no histograma obtido por Otsu. A má segmentação obtida pelo método de Otsu compromete o procedimento de extração de diâmetros, razão pela qual a análise de concordância entre este método e o método padrão não foi realizada.

Para a abordagem CNN e morfológica, os valores mais baixos das medidas M_I , ND e RAE na Tabela 5.2 mostram uma melhor classificação de *pixels* para esses procedimentos, indicando uma melhor preservação das nanofibras e suavização do ruído presente nessas imagens. O melhor desempenho destes procedimentos também é constatado pelos valores mais altos da razão sinal-ruído. Particularmente, a abordagem CNN apresentou desempenho superior a abordagem morfológica e ao método de Otsu com relação às medidas quantitativas. Resultados e discussões similares da abordagem CNN para segmentação das imagens de nanofibras foram abordadas em Calíope, Hernandez e Silva (2009).

A Figura 5.14 mostra os resultados obtidos para a imagem da Figura 5.11(a) usando a abordagem CNN. Na Figura 5.14(b) tem-se a imagem do esqueleto sem o processamento pela transformada de Hough e seu respectivo histograma na Figura 5.14(c). A TH foi

Figura 5.12: Imagem processada pelo algoritmo de Otsu: (a) imagem segmentada (b) imagem esqueleto e (c) seu respectivo histograma.

Figura 5.13: Histograma de diâmetros para as medidas extraídas pelo Photoshop para a imagem da Figura 5.11(a)

usada para detecção das retas do esqueleto, excluindo aquelas correspondentes às regiões de entrecruzamento e sinais espúrios advindos dos algoritmos de segmentação. A imagem resultante do uso da TH está na Figura 5.14(d) e seu respectivo histograma na Figura 5.14(e). As imagens dos esqueletos nas Figuras 5.14 (b) e (d) foram dilatadas para uma melhor visualização da detecção das retas e dos sinais espúrios.

A TH aplicada à imagem do esqueleto não detectou todas as retas que resultariam em uma boa extração de diâmetros, ou seja, além das retas que se desejava excluir correspondente à região de intersecção de fibras, o melhor processamento obtido pela TH não detectou algumas retas correspondentes às áreas sem regiões de entrecruzamento. Isto aconteceu devido a inclinação dessas retas coincidirem com aquelas das regiões de intersecção ou àquelas correspondentes aos sinais espúrios. Se o objetivo da aplicação é obter uma maior e melhor detecção do esqueleto desconsiderando regiões problemáticas, o uso da TH não apresentou desempenho tão bom para esta imagem. Comparando os histogramas resultantes do processamento com e sem a incorporação da TH, observa-se uma redução da variação de diâmetros detectados. Esse resultado era esperado já que a tendência do processamento nessas regiões é superestimar os valores dos diâmetros. O tempo de processamento da transformada de Hough para a detecção de retas é de 1 min, em média, dependendo do número de retas que se deseja detectar. Resultados similares a outros exemplares de imagens são encontrados nas Figuras B.5, B.9, B.13 e B.17 no Anexo B.

Para a abordagem morfológica os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.15. O histograma obtido a partir da imagem do esqueleto na Figura 5.15(b) sem a incorporação da TH encontra-se na Figura 5.15(c). Por sua vez, o histograma resultante do processamento morfológico com o uso da TH da imagem na Figura 5.15(d) está apresentado na Figura 5.15(e). Das medidas de avaliação dos algoritmos de segmentação, viu-se que o desempenho da abordagem morfológica foi semelhante àquele obtido pela abordagem CNN. Dessa forma espera-se que o procedimento de extração de diâmetros para as duas abordagens sejam semelhantes também, bem como os histogramas de diâmetros. Comparando

Figura 5.14: Imagem processada pelos algoritmo de segmentação CNN e transformada de Hough: (a) imagem segmentada resultante (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto processada pela transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

os histogramas das duas abordagens sem o uso da TH, nas Figuras 5.14(c) e 5.15(c), observa-se que o intervalo de valores de diâmetros mais frequentes são semelhantes, de $15nm$ a $350nm$ e $15nm$ a $450nm$, respectivamente. As diferenças ocorrem nos valores mais extremos das distribuições dos diâmetros. O aspecto serrilhado detectado no processo de segmentação pela abordagem morfológica confere à distribuição de diâmetros resultante um maior número de diâmetros abaixo de $160nm$, resultantes dos sinais detectados na esqueletonização, quando comparado ao histograma da abordagem CNN. Por outro lado, os histogramas resultantes da adição da TH nas duas abordagens, nas Figuras 5.14(e) e 5.15(e), reduzem consideravelmente essas diferenças já que a TH desconsidera os sinais espúrios remanescentes da segmentação morfológica e desconsidera igualmente a região de entrecruzamento para as duas abordagens. Resultados similares do processamento puramente morfológico a outros exemplares de imagens são encontrados nas Figuras B.6, B.10, B.14 e B.18 no Anexo B.

A avaliação de concordância entre a metodologia padrão e a abordagem usando CNN é mostrada na Figura 5.16(a) e (b). O gráfico da dispersão da média de medidas entre os métodos pela diferença entre as medidas está ilustrado na Figura 5.16(a) e revela que a média das diferenças está em torno de $-0,462nm$ e limites de concordância entre $-22,27nm$ e $21,35nm$, assim espera-se que 95% das médias das medidas estejam neste intervalo. O histograma da diferença, na Figura 5.16(b), mostra que o número de amostras que excedem estes limites é de 2%, mostrando boa concordância entre métodos. A análise de concordância entre a abordagem morfológica e o método padrão está ilustrado na Figura 5.16(c) e o histograma das diferenças entre métodos na Figura 5.10(d). A média das diferenças encontrada para este caso foi de $-2,033nm$ e os limites de concordância são de $-11,6nm$ e $7,53nm$. Ao observar o histograma das diferenças entre métodos pela frequência com que elas ocorrem entre as amostras, atesta-se que 97% das médias das medidas encontram-se dentro dos limites de concordância. Conclui-se, portanto, que as abordagens CNN e morfológica podem substituir a técnica comumente utilizada, já que mais de 95% das diferenças entre cada uma das abordagens e a metodologia padrão encontraram-se dentro dos limites de concordância.

Figura 5.15: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológica e transformada de Hough: (a) imagem segmentada resultante (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto processada pela transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura 5.16: Análise de concordância para a imagem da Figura 5.11(a) entre os métodos padrão e (a) CNN e (b) seu respectivo histograma das diferenças e (c) morfologia e (d) seu respectivo histograma das diferenças.

5.3.2 Resultados para a imagem da Figura 5.11(b)

O conjunto de imagens da Figura 5.17 mostra o processamento resultante do método de Otsu para a imagem da Figura 5.11(b). A imagem da Figura 5.17(a) mostra a imagem segmentada resultante do processamento por Otsu, a Figura 5.17(b) mostra a imagem esqueleto e seu respectivo histograma encontra-se na Figura 5.17(c). O histograma da amostra obtida pelo Photoshop encontra-se na Figura 5.18. O valor médio para a amostra de diâmetros manuais foi em torno de $667nm$ e o valor mais frequente foi em torno de $750nm$. Apesar do método de Otsu contabilizar valores de diâmetros presentes na amostra padrão ouro, a metodologia investigada extraiu um grande número de diâmetros abaixo de $400nm$ que não foram detectados no método padrão ouro. Esses diâmetros excedentes advêm de *pixels* que não correspondem a *pixels* do esqueleto, resultantes da segmentação inadequada da imagem alcançada pelo método. O resultado da segmentação por Otsu compromete o procedimento de extração de diâmetros, particularmente da detecção do esqueleto. Dessa forma, a análise de concordância entre este método e o método padrão não foi realizada.

Na Tabela 5.2, para o conjunto de medidas referentes à imagem da Figura 5.11(b), a baixa capacidade de discriminação de classes presentes na imagem (nanofibra, fundo de cena) pode ser constatada pelos valores superiores das medidas M_I e ND na abordagem por Otsu, com relação às demais abordagens. Por outro lado, observa-se que os resultados obtidos pela abordagem CNN foram melhores (menores) que as demais abordagens, em que os *pixels* da imagem resultante da abordagem CNN se aproximam dos *pixels* da imagem de referência, constatado pelas medidas RAE e SNR .

Os resultados do processamento CNN para a imagem da Figura 5.11(b) encontram-se na Figura 5.19. Na Figura 5.19(a) tem-se a imagem segmentada. A imagem do esqueleto dilatada sem o uso da TH, considerando portanto a esqueletonização nas regiões de entrecruzamento, está na Figura 5.19(b) e seu respectivo histograma na Figura 5.19(c). A versão do resultado da esqueletonização com a adição da TH está ilustrada na Figura 5.19(d) e seu histograma na Figura 5.19(e). Para esta imagem, a TH foi mais eficiente

Figura 5.17: Imagem processada pelo algoritmo de Otsu: (a) imagem segmentada (b) imagem esqueleto e (c) seu respectivo histograma.

Figura 5.18: Histograma de diâmetros para as medidas extraídas pelo Photoshop para a imagem da Figura 5.11(b)

na detecção de retas correspondentes àquelas que se deseja preservar para calcular os valores dos diâmetros e na supressão daquelas correspondentes às regiões de intersecção de nanofibras. Isto fica evidente quando compara-se os histogramas resultantes nas Figuras 5.19(c) e 5.19(e). Observa-se a supressão dos valores mais extremos e a preservação do intervalo de valores de diâmetros mais frequentes. Outros exemplares de imagens que obtiveram resultados semelhantes encontram-se nas Figuras B.3, B.7 e B.15 do Anexo B.

O processamento morfológico da imagem da Figura 5.11(b) está apresentado na Figura 5.20. Na Figura 5.20(a) tem-se a imagem segmentada resultante. A imagem do esqueleto considerando as regiões de entrecruzamento é mostrada na Figura 5.20(b) e seu respectivo histograma na Figura 5.20(c). A versão da imagem do esqueleto com a incorporação da TH é mostrada na Figura 5.20(d) e seu histograma na Figura 5.20(e). Assim como na abordagem CNN, o processamento morfológico com a incorporação da TH promove um estreitamento na distribuição de diâmetros eliminando a influência de diâmetros menores provenientes de sinais ruidosos e de diâmetros maiores advindos das regiões de entrecruzamento. Comparando as abordagens usando TH, nas Figuras 5.19(e) e 5.20(e), observa-se a semelhança dos histogramas no intervalo de diâmetros mais frequentes, excetuando a influência de alguns diâmetros contabilizados na abordagem CNN abaixo de $30nm$, muito abaixo do diâmetro mais frequente da distribuição (em torno de $550nm$ para ambas abordagens), provenientes provavelmente de algum sinal ruidoso. Outros exemplares de imagens que obtiveram resultados semelhantes usando a abordagem morfológica encontram-se nas Figuras B.4, B.8 e B.16 do Anexo B.

Com respeito à análise de concordância, as abordagens desempenharam-se bem assim como para as demais imagens discutidas anteriormente, mostrando a boa concordância das metodologias investigadas e a metodologia padrão. Os resultados estão na Figura 5.21. O gráfico da dispersão da média de medidas entre as metodologias CNN e padrão pela diferença entre as metodologias está ilustrada na Figura 5.21(a), e o respectivo histograma das diferenças entre os métodos é mostrado na Figura 5.21(b). As diferenças entre as medidas tem valor médio igual a $-1,88nm$ e desvio padrão de $11,2nm$. Assim espera-se que

Figura 5.19: Imagem processada pelos algoritmo de segmentação CNN e transformada de Hough: (a) imagem segmentada resultante (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto processada pela transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura 5.20: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológica e transformada de Hough: (a) imagem segmentada resultante (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto processada pela transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

95% das diferenças entre as medidas estejam entre os limites de concordância inferior de $-24,2nm$ e superior de $20,4nm$. De acordo com o histograma das diferenças, vê-se que existe apenas uma diferença entre medidas acima do limite superior, em torno de $25nm$, evidenciando a boa concordância entre os métodos com 99% das diferenças dentro dos limites de 95% de concordância.

Figura 5.21: Análise de concordância para a imagem da Figura 5.11(b) entre os métodos padrão e (a) CNN e (b) seu respectivo histograma das diferenças e (c) morfologia e (d) seu respectivo histograma das diferenças.

A dispersão da média das medidas pela diferença para as metodologias morfológica e padrão é mostrada na Figura 5.21(c) e seu respectivo histograma das diferenças é ilustrado na Figura 5.21(d). O valor médio das diferenças é $-0,397nm$ e desvio padrão de $10,2nm$. Logo os limites de 95% de concordância entre os métodos serão $-20,7nm$ e $19,9nm$. No histograma da diferença na Figura 5.21(d), observa-se que as amostras das diferenças entre

as medidas não excederam os limites de concordância. Portanto, 100% das amostras estão dentro desses limites mostrando boa concordância entre os métodos. Dessa forma, pode-se concluir que as abordagens CNN e morfológicas podem substituir o método padrão.

5.4 Considerações finais

Neste capítulo foram discutidos os resultados dos algoritmos de segmentação, a saber: Otsu, por redes neurais celulares e morfológico. Como constatado pelas medidas de avaliação das metodologias investigadas, o desempenho da abordagem por Otsu foi aquém dos demais. As imagens segmentadas resultantes mostraram uma má classificação dos *pixels*, particularmente dos objetos de interesse, as nanofibras, sugerindo, em investigações futuras, um pré-processamento para redução do ruído *shot* para um melhor desempenho deste algoritmo. Por outro lado as abordagens usando CNN e morfologia apresentaram medidas próximas àquelas obtidas pelo método padrão Photoshop, como constatado pelos limites de 95% de concordância entre os métodos. A inserção da transformada de Hough no processamento das imagens provocou um estreitamento da distribuição dos diâmetros, reduzindo a influência de diâmetros menores provenientes de ruído remanescente da segmentação e de diâmetros maiores mal contabilizados nas regiões de intersecções de nanofibras. O tempo de processamento médio da transformada de Hough é em torno de 1 min, em contraste com as abordagens de segmentação investigadas que duram em torno de 1s, o que pode ser inviável para certas aplicações. Dependendo das finalidades das aplicações caberá ao especialista que fará uso do método, a escolha entre a precisão de extração de diâmetros com um custo computacional maior ou uma distribuição de diâmetros aproximada daquela fornecida pela método padrão, desconsiderando seus valores mais extremos.

6 Conclusão

Esta tese propõe uma metodologia para extração automática de diâmetros de nanofibras e realizou uma análise comparativa entre técnicas de segmentação aplicadas às imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura obtidas de amostras de silício contendo diferentes nanofibras poliméricas. A análise mostrou que a metodologia é válida e que pode produzir informações importantes para diferentes aplicações. No entanto, a confiabilidade do algoritmo diminui à medida que realiza extração de medidas em imagens cujo emaranhado de nanofibras é considerável, o que pode acarretar erros durante a etapa de segmentação dessas imagens.

6.1 Conclusões gerais

As principais conclusões resultantes neste trabalho são:

1. Na extração de diâmetros de nanofibras através de uma metodologia padrão como o *software* Adobe Photoshop, apenas uma pequena amostra de diâmetros é contabilizada, requerendo precisão e causando fadiga do operador após prolongado uso do microscópio demandando portanto muito tempo para gerar os resultados. Para contornar estes problemas uma metodologia automática para extração dos diâmetros é imprescindível.
2. A segmentação por Otsu não apresentou bons resultados, conforme comprova o Capítulo 5, classificando erroneamente no seu processamento *pixels* de fundo da cena como sendo de nanofibras. Para um melhor desempenho desta abordagem

faz-se necessário um pré-processamento para suavização do ruído, de modo que não comprometa a etapa de extração de diâmetros.

3. O uso combinado de redes neurais celulares para segmentação e processamento morfológico para extração de diâmetros apresentou desempenho satisfatório e constitui uma alternativa eficiente e automática para a extração de diâmetros ao longo das nanofibras em comparação com as técnicas semi-automáticas atuais. A distribuição de diâmetros obtida apresentou um intervalo de diâmetros próximo àquele da distribuição de diâmetros manuais. Para algumas imagens a CNN não suavizou totalmente o ruído presente nessas imagens requerendo a necessidade de *templates* mais robustos, que constitui o grande desafio dessa arquitetura para processamento de imagens. Apesar dessa resposta, a abordagem mostrou boa concordância com o método padrão Photoshop sugerindo que a mesma pode substituir a metodologia padrão para mensuração de diâmetros em imagens SEM, como respaldado nas Seções 5.2 e 5.3.
4. A abordagem puramente morfológica para segmentação e extração de diâmetros proporciona uma excelente conjugação de precisão, tempo de processamento e repetibilidade da tarefa. O bom desempenho dessa abordagem pode ser constatado pelas medidas de avaliação dos algoritmos e pelos limites de concordância de 95% entre ela e a metodologia padrão, conforme comprova as Seções 5.2 e 5.3. Os histogramas resultantes, assim como na abordagem CNN, apresentaram valores similares àqueles da amostra da metodologia padrão. A boa concordância com o método padrão Photoshop sugere o uso de um ou de outro para mensuração de diâmetros em imagens SEM.
5. O uso combinado da metodologia com a transformada de Hough aumenta o custo computacional mas, em contrapartida, resulta numa distribuição de diâmetros isenta de diâmetros advindos de sinais ruidosos e de regiões de intersecções de nanofibras. Os histogramas resultantes e similares das abordagens CNN e morfológica com a adição da transformada de Hough evidenciam também o bom desempenho dos al-

goritmos de segmentação.

6. A extração de características realizadas pelo especialista assim como uma segmentação ineficiente efetuada pelo algoritmo podem alterar as dimensões reais das nanoestruturas. Este procedimento compromete o diagnóstico e a interpretação das imagens.
7. A precisão do processo de segmentação e da extração de características das nanofibras é essencial para o desenvolvimento de sistemas reprodutíveis e precisos. O conhecimento do especialista é indispensável em sistemas de caracterização de imagens de nanofibras, quer seja no ajuste dos parâmetros do microscópio eletrônico ou no processo de busca e aquisição de imagens. Por essa razão não se espera substituir especialistas por sistemas automáticos de caracterização de imagens SEM, e sim utilizar esses sistemas como ferramentas de auxílio para redução de volume e complexidade do trabalho dos mesmos.

6.2 Contribuições futuras

Os temas abordados neste trabalho representam conhecimentos necessários para a concepção, avaliação e implementação de uma metodologia automática para extração de diâmetros em imagens de nanofibras. Concomitantemente, constantes investigações nos aspectos de processamento de imagens, redes neurais celulares e conhecimentos afins são importantes para a otimização e incorporação da metodologia sugerida para caracterização de imagens à sistemas de microscopia.

Outras recomendações decorrentes deste trabalho referem-se a:

1. Realização de novas pesquisas para a implementação de filtros CNN, já que este não era o foco do trabalho, particularmente aqueles voltados para supressão de ruído *shot*, para melhoria da qualidade das imagens e de seus processamentos subsequentes, tais como segmentação e extração de medidas.

2. Estudar a aplicação do algoritmo proposto para caracterização de outras imagens de microscopia eletrônica, com vistas à automatização da extração de medidas.
3. Investigar o aprofundamento da discretização do espaço de Hough para melhoria da detecção de retas e redução de tempo de processamento.
4. A análise Bland Altman não é um teste estatístico e sim uma técnica usada para acessar a concordância entre dois métodos. Dessa forma, como investigação futura faz-se necessário estudar a análise ANOVA para obter diferenças entre médias amostrais e identificar pares de médias que são significativamente diferentes (FREUND; LIVERMORE; MILLER, 1960).
5. Embora uma investigação inicial da máscara para redes neurais celulares, introduzida por Chua e Yang (1988b), tenha sido reproduzida neste trabalho, vale como investigação futura avaliar o desempenho da rede com o uso de outras máscaras visando melhores resultados de segmentação de imagens de nanofibras.

Referências

- ALVARENGA, A. V. Aplicação de operadores morfológicos na segmentação e determinação do contorno de tumores de mama em imagens por ultra-som. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 9, p. 91–101, 2003.
- AMEROM, J. F. V.; KELLENBERGERB, C. J.; YOO, S.-J.; MACGOWANA, C. K. Automated measurement and classification of pulmonary blood-flow velocity patterns using phase-contrast MRI and correlation analysis. *Magnetic Resonance Imaging*, v. 27, p. 38–47, 2009.
- ARIFIN, A. Z.; ASANO, A. Image segmentation by histogram thresholding using hierarchical cluster analysis. *Pattern Recognition Letters*, v. 27, p. 1515–1521, 2006.
- AYRES, C.; BOWLIN, G. L.; HENDERSON, S. C.; TAYLOR, L.; SHULTZ, J.; ALEXANDER, J.; TELEMECO, T. A.; SIMPSON, D. G. Modulation of anisotropy in electrospun tissue-engineering scaffolds: Analysis of fiber alignment by the fast Fourier transform. *Biomaterials*, v. 27, p. 5524–5534, 2006.
- BADAMI, A. S.; KREKE, M. R.; THOMPSON M, S.; RIFFLE, J. S.; GOLDSTEIN, A. S. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials*, v. 27, p. 596–606, 2006.
- BAKER, S. C.; ATKIN, N.; GUNNING, P. A.; GRANVILLE, N.; WILSON, K.; WILSON, D.; SOUTHGATE, J. Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. *Biomaterials*, v. 27, p. 3136–3146, 2006.
- BAKKER, J.; OLREE, M.; KAATEE, R.; LANGE, E. de; MOONS, K.; BEUTLER, J.; BEEK, F. Renal volume measurements: accuracy and repeatability of US compared with that of MR imaging. *Radiology*, v. 211, p. 623–628, 1999.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Ciência e Tecnologia*, v. 15, p. 13–21, 2005.
- BASHUR, C. A.; A., D. L.; GOLDSTEIN, A. S. Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes. *Biomaterials*, v. 27, p. 5681–5688, 2006.
- BERGADANO, F.; CUTELLO, V. Electrospinning of ultra-thin polymer fibers. *Macromolecular Symposium*, v. 127, p. 141–150, 1998.
- BERGSHOEF, M. M.; VANCISO, G. J. Transparent nanocomposites with ultrathin, electrospun Nylon-4,6 fiber reinforcement. *Advanced materials*, v. 11, p. 1362–1365, 1999.

- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Biochimica Clinica*, v. 1, p. 307–310, 1987.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Applying the right statistics: Analyses of measurement studies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, v. 22, p. 85–93, 2003.
- BURLING, D.; HALLIGAN, S.; TAYLOR, S.; HONEYFIELD, L.; RODDIE, M. CT colonography: automatic measurement of polyp diameter compared with manual assessment d an in-vivo study. *Clinical Radiology*, 2007.
- CALÍOPE, P. B.; HERNANDEZ, E. D. M.; SILVA, A. N. R. da. Digital image analysis to determine diameters distribution of nanofibers. *23rd Symposium on Microelectronics Technology and Devices - SBMicro 2008*, v. 14, p. 477–484, 2008.
- CALÍOPE, P. B.; HERNANDEZ, E. D. M.; SILVA, A. N. R. da. Nanofiber diameter measurement using cellular neural network. Proceedings of the XV Workshop IBERCHIP 2009, v. 2, p. 556–560, 2009.
- CALÍOPE, P. B.; HERNANDEZ, E. D. M.; SILVA, A. N. R. da; VERDONK, P. B. Morphological image processing as a tool to analyze plasma etching of polymeric nanofibers. *20th Symposium on Microelectronics and Technology and Devices- SBMicro 2005*, v. 2005-8, p. 263–269, 2005.
- CHUA, L. O.; YANG, L. Cellular neural networks: Applications. *IEEE Transactions on Circuits and Systems*, v. 35, n. 10, p. 1273 – 1290, 1988.
- CHUA, L. O.; YANG, L. Cellular neural networks: Theory. *IEEE Transactions on Circuits and Systems*, v. 35, n. 10, p. 1257–1272, october 1988.
- CORTEZ-COOPER, J. A. S. M. Y.; TANAKA, H. A new device for automatic measurements of arterial stiffness and ankle-brachial index. *The American Journal of Cardiology*, v. 91, n. 12, p. 1519–1522, 2003.
- COSTA, L. F.; JÚNIOR, R. M. C. *Shape analysis and classification: theory and practice*. Florida: CRC Press, 2001.
- CROUNSE, K. R.; CHUA, L. O. Methods for image processing and pattern formation in cellular neural networks: A tutorial. *IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Fundamental Theory and Applications*, v. 42, n. 10, p. 583–601, outubro 1995.
- DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; TAN, N. C. B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, v. 42, p. 261–272, 2001.
- DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HIRVONEN, J. K. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide)fibers. *Polymer*, v. 42, p. 8163–8170, 2001.
- DING, B.; KIMURA, E.; SATO, T.; FUJITA, S.; SHIRATORI, S. Fabrication of blend biodegradable nanofibrous nonwoven mats via multi-jet electrospinning. *Polymer*, v. 45, p. 1895–1902, 2004.

- DOHLER, F.; MORMANNA, F.; WEBER, B.; ELGER, C. E.; LEHNERTZ, K. A cellular neural network based method for classification of magnetic resonance images: Towards an automated detection of hippocampal sclerosis. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 170, p. 324–331, 2008.
- DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, v. 35, p. 151–160, 1995.
- DOUGHERTY, E. R.; LOTUFO, R. A. *Hands-On Morphological Image Processing*. Washington: Spie Press, 2003.
- EIHO, S.; QIAN, Y. Detection of coronary artery tree using morphological operator. *Computers in Cardiology*, p. 525 – 528, 1997.
- ERTAS, G.; GULÇUR, H. O.; OSMAN, O.; UÇAN, O. N.; TUNACI, M.; DURSUN, M. Breast MR segmentation and lesion detection with cellular neural networks and 3D template matching. *Computers in Biology and Medicine*, v. 38, p. 116–126, 2008.
- FORMHALS, A. Method and apparatus for the production of fibers. *US Patent 2116942*, 1938.
- FREUND, J. E.; LIVERMORE, P. E.; MILLER, I. *Manual of Experimental Statistics*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1960.
- GAOBO, Z. Z. Y. Video object segmentation for head shoulder sequences in the cellular neural networks architecture. *Real Time Imaging*, v. 9, p. 171–178, 2003.
- GEORGAKIS, D.; GEORGAKIS, C. Methodology for establishing a 'gold standard' [for a medical expert system]. *Proceedings of Fifth Annual IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems*, p. 378–382, june 1992.
- GIESEL, F. L.; THOMANN, P. A.; HAHND, H. K.; POLITI, M.; STIELTJES, B.; WEBER, M.-A.; PANTEL, J.; WILKINSON, I.; GRIFFITHS, P. D.; SCHRODER, J.; ESSIG, M. Comparison of manual direct and automated indirect measurement of hippocampus using magnetic resonance imaging. *European Journal of Radiology*, v. 66, p. 268–273, 2008.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. *Processamento de Imagens Digitais*. São Paulo: Edgard Blucher, 1992.
- GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, v. 48, p. 263 – 277, 2000.
- GUPTA, P.; WILKES, G. L. Some investigations on the fiber formation by utilizing a side-by-side bicomponent electrospinning approach. *Polymer*, v. 44, p. 6353–6359, 2003.
- HOHMAN, M. M.; SHIN, M.; RUTLEDGE, G.; BRENNER, M. P. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Physics of Fluids*, v. 13, p. 2201–2220, 2001.
- HOHMAN, M. M.; SHIN, M.; RUTLEDGE, G.; BRENNER, M. P. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physics of Fluids*, v. 13, p. 2221–2236, 2001.
- HOUGH, P. V. C. Method and means for recognizing complex patterns. *US Patent 3*, 1960.

- HUANG, C.-T. L. C.-H. Image enhancement algorithm for hexagonal cellular neural networks. APCCAS 2006. IEEE Asia Pacific Conference on Circuits and Systems, 2006.
- HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, v. 63, p. 2223–2253, 2003.
- JIA, Y.-T.; GONG, J.; GU, X.-H.; KIM, H.-Y.; DONG, J.; SHEN, X.-Y. Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydrate polymers*, v. 67, p. 403–409, 2007.
- KIM, C.; CHO, Y. J.; YUN, W. Y.; NGOC, B. T. N.; YANG, K. S.; CHANG, D. R.; LEE, J. W.; KOJIMA, M.; KIM, Y. A.; ENDO, M. Fabrications and structural characterization of ultra-fine carbon fibres by electrospinning of polymer blends. *Solid State Communications*, v. 142, p. 20–23, 2007.
- KWON, I. K.; KIDOAKI, S.; MATSUDA, T. Electrospun nano to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials*, v. 26, p. 3929–3939, 2004.
- LARRONDO, L.; MANLEY, R. S. J. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, v. 19, p. 909–920, 1981.
- LARRONDO, L.; MANLEY, R. S. J. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. II. Examination of the flow field in an electrically driven jet. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, v. 19, p. 921–932, 1981.
- LARRONDO, L.; MANLEY, R. S. J. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. III. Electrostatic deformation of pendant drop of polymer melt. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, v. 19, p. 933–940, 1981.
- LARSEN, G.; SPRETZ, R.; VELARDE-ORTIZ, R. Use of coaxial gas jackets to stabilize taylor cones of volatile solutions and to induce particle-to-fiber transitions. *Advanced Materials*, v. 16, p. 166–169, 2004.
- LEE, K. H.; KIM, H. Y.; KHIL, M. S.; RA, Y. M.; LEE, D. R. Characterization of nano-structured poly(caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer*, v. 44, p. 1287–1294, 2003.
- LI, D.; XIA, Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? *Advanced Materials*, v. 16, p. 1151–1170, 2004.
- LI, L.; BELLAN, L. M.; CRAIGHEAD, H. G.; FREY, M. W. Formation and properties of nylon-6 and nylon-6/montmorillonite composite nanofibers. *Polymer*, v. 47, p. 6208–6217, 2006.
- LIU, G. J.; QIAO, J. F.; DYMOV, B. P.; GLEESON, J. T. Polystyrene-block-poly (2-cinnamoyl ethyl methacrylate) nanofibres - preparation, characterization, and liquid crystalline properties. *Chemistry - A European Journal*, v. 5, p. 2740–2749, 1999.

- LOSCERTALES, I.; BARRERO, A.; MARQUEZ, M.; SPRETZ, R.; VELARDE-ORTIZ, R.; LARSEN, G. Electrically forced coaxial nanojets for one-step hollow nanofiber design. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, p. 5376–5377, 2004.
- LU, W.; TAN, J.; FLOYD, R. Automated fetal head detection and measurement in ultrasound images by iterative randomized Hough transform. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2005.
- LYMAN, C. H.; NEWBURY, D. E.; GOLDSTEIN, J. I.; WILLIAMS, D. B.; JUNIOR, A. D. R.; ARMSTRONG, J. T.; ECHLIN, P.; FIORI, C. E.; JOY, D. C.; LIFSHIN, E. *Scanning Electron Microscopy, X-ray Microanalysis, and Analytical Electron Microscopy - A Laboratory Workbook*. New York: Plenum Press, 1990.
- MA, P. X.; ZHANG, R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 46, p. 60–72, 1999.
- MACDIARMID, A. G.; JONES, W. E.; NORRIS, I. D.; GAO J. AND JOHNSON, A. T.; PINTO, N. J.; HONE, J.; HAN, B.; KO, F. K.; OKUZAKI, H. Electrostatically-generated nanofibers of electronic polymers. *Synthetic Metals*, v. 119, p. 27–30, 2001.
- MADHUGIRI, S.; DALTON, A.; GUTIERREZ, J.; FERRARIS, J. P.; BALKUS, K. J. Electrospun MEH-PPV/SBA-15 composite nanofibers using a dual syringe method. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, p. 14531–14538, 2003.
- MAGAGNIN, V.; CAIANI, E.; DELFINO, L.; CHAMPLON, C.; CERUTTI, S.; TURIEL, M. Semi-automated analysis of coronary flow doppler images: Validation with manual tracings. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society., 2006.
- MARTIN, C. R. Membrane-based synthesis of nanomaterials. *Chemistry of Materials*, v. 8, p. 1739–1946, 1996.
- MATHERON, G. *Random sets and integral geometry*. New York: John Wiley and Sons, 1975.
- MEDEIROS, F. N. S. de. *Filtragem adaptativa de imagens de radar de abertura sintética utilizando a abordagem maximum a posteriori*. Tese (Doutorado) — Instituto de Física de São Carlos, 1999.
- MENDES, L. T. F. *Instalação e Caracterização do Sistema de Deposição Eletrostática*. São Paulo, SP: Monografia apresentada à Faculdade de Tecnologia de São Paulo, 2004.
- MIDOH, Y.; MIURA, K.; NAKAMAE, K.; FUJIOKA, H. Statistical optimization of canny edge detector for measurement of fine line patterns in SEM image. *Measurement Science and Technology*, v. 16, p. 477–487, 2005.
- NUANSING, W.; NINMUANG, S.; JARERNBOON, W.; MAENSIRI, S.; SERAPHIN, S. Structural characterization and morphology of electrospun TiO₂ nanofibres. *Materials Science and Engineering: B*, v. 131, p. 147–155, 2006.
- ONDARCUHU, T.; JOACHIM, C. Drawing a single nanofibre over hundreds of microns. *Europhysics Letters*, v. 42, p. 215–220, 1998.

- OTSU, N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, v. 9, p. 62–66, 1979.
- PARK, K. E.; JUNG, S. Y.; LEE, S. J.; MIN, B.-M.; PARK, W. H. Image processing with neural networks - a review. *Pattern Recognition*, v. 35, p. 2279–2301, 2002.
- PARK, K. E.; JUNG, S. Y.; LEE, S. J.; MIN, B.-M.; PARK, W. H. Biomimetic nanofibrous scaffolds: Preparation and characterization of chitin/silk fibroin blend nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 38, p. 165–173, 2006.
- POURREZAEI, K. Application of nanotechnology to medicine. Proc. of the 23rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, v. 4, 2001.
- REED, S. J. B. *Electron Microprobe Analysis and Scanning Electron Microscopy in Geology*. New York: Cambridge University Press, 1996.
- RENEKER, D. H.; CHUN, I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, v. 7, p. 216–223, 1996.
- RENEKER, D. H.; YARIN, A. L.; FONG, H.; KOOMBHOGSE, S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymers solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics*, v. 87, p. 4531–4547, 2000.
- SERRA, J. *Image analysis and mathematical morphology*. London: Academic Press, 1982.
- SILVA, A. N. R.; FURLAN, R.; RAMOS, I.; SILVA, M. L. P.; FACHINI, E.; SANTIAGO-AVILES, J. Characterization of electrospinning process using blends of polyacrylonitrile and carbon particles. *Electrochemical Society Proceedings*, v. 2003, p. 284–291, 2003.
- SOILLE, P. *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1999.
- SRINIVASAN, G.; RENEKER, D. H. Structure and morphology of small diameter electrospun aramid fibers. *Polymer International*, v. 36, p. 195–201, 1995.
- SUN, Z.; ZUSSMAN, E.; YARIN, A.; WENDORFF, J.; GREINER, A. Compound coreshell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced Materials*, v. 15, p. 1929–1932, 2003.
- TIAN S. K. LAM, T. S. H. Implementing otsu's thresholding process approximation unit using area-time efficient logarithmic. Proceedings of the 2003 International Symposium on Circuits and Systems, 2003. ISCAS '03., v. 4, p. IV21–IV24, 2003.
- VERDONCK, P. B.; CALÍOPE, P. B.; HERNANDEZ, E. D. M.; SILVA, A. N. R. Plasma etching of electrospun polymeric nanofibres. *Thin Solid Films*, v. 515, p. 831–834, 2006.
- VILARINO, D. L.; CABELLO, D.; PARDO, X. M.; BREA, V. M. Cellular neural networks and active contours: a tool for image segmentation. *Image and Vision Computing*, v. 21, p. 189204, 2003.

- WANG, Y.; RAMOS, I.; SANTIAGO-AVILES, J. Detection of moisture and methanol gas using a single electrospun tin oxide nanofiber. *IEEE Sensors Journal*, v. 7, p. 1347–1348, 2007.
- WEI, F. K. C. Multilevel thresholding algorithm based on particle swarm optimization for image segmentation. 27th Chinese Control Conference, 2008. CCC 2008., p. 348 – 351, 2008.
- WHITESIDES, G. M.; LAIBINIS, P. E. Wet chemical approaches to the characterization of organic-surfaces - self-assembled monolayers, wetting, and the physical organic-chemistry of the solid liquid interface. *Langmuir*, v. 6, p. 87–96, 1990.
- YARIN, A. L.; KOOMBHONGSE, S.; RENEKER, D. Bending instability in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics*, v. 89, p. 3018–3026, 2001.
- YARIN, A. L.; KOOMBHONGSE, S.; RENEKER, D. H. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics*, v. 89, p. 4836–4846, 2001.
- YARIN, A. L.; KOOMBHONGSE, S.; RENEKER, D. H. Synthesis and characterization of micro/nanosopic $\text{Pb}(\text{Zr}_{0.52}\text{Ti}_{0.48})\text{O}_3$ fibers by electrospinning. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, v. 78, p. 1043–1047, 2004.
- ZHANG, W.; HUANG, Z.; YAN, E.; WANG, C.; XIN, Y.; ZHAO, Q.; TONG, Y. Preparation of poly(phenylene vinylene) nanofibers by electrospinning. *Materials Science and Engineering*, v. 443, p. 292–295, 2007.
- ZHANG, Y. J. A survey on evaluation methods for image segmentation. *Pattern Recognition*, v. 39, p. 1335–1346, 1995.

Anexo A – Publicações acadêmicas

As publicações obtidas até o momento foram:

CALÍOPE, P. B.; Hernandez, E. D. M.; Silva, A. N. R.. A New Approach to Electrospun Nanofiber Diameter Measurement using Cellular Neural Network. In: IBERCHIP 2009, 2009, Buenos Aires. Proceedings of the IBERCHIP 2009, 2009.

CALÍOPE, P. B.; Del-Moral-Hernandez, E. ; Silva, A. N. R.. Digital Image Analysis to Determine Diameters Distribution of Nanofibers. In: SBMicro 2008, 2008, Gramado. Proceedings of the SBMicro 2008, 2008.

CALÍOPE, P. B.; Del-Moral-Hernandez, E. ; Silva, A. N. R.. Characterization of Nanofibers by SEM Digital Image Processing. In: SEMINATEC 2008 - Seminário / Workshop sobre Semicondutores; Micro & Nano Tecnologia, 2008, Sao Paulo. Sumários do SEMINATEC 2008 - Seminário / Workshop sobre Semicondutores; Micro & Nano Tecnologia, 2008.

Verdonck, P. B.; CALÍOPE, P. B.; Hernandez, E. D. M.; Silva, A. N. R.. Plasma etching of electrospun polymeric nanofibres. **Thin Solid Films**, v. 515, p. 831-834, 2006.

CALÍOPE, P. B.; Hernandez, E. D. M.; da Silva, A. N. R.; Verdonk, P. B.. **Morphological Image Processing as a Tool to Analyze Plasma Etching of Polymeric Nanofibers**. In: Simpósio Brasileiro de Microeletrônica, 2005, Florianópolis - SC. Proceedings Simpósio Brasileiro de Microeletrônica. Florianópolis: SBMICRO 2005. p. 263-269.

Anexo B – Resultados de aplicação do algoritmo

Neste anexo são apresentados as imagens utilizadas para teste dos algoritmos. No primeiro conjunto de imagens são apresentados os resultados do processamento das imagens de nanofibras sem regiões de entrecruzamento. Em seguida são apresentados os resultados das imagens de nanofibras que apresentam regiões de intersecção, comparando os histogramas resultantes dos algoritmos de segmentação com e sem o uso da transformada de Hough.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura B.1: (a) Imagem original (b) imagem segmentada pelo método de Otsu (c) imagem esqueleto e (d) seu respectivo histograma.

Figura B.2: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação (a) CNN e (b) morfológico (c) imagem do esqueleto para a abordagem CNN e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto para a abordagem morfológica e (e) seu respectivo histograma.

Figura B.3: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.

Figura B.4: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura B.5: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.

Figura B.6: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura B.7: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.

Figura B.8: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura B.9: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.

Figura B.10: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura B.11: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.

Figura B.12: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura B.13: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.

Figura B.14: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura B.15: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.

Figura B.16: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura B.17: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.

Figura B.18: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Figura B.19: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação CNN (a) imagem original (b) imagem segmentada (c) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (d) seu respectivo histograma (e) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (f) seu respectivo histograma.

Figura B.20: Imagem processada pelo algoritmo de segmentação morfológico (a) imagem segmentada (b) imagem do esqueleto sem a transformada de Hough e (c) seu respectivo histograma (d) imagem do esqueleto com a transformada de Hough e (e) seu respectivo histograma.

Anexo C – Algoritmos

Os algoritmos das metodologias investigadas nesta tese foram implementadas no software MatLab versão 7.1. Dessa forma, dada uma imagem de nanofibras em níveis de cinza, o procedimento realizado para a obtenção das imagens segmentadas para essas abordagens foram:

```

Abordagem de Otsu
%-----
%Definição das variáveis
%-----
Imagem original = img;
Imagem segmentada pelo método de Otsu = imgOtsu;
%-----
% Funções para obtenção da imagem segmentada pelo método de Otsu
% graythresh e im2bw são funções disponíveis no MatLab
%-----
limiar = graythresh(img);
imgOtsu = im2bw(I,limiar);
%-----

Abordagem CNN
%-----
%Definição das variáveis
%-----
Imagem original = img;
Imagem de saída = vy;
Estado da célula = vx;
Estado anterior = vxanterior;
%-----
% Normalização (atendendo a condição inicial do estado da célula
%|vxij(0)|<=1)
%-----
img = img - valor mínimo de img;

```

```

img = img/ (valor máximo de img);
img = 2*(img-0.5);
%-----
% Condições iniciais
%-----
vxanterior = img;
vy=(img+.9)-(img-.1));
%-----
% Templates utilizados
%-----
A = [0.25 1 0.25; 1 4 1; 0.25 1 0.25];
B=0;
%-----
% Equação de estado da célula CNN
%-----
% A versão original é a seguinte:
% vx(i,j,n+1) = vx(i,j,n) + a*[-vx(i,j,n) + A*vy(i,j,n)+ B*vu + I(i,j)];
%-----

para n=1:5000 faça
    matrizA = convolução de vy com a máscara A;
    vx = vxanterior + 10^6.*(-vxanterior + matrizA);
%-----
% Verificação das condições de estabilidade
%-----
% As condições de estabilidade, isto é, vx == vxanterior e
% saida(i,j)=1 ou saida(i,j)=-1;
%-----

    [lin,col] = encontrar em vy valores diferentes de 1 e -1 e devolver suas
        coordenadas para lin e col;
    teste = vxanterior-vx;

    se ((teste < 1) e (o número de elementos do vetor lin for igual a 0))
        a rede convergiu;
        exiba a imagem de saída, vy;
    senão
        vxanterior = vx;
        vy = (vxanterior+.9)-(vxanterior-.1);
        exiba a imagem de saída;
        n = n+1;
    fim
fim
%-----

```

Abordagem Morfológica

```
%-----
% Limiarização para a obtenção da imagem binária ( 1 para nanofibra 0 para
% fundo de cena)
% o valor de limiar é constatado visualizando o histograma da imagem original
%-----

para img faça
    se o nível de cinza img é maior que o limiar então
        imglimiar = 1;
    senão
        imglimiar = 0;
    fim
fim

%-----
% Supressão do ruído
% bwareaopen é uma função disponível no MatLab
%-----

imgmorf = bwareaopen(imglimiar,limiarTau);
%-----
```

Extração de diâmetros

```
%-----
% Funções:
% strel - cria um elemento estruturante de uma forma específica
% imerode - retorna a versão erodida da imagem original
% bwmorph, skel - retorna o esqueleto da imagem original
% o parâmetro Inf indica que a operação é repetida até a imagem de saída não
% mudar mais
%-----

ees = strel('disk',1);
imerosao = imerode(img,se);
imbordas = img-imerosao;
imeskel = bwmorph(img,'skel',Inf);

[lin,col] = encontre em imgeskel valores de pixels iguais a 1 e armazene suas
    coordenadas em lin e col;

para i = 1:comprimento de lin
    janela = imbordas([lin(i)-60:lin(i)+60],[col(i)-60:col(i)+60]);
    [lin2,col2] = encontre em janela valores de pixels iguais a 1 e
        armazene suas coordenadas em lin2 e col2;
    distancia = sqrt((60-lin2).^2+(60-col2).^2);
    raio(i) = min(distancia);
fim
```



```

diam = 2*raio-1;
[x,h] = histograma(diam);
%-----

Função para gerar o histograma
%-----

[x,h] = histograma(y);
xmin = min(min(y));
xmax = max(max(y));
xrange = xmax - xmin;

i = 1;
for k = xmin : xmax
    h(i) = length(find(y == k));
    i = i + 1;
end

x = xmin:xmax;
%-----

Detecção do esqueleto por transformada de Hough
%-----
% Funções:hough, houghpeaks, houghlines
% imgresult - é a imagem do esqueleto sem interseções das nanofibras
%-----

[A,T,R] = hough(imeskel,'RhoResolution',1,'ThetaResolution',0.05);

figure;imshow(A,[],'XData',T,'YData',R,'InitialMagnification','fit');
xlabel('\theta'), ylabel('\rho');
axis on, axis normal, hold on;

P = houghpeaks(A,50,'threshold',ceil(0.1*max(H(:))), 'NHoodSize',[33 33]);

lines = houghlines(imeskel,T,R,P,'FillGap',15,'MinLength',20);

imgresult = zeros(size(imeskel));

para k = 1 até tamanho de(lines) faça
    xy = [lines(k).point1; lines(k).point2];
    x1 = xy(1,2);
    y1 = xy(1,1);

```

```
x2 = xy(2,2);
y2 = xy(2,1);
mr = (y1 - y2)/ (x1 - x2);
se x2 > x1
    p = 0.05;
senão
    p = -0.05;
fim

X = x1 : p : x2;
Y = (X - x1)*mr + y1;

para i=1:length(X)
    se round(Y(i))>1e-5
        imgresult(round(X(i)),round(Y(i))) = 1;
    fim
fim

fim

%-----
```

Apêndice A – Intervalos de confiança para média de população

Um intervalo de confiança para a média, μ , de uma população é um intervalo para o qual pode-se afirmar com uma dada probabilidade de conter μ . Se o tamanho da amostra, n , é pequeno e a variância da população, σ^2 , desconhecida, a distribuição t é usada para obter intervalos de confiança para μ ; se n é grande, 30 ou mais, ou se σ^2 é conhecida, a distribuição Normal é considerada (HOUGH, 1960).

Dado $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n$, em que x_i é a i -ésima observação na amostra aleatória dada, o modelo para cada observação é dado por:

$$x_i = \mu + \varepsilon_i, \quad (\text{A.1})$$

para $i = 1, 2, \dots, n$, em que ε_i são componentes de mudança independentes com distribuições Normais idênticas $N(0, \sigma)$.

O intervalo de confiança $1 - \alpha$ para μ é dado por:

$$\bar{x} - t_{\alpha/2} (s/\sqrt{n}) < \mu < \bar{x} + t_{\alpha/2} (s/\sqrt{n}), \quad (\text{A.2})$$

em que $t_{\alpha/2}$ é obtida da tabela de valores de t para $n - 1$ graus de liberdade e a média e a variância da amostra são dadas por:

$$\bar{x} = \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) / n, \quad (\text{A.3})$$

e

$$s^2 = \left(n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \right) / n(n-1). \quad (\text{A.4})$$

Para amostras grandes o intervalo de confiança $1 - \alpha$ para μ é dado por:

$$\bar{x} - z_{\alpha/2} (s/\sqrt{n}) < \mu < \bar{x} + z_{\alpha/2} (s/\sqrt{n}), \quad (\text{A.5})$$

em que $z_{\alpha/2}$ é obtida da tabela da distribuição Normal.

Apêndice B – Intervalos de confiança para desvio padrão da população

Um intervalo de confiança para o desvio padrão, σ , de uma população é um intervalo para o qual pode-se afirmar com uma dada probabilidade de conter σ . Os métodos mostrados abaixo incluem um intervalo de confiança exato baseado na distribuição chi-quadrada e um intervalo de confiança aproximado, para amostras com 30 ou mais observações, baseado na distribuição Normal (HOUGH, 1960).

Dado $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n$, em que x_i é a i -ésima observação na amostra aleatória dada, o modelo para cada observação é dado por:

$$x_i = \mu + \varepsilon_i, \quad (\text{B.1})$$

para $i = 1, 2, \dots, n$, em que ε_i são componentes de mudança independentes com distribuições Normais idênticas $N(0, \sigma)$.

O intervalo de confiança $1 - \alpha$ para μ é dado por:

$$\sqrt{((n-1)s^2)/\chi_2^2} \leq \sigma \leq \sqrt{((n-1)s^2)/\chi_1^2}, \quad (\text{B.2})$$

em que $\chi_1^2 = \chi_{1-\alpha/2}^2$ com $n-1$ graus de liberdade e $\chi_2^2 = \chi_{\alpha/2}^2$ com $n-1$ graus de liberdade. Os valores de $\chi_{1-\alpha/2}^2$ e $\chi_{\alpha/2}^2$ são obtidos da tabela da distribuição chi-quadrada. Para amostras grandes, o intervalo de confiança de $1 - \alpha$ para σ é dado por:

$$s / \left(1 + \left(z_{\alpha/2} / \sqrt{2n} \right) \right) \leq \sigma \leq s / \left(1 - \left(z_{\alpha/2} / \sqrt{2n} \right) \right), \quad (\text{B.3})$$

em que $z_{\alpha/2}$ é obtida da tabela da distribuição Normal.