

EMERSON FERREIRA DE LUCENA

**ESTUDO DE ALGORITMOS PARA RECONSTRUÇÃO DE RELEVOS
DE SUPERFÍCIES IRREGULARES: APLICAÇÕES NA
FRACTOGRAFIA QUANTITATIVA E
CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS.**

Tese de doutorado apresentada à
Unesp-Campus de Guaratinguetá,
como pré-requisito para a
obtenção do título de Doutor em
Engenharia Mecânica na Área de
Projetos e Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Luis Rogerio de Oliveira Hein

Guaratinguetá
Fevereiro/2004

L93
5e Lucena, Emerson Ferreira de
Estudo de algoritmos para reconstrução de relevos de superfícies
irregulares: aplicações na fractografia quantitativa e caracterização de
materiais. / Emerson Ferreira de Lucena – Guaratinguetá : [s.n], 2004.
128f. : il.

Bibliografia: f. 104-111

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Engenharia de Guaratinguetá, 2004.

Orientador: Dr. Luis Rogério de Oliveira Hein

1. Processamento de imagens 2. Relevo – reconstrução I. Título

CDU 621.381

DADOS CURRICULARES

EMERSON FERREIRA DE LUCENA

NASCIMENTO 21.03.73- Recife, PE

FILIAÇÃO Clidenor de Andrade Lucena
Ana Maria Ferreira de Andrade Lucena

1991/1993 Técnico em Mecânica
(Colégio Técnico Industrial de Guaratinguetá)

1994/1998 Graduação em Licenciatura em Física
(Unesp Campus de Guaratinguetá)

1998/2000 Mestre em Física Aplicada
(Unesp Campus de Guaratinguetá)

À minha esposa e aos meus filhos Beatriz (Bia) e Vitor Hugo (Toihugo) pela paciência em ficar sem os meus carinhos. Finalmente aos meus pais que sempre me incentivaram durante o trabalho. Minha família, razão da minha existência, adoro vocês...

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço ao autor da grande obra da vida que escreveu, e ainda escreve, os meus capítulos e aos poucos introduz novos personagens.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Rogério de Oliveira Hein pelo incentivo e orientação.

Ao amigo Prof. Dr. Elson de Campos pelos conselhos no texto da tese e aos convites para participar dos trabalhos em congressos e artigos sem os quais não teria cumprido os créditos exigidos no programa.

Ao amigo Prof. Dr. Flávio de Paula Santos pelas aulas dadas no meu lugar e o apoio imprescindível na elaboração dos trabalhos em congressos e artigos.

Ao amigo Prof. Eleasar Martin Marins pelas orientações dadas sobre assuntos que envolviam conhecimentos de instrumentação em eletrônica (números hexadecimais usados em operações com bits na linguagem JAVATM, por exemplo), bem como as dicas para não me estressar.

Ao Major Telles Ribeiro, cuja visão de ensino me deu novas esperanças de como o Comando da Aeronáutica vê a Escola de Especialistas de Aeronáutica.

Às esposas e filhos dos amigos do grupo de física da Escola de Especialistas de Aeronáutica pela paciência durante a ausência do marido e pai.

Aos tecnólogos Domingos Hasman Neto e Manoel Francisco dos Santos Filho, pela elaboração das cerâmicas usadas sem as quais não haveria como elaborar esta tese.

Aos colegas de trabalho Prof. Hamilton Lopes da Costa, Prof. Maria Sônia Figueiredo Vieira Valim, Prof. Gilda Alves Garufe, Prof. José Alfonso Machry e ao Prof. Marco Aurélio por permitirem de alguma maneira a execução da tese e pelo ambiente agradável de trabalho na EEAR.

“Há pouco tempo era elegante que aqueles envolvidos com microscopia eletrônica desprezassem os esforços dos microscopistas com luz. Esperemos que nestes tempos mais esclarecidos tome-se a atitude de que todas formas de microscopia têm um papel no esclarecimento das microestruturas”

B. Ralph, 1980

LUCENA, E.F. **Estudo de algoritmos para reconstrução de relevos de superfícies irregulares: aplicações na fractografia quantitativa e caracterização de materiais.** 2004. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2004.

RESUMO

O objetivo deste trabalho é desenvolver rotinas para a reconstrução de relevos de superfícies irregulares, particularmente aquelas observadas por microscopia óptica ou eletrônica de varredura, e estudar os conceitos de imageamento envolvidos, visando definir critérios para uma futura padronização dos métodos de processamento na área de estudo de relevos. As imagens obtidas em um microscópio óptico Nikon Epiphot 200 e em um microscópio eletrônico de varredura 5600 LV, respectivamente, foram processadas por rotinas de reconstrução a partir do foco e a partir do paralaxe. Essas rotinas implementadas apresentam a inovação, respectivamente, de permitir que o usuário aumente o tamanho da região onde o critério de foco é empregado e a diminuição do tempo de processamento através da análise da transformada de Hartley somente na direção horizontal. Os resultados mostram que a rotina de reconstrução a partir do foco implementada neste trabalho apresentou as mesmas tendências obtidas em um rugosímetro Mitutoyo Surtest 301 e menor quantidade de ruídos quando é utilizado polarizadores; e que a rotina de reconstrução a partir do paralaxe apresenta um erro médio de $5 \pm 2\%$ para pontos do par estéreo que são epipolares. Finalmente, o menor tempo de processamento, no caso da reconstrução a partir do paralaxe, permite aumentar a resolução espacial (maior quantidade de pixels) visando diminuir a rotação usada para obter o par estéreo e conseqüentemente reduzir a oclusão de área e o problema de pontos não epipolares.

PALAVRAS-CHAVE: Processamento digital de imagens, Reconstrução do relevo a partir do paralaxe, Reconstrução do relevo a partir do foco

LUCENA, E.F. **Study of algorithms for reconstruction of irregular surfaces: applications in quantitative fractography and characterization of materials.** 2004. 128 f. Thesis (Doctorate in Mechanical Engineering) - Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2004.

ABSTRACT

The objective of this work is to develop routines for the reconstruction of irregular surfaces relieves, particularly those observed by optical microscopy or scanning electron microscopy, and to study the imaging concepts, seeking to define criteria for a future standardization of the processing methods in the area of study of relieves. The images were obtained in an optical microscope Nikon Epiphot 200 and in an scanning electron microscope 5600. They were, respectively, processed by depth from focus routine and parallax measurement. Those implemented routines present the innovation, respectively, of allowing the user to increase the size of the area where the focus criterion is used and the decrease of the time of processing through the analysis of the transformed of Hartley only in the horizontal direction. The results show that the depth from focus routine implemented in this work it presented the same tendencies obtained in a Mitutoyo Surtest 301 contact profilometer and smaller amount of noises when polarizers is used. The parallax routine presents error of $5 \pm 2\%$ for epipolar points from the stereo pair. Finally, in the case of the reconstruction from parallax is necessary to reduce the rotation used to obtain the stereo pair and to increase the space resolution (larger amount of pixels) to reduce the area occlusion and the problem of non-epipolar points.

KEYWORDS: Digital image processing, Parallax surface reconstruction, Depth from focus reconstruction

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2-1	Representação de como a) o usuário, b) o JAVA TM e c) a plataforma ImageJ identifica a posição dos elementos.....	10
FIGURA 3-1	Alterações das informações contidas nas ondas luminosas a) amplitude, b) frequência, c) fase e d) polarização. MANNHEIMER (2000).....	13
FIGURA 3-2	a e b) Transmissão, campo claro e campo escuro, c e d) Reflexão, campo claro e campo escuro.....	14
FIGURA 3-3	Representação de um feixe de luz após incidir em a) um conjunto de polarizadores paralelos, b) polarizadores cruzados e c) um conjunto de polarizadores com um cristal anisotrópico entre eles. Extraído de MANNHEIMER (2002).....	16
FIGURA 3-4	Representação vetorial do deslocamento do feixe de luz. Extraído de MANNHEIMER (2002).....	17
FIGURA 3-5	Esboço das principais lentes usadas em microscópios ópticos.....	19
FIGURA 3-6	Lentes planocromáticas comparadas com lentes acromáticas....	20
FIGURA 3-7	Representação da faixa de variação do campo de profundidade de uma lente.....	22
FIGURA 3-8	Ilustração onde se destaca a abertura angular do cone de luz capturado por uma lente.....	23
FIGURA 3-9	Detalhe da região da objetiva que fica imersa em óleo. No centro há destacado o eixo óptico onde estão alguns pontos objetos (P). Extraída de http://micro.magnet.fsu.edu/primer/	25
FIGURA 3-10	Geometria dos filmes anti-reflexão, extraída de http://micro.magnet.fsu.edu/primer/	26
FIGURA 3-11	Esboço da curva de espalhamento de ponto: a) sem ruído, b) 20% de ruído. Mostra a imprecisão que o ruído introduz nas medidas de contraste e consequentemente na resolução.....	29

FIGURA 3-12	Esboço da influência da diminuição da faixa dinâmica nas curvas de CTF.....	34
FIGURA 3-13	Esboço da curva de conversão sinal elétrico para níveis de um canal.....	32
FIGURA 3-14	Esboço do efeito do aumento do número de pixels da função de espalhamento de ponto.....	34
FIGURA 3-15	Eficiência quântica (%) versus comprimento de onda de alguns fotosensores (http://micro.magnet.fsu.edu/primer/).....	35
FIGURA 3-16	Esboço da arquitetura usada em CCDs, a) <i>frame transfer</i> e b) <i>interline transfer</i> (http://micro.magnet.fsu.edu/primer/).....	37
FIGURA 3-17	Esboço das curvas de sensibilidade espectral. Adaptado de http://micro.magnet.fsu.edu/primer/	38
FIGURA 3-18	Esboço da curva gama: a) > 1 , b) 1 e c) < 1	42
FIGURA 3-19	Espectro de emissão da lâmpada de Xenônio.....	43
FIGURA 4-1	Esboço do método de reconstrução a partir do foco.....	48
FIGURA 4-2	Foto de uma das pilhas onde foi aplicada a reconstrução a partir do foco.....	50
FIGURA 4-3	Elevações a partir do foco (mesma região): a) sem polarizador e b) com polarizador e analisador.....	51
FIGURA 4-4	Mapa de elevações feitos a partir de uma pilha salva em a) JPEG e b) TIFF.....	51
FIGURA 4-5	Imagens mostrando: a) subtração dos níveis de brilho entre os mapas de elevação resultantes da aplicação da rotina na pilha salva em JPEG e TIFF, b) Histograma da figura 4-3 a) mostrando que aproximadamente 51,2% dos brilhos (982495 brilhos) são diferentes.....	52
FIGURA 4-6	Curvas de foco obtidas a partir da seleção de uma região da pilha Campo2-Amostra42-Cerâmica 1200C-0,8T, critérios: a) Brenner, b) Índice de foco proposto na tese, c) Laplaciano, d) Sobel, e) Gradiente e f) Desvio Padrão.....	54

- FIGURA 4-7 Parâmetro Ra para uma temperatura de 900°C de fabricação da cerâmica em função da carga aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301..... 55
- FIGURA 4-8 Parâmetro Ra para uma temperatura de 1000°C de fabricação da cerâmica em função da carga aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301..... 55
- FIGURA 4-9 Parâmetro Ra para uma temperatura de 1100°C de fabricação da cerâmica em função da carga aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301..... 56
- FIGURA 4-10 Parâmetro Ra para uma temperatura de 1150°C de fabricação da cerâmica em função da carga aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301..... 56
- FIGURA 4-11 Parâmetro Ra para uma carga de 0,6 tf de fabricação da cerâmica em função da temperatura aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301..... 56

FIGURA 4-12	Parâmetro Ra para uma carga de 0,8 tf de fabricação da cerâmica em função da temperatura aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301.....	57
FIGURA 4-13	Parâmetro Ra para uma carga de 1,0 tf de fabricação da cerâmica em função da temperatura aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301.....	57
FIGURA 4-14	Mapa de elevações da amostra da cinta metálica.....	58
FIGURA 4-15	Ilustração da projeção da topografia real no plano horizontal.....	58
FIGURA 4-16	Mapa de elevações correspondente à reconstrução a partir do foco mostrada na Figura 4-15. Elevações em [μm].....	59
FIGURA 4-17	a) Mapa de elevações e b) representação tridimensional do mapa de elevações mostrado na Figura 4-17 a.....	59
FIGURA 4-18	Ilustração da direção do corte usado para obter as amostras das quais foram obtidas as reconstruções tridimensionais.....	60
FIGURA 4-19	Imagem com todas as regiões em foco obtido a partir da reconstrução tridimensional de uma região da superfície de cerâmica de TiO_2	60
FIGURA 5-1	Detalhamento da coluna de um MEV. Adaptado de MANNHEIMER (2002).....	63
FIGURA 5-2	Esboço dos detetores usados no MEV. Adaptado de MANNHEIMER (2002), a) Everhart-Thornley, b) Robinson e c) semicondutores.....	65
FIGURA 5-3	Sinal de um a MEV a) sem ruído e com b) com ruído. Extraído de MANNHEIMER (2002).....	67

FIGURA 5-4	Volume de interação entre o feixe de elétrons primário e a amostra, bem como a região de onde os sinais resultantes são gerados. Extraído de MANNHEIMER (2002).....	68
FIGURA 5-5	Representação de um feixe incidindo em uma superfície com uma determinada inclinação em relação a normal.....	69
FIGURA 6-1	Desenho representando o processo de busca pela região semelhante.....	74
FIGURA 6-2	Representação gráfica do processo de busca da região semelhante	74
FIGURA 6-3	Esboço do deslocamento angular para obter as imagens do par estéreo.....	75
FIGURA 6-4	Par estéreo LT +- 1000 X.....	78
FIGURA 6-5	Histograma do par estéreo mostrado na Figura 7-4 onde se pode ver a diferença nos valores de desvio padrão: 41,87 para a projeção negativa e 37,64 para a projeção positiva.....	78
FIGURA 6-6	Desenho representando os planos onde ocorrem a translação (plano A) e o de rotação do porta-amostra (plano B).....	82
FIGURA 6-7	a)LT -3 1000X e b) LT+3 1000X.....	90
FIGURA 6-8	a)LT -3 5000X e b) LT +3 5000X.....	90
FIGURA 6-9	a)LT -3 5000X_2 e b) LT +3 5000X_2.....	90
FIGURA 6-10	a)TL 15 kV 5000X tilt -3 e b) TL 15kV 5000X tilt +3.....	91
FIGURA 6-11	a)TL 15 kV 5000X tilt +3 Recristal e b)TL 15 kV 5000X tilt +3 Recristal.....	91
FIGURA 6-12	Mapa de elevação do par LT+- 3 1000X.....	92
FIGURA 6-13	Mapa de elevação do par LT +-3 5000X.....	92
FIGURA 6-14	Mapa de elevação do par LT+-3 5000X_2.....	92
FIGURA 6-15	Mapa de elevação do par TL 15kV 5000X tilt +-3 Recristal anteriormente alinhado.....	92
FIGURA 6-16	Mapa de elevação do par TL 15kV 5000X tilt +-3 Recristal anteriormente alinhado.....	92

FIGURA 6-17	Mapas de elevação obtidos com Kernel de dimensão 2x2 (direita) e 4x4 (esquerda).....	94
FIGURA 6-18	Mapas de elevação obtidos com Kernel de dimensão 8x8 (direita) e 16x16 (esquerda).....	94
FIGURA 6-19	Mapas de elevação obtidos com Kernel de dimensão 32x32 (direita) e 64x64 (esquerda).....	94
FIGURA 6-20	Detalhe do par estéreo LT+-3 5000X onde está destacado uma região que possui uma distorção geométrica.....	95
FIGURA 6-21	Falha do algoritmo quando há regiões lisas com iluminação simétrica.....	96
FIGURA 6-22	Imagem de um nanofio com 240 nm de diâmetro.....	97
FIGURA 6-23	Morfologia da região do nanofio destacada no quadro da Figura 6-22. As elevações forma determinadas pela rotina de reconstrução por paralaxe desenvolvida neste trabalho.....	97
FIGURA 6-24	Mapa de elevação resultante da aplicação da rotina de reconstrução a partir do paralaxe aplicada no nanofio mostrado na Figura 6-21.....	98
FIGURA A-1	Representação de uma lente com aberração cromática de um ponto objeto.....	111
FIGURA A-2	Representação de uma lente com aberração esférica de um ponto objeto.....	112
FIGURA A-3	Exemplo da forma da figura de Airy resultante do imageamento de um ponto objeto por uma lente com aberração de coma.....	113
FIGURA A-4	Imagens formadas com astigmatismo a partir de um ponto objeto que não está no eixo óptico da lente. Nele destaca-se os planos A) equatorial, B) meridional e o C) plano onde se forma o círculo de menor confusão.....	113
FIGURA A-5	Pontos A e B conjugados em uma superfície curva através de uma lente que sofre dessa aberração.....	114

FIGURA B-1	Exemplo de contraste (valores representados por setas com pontas duplas) de duas grades após serem imageadas por um sistema óptico. O eixo y indica valores de brilho e o eixo x a posição na imagem . http://micro.magnet.fsu.edu/primer/	115
FIGURA B-2	A direita Intensidade (y) em função dos pixels (x). A esquerda contraste (%) em função da frequência espacial. Note a influência da NA (http://micro.magnet.fsu.edu/primer/)	116
FIGURA B-3	Esboço de um a) PSF, b) das curvas de contraste X distância e c) CTFs. Adaptado de STELZER (1998).....	117
FIGURA B-4	Figuras testes sinusoidal a) e estrela b). Adaptado de http://micro.magnet.fsu.edu/primer/	118
FIGURA C-1	Parte superior mostra as figuras formadas pela vista radial da distribuição de intensidade luminosa de um ponto conjugado por um sistema óptico. A parte inferior mostra essa distribuição vista em 3D.....	119
FIGURA E-1	Ilustração adaptada de El-Soudani que mostra três pontos P_0 , P_1 e P_2 de uma superfície a) e a rotação da amostra para obter a projeção à esquerda b) e a projeção à direita c).....	123

LISTA DE TABELAS

TABELA 3-1	Especificações das objetivas CFI da Nikon obtidas na página http://www.nikonusa.com/bluelink/BDPlan/EPIPHOT200300.pdf	40
TABELA 3-2	Especificações da câmera utilizada que influem na distribuição de brilho da imagem.....	41
TABELA D-1	Designação das objetivas. Extraída de http://micro.magnet.fsu.edu/primer/	121
TABELA D-2	Designação de cores das objetivas. http://micro.magnet.fsu.edu/primer/	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TiO ₂	Dióxido de Titânio
MgO	Óxido de Magnésio
Si ₃ N ₄	Nitreto de Silício
R _A	Parâmetro de rugosidade média
R _T	Parâmetro de rugosidade total
3D	Tridimensional
PET	Polietileno tereftalato
PMMA	Polietilenometilmetacrilato
DMT	Departamento de Materiais e Tecnologia
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
LMAF	Laboratório de Metalografia e Análise de Falhas.
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscopy
LVSEM	Low Vacuum Scanning Electron Microcopy
ES	Elétrons secundários
EP	Elétrons primários
ERE	Elétrons retroespalhados
TRC	Tubos de raios catódicos.
CFI	Chrome (aberration) free infinity
DIC	Differential interference contrast
Plan	Designação dada pelo fabricante Nikon as lentes corrigidas da curvatura de campo
BD	Bright-Dark, termos usados pelo fabricante Nikon referentes as lentes usadas para observação em modo campo claro e escuro, respectivamente
AN	Abertura numérica
CCD	Charge Coupled Device
RGB	Red-Green-Blue, sistema de cores utilizado na maioria do dispositivos de imageamento digital.

JPEG	J oint P hotographic E xperts G roup, uma das extensões dada a arquivos de imagens. Possui um algoritmo de compressão que reduz consideravelmente o tamanho do arquivo.
LaiMat	Laboratório de Imagens de Materiais do Departamento de Materiais da Unesp-Campus de Guaratinguetá.
TIFF	T ag I mage F ile F ormat, uma das muitas extensões dada a arquivos de imagens. Pode ou não possuir algoritmos de compressão.
RAM	Random access memory
SNR	Signal Noise Ratio, razão sinal/ruído.
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CDI	Charge –injection Device
CTF	Contrast Transfer Function, curva de transferência de contraste
FN	Field Number, número de campo

LISTA DE UNIDADES

μm	Micrometro
K	Kelvin
nm	Nanometro
W	Watts
mm	Milímetro
cm	Centímetro
ms	Milisegundo
tf	Tonelada-força
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
s	Segundos
V	Volts
kV	Quilovolts
eV	Elétron-Volts
Torr	Torriceli (unidade de pressão)
$^{\circ}$	Graus (unidade de amplitude de arco)
kgf/cm^2	Quilogramaforça por centímetro quadrado

SUMÁRIO:

LISTA DE FIGURAS.....	XVI
LISTA DE TABELAS.....	XXIII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XXIV
LISTA DE UNIDADES	XXVI
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.PLATAFORMA USADA PARA GERAR AS ROTINAS	5
2.1.INTRODUÇÃO.....	5
2.2.LINGUAGEM JAVA™	6
2.3.EDITOR TEXTPAD®	7
2.4.O CONCEITO DE PLUGIN DO IMAGEJ.....	7
2.4.1.TIPOS DE PLUGINS.....	7
2.4.2.COMPILAÇÃO DO PLUGIN	8
2.4.3.OBJETOS USADOS EM PLUGINS.....	8
3.MICROSCOPIA ÓPTICA E IMAGENS DIGITAIS.....	12
3.1.INTRODUÇÃO.....	12
3.2.MICROSCÓPIO ÓPTICO.....	13
3.2.1.ILUMINAÇÃO.....	13
3.2.1.1.CONTRASTE EM MICROSCOPIA ÓPTICA.....	13
3.2.1.2.FONTES DE LUZ.....	17
3.2.2.OBJETIVAS.....	19
3.2.2.1.ACROMÁTICAS.....	19
3.2.2.2.CORRIGIDAS PARA CAMPO PLANO.....	20
3.2.2.3.SEMICROMÁTICA OU FLUORITA.....	20
3.2.2.4.APOCROMÁTICAS.....	20

3.2.2.5.ESPECIFICAÇÕES E IDENTIFICAÇÃO.....	20
3.2.2.4.OCULARES.....	27
3.2.3.DETETORES DIGITAIS.....	27
3.2.3.1.FOTOMULTIPLICADOR.....	35
3.2.3.2.DETETORES DE ESTADO SÓLIDO.....	36
3.2.3.3.DETETOR HUMANO VISUAL VERSUS CCD	38
3.3.EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	39
3.3.1.MICROSCÓPIO ÓPTICO NIKON EPIPHOT 200.....	39
3.3.1.1.DESLOCAMENTO TOTAL DO PORTA-OBJETIVAS.....	39
3.3.1.2.MENOR DESLOCAMENTO DO ANEL GRADUADO DO PORTA- OBJETIVAS.....	39
3.2.2.DETETOR USADO NESTE TRABALHO: CÂMERA DIGITAL SPOT INSIGHT QE.....	40
3.2.3.FONTE DE LUZ.....	43
4.RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO FOCO.....	44
4.1.INTRODUÇÃO.....	44
4.2.ALGORITMO DE RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO FOCO IMPLEMENTADO NESTE TRABALHO.....	44
4.3.METODOLOGIA DE IMAGEAMENTO.....	49
4.3.1.CONFIGURAÇÃO DO MICROSCÓPIO.....	50
4.3.2.CONFIGURAÇÃO DA CÂMERA.....	51
4.3.3.FORMATO DE ARQUIVO DAS PILHAS.....	51
4.3.4.MATRIZ DO CRITÉRIO DE FOCO.....	52
4.4.MATERIAIS ANÁLISES E RESULTADOS.....	52
4.4.1.INTRODUÇÃO.....	52
4.4.2.ROTINA E O RUGOSÍMETRO MITUTOYO SURTEST 301.....	53
4.4.3.APLICAÇÕES DA ROTINA.....	57
4.4.3.1.CORRIGIR O ESPAÇAMENTO DE ESTRIAS DEVIDO A INCLINAÇÃO DA AMOSTRA.....	57
4.4.3.2.VISUALIZAÇÃO DE PARTES INTERNAS.....	60

5.MICROSCOPIA POR VARREDURA	62
5.1.INTRODUÇÃO	63
5.2.MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV).....	63
5.2.1.INTERAÇÃO ELÉTRONS-MATÉRIA.....	63
5.2.2.RESOLUÇÃO E CONTRASTE.....	66
5.2.3.LIMITAÇÕES DO MEV	71
6.RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO PARALAXE.....	74
6.1.INTRODUÇÃO.....	74
6.2.TRANSFORMADA DE HARTLEY	79
6.3.DESCRICÃO DO ALGORITMO IMPLEMENTADO NESTE TRABALHO.....	81
6.4.MATERIAIS, ANÁLISES E RESULTADOS.....	89
6.4.1.INTRODUÇÃO	89
6.4.2.SUPERFÍCIES RUGOSAS.....	89
6.4.3.SUPERFÍCIES LISAS.....	96
7.CONCLUSÕES.....	99
7.1.RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO FOCO.....	99
7.2.RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO PARALAXE.....	100
8.TRABALHOS FUTUROS.....	101
REFERÊNCIAS.....	104
APÊNDICE.....	111
A. ABERRAÇÕES ÓPTICAS.....	111
B. FUNÇÃO DE TRANSFERÊNCIA ÓPTICA (OPTICAL TRANSFER FUNCTION).....	115
C. DISCOS DE AIRY.....	119
D. ESPECIFICAÇÕES USADAS.....	120
E. ELEVAÇÃO A PARTIR DO PARALAXE DE PAR ESTÉREO OBTIDO EM MEV.....	122
F. TEMPERATURA DA COR.....	124
G. PARÂMETROS DE RUGOSIDADE.....	125

Capítulo

1

INTRODUÇÃO

O Ministério da Ciência e Tecnologia implantou recentemente um programa chamado ProspeCTar (www.mct.gov.br/cct/prospectar/Relatorio3/sumario). Este programa tem por objetivo, junto com a sociedade brasileira, planejar o que deve ser feito em ciência e tecnologia que acarrete em melhoria de qualidade de vida da população e competitividade internacional dos bens e serviços produzidos no Brasil.

No Relatório Final-Área de Materiais da terceira rodada de discussão, os ensaios não destrutivos¹ aparecem em um grupo de temas com horizonte de realização mais próximo, maiores indicadores de relevância e de disponibilidade, menor necessidade de cooperação internacional e um maior conteúdo de tópicos de uso e aplicação. Este resultado mostra o quanto este setor é importante já a curto prazo, uma vez “...que perpassam [os ensaios não destrutivos] mais de um dos subtemas de Materiais...”.

Dentre esses ensaios não destrutivos está o processamento digital de imagens. Apesar da reconhecida importância e da ampla aplicabilidade, o processamento digital de imagens no meio científico passa hoje por um momento de reelaboração nos procedimentos usados. Na literatura pesquisada não existe uma padronização ou pelo menos a preocupação em estabelecer quais são os parâmetros dos sistemas de imageamento durante a aquisição das imagens. Os softwares comerciais também não atendem ao usuário final do meio científico e industrial, pois nesses casos é necessário

¹ O processamento digital de imagens pode ser entendido como um ensaio não-destrutivo de superfícies fraturadas por mantê-las intactas.

o conhecimento do código fonte da rotina para permitir a discussão das limitações dos algoritmos e comparação de resultados obtidos por equipamentos diferentes.

A grande variedade de sistemas de imageamento também dificulta a padronização, necessária na comparação de resultados, dos parâmetros dos sistemas de medida de superfície.

Nos estudos feitos em superfícies com grandes variações de relevo, por exemplo superfícies produzidas por fratura, a partir do processamento digital de imagens a falta de padronização também ocorre. Portanto, para dar mais um passo de encontro a uniformização dos procedimentos usados, um dos objetivos deste trabalho é propor e discutir detalhadamente alguns algoritmos a serem usados em estudos quantitativos de superfícies para que o usuário saiba como eles operam em uma imagem e assim ele possa estabelecer:

- melhor o valor das variáveis de entrada,
- as limitações do algoritmo,
- como o tempo de processamento é afetado,
- a ordem de grandeza das variáveis.

Outro objetivo é também entender e estabelecer como os sistemas de imageamento influem nas imagens e conseqüentemente nas medidas realizadas.

Os algoritmos estudados foram determinados a partir da constatação do seu uso no processamento digital de imagens de superfícies fraturadas. Eles podem ser agrupados em²:

- Reconstrução tridimensional a partir do foco;
- Reconstrução tridimensional por paralaxe;
- Análise da rugosidade através da dimensão fractal³.

Estes algoritmos foram implementados na plataforma de domínio público ImageJ que se baseia na linguagem de programação JAVATM. Esta plataforma possui uma lista de discussão que inclui médicos, engenheiros, físicos, entre outros profissionais; bem como possui as ferramentas básicas (edição, salvamento e outras) e que permitisse a inclusão de novas rotinas era necessário. Além disso, diante da

² Estes algoritmos também podem ser usados em superfícies que não foram originadas por fratura.

importância do tema era necessário que o trabalho computacional envolvesse somente a implementação dos algoritmos citados. Assim o uso de uma plataforma

Vale ressaltar que de acordo com (THOMAS, 1998), com o recente desenvolvimento do microscópio de força atômica e outros há um aumento linear nas publicações que envolvem a rugosidade. Ainda no mesmo texto, ele cita que apesar de existirem sistemas de imageamento para obter imagens com grandes amplitudes e pequenos comprimentos de onda (MEV), a obtenção de medidas neste caso “...é muito difícil...” (THOMAS, 1998), provavelmente no que se refere ao tempo de processamento. O aprimoramento da reconstrução por paralaxe pode vir a ser uma solução. Além disso, na página da Web da empresa Alicona podemos verificar que grandes empresas como *Advanced Micro Devices (AMD)*, *Bosch*, *BMW* entre outras, utilizam softwares dessa área desenvolvidos pela empresa *Alicona Imaging*. Dentre os programas que ela vende há o de reconstrução a partir do foco e a partir de pares estéreo, respectivamente chamados de *InfiniteFocus* e *MeX*. Existe também o *IF Junior* que nada mais do que o *Infinite Focus* sem a parte do código que estabelece o mapa de elevações, e o *AnaglyphView* que produz imagens anaglíficas a partir de pares estéreo para análise qualitativa do relevo e que pode também ser feito no ImageJ. Este pacote de rotinas é vendido hoje por um preço aproximado de 8000,00 EUR (oito mil euros, ou seja, U\$S 9440,00⁴). Portanto, o desenvolvimento desse algoritmo significa uma grande economia.

Podemos ainda acrescentar o uso da reconstrução a partir do foco no controle de qualidade dos *wafers* de circuitos eletrônicos (JONES e TAYLOR; SCHAPER, 2003, 2002).

Outras possíveis aplicações dos dois grupos de algoritmos em imagens obtidas em microscópios ópticos ou eletrônico de varredura em estudos de superfícies são o controle de qualidade da rugosidade interna de tubos utilizados para transporte de petróleo e gás natural (FARSHAD et al., 2001), medidas de rugosidade feitas durante a usinagem (WONG e LI, 1999), estudos de fratura (CWAJNA E STANISLAW, 2001), determinação da textura de materiais usados na restaurações dentais (WHITEHEAD et

³ O último grupo não foi implementado.

⁴ Conversão feita dia 25/11/03 no conversor <http://br.invertia.com/mercados/divisas/calculadivisa.asp>.

al., 1999) e desenvolvimento de equipamentos comerciais com vistas para aplicação na análise de rugosidade na linha de produção (*in-process measurements* ou *in-situ measurements*) cuja área é deficiente (THOMAS, 1998).

Finalmente, o trabalho a seguir consta dos seguintes capítulos:

- *Plataforma usada para gerar as rotinas*: mostra alguns termos usados em JAVATM, bem como dá alguns princípios de como implementar novas rotinas para processamento de relevos e introduzi-las no ImageJ.
- *Microscopia óptica e imagens digitais*, este capítulo mostra uma série de termos e conceitos usados em microscopia e imagens digitais.
- *Reconstrução tridimensional a partir do foco*: descreve diversos critérios de foco baseados na distribuição de brilho usados na literatura e aquele implementado neste trabalho.
- *Microscópios de varredura*, mostra o funcionamento e descreve os principais parâmetros do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) que afetam a imagem.

Reconstrução tridimensional a partir do paralaxe: descreve o algoritmo desenvolvido neste trabalho e suas limitações.

PLATAFORMA⁵ DAS ROTINAS

2.1.INTRODUÇÃO:

Das classes existentes em uma plataforma (mídia, processamento e formato) nos concentramos na elaboração de alguns objetos funcionais⁶ da classe de processamento⁷.

Estes objetos funcionais foram implementados em uma plataforma de domínio público e independente do sistema operacional para que diferentes usuários pudessem identificar os algoritmos usados neste trabalho.

A plataforma usada é a ImageJ desenvolvida por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA. Além de apresentar os elementos citados anteriormente, a linguagem JAVATM usada é de domínio público e independente de arquitetura⁸. O ImageJ possui um “mailing list” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/list.html>) onde podem ser retiradas dúvidas a respeito da plataforma. Existem também outras plataformas de processamento digital como o PhotoPixJ desenvolvido por ALMEIDA (1998).

Este capítulo dá ao leitor os elementos básicos usados no algoritmo de processamento de imagem para reconstrução de superfície implementado na plataforma ImageJ.

⁵ Os termos neste capítulo são usados na linguagem de programação JAVA. Por exemplo, plataforma significa uma coleção de classes relacionadas entre si compondo um projeto que pode ser reutilizável.

⁶ É a rotina de processamento em si. Eles encapsulam tanto a função quanto seus argumentos.

⁷ Estas classes incluem objetos que armazenam os argumentos de uma função usando objetos de entrada, e estabelecem os argumentos de saída. Nesta classe também há a presença de objetos que invocam determinadas funções, outros que armazenam quais objetos de entrada são válidos para determinado algoritmo e atributos que armazenem parâmetros de entrada obtidos através de uma interface gráfica com o usuário. (ALMEIDA, 1998).

⁸ O termo arquitetura e ambiente serão usados daqui em diante com relação a sistemas operacionais como Mac OS, Windows, SolarisTM e Linux.

2.2.LINGUAGEM JAVA™:

A linguagem JAVA foi elaborada inicialmente para eletrodomésticos. Estes aparelhos requerem softwares com grande adaptabilidade a modificações. Foi então que a Sun Microsystems® (<http://www.sun.com/index.xml>) desenvolveu uma nova linguagem independente de arquitetura: JAVA™. As características dessa linguagem são (HORSTMANN e CORNELL, 1992).

- Simplicidade: para obter isso os projetistas do JAVA™ a elaboraram com um número pequeno de construções e que fossem familiares para a maioria dos programadores, ou seja, JAVA™ usa várias construções presentes em C e C++.
- Orientada para objetos: os programadores que utilizam estas linguagens podem, a princípio, não se preocupar como os objetos são implementados. Nesta forma de programação as classes com objetos que determinam as formas de salvamento dos arquivos, a maneira como as imagens são mostradas, entre outras classes que dão suporte são elaboradas primeiro para posteriormente serem elaborados os algoritmos que resolverão os problemas.
- Interpretada: o compilador⁹ JAVA™ gera *bytecodes*¹⁰ em um formato independente da arquitetura ao invés do código nativo do sistema operacional. Para de fato executar um programa em JAVA™, utiliza-se um interpretador e o sistema de tempo de execução que executam os *bytecodes*. Em conjunto, formam a Máquina Virtual JAVA™ que difere de arquitetura para arquitetura.
- Independente da arquitetura: para que isto ocorra basta que o sistema operacional implemente a Máquina virtual
- Alto desempenho: JAVA™ se enquadra entre as linguagens totalmente interpretadas e as totalmente compiladas. Esta linguagem não apresenta um desempenho no tempo de execução tão alto quanto as linguagens compiladas, mas permite a portabilidade das rotinas em diferentes arquiteturas.

⁹ O compilador traduz palavras e abreviaturas significativas para as pessoas (programa fonte) em longas séries de dígitos binários (programa objeto) compreendidos pela máquina.

¹⁰ São os arquivos com extensão .class gerados após a compilação.

- Múltiplos processos: permite a implementação de múltiplos processos evitando a necessidade do uso de bibliotecas que nem sempre estão disponíveis em todos os ambientes.

Neste texto vários trechos dos programas implementados são apresentados na forma original da sintaxe JAVA™. A opção por apresentar as rotinas dessa maneira ao invés de outras mais usuais (descrição narrativa, fluxograma e pseudocódigo) é que o usuário não precisa saber de antemão a sintaxe da linguagem e o entendimento da lógica do algoritmo é feita após a leitura das explicações do referido trecho.

2.3.EDITOR TEXTPAD:

O editor TEXTPAD® de arquivos para Windows é um programa *freeware* (disponível gratuitamente e com todos os recursos) e que pode ser baixado de <http://www.textpad.com/download/index.html>. É extremamente prático na edição das rotinas da linguagem JAVA™. Por exemplo, neste editor há como localizar na barra inferior a linha em que o usuário está. Em vários momentos este recurso foi imprescindível para facilitar a identificação da posição das falhas (*bugs*) do programa. O editor do ImageJ (acionado pelos comandos Plugin-Edit) ainda não possui tal recurso.

2.4.O CONCEITO DE PLUGIN DO IMAGEJ:

2.4.1. TIPOS DE PLUGINS:

Existem basicamente dois tipos de plugins (BAILER, 2000) em função do tipo de dados de entrada: aqueles que não precisam de imagens e que implementam a interface *PlugIn* e aqueles que necessitam de imagens e implementam a interface *PlugInFilter*. Os plugins implementados devem ser colocados na pasta ImageJ\plugin e devem usar nomes com o símbolo(_). Por exemplo, Confocal_ ou Confocal_Depth para que o algoritmo seja corretamente incluído na interface com usuário (no menu Plugin) durante o carregamento do ImageJ.

2.4.2.COMPILAÇÃO DO PLUGIN:

Para poder compilar uma rotina através do comando no editor Textpad[®] é necessário acrescentar no arquivo *compile.bat* localizado no diretório C:\ as seguintes linhas

```
set PATH=c:\(acrescente o nome da versão do JAVATM)\bin;%PATH%
set CLASSPATH=../ij.jar;.
```

2.4.3.OBJETOS USADOS EM PLUGINS:

Os trechos a seguir foram extraídos dos algoritmos implementados neste trabalho.

- **Importação dos pacotes:**

Primeiro importamos os pacotes importantes *ij.** das classes básicas do ImageJ, *ij.process.** dos processadores e da interface *ij.plugin.filter.PlugInFilter*.

```
import ij.*;
import ij.plugin.filter.PlugInFilter;
import ij.process.*;
import java.awt.*;
```

- **Nomenclatura das classes:**

O nome da classe aparece logo em seguida tomando cuidado para acrescentar ().

```
public class Reconstruction_3Dsomaalinhada implements PlugInFilter {
```

- **Limitação nas imagens de entrada:**

A última linha do trecho a seguir define que este objeto trabalha com imagens em escala de cinza de 8 bits, pilhas (*stacks*), e no caso em que há uma região de interesse (*Region Of Interest, ROI*).

```
public int setup(String arg, ImagePlus imp) {
    if (arg.equals("about"))
        {showAbout(); return DONE;}
    return DOES_8G+DOES_STACKS+DOES_ROI;
}
```

- **Armazenamento da matriz de brilhos e definição da quantidade de números significativos:**

O método *run* implementa a atual função do *plugin*, ou seja, obtém o processador através de *ImageProcessor ip* e daí em diante se refere ao mesmo através da abreviação *ip*. Então armazena a imagem como uma matriz (chamada de *pixels*) através do comando *ip.getPixels()*. Note que a matriz armazenada é definida como *byte* devido a imagem ser de 8 bits. Se fosse de 16 deveria ser *short* e 32 no caso de ser *float* ou *double*. Posteriormente determina o comprimento da imagem através de *int width = ip.getWidth()*; e a medida da região selecionada, caso tenha, através de *Rectangle r = ip.getRoi()*;

```
public void run(ImageProcessor ip) {
    byte[] pixels = (byte[])ip.getPixels();
    int width = ip.getWidth();
    Rectangle r = ip.getRoi();
```

- **Extraindo elementos individuais da matriz de brilho:**

Em vários programas é de extrema importância o trecho a seguir. Nele temos duas variáveis (*rowg* e *colg*) para permitir localizar qualquer elemento da matriz unidimensional da imagem. No looping mais externo o deslocamento é feito na vertical da primeira até a última linha. O looping interno realiza o deslocamento na horizontal da esquerda a direita.

```
for (int rowg=searchy-(maxN/2); rowg <searchy-(maxN/2)+maxN; rowg++){
  for (int colg=searchx-(maxN/2); colg <searchx-(maxN/2)+maxN; colg++){
    g[colg+rowg*maxN]=pixels2[colg+rowg*width];
  }
}
```

Para entender melhor como funciona a representação matricial da plataforma ImageJ observe a Figura 2-1 que representa como o usuário, o JAVATM e a plataforma estabelecem a posição dos elementos de uma matriz 3X3.

1,1	1,2	1,3	0,0	0,1	0,2	1	2	3
2,1	2,2	2,3	1,0	2,2	1,2	4	5	6
3,1	3,2	3,3	2,0	2,1	2,2	7	8	9
	a)			b)			c)	

Figura 2-1: Representação de como: a) o usuário, b) o JAVATM e c) a plataforma ImageJ identifica a posição dos elementos.

Para localizar um elemento, a plataforma ImageJ realiza o seguinte cálculo com os valores de linha e coluna estabelecidos na Figura 2-1 b), ou seja,

$$\text{elemento} = \text{linha} + \text{coluna} \times \text{comprimento da matriz}$$

Por exemplo, o elemento 8 na representação da plataforma ImageJ é calculado por

$$8 = 2 + 2 \times 3$$

- **Caixas de mensagem:**

Às vezes é necessário que o usuário veja uma caixa com alguma mensagem ou explicação. Para isso pode ser usado o método *IJ.showMessage()*. Note que o símbolo `\n` indica mudança de linha.

```
IJ.showMessage("About Reconstruction_3D",
               "This plug-in make elevation maps from stereo pair\n" +
               "It is very important that the opening first image\n"+
               "have been the negative or left projection.\n"
               );
```

- **Caixas de valores de entrada:**

O trecho a seguir implementa a caixa chamada de *Parameters of Alignment* com os valores de entrada *Dimension Kernel* e *Searching-x*.

```
GenericDialog gd=new GenericDialog ("Parameters of Alignment");
gd.addNumericField("Dimension Kernel(square):",2,3);
gd.addNumericField("Searching-x:",(30),3);
```

Estes valores são armazenados, respectivamente, nas variáveis *dimension* e *matchx*. Para que o armazenamento do valor de entrada seja feito de maneira correta com a variável é necessário que a ordem de cima para baixo seja respeitada.

```
short dimension=(short) gd.getNextNumber();
int matchx=(int)gd.getNextNumber();
```

Capítulo

3

MICROSCOPIA ÓPTICA¹¹

E

IMAGENS DIGITAIS

3.1.INTRODUÇÃO:

Fotografias feitas com filme ou imagens de vídeo contêm um espectro contínuo de cores. Imagens deste tipo são chamadas de tons-contínuos e são produzidas por instrumentos analógicos onde a imagem é gravada por flutuações de sinais elétricos ou mudanças químicas no filme.

Esta imagem para ser mostrada pelo computador deve ser digitalizada. Isto significa dividí-la em valores individuais de brilho através de dois processos: amostragem e quantização. O primeiro transforma a imagem em uma matriz bidimensional e o segundo estabelece que cada elemento (*picture element* ou pixel) possua informação sobre o nível de brilho em termos de valores inteiros (quantização) (RUSS, 1992).

Este capítulo visa a compreensão do processo de formação da imagem digital em 2D a partir de uma cena em 3D através de um sistema óptico qualquer, ou seja, o imageamento digital (GONZALEZ e WOODS, 2000). Apresenta uma série de termos e seus significados com o objetivo de permitir falar sobre microscopia e determinar quais são os fatores e como eles afetam a imagem digital e conseqüentemente as medidas realizadas sobre as mesmas. Das partes de um sistema de imageamento óptico descreveremos a iluminação, as objetivas/oculares e a câmera digital pelo de que podem ser configurados pelo usuário.

¹¹ Os termos aceitos para a luz são óptica (devido a origem estar na palavra grega *optiké*), ótica ou óptico. Vale ressaltar que ótico não é aceito pela origem na palavra *otikos* no que se refere a ouvido.

3.2.MICROSCÓPIO ÓPTICO:

3.2.1.ILUMINAÇÃO

3.2.1.1.CONTRASTE EM MICROSCÓPIA ÓPTICA

A luz ao incidir em uma amostra pode sofrer alterações na amplitude, frequência, fase e polarização (ver Figura 3-1). Cada uma dessas características contém informações sobre a amostra. No entanto, os nossos olhos são sensíveis somente a mudanças na amplitude (claro e escuro) e no comprimento de onda (cor). Para que a mudança nas outras características seja perceptível pelo olho humano é necessário que ela seja convertida em alterações de amplitude ou de comprimento de onda (MANNHEIMER, 2002).

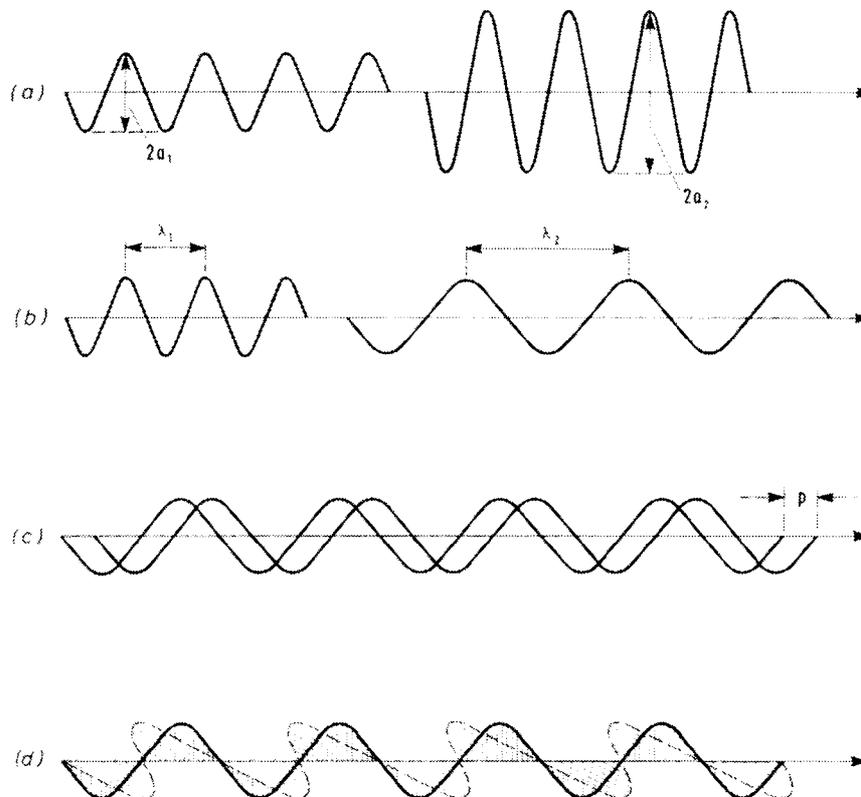


Figura 3-1: Alterações das informações contidas nas ondas luminosas a) amplitude, b) frequência, c) fase d) polarização. Extraída de MANNHEIMER (2002)

Dentre as formas de contraste, descreveremos somente aquelas que foram usadas neste trabalho: amplitude e polarização. Em MANNHEIMER (2002) há um texto sobre as outras formas mais usadas de contraste: fase, DIC ou Normansky e fluorescência.

- **Contraste de amplitude**

A luz interagindo com a amostra pode ser absorvida, transmitida ou refletida, resultando em contraste de amplitude. Esse contraste é resultado de dois modos de iluminação: campo claro e campo escuro (Figura 3-2).

Em reflexão, no modo de iluminação de campo claro regiões planas do objeto, cuja normal está perpendicular ao eixo óptico, refletem a luz de volta para a objetiva e aparecem claras; a luz que incide em regiões inclinadas é refletida para fora da abertura numérica da objetiva e o grau de escurecimento depende da inclinação do raio de luz em relação a normal ao ponto de incidência.

A iluminação de campo escuro funciona de maneira contrária.

A escolha por um dos dois modos dependerá da amostra e portanto, não há uma regra definida de escolha.

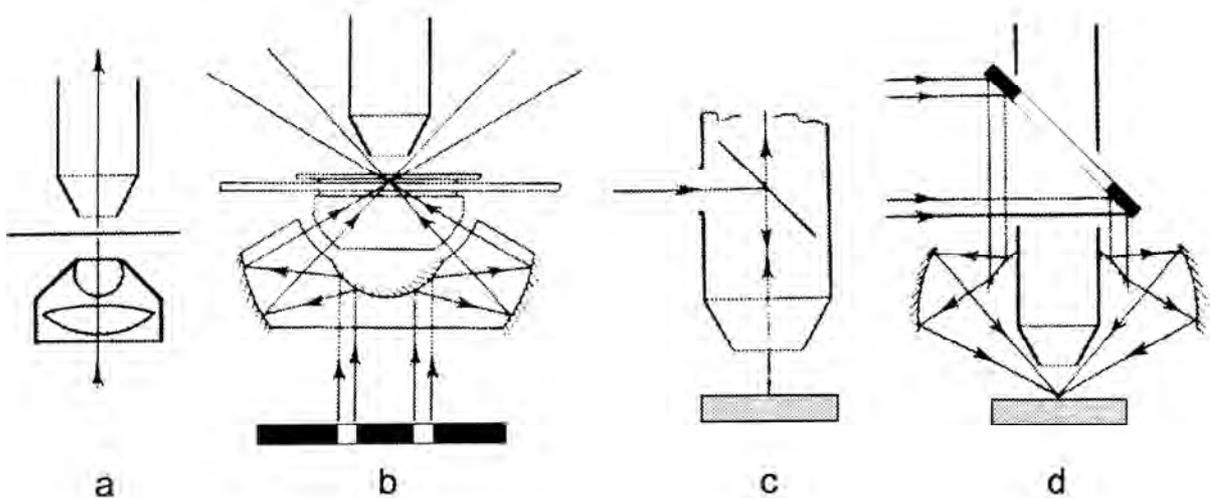


Figura 3-2:a e b) Transmissão, campo claro e campo escuro c e d) Reflexão, campo claro e campo escuro. Extraída de MANNHEIMER (2000)

- **Contraste por polarização**

Um raio de luz tem seu vetor deslocamento elétrico vibrando em determinada direção e amplitude em condições normais. Em geral ocorrem mudanças na direção da vibração cujo efeito é simétrico. Quando algumas direções de vibração são suprimidas ou favorecidas a luz diz-se polarizada.

A geração de luz polarizada pode ocorrer devido à reflexão ou refração (MASSOUMIAN et al., 2003). No caso da luz refletida é maior a proporção de luz polarizada de acordo com o aumento do ângulo de incidência para um polarizador isotrópico e a vibração do deslocamento elétrico é perpendicular ao plano de incidência.

No caso de um polarizador anisotrópico, há também polarização, mas cuja geometria dependerá da orientação do cristal. Por exemplo, em um cristal de calcita (carbonato de cálcio natural, espato de Islândia) ou de quartzo, há além do raio refletido dois raios refratados. Este fenômeno é chamado de dupla refração ou birefringência. Um destes raios é chamado de ordinário (O) e obedece a lei de Snell (refração ocorre no plano de incidência e possui um único índice de refração). O outro raio é denominado de extraordinário (E), não está no mesmo plano de incidência e seu índice de refração varia com a direção cristalina. Os cristais anisotrópicos também apresentam uma ou duas direções, denominadas de eixos ópticos, ao longo do qual a luz se propaga com uma única velocidade, não há modificações nas direções de vibração e na formação de raios E e O.

Alguns cristais, além da propriedade da birefringência, podem absorver muito mais fortemente um dos raios refratados. Tais cristais são chamados de dicróicos. Um exemplo é a turmalina e outro é o iodossulfato de quinina (herapathita). Este segundo acabaria por ser a matéria prima do material (*Polaroid*) mais utilizado quando se deseja polarizar a luz em sistemas de imageamento por ser de fácil obtenção e baixo custo.

Os princípios fundamentais que descrevem os efeitos de um polarizador sobre a luz já foram descritos anteriormente, no entanto, na microscopia há uma série de termos muito usados para dar nome ao mesmo dispositivo: o polarizador. O

entendimento destes termos torna-se necessário para a correta compreensão do funcionamento do contraste por luz polarizada.

A sequência de dois polarizadores é denominado em microscopia de conjunto polarizador e analisador (MANNHEIMER, 2002). A propagação da luz através desse conjunto quando suas direções de polarização estão cruzadas e paralelas está ilustrada, respectivamente, nas Figuras 3-3 a e b. Quando o analisador está em uma posição intermediária podemos decompor o vetor que representa o raio polarizado em dois ortogonais, um dos quais, na direção de polarização do analisador é transmitido com menor intensidade (Figura 3-4). A Figura 3-3 c representa a estrutura básica do contraste DIC Normansky o qual não será detalhado neste trabalho.

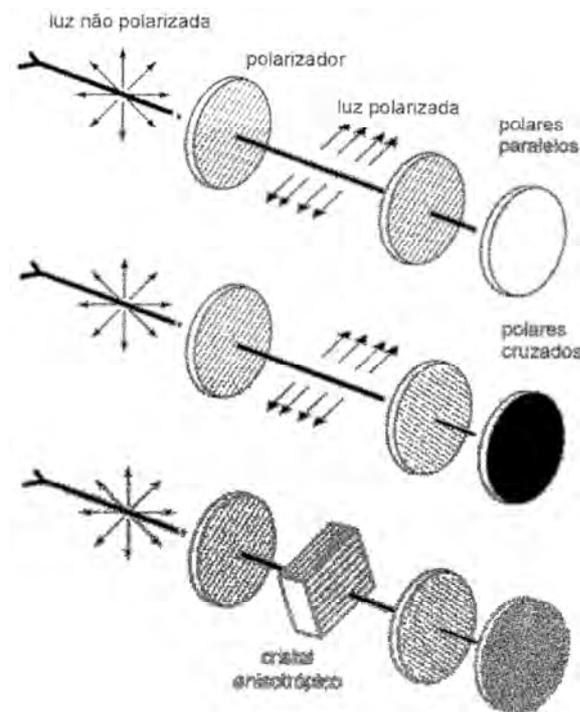


Figura 3-3: Representação de um feixe de luz após incidir em a) um conjunto de polarizadores paralelos, b) polarizadores cruzados e c) um conjunto de polarizadores com um cristal anisotrópico entre eles. Extraído de MANNHEIMER (2002)



Figura 3-4: Representação vetorial do deslocamento do feixe de luz. Extraído de MANNHEIMER (2002).

Outro termo utilizado é a palavra compensador que dá nome aos polarizadores usados a partir do princípio da compensação¹². Por exemplo, duas lâminas de mica superpostas e girando uma em relação a outra produzem paulatinamente transmissão nula (direções de polarização não coincidentes) ou outras cores de interferência de ordem superior (direções de polarização coincidentes).

3.2.1.2.FONTES DE LUZ:

Microscópios sofisticados podem gerar imagens ruins devido ao uso incorreto da fonte de luz. Quando otimizada, a iluminação deve ser clara, e uniformemente distribuída em todo campo de visão. As fontes existentes são (DELLY, 1998):

a)Lâmpadas incandescentes:

Lâmpadas incandescentes de tungstênio são uma das primeiras fontes de iluminação usadas em microscópios modernos, com exceção de fluorescência. Estas lâmpadas são emissores térmicos que produzem um espectro contínuo de luz de 300nm até 1200-1400nm, com a maioria dos comprimentos de onda centralizados em torno de 600 a 1200nm. A lâmpada consiste de um bulbo selado e preenchido com gás inerte e contendo um filamento de tungstênio energizado por uma corrente elétrica DC. O bulbo produz uma grande quantidade de calor e luz. Lâmpadas de tungstênio

¹² Refere-se à adição de fases para neutralizar a birrefringência do cristal. O termo extinção refere-se à retenção de luz polarizada devido a posição da direção de vibração do analisador em relação ao polarizador.

(mas não de tungstênio-halogênio) são similares quanto a forma e tendem a diminuir a intensidade com o passar do tempo e formar uma deposição na parte interna do bulbo devido ao tungstênio evaporado do filamento. A temperatura da cor¹³ destas lâmpadas varia de acordo com a voltagem, mas é sempre em torno de 2200 a 3400K.

As modernas lâmpadas de tungstênio têm as seguintes vantagens: pequena dimensão, alto brilho, uniformidade na iluminação, maior tempo de vida útil e grande economia. Além disso, o uso de um halogênio, normalmente iodo, garante que não haja deposição de tungstênio na parte interna do bulbo.

b) Lâmpadas em arco:

Lâmpadas em arco de vapor de mercúrio, xenônio e zircônio são também usadas como fonte de iluminação.

Lâmpadas em arco de mercúrio (outras vezes chamadas de queimadores) possuem uma potência variando entre 50 e 200W e consistem usualmente de dois eletrodos selados sob alta pressão em um invólucro de vidro de quartzo. Estas lâmpadas não emitem o espectro completo entre o ultravioleta próximo e o infravermelho. O espectro está deslocado para o ultravioleta próximo, apresentando picos em 313, 334, 365, 406, 435, 546 e 578 nanômetros. Elas são usadas em microscopia por fluorescência e na fotomicrografia em branco e preto. Estas lâmpadas têm uma vida média de 200 horas.

Lâmpadas em arco de xenônio têm mais linhas no espectro visível do que as lâmpadas de mercúrio, mas menor intensidade. São deficientes na região do violeta e o espectro está deslocado para o infravermelho e, portanto, há uma grande produção de calor. A vida útil é muito maior do que das lâmpadas de vapor de mercúrio.

Lâmpadas em arco de zircônio produzem uma fonte quase pontual de iluminação e têm uma temperatura da cor em torno de 3200K. Enquanto estas lâmpadas não emitem grande intensidade, elas produzem um espectro contínuo dentro da faixa de variação.

¹³ Ver no Apêndice G.

c) Laser

Atualmente há um grande uso de lasers como fonte de iluminação em particular o de argônio. São muito usadas em microscopia por varredura (microscopia confocal).

3.2.2.OBJETIVAS:

Dos pontos focais o mais próximo do objeto é chamado de ponto focal frontal (*front focal*). O outro, mais próximo da porta-objetiva, é chamado de ponto focal posterior (*rear focal*). Os raios de luz que saem da objetiva pela parte posterior são restritos por uma abertura chamada pupila de saída. Seu tamanho determina a abertura numérica e consequentemente a resolução (menor distância entre dois pontos que um sistema óptico pode distinguir) da objetiva.

A Figura 3-5 apresenta um esboço das três principais lentes objetivas existentes hoje.

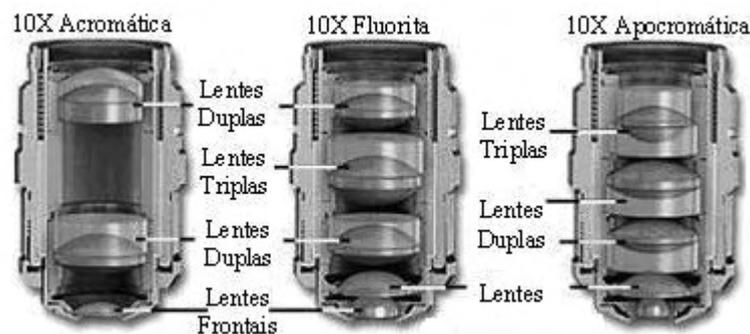


Figura 3-5: Esboço das principais lentes usadas em microscópios ópticos. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>

3.2.2.1.ACROMÁTICAS:

As mais baratas e comuns são as lentes acromáticas. Estas objetivas são corrigidas para aberração cromática axial em dois comprimentos de onda (azul e vermelho, em torno de 486 e 656 nm, respectivamente). Além disso, objetivas acromáticas são corrigidas para aberração esférica na cor verde (546 nm).

3.2.2.2.CORRIGIDAS PARA CAMPO PLANO:

Nos últimos anos, os fabricantes produzem objetivas que corrigem a curvatura de campo e esse artefato é proporcional ao grau de ampliação da lente. Para corrigir isso são usadas lentes corrigidas para campo plano. Os termos usados para designar essas lentes são planacromática, planfluorite ou planapocromática.

3.2.2.3.SEMICROMÁTICA OU FLUORITA:

Existem as objetivas chamadas semi-acromática ou fluorita, este último termo é usado devido ao uso deste mineral na composição original. Corrigem mais de um comprimento de onda. Elas corrigem cromaticamente para o vermelho e verde e esfericamente para duas ou três cores. O maior grau de correção que estas objetivas possuem permite serem fabricadas com maiores aberturas numéricas resultando em imagens com brilhos maiores, em maior poder de resolução e maior contraste.

3.2.2.4.APOCROMÁTICAS:

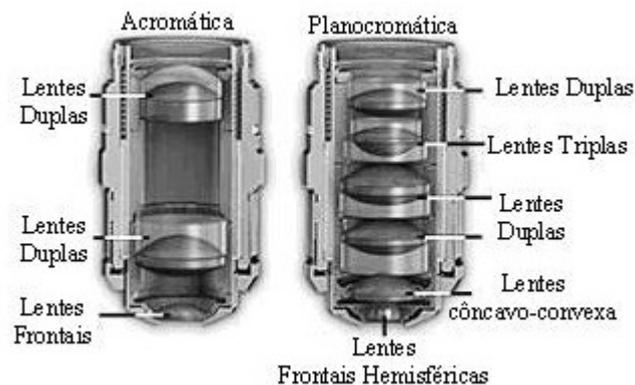


Figura 3-6: Lentes planacromáticas comparadas com lentes acromáticas.
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>

E finalmente existem as apocromáticas (Figura 3-6). Estas são as objetivas mais corrigidas de todas. Tradicionalmente essas lentes são corrigidas para três cores (vermelho, verde e azul) quase eliminando a correção cromática, e são corrigidas

esféricamente para dois ou três comprimentos de onda diferentes. Possuem os maiores valores de abertura numérica.

3.2.2.5.ESPECIFICAÇÕES E IDENTIFICAÇÃO:

O conhecimento, mesmo que superficial, das especificações e seus significados na área de microscopia óptica tem grande interesse prático. Destacam-se hoje 4 grandes fabricantes de componentes ópticos (Zeiss, Leica, Nikon e Olympus) cada um com um conjunto de nomes diferentes para os seus produtos. Portanto, saber o que significam e quais são, pelo menos a maioria (ver apêndice E), das especificações usadas torna-se necessário para que o usuário saiba qual produto é mais adequado para sua aplicação.

As principais características das objetivas descritas nas especificações são (<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>, INOUÉ e SPRING, 1997):

- **Diâmetro do campo:**

O diâmetro do campo visto pelo usuário em um microscópio é expresso pelo número do campo de visão (*field number, FN*) ou simplesmente número de campo. Para determinar o diâmetro no objeto basta dividir FN pela ampliação da objetiva.

- **Profundidade de campo (*depth of field*):**

A região do espaço que a objetiva pode focalizar sem apreciável mudança nas bordas é dado pelo campo de profundidade, ver Figura 3-7. Usualmente, este valor é inversamente proporcional à abertura numérica da lente.

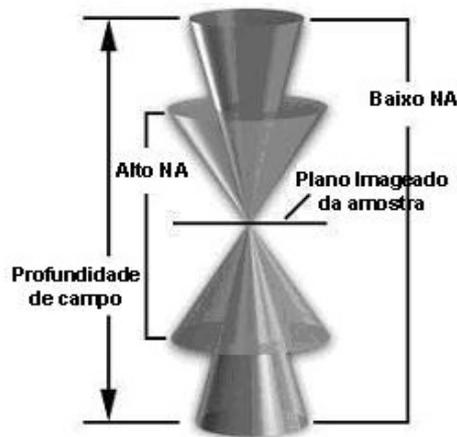


Figura 3-7: Representação da faixa de variação da profundidade de campo de uma lente.

- **Objetivas paracêntricas:**

Quando um conjunto de lentes do porta objetivas é configurado para projetar imagens aproximadamente em um mesmo plano as lentes são chamadas de parafocais ou paracêntricas.

- **Distância de trabalho:**

Esta é a distância entre as lentes e o topo do vidro de cobertura quando a amostra está em foco. Nem sempre há indicação da distância de trabalho. Geralmente, objetivas projetadas para ar como meio possuem grande distância de trabalho, caso contrário, esse valor também cai. Os valores variam de, por exemplo, 0,17 a 30 mm.

- **Abertura numérica:**

A abertura numérica é a medida da habilidade de capturar luz e definir detalhes de uma amostra de uma objetiva. A Figura 3-8 mostra um exemplo de abertura numérica.

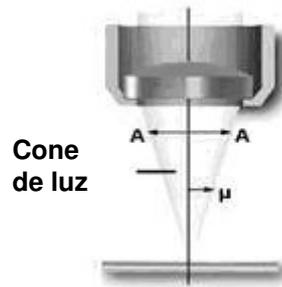


Figura 3-8: Ilustração onde se destaca a abertura angular do cone de luz capturado por uma lente.

O ângulo μ é a metade da abertura angular A e está relacionado com a abertura numérica através da fórmula

$$\text{Abertura numérica} = n \cdot \sin \mu \quad (3-3)$$

onde n é o índice de refração do meio entre o meio e a amostra.

Considerando o ar como meio de imageamento, podemos constatar teoricamente que a abertura numérica máxima é 1. No entanto, por razões de fabricação não há como atingir valores de abertura numérica acima de 0,95. A saída é usar um meio de índice de refração maior como a água (1,33), glicerina (1,47) ou o óleo (1,51).

- **Ampliação:**

As ampliações são impressas no tubo das oculares/objetivas e são nominais¹⁴. Portanto, o usuário deve calibrar as imagens com o auxílio de um régua calibradora colocada no plano da amostra com o objetivo de determinar a ampliação real do sistema de imageamento.

¹⁴ Esta ampliação pressupõe que a imagem esteja focalizada no infinito.

- **Colares de correção:**

Estes dispositivos fazem parte das objetivas que são usadas quando a amostra é protegida por um vidro de cobertura. O vidro converge os raios provenientes da amostra, porém introduz aberrações cromática e esférica que devem ser corrigidas pela objetiva. O grau que a luz é convergida é determinada pelo índice de refração, dispersão e espessura do vidro¹⁵. Isso tudo faz com que o microscopista não consiga focalizar todas as regiões ao mesmo tempo.

Para corrigir isto, algumas objetivas apocromáticas são montadas com colares de correção que permitem corrigir aberrações esféricas devido a variações na espessura do vidro.

A correção é obtida pela rotação do colar que movimenta dois dos grupos de lentes da objetiva.

A espessura padrão para vidros de cobertura é 0,17 mm e sua designação é dada por 1½ vidros de cobertura. Porém, nem todos 1½ vidros possuem tal precisão variando de 0,16 a 0,19 mm.

- **Meio de imersão:**

Objetivas de baixa ampliação têm abertura numérica relativamente baixa e são projetadas para serem usadas secas com o meio ar entre ela e o vidro.

No entanto, a abertura numérica de uma objetiva pode aumentar dramaticamente ao se usar objetivas projetadas para trabalhar em meios como óleo¹⁶, glicerina e água. Ao usar um meio com índice de refração semelhante ao do vidro de cobertura, as degradações da imagem devido ao vidro são praticamente eliminadas. A luz que passa pela amostra encontra um meio homogêneo entre o vidro de cobertura e o óleo de imersão e são pouco refratados (Figura 3-9).

¹⁵ Que varia de 0,13 a 0,22 mm.

¹⁶ Óleos de imersão possuem índice de dispersão igual a 1,51. Valor muito similar ao do vidro de cobertura.

O uso dessas lentes sem o óleo entre a lente e o vidro acarreta em imagens com artefatos. Isto devido ao fato que a refração que ocorre na superfície da lente frontal que introduz aberração esférica não é corrigida pelo conjunto posterior de lentes.

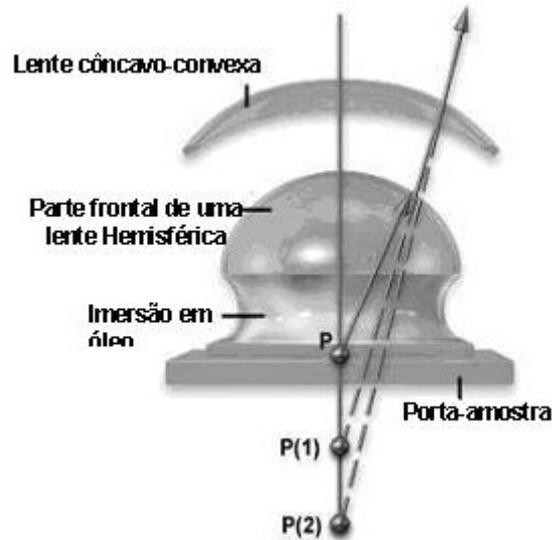


Figura 3-9: Detalhe da região da objetiva que fica imersa em óleo. No centro há destacado o eixo óptico onde estão alguns dos pontos objetos (P) pela objetiva da amostra observada. Extraída de <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>

- **Filmes anti-reflexão:**

Não variando a abertura numérica e ampliação da objetiva, bem como a intensidade de iluminação, os valores de brilho da imagem dependem de como a transmissão da luz é feita.

A transmissão da luz depende da transmitância (intensidade de luz transmitida como porcentagem da luz incidente) dos componentes ópticos. Ela varia em função do comprimento de onda da luz incidente e do material que o compõem. Fora da região do visível há uma queda considerável da intensidade transmitida. Ocorrem também perdas por reflexão nas interfaces ópticas, nos filtros, polarizadores e outros elementos ópticos auxiliares.

Todas as superfícies na interface vidro-ar refletem luz que acarreta na diminuição da transmissão. As modernas objetivas de alta abertura numérica possuem

de 10 a 12 interfaces ar-vidro, se considerarmos uma perda média de 4% em lentes não tratadas, isso significaria uma transmissão de apenas 52%. Com o aumento do ângulo de incidência, a perda por reflexão aumenta (daí também a necessidade de ter raios paraxiais). O vidro não tratado chega a refletir de 4 a 6% da luz incidente perpendicular a normal do ponto de incidência. Ao se tratar (única camada) a perda pode cair para menos de 1%. Tratamentos anti-reflexão multicamadas podem reduzir abaixo de 0,1% a reflexão.

A Figura 3-10 é uma representação dos raios de luz passando e refletindo pelo filme antireflexão (um quarto de onda de espessura) e o vidro. Os raios de luz incidem na primeira camada são refletidos parcialmente. A parte transmitida é novamente refletida pela interface n_3-n_4 e interferem construtiva e destrutivamente com as parcelas refletidas anteriormente. Como a maioria da luz incide perpendicularmente na lente, em torno de 99% é transmitida. Estes filmes são facilmente danificados e todo cuidado é pouco ao se limpar as superfícies externas das lentes.

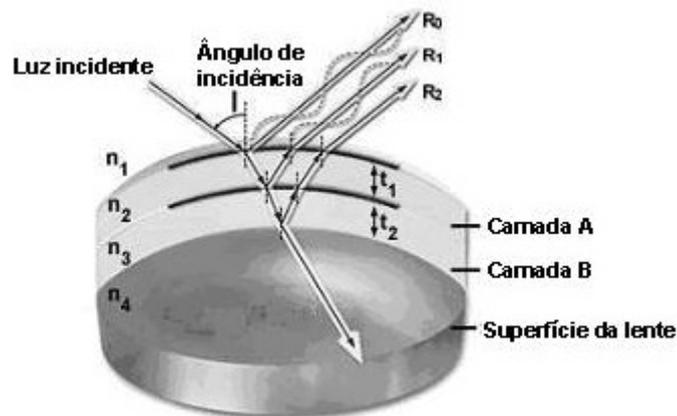


Figura 3-10: Geometria dos filmes anti-reflexão, extraída de <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>

A identificação se o filme antireflexão é simples ou multicamada é feita através da cor observada na lente: verde claro camada simples, púrpura claro multicamada.

3.2.2.4. OCULARES:

Quando o usuário observa a amostra pela ocular, a ampliação do sistema de imageamento é dada pelo produto entre os valores nominais de ampliação da ocular e a objetiva.

As oculares podem ter a inscrição UW de *Ultra wide* que indicam um maior campo de visão. Outra designação que algumas oculares possuem é a letra H que indica alto ponto focal que permite aos microscopistas usarem óculos enquanto observam o objeto. Outras inscrições são WF para *Wide-Field*; UWF para *Ultra Wide-Field*; SW e SWF para *Super Wide-Field*; HE para *High Eye point*; e CF ou Plan para oculares usadas com objetivas corrigidas para curvatura de campo (INOUE e SPRING, 1997).

Como as soluções para corrigir as lentes objetivas e oculares variam entre fabricantes é sempre recomendado que o microscopista use as recomendações do mesmo. O que ele pode fazer é escolher com muito cuidado a objetiva e daí estabelecer a ocular.

Oculares são fabricadas em uma faixa ampla de ampliações que vai de 6,5X a 25X. Ao usar objetivas de alta ampliação várias regiões de uma amostra podem se apresentar fora de foco ocorrendo o problema chamado de *empty magnification*. Para evitar isso os fabricantes têm limitado as oculares com ampliações variando apenas de 10X a 20X (<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>).

3.2.3.DETETORES DIGITAIS:

Os detetores digitais são extremamente importantes, pois determinam quais estruturas serão visíveis e em que grau resolvidas.

O número de opções no mercado é muito grande tornando o processo de escolha e o entendimento das influências nas imagens difíceis. Existem quatro grandes fabricantes no mercado de fotossensores no mercado Kodak, Marconi, Philips e SITE.

Portanto, o conhecimento básico de como funcionam torna-se necessário. Os parâmetros que estabelecem as diferenças entre eles são (PIRARD, 1999):

- **Sensibilidade espectral:**

Dá a intensidade do sinal produzido pelo fotosensor como função do comprimento de onda da luz incidente. Este gráfico muitas vezes é chamado de eficiência quântica e determina qual o melhor espectro para iluminar a amostra bem como a objetiva a ser usada, ou seja, o usuário deve usar uma fonte de luz que produza um espectro semelhante ao da câmera e um determinado comprimento de onda deste espectro para o qual a objetiva possua correção das aberrações ópticas (ver item 3.2.2. deste capítulo).

- **Resolução:**

Antes de estabelecer o que é resolução¹⁷ é necessário definir contraste pois estes conceitos estão intimamente relacionados (STELZER, 1998). Este conceito é estabelecido como a distância entre o maior e o menor valor da Função de Transferência Óptica (ver Apêndice B) de padrões para um determinado sistema de imageamento.

Quanto à resolução de um microscópio, existem vários critérios encontrados na literatura:

- Distância de corte: é a distância abaixo da qual dois objetos não podem ser distinguidos. O critério de Sparrow define a resolução a partir dessa distância.
- Critério de Rayleigh: propõe usar a distância em que o contraste é de 26,4% como resolução. Esta distância corresponde à distância do primeiro mínimo do disco de Airy (Apêndice D).
- A área abaixo da curva contraste versus frequência: pode ser usada como critério de resolução.

¹⁷ Existe o termo resolução espacial que está relacionado ao número de pixels para construir da imagem digital.

Estabelecida a resolução, o contraste também acaba sendo definido, ou seja, a diferença entre o pico e o ponto de cruzamento do imageamento de dois pontos objeto é função da resolução adotada (ver Apêndices B e D para entender como são feitas as medidas de resolução e, portanto, de contraste)

Diante desses vários critérios, portanto, não existe o melhor. Qualquer contraste entre 0 a 99% pode ser usado como critério de resolução.

Com relação ao CCD, o número de fotodiodos e o tamanho relativo da imagem projetada na superfície do mesmo estabelecem a resolução final do sistema de imageamento microscópio/CCD. Na prática para determinar a resolução basta estabelecer a escala de calibração para um determinado conjunto objetiva/CCD a partir do imageamento de uma régua calibradora e usando o comando SET SCALE da plataforma ImageJ.

- **Ruído:**

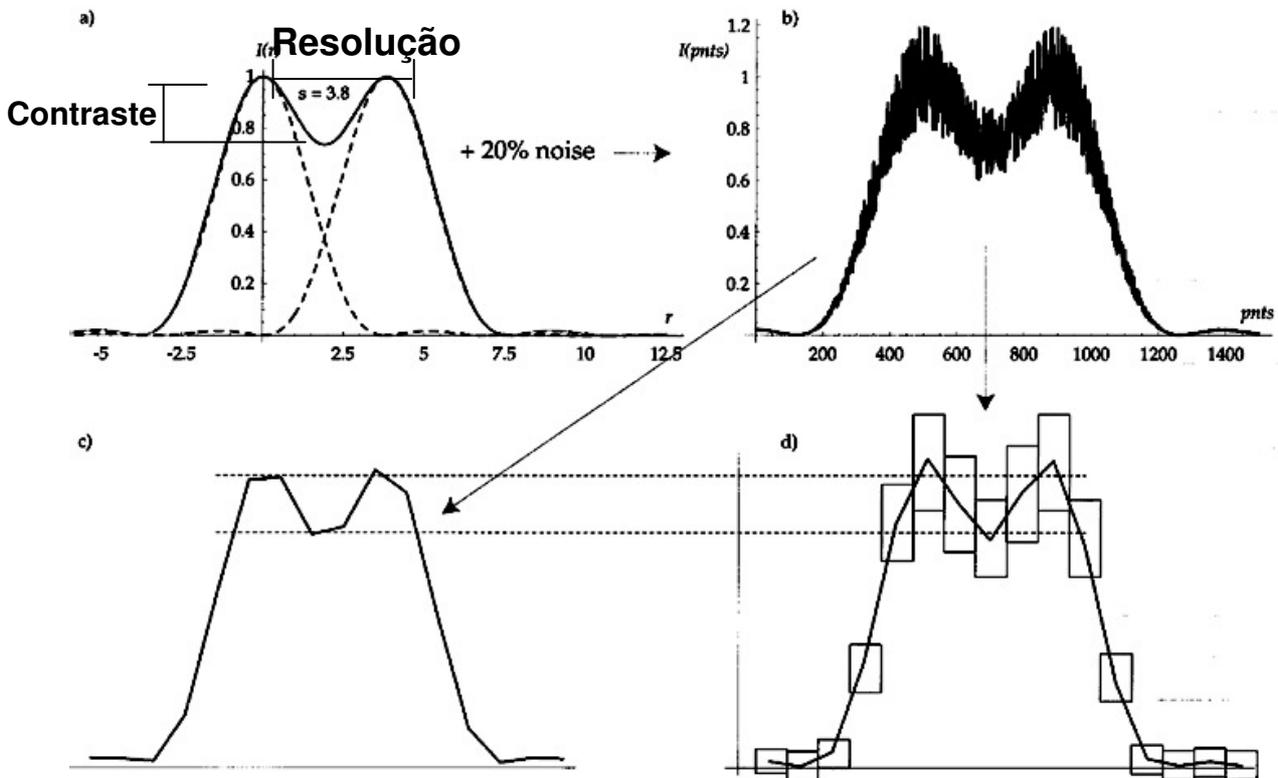


Figura 3-12: Esboço da curva de espalhamento de ponto: a) sem ruído, b) com 20% de ruído, c) novo perfil da curva devido ao ruído e d) imprecisão introduzida pelo ruído nas medidas de contraste e resolução (STELZER, 1998).

Este fator reduz a resolução devido à alteração no perfil da Função de Transferência Óptica o que leva a uma redução no contraste (Figura 3-12). Conseqüentemente há uma diminuição na frequência de corte. Limitar o ruído através da captura de um número significativo de imagens de uma mesma região para estabelecer uma imagem com os respectivos valores médios de brilho diminui seus efeitos.

O ruído pode ser originado no próprio CCD devido a corrente de escuro ou a fatores externos ao CCD como, por exemplo, o formato do arquivo. Alguns formatos possuem algoritmos de compressão que alteram a distribuição de brilho (SEDEWICK, 2002). Isto pode ser verificado no capítulo sobre a reconstrução a partir do foco.

- **Faixa Dinâmica:**

A energia luminosa proveniente do objeto (intensidade radiante) é imageada por um dispositivo analógico ou digital. A matriz de pixels que forma a imagem digital é então estabelecida com cada pixel possuindo seu valor numérico (brilho)¹⁸. Se 4 bits são usados existem 16 níveis de brilho possíveis na imagem (2^4). O nível mais baixo é designado para a cor preta enquanto o mais alto para o branco¹⁹. Os níveis intermediários são níveis de cinza. Todos esses níveis combinados formam a escala de cinza.

Faixa dinâmica é definido como a razão entre o máximo do sinal²⁰ adquirido e o ruído da câmera. A faixa dinâmica (FD) é determinada pela equação

$$FD = 20 \cdot \log \left(\frac{N_{\text{sat}}}{N_{\text{ruído}}} \right)$$

¹⁸ A quantidade de algarismos significativos de cada pixel é chamado, em inglês, de *bit¹⁸ depth*

¹⁹ Existem alguns *softwares* que estabelecem o contrário.

²⁰ Também chamado de *full well capacity* do CCD e corresponde ao total de elétrons armazenado no fotosensor do CCD.

onde N_{sat} é a capacidade total do poço (ou *full-well capacity*) dado em número de elétrons, $N_{\text{ruído}}$ é o valor total do ruído também dado em elétrons.

Se a faixa dinâmica for diminuída significa que o ruído aumentou ou o sinal diminuiu. Isto leva a uma redução na frequência de corte (observe a linha pontilhada horizontal que corta a Função Transferência de Contraste²¹ da Figura 3-13) e na capacidade de resolução²².

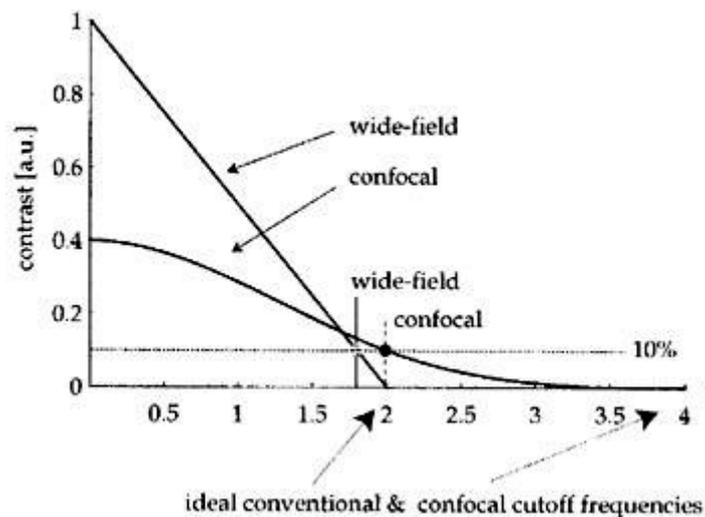


Figura 3-13: Esboço da influência da diminuição da faixa dinâmica nas curvas de CTF (STELZER, 1998).

- **Ganho (*gain*) e mínimo (*offset*) da câmera.**

Estes parâmetros (Figura 3-14) determinam a curva de conversão do sinal elétrico medido nos pixels do CCD em brilhos da imagem e normalmente podem ser configurados pelo usuário do CCD. O objetivo de configurar esses parâmetros é resgatar a homogeneidade²³ de iluminação prejudicada devido a defeitos de fabricação do CCD (STELZER, 1998).

²¹ Ver o significado no apêndice B.

²² Há na literatura uma confusão com o termo resolução. Em momentos se refere ao aspecto quantitativo e em outros ao qualitativo da resolução. MANNHEIMER (2002) diferencia, respectivamente, estes através dos termos resolução e capacidade de resolução. Adotados neste trabalho.

²³ O termo se refere ao caso ideal em que ao imagear uma amostra plana a imagem resultante deve ter somente valores iguais a 255.

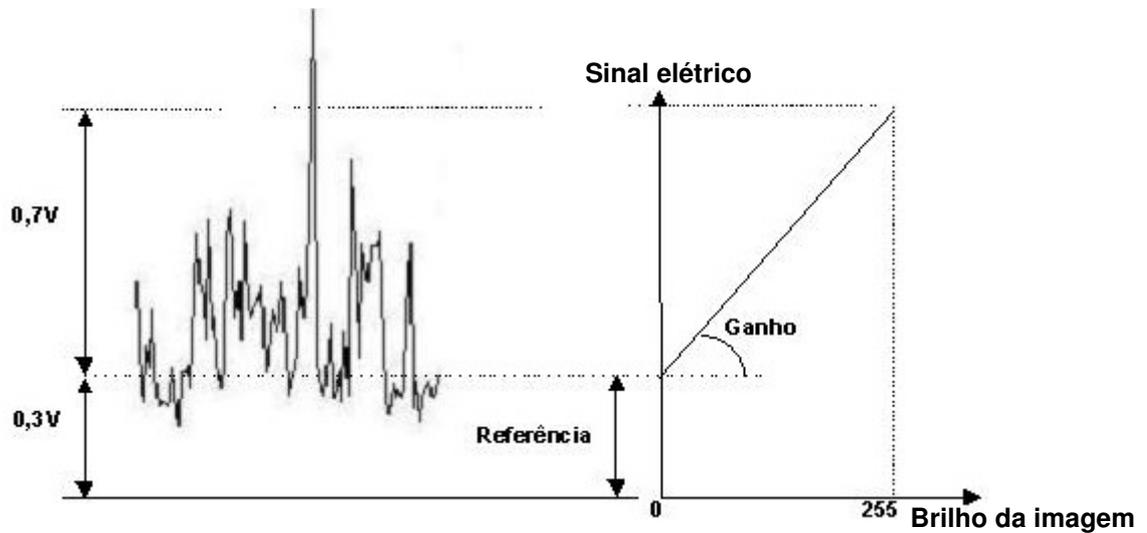


Figura 3-14: Esboço da curva de conversão sinal elétrico para níveis de um canal (PIRARD, 1999)

O valores do mínimo e do ganho deve resultar em uma curva de conversão que englobe a maior parte da intensidade do sinal elétrico medido para permitir uma distribuição de brilho da imagem mais dispersa. Esta imagem resultante possui um maior contraste e conseqüentemente maior capacidade de resolução.

- **Capacidade de armazenamento de elétrons ou buracos²⁴ (*full-well capacity*):**

Determina a quantidade de elétrons que podem ser armazenados. Um maior valor diminui a possibilidade de ocorrer saturação no brilho da imagem, pois diminui a probabilidade de que um grande número de pixels tenham o sinal convertido para branco (Figura 3-14).

- **Curvas de saturação do brilho:**

O brilho obtido para um determinado comprimento de onda varia em função do tempo até que haja a chamada saturação e esta variação não mais ocorra. As curvas de saturação podem ser estabelecidas através de imagens capturadas em função do tempo e com iluminação de um único comprimento de onda.

²⁴Um buraco é gerado toda vez que o silício perde elétrons. A maioria dos CCDs medem a geração desses buracos, no entanto, é usual nos textos sobre CCD utilizar indistintamente os dois termos.

Portanto, durante o uso de um CCD o usuário deve pré-aquecer a câmera para atingir a região de saturação. Caso contrário, a Curva de Transferência de Contraste que define a resolução varia com tempo.

- **Intervalo de amostragem ou *Pixelation*²⁵:**

O detector não identifica pontos, mas áreas da imagem. Portanto, não há como se obter a intensidade nula. Dessa forma, o contraste é reduzido. Além disso, a distância de corte é aumentada e conseqüentemente a resolução é diminuída. Logo com o uso de uma câmera com detector CCD nunca obteremos a resolução teórica dada pela expressão de Rayleigh.

Para diminuir este efeito é comum concluir que é melhor usar câmeras com um número maior de pixels como em RUSS (1997), observe a Figura 3-15. No entanto, a frequência espacial²⁶ que pode ser observada na imagem já é limitada pela objetiva devido aos efeitos de difração. Portanto, se muitos pixels são usados para amostrar o objeto nenhuma informação espacial adicional é acrescentada e a imagem é dita super amostrada (*oversampled*). Além disso, a maioria das câmeras digitais acopladas aos microscópios modernos e outros instrumentos ópticos têm um intervalo fixo de amostragem que não pode ser ajustado pelo usuário²⁷. A capacidade da câmera digital em capturar todos esses detalhes depende do intervalo de amostragem do que é observado. Objetos vistos no microscópio que são menores que este intervalo não são representados adequadamente pela sistema de captura. O critério de Nyquist requer que o intervalo de amostragem seja igual a duas vezes a maior frequência espacial encontrada na amostra para correta representação. Uma medida equivalente é o teorema de amostragem de Shannon, nele o intervalo de amostragem não deve ser maior que a metade da menor distância resolvida pelo microscópio.

²⁵ O tamanho de um pixel do CCD pode ser alterado pelo processo chamado de *binning* em que a carga de um conjunto de pixels é tratada como se fosse produzida por um único e maior fotodiodo.

²⁶ A taxa de variação entre as transições de brilho é conhecida como frequência espacial.

²⁷ O ajuste da resolução espacial do detector é chamado de *binning*.

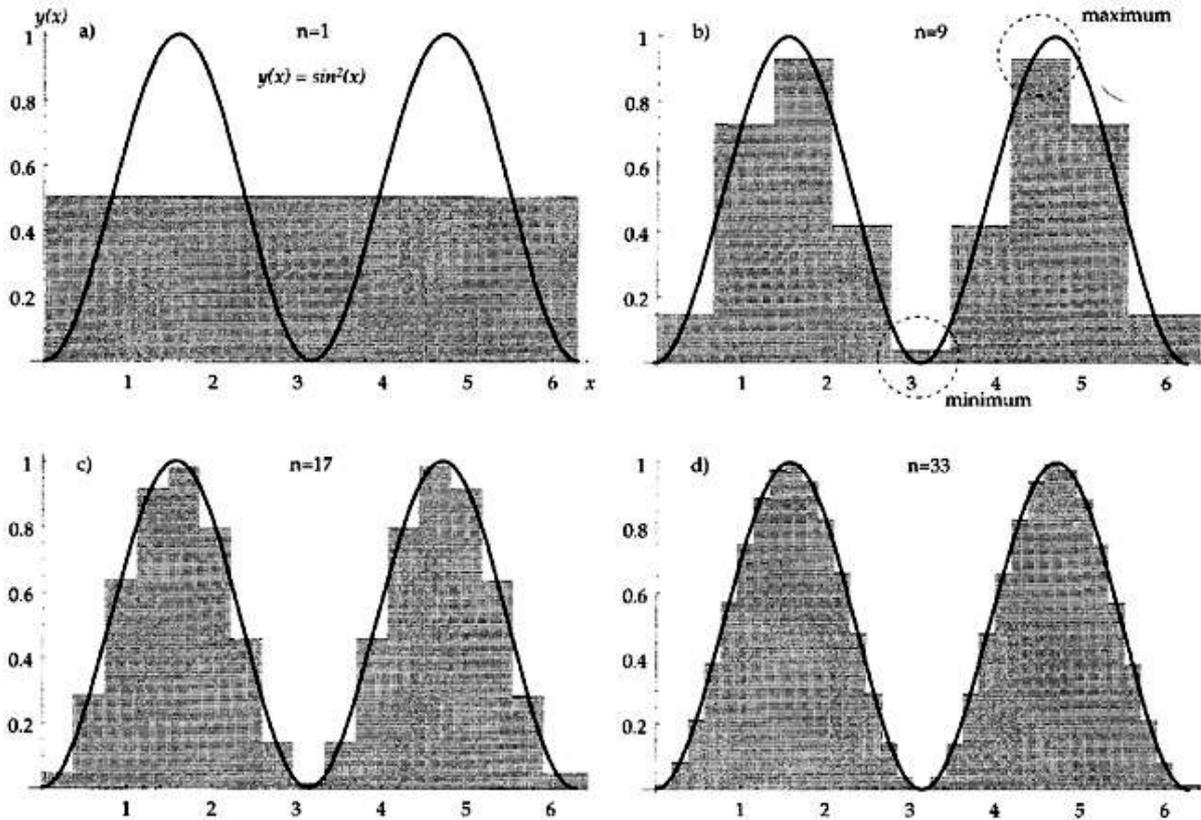


Figura 3-15: Esboço do efeito do aumento do número de pixels na função de espalhamento de ponto. (STELZER, 1998)

Existe também um número mínimo necessário para estabelecer uma determinada resolução e evitar a subamostragem. Quando a imagem é subamostrada o resultado é a perda de detalhes e o fenômeno de *aliasing*. Objetos contendo espaços regulares, formatos repetidos exibem franjas de moiré devido ao mesmo fenômeno.

- **Curva de resposta da câmera**

A curva de resposta da câmera define como o CCD transforma uma porcentagem da luz transmitida em níveis de cinza. Não podemos comparar resultados de um mesmo processamento realizado em imagens obtidas em CCDs com respostas diferentes pois a distribuição de brilho das imagens não correspondem. Para verificar a curva é necessário imagear uma amostra plana. Posteriormente, sem mudar a voltagem da lâmpada usar outros padrões com reflectância ou filtros com curvas de transmissão conhecidos para plotar os níveis de cinza de uma parte de um conjunto de imagens de

uma mesma região sempre com as mesmas coordenadas (centro, por exemplo) e depois obter uma imagem com valores médios (PIRARD et al., 1999):

3.2.3.1.FOTOMULTIPLICADOR:

A luz ao entrar no tubo incide no fotocátodo e elétrons são liberados, por exemplo do Ga-As-P. Esses elétrons são multiplicados após incidirem nos dinodos e o resultado é uma corrente elétrica proporcional ao número de fótons e a queda de voltagem ao longo dos dinodos. A sensibilidade espectral depende da composição química do fotocátodo, por exemplo há dispositivos compostos que são sensíveis de 300 a 800 nm. Devido a não armazenarem as cargas e responderem a mudanças no fluxo de luz no intervalo de alguns nanossegundos eles são usados em eventos que ocorrem rapidamente (<http://micro.magnet.fsu.edu/primer>).

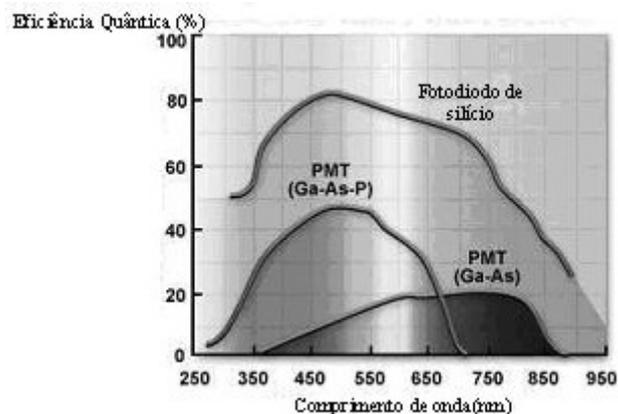


Figura 3-16: Exemplos de eficiência quântica (%) versus comprimento de onda de alguns fotossensores. Adaptado de <http://micro.magnet.fsu.edu/primer>

Na Figura 3-16 existem algumas curvas típicas de sensibilidade em função do comprimento de onda de três detectores. As duas curvas mais baixas descrevem fotocátodos compostos por ligas de Ga-As-P (Gálio-Arsênio-Fósforo) e Ga-As (Gálio-Arsênio) enquanto a terceira curva é de um fotodiodo de silício explicado no item 3.2.3.2. deste capítulo.

3.2.3.2.DETETORES DE ESTADO SÓLIDO:

Detetores de estado sólido são compostos por uma matriz de fotodiodos que precisam de regiões para armazenamento da carga produzida após a incidência do fóton. Devido a necessidade de acumular a carga são dispositivos usados em fenômenos mais lentos (milisegundos) do que os fotomultiplicadores. Essa carga armazenada produzirá um sinal elétrico proporcional ao brilho que o pixel possui (ver item 3.2.3.1 neste capítulo). Existem três variações desta configuração básica: *charge-coupled device* (CCD), *charge-injection device* (CDI) e *complementary-metal-oxide-semiconductor* (CMOS). Detalharemos mais o CCD pois foi o detector usado neste trabalho.

Fotodiodos de silício respondem rapidamente, mas não têm o ganho correspondente ao dos multiplicadores de elétrons dos fotomultiplicadores. Possuem resposta em todo o espectro visível com alta eficiência quântica (em torno de 80 a 90%). A uniformidade de resposta da superfície, a faixa dinâmica e a velocidade de resposta é a maior do que dos fotomultiplicadores. No entanto, também possuem altos valores de ruído.

O CCD possui um amplificador no canto da matriz de fotossensores e a carga armazenada é sequencialmente transferida através de registradores paralelos até chegar ao amplificador de saída.

Dois arquiteturas básicas de CCD existem para se obter taxas rápidas de transferência de carga²⁸: *interline-transfer* e *frame-transfer* (Figura 3-17). O *interline-transfer* CCD incorpora os canais de transferência de carga (*interline masks*) imediatamente adjacente a cada fotodiodo. Esta arquitetura permite fechar os fotodiodos através da alteração da voltagem então as cargas geradas são injetadas no substrato antes de ir para os canais de transferência. Estes dispositivos possuem um “dreno” de elétrons para evitar o *blooming*²⁹ e são usualmente equipados com

²⁸ A transferência de carga não é um problema tão grande quando se trata de trabalhos que não exigem rápido imageamento. No entanto, podemos citar que nas fotogrametrias aéreas, câmeras com rápidas transferência de carga e posterior armazenamento da imagem são mais adequadas para o serviço pois podem permitir uma única passagem na região a ser fotografada (AMORIM, 2000)

²⁹ É o acontece quando há a carga acumulada excede o valor total de capacidade do fotodiodo e extrapola para outros fotossensores.

microlentes para permitir uma maior coleta de fótons pelo fotodiodo aumentando o fator de preenchimento de carga e portanto eficiência quântica.

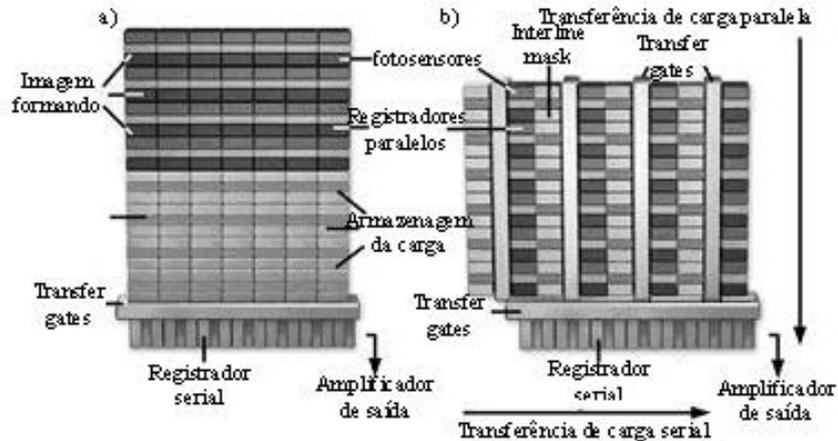


Figura 3-17: Esboço da arquitetura usada em CCDs, a) *frame transfer* e b). *interline transfer*. Adaptado de <http://micro.magnet.fsu.edu/primer>

O *frame-transfer* CCD é dividido em duas partes. Uma delas é descoberta e é onde a luz incide para produzir as cargas que são rapidamente acumuladas na outra parte para posterior transferência ao registrador serial de saída. Logo, enquanto o sinal é integrado na parte iluminada a carga é armazenada fora.

A escolha por uma das arquiteturas reside no tempo de aquisição. O *interline transfer* possui menor tempo.

A uniformidade³⁰ de um CCD típico é de menos de 10%. No entanto, sombreamento pode ser introduzido devido a deficiências na transferência de carga. A operação de um CCD requer que todo pacote de carga de um fotodiodo seja transferido ao amplificador de saída. Esta transferência é acompanhada por uma série de deslocamentos paralelos e sequenciais ao longo do CCD até o amplificador de saída. O deslocamento pode não ter uma eficiência de 100% e parte da carga produzida no pixel se perde aumentando a possibilidade de produzir regiões não nítidas na imagem

³⁰ Este termo é usado em microscopia incluindo vários conceitos como o ganho, diferenças no ruído e na amostragem em determinadas regiões (chamadas de *shading*) e variação espacial na eficiência da luz coletada ou transmitida.

correspondentes aos locais do CCD mais afastados do amplificador de saída. Esse efeito é diminuído através do resfriamento³¹ e de menores taxas de transferência.

3.2.3.3.DETETOR HUMANO VISUAL VERSUS CCD:

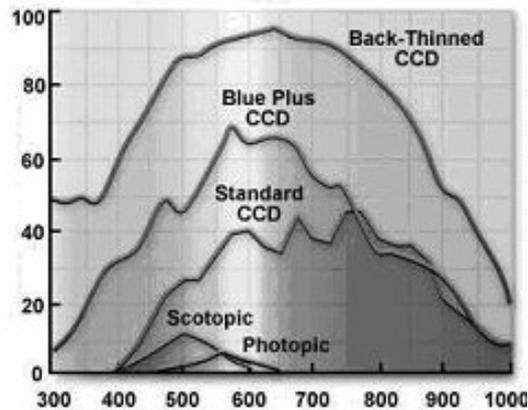


Figura 3-18: Esboço das curvas de sensibilidade espectral. Adaptado de <http://micro.magnet.fsu.edu/primer>

As duas últimas curvas da Figura 3-18 ilustram a sensibilidade espectral do olho, correspondente a visão diurna (*scotopic*) e noturna (*photopic*), respectivamente, dos cones e bastonetes. O maior valor está na região do verde (555nm da visão diurna e 507 nm da visão noturna) com uma eficiência quântica de, respectivamente, de 3 e 10%.

A resolução espacial do olho não é uniforme e a maior concentração se dá na fovea onde a resolução lateral é em torno de 1,5 μ m.

A faixa dinâmica é de aproximadamente 6 bits. A razão sinal ruído é de 3/1. O CCD para uso científico possui maior sensibilidade espectral, eficiência quântica, capacidade de integração, uniformidade, faixa dinâmica (mais bits) e razão SNR (*Signal Noise Ratio*), mas menor capacidade de resolução do que o olho humano (<http://micro.magnet.fsu.edu/primer>).

³¹ As câmeras CCD são resfriadas também para diminuir a corrente de escuro. Assim o tempo de exposição pode ser maior. Câmeras esfriadas são normalmente chamadas de varredura lenta (*slow scan*) pois a taxa de quadros (*frame rate*) é menor do que de câmeras de vídeo.

Este item foi acrescentado neste capítulo, pois o uso da visão humana como critério de tomada de decisão muitas vezes é questionada por pesquisadores que trabalham em processamento de imagens. No entanto, a partir da leitura da descrição dos métodos usados por pesquisadores em vários artigos podemos constatar o seu uso, mesmo eles não o citando. Além do mais, (EFFORD, 2000) cita que na ordem de alguns milhões de células fotorreceptoras na retina são responsáveis pela formação da imagem. A mesma ordem de grandeza, por exemplo, é encontrada no CCD usado neste trabalho.

3.3.EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO:

3.3.1.MICROSCÓPIO ÓPTICO NIKON EPIPHOT 200:

Das características que afetam a imagem encontram-se abaixo relacionadas aquelas que são mais importantes.

3.3.1.1. DESLOCAMENTO TOTAL DO PORTA OBJETIVAS:

Determina, no caso da reconstrução a partir do foco, a elevação máxima que se pode observar a partir da aplicação da rotina. O microscópio possui o valor de 6mm.

3.3.1.2.MENOR DESLOCAMENTO DO ANEL GRADUADO DO PORTA-OBJETIVAS:

Este valor tem um efeito na percepção do relevo semelhante ao fenômeno de amostragem para uma câmera digital. As elevações, devido a esse deslocamento, são discretizadas de 1 em 1 μ m (Manual Microscópio Epiphot 200) com precisão de 0,91 μ m (dada pela profundidade de campo da objetiva). Portanto, se a distância entre as elevações for menor que este valor (podemos comparar a uma espécie de frequência espacial vertical) não poderemos estabelecê-las.

A Tabela 3-1 mostra a especificação das objetivas CFI³² para modo refletido que o LAIMAT possui em uso no microscópio Nikon Epiphot 200.

Especificação	EPI Plan Apocromática		BD/DIC Plan Acromática					
	81836	81837	81849	81819	81811	81812	81813	81814
Ampliação	150	200	5	50X	10	20	50	100
Prisma DIC	-	A	C	-	A	A	A	A
AN	0,95	0,95	0,15	0,55	0,3	0,46	0,8	0,9
Distância de trabalho (mm)	0,2	0,2	12	8,2	7	3,1	0,54	0,39
Comprimento focal (mm)	1,33	1	40	4	20	10	4	2
Resolução (μm)	0,29	0,29	1,83	0,5	0,92	0,60	0,34	0,31
Profundidade de Campo (μm)	0,30	0,30	12,22	0,91	3,06	1,30	0,43	0,34

Tabela 3-1: Especificações das objetivas CFI da Nikon (www.nikonusa.com/bluelink/BDPlan/EPIPHOT200300.pdf).

3.2.2.DETETOR USADO NESTE TRABALHO: CÂMERA DIGITAL SPOT INSIGHT QE

Das especificações da câmera usada para obter as imagens do trabalho, as que afetam diretamente a distribuição de brilho e conseqüentemente as medidas são mostradas na Tabela 3-2.

³² CFI é a abreviação de *Chrome Free (Chromatic aberration-Free) Infinity*. Esta série possui os maiores valores de distância de trabalho, ampliação e abertura numérica disponíveis hoje.

Especificações da câmera Diagnostic Instruments Spot Insight-Color QE	
Câmera-filtro	Insigth Color-policromático
CCD	Insigth Color-KAI 2000 Mosaico colorido Área Imageada-11,8mm x 8,9mm Pixels ativos-1600x1200 (1,92 milhões) Pixels quadrados de 7,4µm de lado Capacidade do poço (<i>Full well capacity</i>) de 31500e
Resolução espacial	Imagem ao vivo-800x600 pixels Imagem capturada-1600x1200 pixels
Bits significativos (<i>bit depth</i>)	Amostrada a 30bits (RGB) Salva em formatos de 24, 36 ou 48 bits (RGB)
Taxa de quadros (<i>Frame rates</i>) imagem ao vivo	Insigth Color:15 quadros\segundo
Aquisição para o monitor	Insigth Color:<6s
AD-fundo de escala	31500e para um ganho (<i>gain</i>) igual a 1
Sinal\Ruído	58 dB
Fator anti- <i>blooming</i>	300 vezes (nominal) e 100 vezes (mínimo)
Exposição: Automática ou Manual	Faixa de 1 ms a 536 s
Lentes	Tipo “C”

Tabela 3-2: Especificações da câmera utilizada que influem na distribuição de brilho.

Esta câmera pode ser controlada por um dos softwares que a acompanham (*Spot Insight User Guide*): *Basic* ou *Advanced*. A diferença entre os dois é o número de configurações e ferramentas de edição que podem ser controladas pelo usuário. Para quem está iniciando, o primeiro já permite definir as mais importantes configurações para se capturar uma imagem a partir da caixa de diálogo *Image Settings*. Sempre que for realizar capturas em dias diferentes de uma mesma amostra verifique esta caixa para saber se houve alguma alteração por parte de algum outro usuário. A seguir há uma relação de itens do modo *Basic* da câmera *Insight Color* usada e a configuração recomendada pelo autor em imagens a serem usadas para estabelecer medidas.

- No item *Exposure* opte pelo *Manual* pois permite que se estabeleça a captura de imagens sob as mesmas condições. Em *Auto* o tempo do obturador do CCD é feito pelo software não permitindo ao usuário saber qual foi o seu valor. Em *Exposure*

Time o valor pode ser especificado entre 0,04ms a 526,746 s e dependerá da amostra.

- *Gain* permite optar por um dos valores: 1, 2, 4, 8, 16 ou 32 que definirá a fração (1,1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, respectivamente) da capacidade do fotosensor (*full well capacity*) que corresponderá ao valor de 255 de brilho.
- *Offset* da câmera não pode ser alterado. Já é definido na captura que os pixels que possuem brilhos iguais entre 20 são o *offset*.
- *Gamma* pode ser definido para valores de 0,1 a 4. Ele altera a distribuição dos valores de brilho da imagem original através da curva mostrada na Figura 3-19.

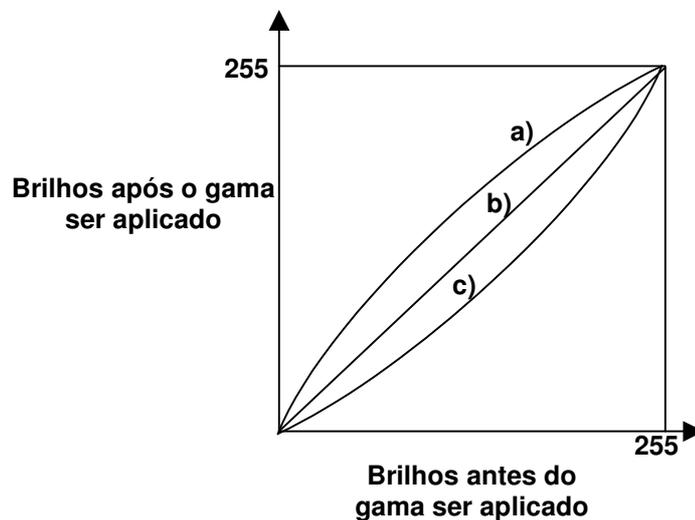


Figura 3-19: Esboço da curva gama: a) >1 , b) 1 e c) <1 .

Esse parâmetro é útil quando se quer tornar mais (>1) ou menos (<1) claras regiões na imagem que possuem valores de brilho que não estão nos extremos dos níveis de cinza.

- *Flatfield* este parâmetro deve ser usado para corrigir a iluminação não uniforme inerente ao tipo de CCD que a câmera possui: tipo Mosaico³³. Além disso, serve também para corrigir a não uniformidade ocasionada pelo microscópio. Esta correção trabalha armazenando uma imagem da região escura do porta-amostra através do comando *GetFlatfield Image*³⁴. Esta imagem então é usada para corrigir

³³ Neste tipo de CCD alguns pixels possuem um filtro vermelho, outros verde e azuis. Um pixel vermelho só tem condição de determinar a intensidade desse canal vermelho. Os outros dois canais são estabelecidos através da média dos pixels vizinhos ao vermelho que possuem as outras duas cores.

³⁴ Ela deve ser feita para cada objetiva.

o brilho da imagem da amostra capturada eliminando os efeitos da iluminação não-uniforme. É o que chamamos no capítulo sobre microscopia óptica de correção de fundo.

- *Noise Filter* checa cada pixel vermelho com oito pixels vermelhos vizinhos. Se nenhum deles possui valor de $\pm 15\%$ do valor primeiro pixel, este é substituído pela média dos outros oito. O mesmo procedimento é feito para os pixels verde e azul.
- *White Balance* Antes de qualquer sessão, após a alteração da voltagem da lâmpada ou da objetiva é necessário realizar a *White Balance*. Este parâmetro estabelece a razão de vermelho, verde e azul necessário para se obter a cor branca. Para realizá-lo selecione em *Image Type* o modo em que você está operando. Para cada modo um objeto referência diferente deve ser usado (ver manual da câmera), no caso de luz refletida substitua a amostra por um espelho e clique em *White Balance* e depois em *Begin*. Este valor ficará armazenado para aquele modo selecionado pelo usuário em *ImageType*.

3.2.3.FONTE DE LUZ:

A Figura 3-20 mostra o espectro de emissão da lâmpada usada no microscópio. Esta é uma lâmpada de Xenônio. A escolha residiu no fato de que ela possui um espectro mais amplo e a emissão mais distribuída no bulbo se comparados ao da lâmpada de tungstênio-halogênio.

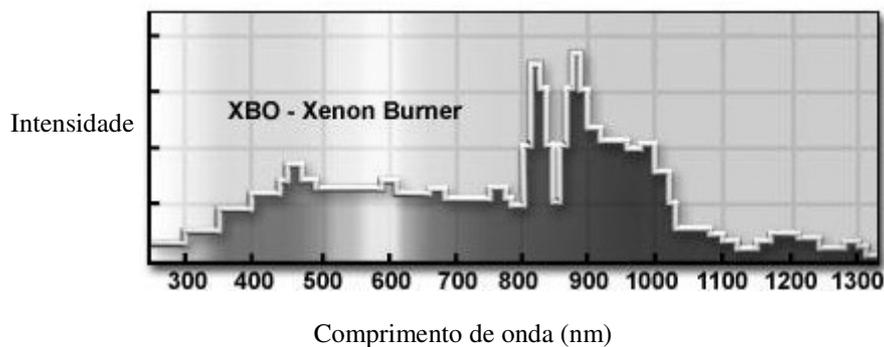


Figura 3-20: Espectro de emissão da lâmpada de Xenônio

Capítulo 4

RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO FOCO

4.1.INTRODUÇÃO:

O método tem como princípio o uso de um critério de foco e a literatura apresenta diversos usados em imagens de amostras com pouca textura. O critério de foco é um valor calculado a partir da aplicação de uma matriz sobre a imagem. Das definições existentes, usamos aquela que determina que em uma imagem desfocada as frequências espaciais presentes são tipicamente de valores baixos (a diferença entre os valores de brilho de uma região é baixa).

Portanto para determinar se uma imagem está em foco é necessário estudar as mudanças que ocorrem nas altas frequências ou bordas presentes nas imagens.

As principais características de um bom critério de foco que são encontradas repetidamente na literatura (GROEN et al.; FIRESTONE et al., GEUSEBROEK et al., BODDEKE et al.,1985, 1991, 2000, 1994) são:

- Unimodalidade: a curva de foco deve possuir um único máximo ou mínimo,
- Máximo ou mínimo delgado,
- Tamanho da pilha: deve ser tal que se possa identificar o pico da curva correspondente ao melhor foco.
- Versatilidade: a função de foco não deve se limitar a um tipo de imagem,
- Insensibilidade a outros parâmetros: a função não pode ser afetada caso hajam mudanças em outros parâmetros,
- Compatibilidade com sinal: é necessário que o critério de foco leve em conta o tipo de sinal que é gerado pelo sistema óptico/detector,
- Fácil implementação.

Vale ressaltar que os trabalhos específicos sobre critério de foco visam fornecer subsídios para a determinação de um algoritmo que possa ser usado em microscópio de foco automático. Neste caso os programas não devem se limitar a um tipo de imagem. No entanto, não há um algoritmo que funcione em qualquer situação. Deve ser oferecido ao usuário vários critérios de foco para que ele decida a partir das características citadas anteriormente.

Existem basicamente três grupos de critérios de foco na literatura (VALDECASAS et al., 2001) baseados: no pixel (*point based*), na área (*area based*) e na frequência (*frequency based*). Os critérios que resultam nas melhores curvas de foco em imagens com textura são baseados na área. Alguns desses critérios são apresentados a seguir:

- De acordo com (BODDEKE et al., 2001)

Quadrado do gradiente

$$CF = \sum_x \sum_y E \left\{ \left| \frac{\partial g(x, y)}{\partial x} \right| - \theta \right\}^2 \quad (4-1)$$

Laplaciano

$$CF = \sum_x \sum_y E \left\{ \left| \frac{\partial^2 g(x, y)}{\partial^2 x} \right| - \theta \right\}^2 \quad (4-2)$$

onde x e y são as coordenadas da imagem, θ é um limiar arbitrado pelo usuário e que no caso acima é estabelecido como sendo 0 (zero), $E(z) = z$ se $z \geq 0$ e $E(z) = 0$ se $z < 0$, $\partial g(x, y)/\partial x$ $\partial^2 g(x, y)/\partial^2 x$ são as derivadas parciais na direção x , CF é o critério de foco e $g(x, y)$ é o valor do brilho nas coordenadas (x, y) .

Estas funções podem ser calculadas por uma aproximação através de

$$\frac{\partial g(x, y)}{\partial x} \approx \frac{\Delta g}{\Delta x} = g(x, y) - g(x, y-1) \quad (4-3)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 g(x, y)}{\partial x^2} &\approx \frac{\Delta^2 g}{\Delta x^2} = \\ &= g(x, y+1) - 2g(x, y) + g(x, y-1) \end{aligned} \quad (4-4)$$

- De acordo com (VALDECASAS et al., 2002),

Sobel

$$S(i, j) = \sum_{i=0}^2 \sum_{j=0}^2 \sqrt{G_i^2(i, j) + G_j^2(i, j)} \quad (4-5)$$

para

$$G_i(i, j) = A(i, j) \times B(x_c, y_c) = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \times B(x_c, y_c) \quad (4-6)$$

e

$$G_j(i, j) = C(i, j) \times B(x_c, y_c) = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & 1 \end{bmatrix} \times B(x_c, y_c) \quad (4-7)$$

onde $G_j(i, j)$ é a componente de Sobel na direção y, $G_i(i, j)$ é a componente de Sobel na direção x. As multiplicações das Equações 4-6 e 4-7 são válidas para elementos das matrizes que são coincidentes e a matriz B é dada por

$$\begin{bmatrix} g(x_c - 1, y_c - 1) & g(x_c, y_c - 1) & g(x_c + 1, y_c + 1) \\ g(x_c - 1, y_c) & g(x_c, y_c) & g(x_c + 1, y_c) \\ g(x_c - 1, y_c + 1) & g(x_c, y_c + 1) & g(x_c + 1, y_c + 1) \end{bmatrix} \quad (4-8)$$

onde $g(x_c, y_c)$ é o valor de brilho do centro da região de onde é determinado o critério de foco e (x_c, y_c) são as coordenadas da região na imagem.

- De acordo com (FIRESTONE et al., 1991) são os métodos de Brenner e do desvio padrão

Brenner:

$$CF = \sum_x \sum_y [J(x+2, y) - J(x, y)]^2 \quad (4-8)$$

Desvio padrão:

$$CF = \sum_x \sum_y [J(x, y) - \mu]^2 \quad (4-9)$$

onde x e y são as coordenadas da imagem, $J(x, y)$ é o valor do brilho em um determinado par ordenado, μ é dado pela expressão

$$\mu = \frac{1}{MN} \sum_x \sum_y J(x, y) \quad (4-10)$$

e MN é o produto das dimensões da janela onde é calculado o critério.

Além dos métodos citados na literatura elaboramos uma variação do algoritmo sugerido por Ryall e citado em (GOLDSMITH, 2000). A principal modificação nesse método é permitir ao usuário escolher as dimensões da matriz usada para calcular o critério de foco. Imagens que possuem fronteiras distantes são melhor processadas por matrizes de dimensões maiores e vice-versa.

Adotando um dos critérios, o método de reconstrução a partir do foco é feito sobre um conjunto de imagens (*stack*) obtidas a cada deslocamento do anel graduado que controla a mesa do porta-amostra do microscópio óptico de reflexão (ver Figura 4-1). Uma matriz percorre cada imagem da pilha e para cada pixel de uma mesma imagem é calculado um valor que é usado como índice de foco. Esse valor estabelece em qual imagem da pilha um determinado pixel está em foco e uma imagem de saída em que se armazena o valor desse pixel e de todos os outros que estão em foco para compor uma única imagem. Há uma segunda saída em que é armazenado o produto entre o deslocamento usado pelo usuário para deslocar o porta-amostra e a posição na pilha. Portanto, nessa segunda imagem os brilhos correspondem às elevações da superfície do material.

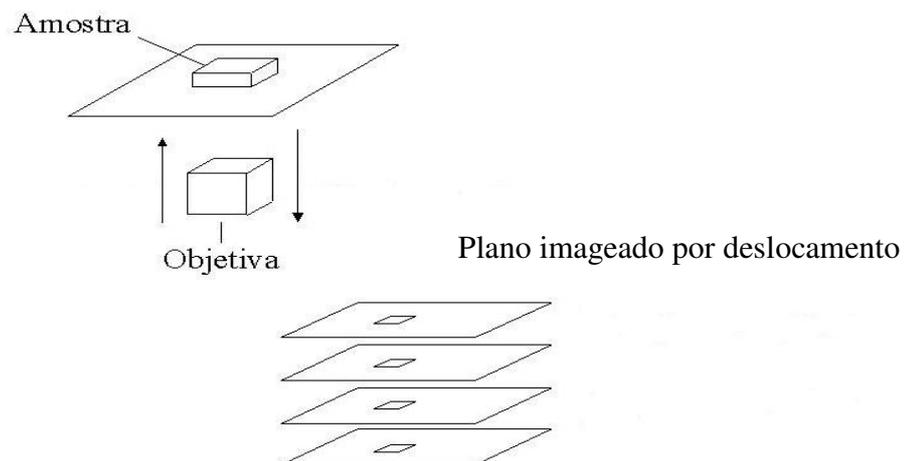


Figura 4-1: Esboço do método de reconstrução a partir do foco

4.2.ALGORITMO DE RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO FOCO IMPLEMENTADO NESTE TRABALHO:

A maioria dos critérios implementados não permitem variar a dimensão da matriz usada para determinar o valor do critério. A partir dessa limitação constatada na literatura, o autor procurou implementar um critério de foco já conhecido na literatura e que permitisse essa variação não existente até o momento.

A expressão que serve de base para o critério é dada pela equação 4-11(RUSS, 1992)

$$CF = \sum_{x=0}^{w-1} \sum_{y=0}^{h-1} |f(x, y) - f(x_c, y_c)| \quad (4-11)$$

onde CF é critério de foco; x, y são as coordenadas dos elementos da região onde está sendo aplicado o critério de foco em relação ao sistema de coordenada da imagem original; f(x,y) é o valor de brilho em uma determinada posição e f(x_c,y_c) é o valor de brilho do centro da região onde está sendo aplicado o critério de foco.

Normalmente a região estudada tem tamanho fixo de 1 ou 2 pixels em torno do centro (veja as definições apresentadas no início do capítulo) devido a maior facilidade de implementação. No algoritmo desenvolvido neste trabalho contornamos este problema permitindo que o usuário alterasse as dimensões da matriz que determina o critério de foco. Isto foi conseguido implementando o código

```
for(int y=vc; y<height-vc; y++) {
    for(int x=uc; x<width-uc; x++) {
        byte CF = 0;
        for(int v=-vc; v <= vc; v++) {
            int offset = x+(y+v)*width;
            for(int u = -uc; u <= uc; u++) {
                CF +=Math.abs(pixels2[offset+u]-pixels2[x+y*width]);
            }
        }
    }
}
```

onde vc e uc representam as coordenadas do centro da região em relação a imagem original; CF é o critério de foco; *height* e *width* é a altura e o comprimento da imagem original; pixels2[offset+u] representa os valores de brilho dos pixels vizinhos ao centro da região e pixels2[x+y*width] é o centro da região estudada.

Note que a introdução das variáveis u e v permite o uso de matrizes maiores que 3×3 . O tamanho é definido pelo usuário a partir de uma caixa de entrada.

4.3. METODOLOGIA DO IMAGEAMENTO:

Antes de iniciar o uso da rotina de reconstrução a partir do foco, a configuração da câmera, do microscópio e do algoritmo foram testados de diversos modos até se obter parâmetros que permitissem a visualização da superfície e aumentassem a faixa dinâmica da reconstrução obtida.

4.3.1. CONFIGURAÇÃO DO MICROSCÓPIO:

Optamos por campo claro, objetiva Nikon BD/DIC Plan Acromática (designação do fabricante 81819) com ampliação nominal de 50X, abertura numérica de 0,55, distância de trabalho de 8,2mm, comprimento focal de 4mm, resolução de $0,5\mu\text{m}$, e profundidade de campo de $0,91\mu\text{m}$. Esta objetiva foi escolhida por verificarmos visualmente que era sensível as variações de relevo existentes na amostra, ou seja, a profundidade de campo era suficiente para observá-las (ver Figura 4-2).

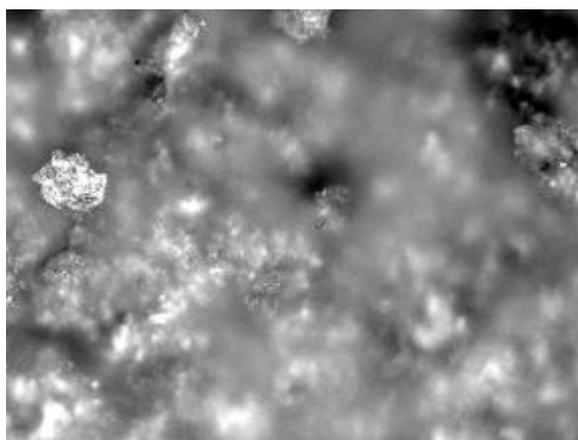


Figura 4-2: Foto de uma das pilhas onde foi aplicada a reconstrução a partir do foco.

Durante a aquisição das imagens, o alinhamento do microscópio é muito importante para evitar iluminação não-uniforme. É feito através do deslocamento da

lâmpada em relação ao caminho óptico e só deve ser realizado se o usuário observar que a imagem obtida em *GetFlatfield Image* da câmera possui regiões com brilhos muito distintos. Esse procedimento não deve ser feito a todo momento pois durante sua execução o usuário tem de olhar a imagem da lâmpada, cuja intensidade é muito alta.

Usamos ainda o conjunto polarizador e analisador uma vez que as reconstruções obtidas nessa configuração possuíam menos ruídos³⁵ (Figura 4-3).

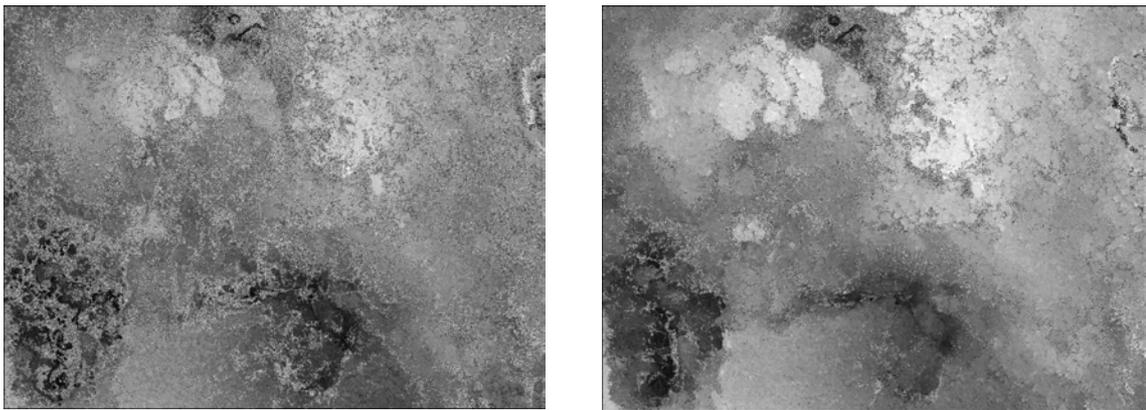


Figura 4-3: Elevações a partir do foco (mesma região): a) sem polarizador e b) com polarizador e analisador.

4.3.2. CONFIGURAÇÃO DA CÂMERA:

A câmera utilizada foi uma Diagnostic Instruments Spot Insight Color QE.

Optamos por trabalhar com um valor para *Exposure Time* de 2,34ms, *Gain* de 2, *Gamma* de 2,12 e sem filtrar o ruído através do item *Noise Filter*. Durante o procedimento capturamos uma imagem através do recurso *Flatfield* para corrigir a iluminação não-uniforme sobre os pixels, bem como definimos o *White Balance* da nossa sessão.

4.3.3.FORMATO DE ARQUIVO DAS PILHAS:

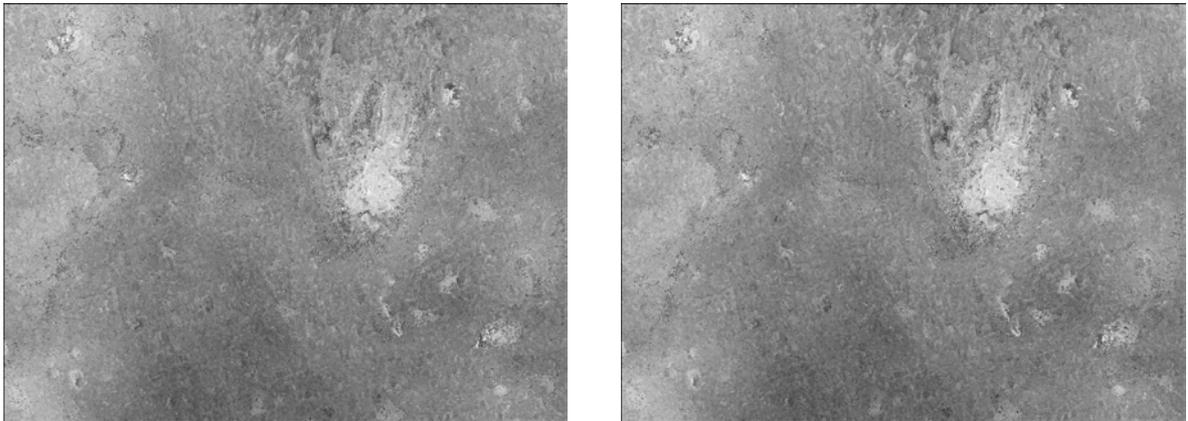


Figura 4-4: Mapa de elevações feitos a partir de uma pilha salva em a)JPEG e b)TIFF.

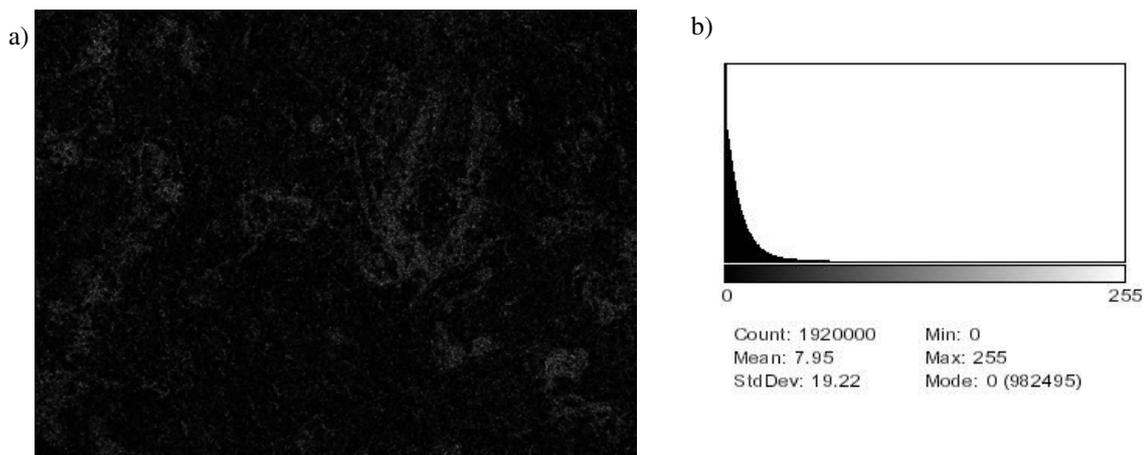


Figura 4-5: Imagens mostrando: a) subtração dos níveis de brilho entre os mapas de elevação resultantes da aplicação da rotina na pilha salva em JPEG e TIFF (escuro $\Delta = 0$ e claro $\Delta \neq 0$), b)Histograma da imagem a) onde apenas 51,2% dos valores de brilho se reproduzem (982495 pixels com brilho igual a zero numa imagem com 1.920.000 pixels).

A partir das imagens da Figura 4-2 podemos verificar que visualmente não há diferença nenhuma entre elas. No entanto ao estabelecer a subtração entre si o resultado mostra que são muito diferentes. A imagem resultante dessa operação deveria dar níveis brilho iguais a zero em toda a extensão, mas em torno de 51,2% não são (Figura 4-3). Portanto, sabendo que há diferenças entre os formatos do arquivo da pilha é melhor optar pelo formato TIFF sem algoritmo de compressão.

³⁵ Valores de brilhos muito altos se comparados com os vizinhos.

4.3.4.MATRIZ DO CRITÉRIO DE FOCO :

O valor utilizado neste trabalho em todas as reconstruções foi de 11X11.

4.4.MATERIAIS, ANÁLISES E RESULTADOS:

4.4.1.INTRODUÇÃO:

Para confirmar a aplicabilidade da rotina, neste capítulo apresentamos dois tipos de análises:

- O primeiro procurou estabelecer se a rotina era capaz de determinar os parâmetros³⁶ R_A e R_T da superfície de uma cerâmica. Os resultados obtidos foram comparados com as medidas feitas por um rugosímetro MITUTOYO SURTEST 301. Os dois métodos apresentam resoluções laterais diferentes (10 μ m do rugosímetro e 0,5 μ m das imagens onde foram aplicadas a reconstrução a partir do foco) e, portanto, são sensíveis a diferentes componentes do relevo: rugosímetro, componentes de menor frequência e a rotina àquelas de maior frequência. No entanto, como são aplicados sobre a mesma superfície devem apresentar as mesmas tendências.
- O segundo apresenta uma série de resultados obtidos em que a aplicação da rotina foi essencial para estabelecer parâmetros quantitativos do relevo.

4.4.2.ROTINA E O RUGOSÍMETRO MITUTOYO SURTEST 301:

As amostras de cerâmicas usadas no trabalho foram feitas a partir de argilas da região de Guaratinguetá e confeccionadas pelos pesquisadores do laboratório de cerâmica do Departamento de Materiais e Tecnologia da Unesp-Câmpus de Guaratinguetá. Foram elaboradas cerâmicas para cada par temperatura (900°C, 1000°C, 1100°C e 1150°C) e carga aplicada na fabricação (0,6tf, 0,8tf e 1tf) no formato de barras medindo 150mmx40mmx5mm.

³⁶ Ver maiores explicações sobre estes parâmetros de rugosidade no apêndice G.

Cada barra foi cortada em 30 pedaços medindo 40mmx5mmx5mm. A partir destes foram capturadas 4 pilhas de imagens em diferentes posições de cada pedaço resultando num total de 1440 pilhas. Cada pilha possui em média 15 imagens dando um total de 21600 imagens processadas.

Antes de utilizar a nossa rotina, devido ao fato constatado de que não há um algoritmo que seja robusto o suficiente para atender a todos os casos, optamos primeiro por analisar a curva de foco (critério de foco em função da posição da imagem na pilha) obtida pelos critérios de foco do grupo de rotinas de reconstrução a partir do foco descritas no início do capítulo 4 e a desenvolvida neste trabalho para estabelecer a mais adequada.

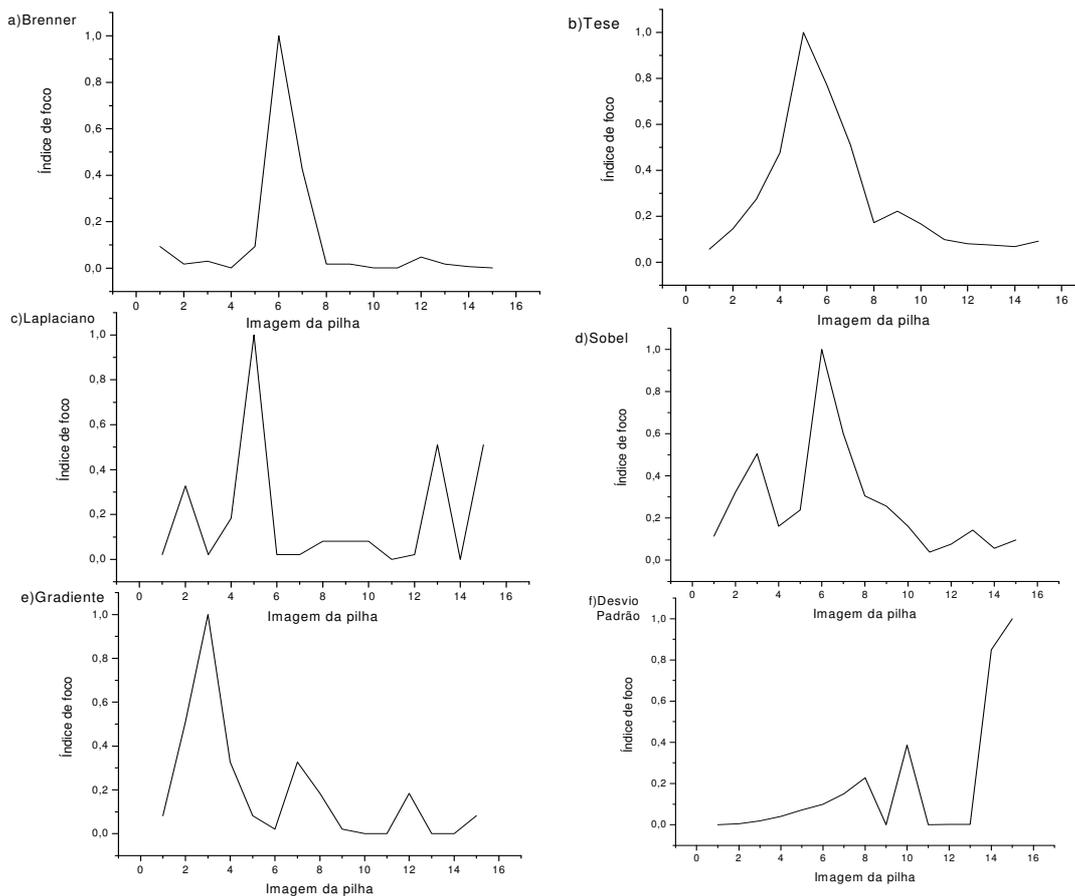


Figura 4-6: Curvas de foco obtidas a partir da seleção de uma região da pilha Campo2-Amostra42-Cerâmica 1200C-0,8T, critérios: a) Brenner, b) Índice de foco proposto na Tese, c) Laplaciano, d) Sobel, e) Gradiente e f) Desvio padrão.

Os gráficos critério de foco (normalizados) versus posição da imagem na pilha são mostrados na Figura 4-6. Por estes gráficos, os dois melhores critérios para esta amostra são o Brenner e o proposto nesta Tese por apresentarem uma curva unimodal e mais estreita que as outras. No entanto, devido a característica de poder aumentar a dimensão da matriz utilizada para calcular o critério de foco o algoritmo deste trabalho deve ser escolhido pois permite visualizar uma quantidade maior de componentes de relevo. Fato que não acontece com Brenner.

Em cada par temperatura-carga foi estabelecido, por uma outra rotina também implementada neste trabalho, os parâmetros de rugosidade média Ra (média das diferenças de elevações em relação a uma linha média) e o de rugosidade máxima (elevação máxima em relação ao menor vale) a partir dos mapas de elevação obtidos pela rotina de reconstrução a partir do foco. Estes resultados são mostrados nas Figuras 4-7 a 4-13 junto com as medidas obtidas pelo rugosímetro MITUTOYO SURTEST 301. A análise destes gráficos leva a concluir que a rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho é capaz de estabelecer corretamente os parâmetros de rugosidade uma vez que apresenta as mesmas tendências do rugosímetro MITUTOYO SURTEST 301.

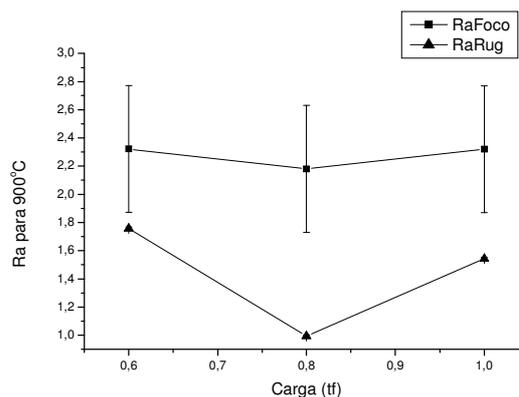


Figura 4-7: Parâmetro Ra para uma temperatura de 900°C de fabricação da cerâmica em função da carga aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301.

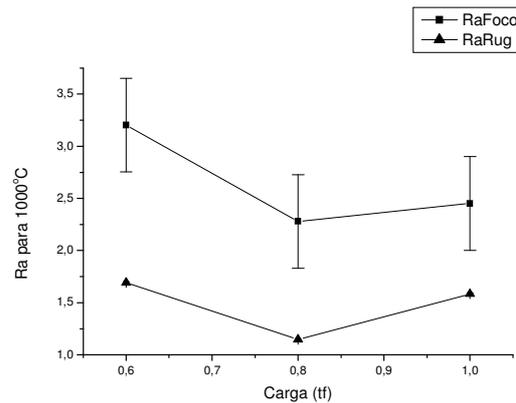


Figura 4-8: Parâmetro Ra para uma temperatura de 1000°C de fabricação da cerâmica em função da carga aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301.

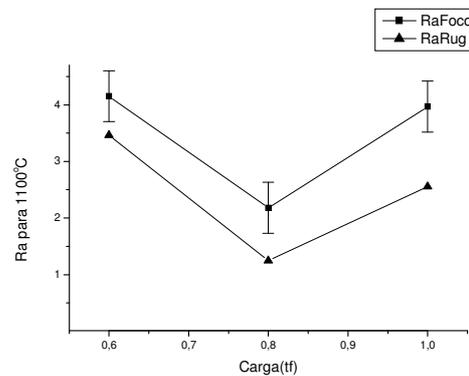


Figura 4-9: Parâmetro Ra para uma temperatura de 1100°C de fabricação da cerâmica em função da carga aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301.

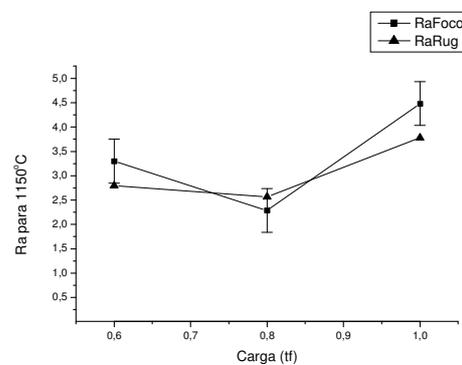


Figura 4-10: Parâmetro Ra para uma temperatura de 1150°C de fabricação da cerâmica em função da carga aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301.

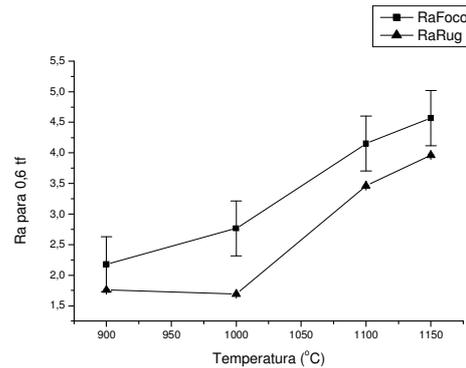


Figura 4-11: Parâmetro Ra para uma carga de 0,6 tf de fabricação da cerâmica em função da temperatura aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301.

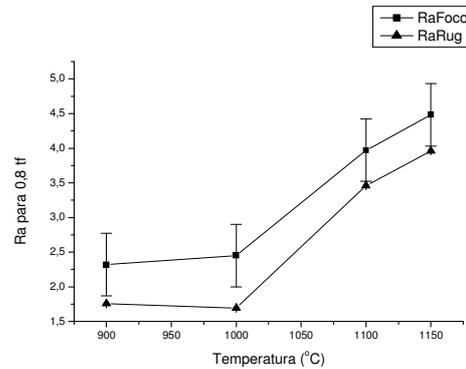


Figura 4-12: Parâmetro Ra para uma carga de 0,8 tf de fabricação da cerâmica em função da temperatura aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301.

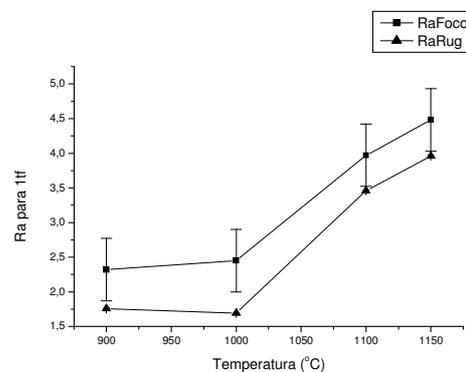


Figura 4-13: Parâmetro Ra para uma carga de 1,0 tf de fabricação da cerâmica em função da temperatura aplicada na elaboração. RaFoco dá o comportamento deste parâmetro estabelecido pela rotina de reconstrução a partir do foco desenvolvida neste trabalho enquanto RaRug é estabelecida pelo rugosímetro Mitutoyo Surtest 301.

4.4.3.APLICAÇÕES DA ROTINA:

4.4.3.1.CORRIGIR O ESPAÇAMENTO DE ESTRIAS DEVIDO A INCLINAÇÃO DA AMOSTRA:

No parecer técnico dado pelo Departamento de Materiais e Tecnologia (DMT 08/2003) sobre a causa da falha por fratura em um componente de cinta metálica (mostrado na Figura 7-4) para suporte de placas de vidro a pedido da Canetti Engenharia de Soldagem S/C Ltda a utilização da rotina de reconstrução a partir do foco foi fundamental para corrigir o espaçamento das estrias.

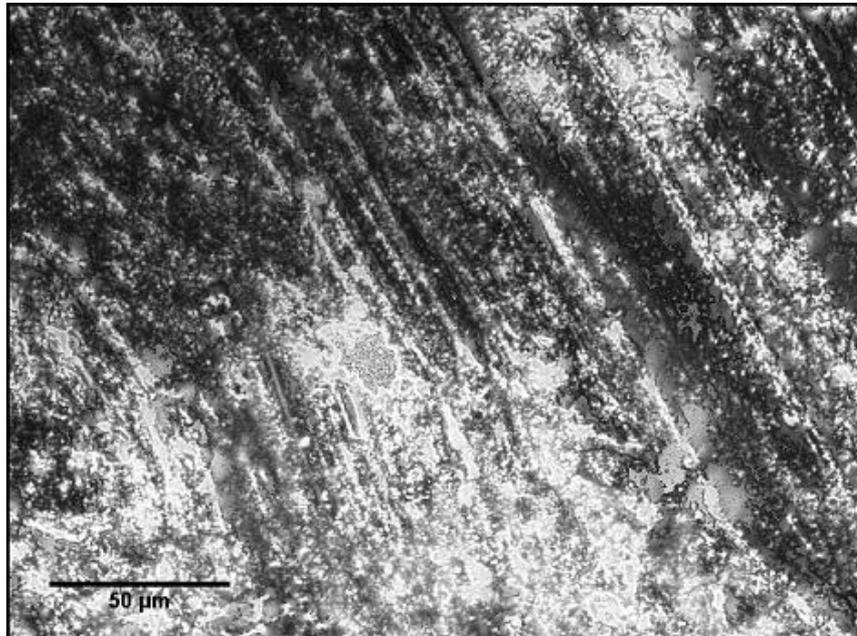


Figura 4-14: Mapa de elevações da amostra da cinta metálica.

A Figura 4-14 é o resultado da aplicação da rotina de reconstrução a partir do foco na amostra da cinta metálica. As estrias que aparecem na Figura 4-14 são a projeção (Figura 4-15) da topografia real da amostra. Para medi-las corretamente foi necessário estabelecer a inclinação a partir do mapa de elevações (Figura 4-16), cujo valor encontrado foi de $21,6^\circ$.

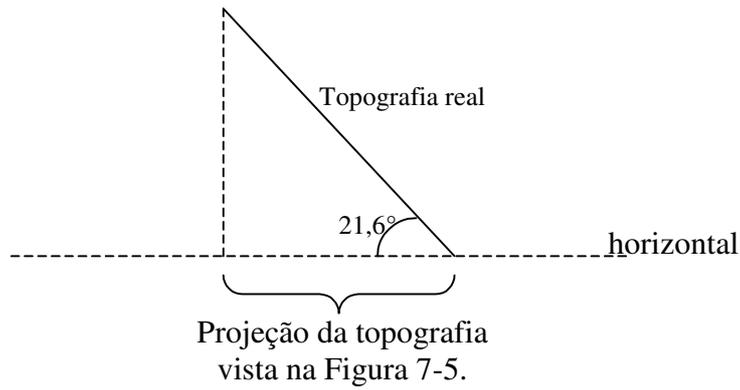


Figura 4-15: Ilustração da projeção da topografia real no plano horizontal.

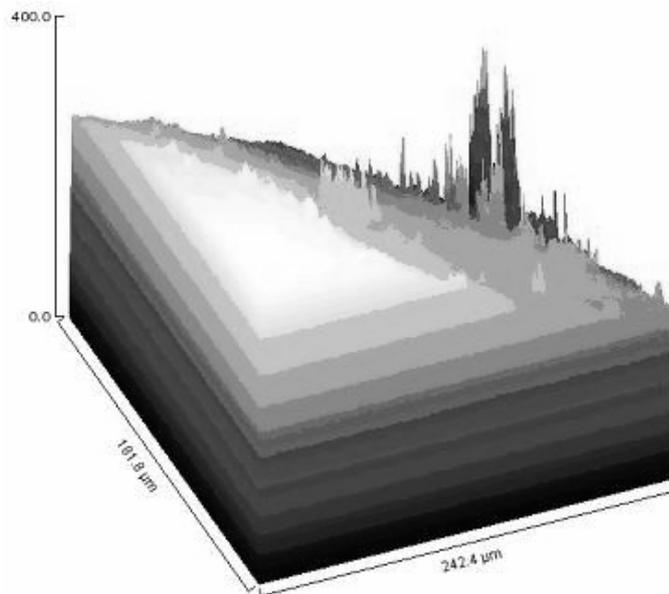


Figura 4-16: Mapa de elevações correspondente à reconstrução de foco mostrada na Figura 7-5. Elevações em [μm].

O mesmo problema foi encontrado no estudo da adesão do Polietileno Tereftalato (PET) ao Polimetilmetacrilato (PMMA).

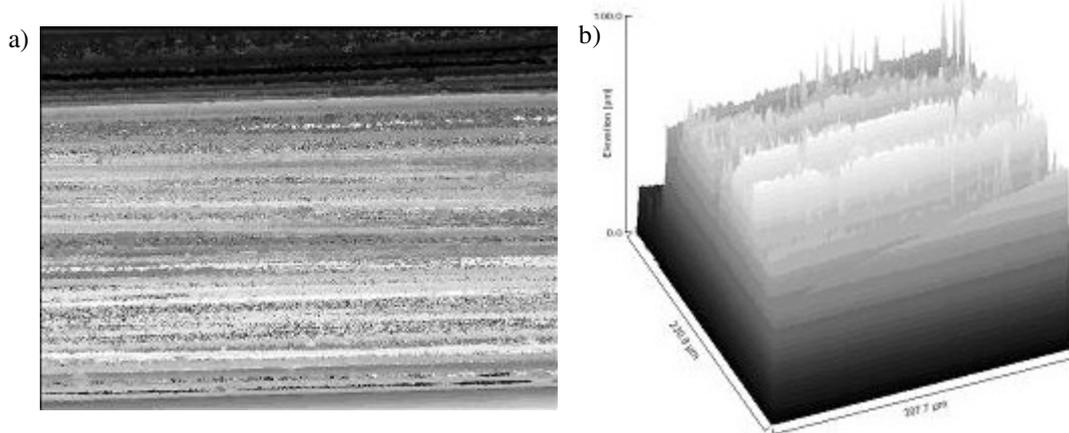


Figura 4-17: a) Mapa de elevações a direita e b) representação tridimensional do mapa de elevações mostrado na Figura 4-17 a.

Na Figura 4-17 b) podemos ver a representação tridimensional do mapa de elevações da Figura 4-17 a) onde se verifica a inclinação da superfície.

4.4.3.2. VISUALIZAÇÃO DE PARTES INTERNAS:

Cruz (2003) propõe o uso da técnica de reconstrução a partir do foco como método para caracterização de partes internas de cerâmicas de TiO_2 . As amostras de cerâmica foram cortadas e observadas como mostra a Figura 4-18.

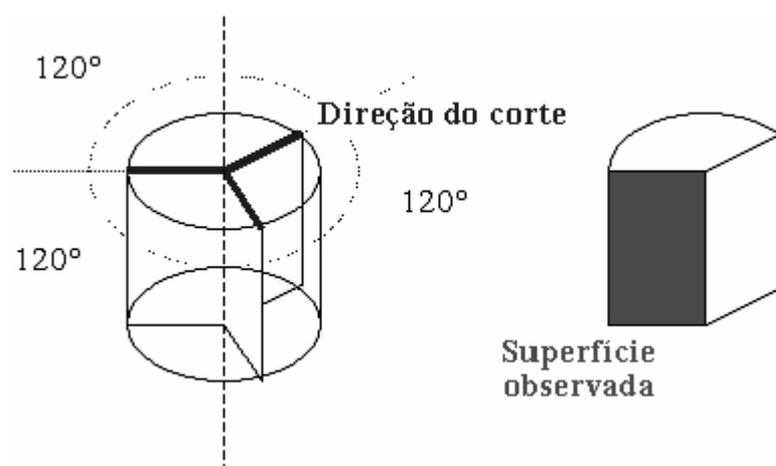


Figura 4-18: Ilustração da direção do corte usado para obter as amostras das quais foram obtidas as reconstruções tridimensionais.

Na Figura 4-19 a autora tem todas as regiões em foco obtidas a partir da aplicação da rotina de reconstrução a partir do foco. Pode, então, identificar a morfologia e a origem e estabelecer a origem da forma desses poros devido ao mesmo formato de um dos componentes da cerâmica (o amido).

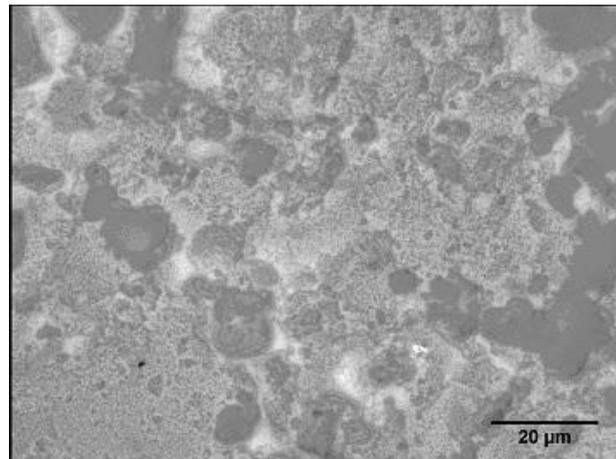


Figura 4-19: Imagem com todas as regiões em foco obtido a partir da reconstrução tridimensional de uma região da superfície de cerâmica de TiO_2

A autora conclui o trabalho afirmando que a reconstrução a partir do foco para caracterização das cerâmicas de TiO_2 mostrou-se mais confiável que os resultados obtidos pela porosimetria de mercúrio e densidade aparente uma vez que o corte no sentido axial (Figura 4-18) permite visualizar os poros interconectados do interior da amostra (Figuras 4-19), região em que as outras duas técnicas não tem acesso.

Capítulo

5

MICROSCOPIA POR VARREDURA:

5.1.INTRODUÇÃO:

Em meados do século XX, dois desenvolvimentos tecnológicos propiciaram a invenção da microscopia por varredura: a televisão e o radar. O primeiro estabeleceu a aquisição ponto-a-ponto da imagem. O segundo, o conceito de investigar ponto-a-ponto o espaço por meio de uma sonda colimada, registrando em um monitor a intensidade do sinal detectado como função da posição da sonda.

Uma nova maneira de formar imagens era estabelecida: a serial. Neste modo a imagem, ao contrário da paralela, não tem relação geométrica com o objeto. A relação é temporal. Aqui reside uma das principais vantagens dos sistemas de imageamento serial, a possibilidade de arquivamento e processamento eletrônico da imagem.

Os conceitos de aumento e resolução devem ser reformulados. O aumento é obtido pela razão entre a dimensão do detetor e a região varrida pela sonda. É de se notar que a resolução horizontal está relacionada com a dimensão da sonda.

Microscopia por Varredura de Sonda (*Scanning Probe Microscopy-SPM*) é um termo genérico para descrever um grupo de microscópios que são capazes de resolução lateral e elevação na ordem nanométrica (MANNHEIMER, 2002). Os principais exemplos são os Microscópios de Tunelamento (*Scanning Tunelling Microscope-STM*) e o Microscópio de Força Atômica (*Atomic Force Microscope-AFM*). Outros sistemas de microscopia, e suas respectivas siglas em inglês, por varredura podem ser citados: força magnética (MFM), força lateral (LFM), campo próximo (SNOM), raio-X, fotônico de varredura ou confocal (SOM ou *Confocal Microscope*). Não entraremos em detalhe quanto a estes microscópios, pois as imagens com as quais trabalhamos na

rotina de reconstrução a partir do paralaxe foram obtidas somente no Microscópio Eletrônico de Varredura (*Scanning Eletronic Microscope*, SEM).

Este capítulo visa fornecer as influências do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) nas imagens para que o usuário das rotinas possa configurar melhor o MEV e obter imagens com menor distorção geométrica e oclusão de área – maiores problemas encontrados nas imagens usadas na reconstrução por paralaxe.

5.2.MICROSCÓPIO ELETRÔNICO POR VARREDURA:

5.2.1.INTERAÇÃO ELÉTRONS-MATÉRIA:

Mediante a utilização dos múltiplos efeitos de interação entre elétrons e a matéria, o MEV permite a aquisição de informações sobre topografia, orientação cristalina, diferenciação entre elementos, potencial elétrico e campos magnéticos localizados (MANNHEIMER, 2002). Essas interações ocorrem após a varredura da amostra por um feixe colimado de elétrons (elétrons primários, EP), e com o auxílio dos sinais resultantes dessa interação a imagem é formada.

Na Figura 5-1 há um detalhamento dos componentes.

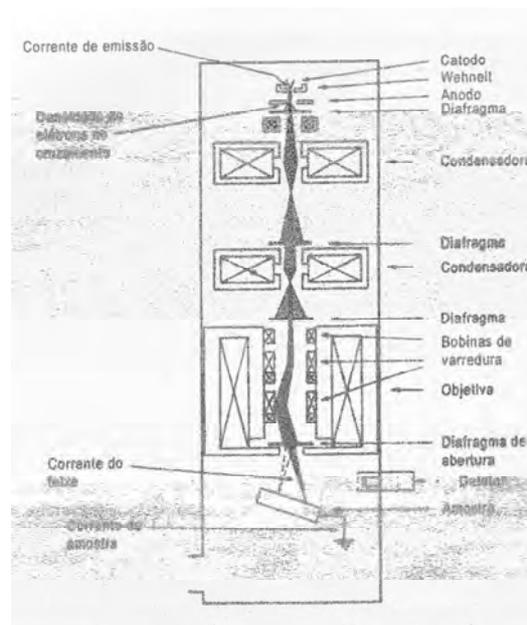


Figura 5-1: Detalhamento da coluna de um MEV. Adaptado de MANNHEIMER (2002).

Primeiramente os elétrons são gerados por um filamento aquecido³⁷ e percorrem a coluna do MEV atravessando três lentes eletromagnéticas: duas condensadoras e uma objetiva. As duas primeiras agem diminuindo a imagem do ponto luminoso do feixe através da perda de elétrons quando aumentamos a convergência das lentes.

A terceira lente (objetiva) tem a função de focalizar o feixe de elétrons que vai incidir sobre a amostra³⁸. Seu diâmetro de abertura é inversamente proporcional ao poder de resolução e a profundidade de campo. A distância focal da terceira lente pode ser bastante alterada, uma vez que a distância da amostra à lente (denominada distância de trabalho) pode variar de alguns milímetros a centímetros. Essa variação também altera a convergência do feixe e, portanto, é inversamente proporcional a profundidade de campo e a resolução.

Próximo às lentes é instalado um conjunto de bobinas astigmatadoras. Uma imagem é dita livre de astigmatismo se não houver nenhuma região desfocada de maneira unidirecional quando as lentes objetivas estão abaixo ou acima do foco em baixa ampliação.

A última parte do MEV é o local onde ficam o detetor e o porta-amostra. O tamanho varia em função das amostras desde as pequenas até os *wafers* e peças fraturadas. Essas peças são fixadas em uma mesa de trabalho que possui 5 graus de liberdade: X-Y (de 20 a 150mm), coordenada Z, inclinação e rotação.

Após o feixe EP incidir na amostra, há uma produção de vários sinais: elétrons secundários (ES), retroespalhados (ERE), fótons, raios-X entre outros, que requerem um detetor apropriado para sua aquisição e transformação em sinal elétrico (BOYES, 2000, JOY e JOY, 1996).

O detetor de ES consiste de um cintilador acoplado a uma fotomultiplicadora, e é conhecido como o detetor de Everhart-Thornley (Figura 5-2-a). É constituído de um cintilador, recoberto por uma fina camada de alumínio, à qual se aplica um potencial

³⁷Aquecimento insuficiente diminui a possibilidade de obtenção de um feixe e conseqüentemente imagens focadas. No entanto, o aquecimento excessivo provoca o desgaste prematuro do filamento e conseqüentemente diminuição da vida útil.

³⁸Uma parte da energia de translação dos elétrons, ao incidir na amostra, é convertida em calor. Essa conversão é maior quanto maior for a voltagem de aceleração do feixe, a área varrida, o tempo de varredura e a condutibilidade térmica da amostra.

de $+10\text{kV}^{39}$. Os elétrons emitidos pela amostra são acelerados sobre o cintilador, emitindo fótons que são levados a um fotomultiplicador pelo guia de luz, originando o sinal modulador de saída. O cintilador está envolto em uma gaiola de Faraday, polarizada a $+400\text{V}$, que exerce duas funções: blindar o feixe primário da influência do potencial do cintilador, e atrair todos os elétrons secundários (de baixa energia, tipicamente 50 eV), coletando assim mesmo aqueles que não emitidos na direção do detector.

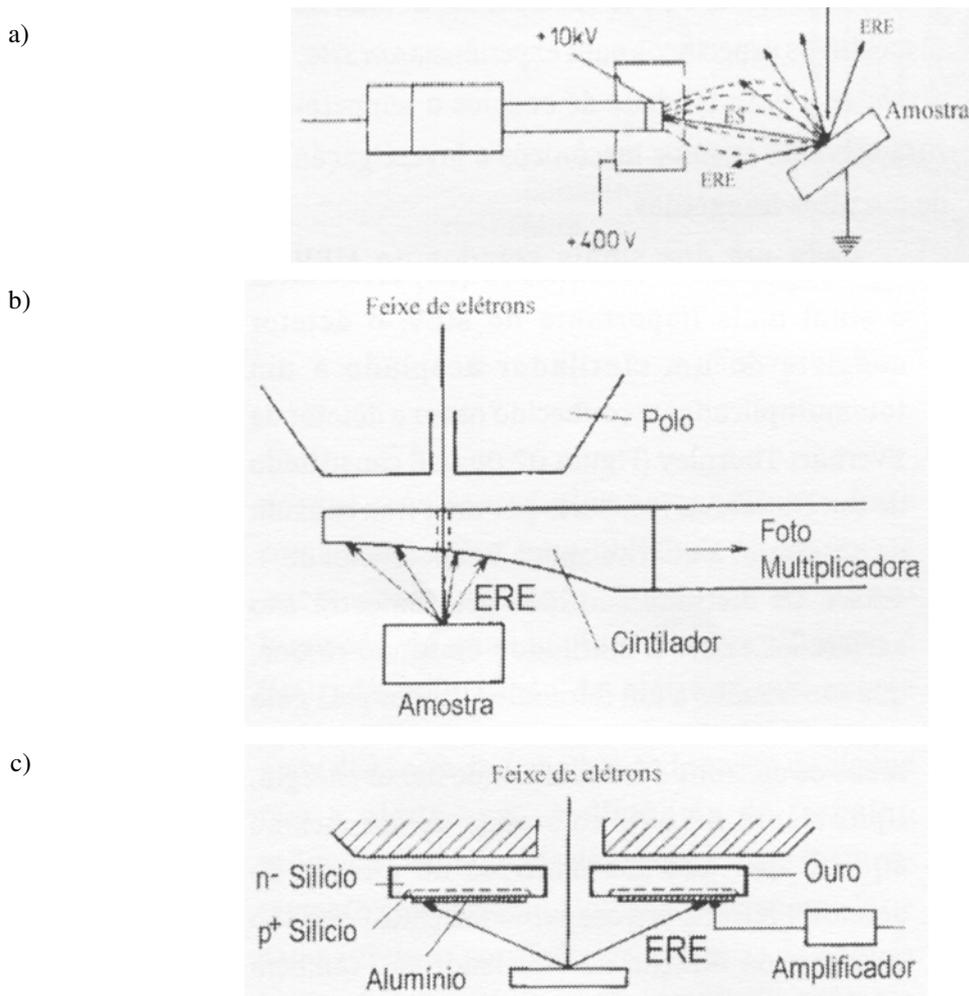


Figura 5-2: Esboço dos detectores usados no MEV. Adaptado de MANNHEIMER (2002), a) Everhart-Thornley, b) Robinson e c) semicondutores.

³⁹Conexão incorreta dos cabos, sujeira nos anéis de metal e no plano fluorescente do detector podem causar certas descargas cujos efeitos nas imagens são semelhantes àsquelas produzidas em condições de elétrons absorvidos pela amostra, baixa aceleração de voltagem e emissão insatisfatória de elétrons. Portanto, é interessante o usuário obter esporadicamente uma imagem de uma mesma amostra padrão para compará-la com a primeira imagem adquirida logo após a compra do MEV com o objetivo de verificar se houve mudanças.

Elétrons retroespalhados (ERE) que são emitidos na direção do cintilador são também adquiridos pelo Everhart-Thornley. Deste modo, desligando-se o potencial de 10kV, aparece uma imagem originada pelos ERE, constituída apenas de uma pequena porção destes.

Por este motivo o detetor Everhart-Thornley não é mais usado para esta finalidade, mas sim detetores situados acima da amostra onde a densidade de ERE é máxima. Os tipos principais são baseados em cintiladores ou em semicondutores.

Os primeiros, dos quais o detetor Robinson (Figura 5-2-b) é um exemplo típico, têm alta taxa de varredura, mas são volumosos e, como podem interferir em outros sinais, devem ser removíveis. No segundo grupo (Figura 5-2-c) o sinal dos ERE gerado é proporcional a corrente originária dos pares de elétrons-buracos separados por um potencial aplicado. Apesar de serem lentos em sua resposta, estes detetores podem ser fixados diretamente na parte inferior da objetiva, e devido à sua pequena espessura, permitem pequenas distâncias de trabalho, e grandes ângulos e eficiência de aquisição.

5.2.2.RESOLUÇÃO E CONTRASTE:

Como foi visto no capítulo sobre microscopia óptica, a resolução e o contraste são inversamente proporcionais.

No MEV a resolução depende do diâmetro do feixe incidente, e em princípio poderíamos pensar que um feixe mínimo levaria às menores resoluções. Há, no entanto, uma série de outros fatores, (GOLDSTEIN et al.; MANNHEIMER, 2003, 2003, 2002).

- **Diâmetro do feixe versus resolução do detector:**

Por exemplo, a resolução típica que define o tamanho dos pontos que compõem a imagem em um tubo de raios catódicos é de 0,2mm. Para um mapeamento ótimo, deve haver uma correspondência entre os pontos da amostra e da imagem, e podemos

definir o que seria o pixel da imagem como $p \approx \frac{0,2}{\text{ampliação}}$ mm. Se o diâmetro do

feixe for maior que este valor, diversos pixels do detetor serão excitados simultaneamente e haverá perda de resolução; caso contrário, se o feixe for muito fino, dará origem a um sinal fraco. Nessa circunstância, é necessário aumentar a ampliação do sinal o que provoca maior ruído e conseqüentemente uma diminuição da resolução (ver Figura 5-3).

- **Razão Sinal/Ruído:**

Outro fator é a razão sinal/ruído. A Figura 5-3 mostra o sinal resultante de uma varredura de linha sobre a amostra; caso esta varredura seja repetida várias vezes, sobre o sinal de um mesmo perfil acumula-se uma oscilação denominada ruído. Este ruído é devido a variações estatísticas na incidência e no rendimento do sinal emitido pelos EP. A princípio, então, é desejável que o feixe de elétrons tenha grande intensidade, no entanto, isto pode aumentar o volume de interação e conseqüentemente diferentes sinais que se interferem são gerados. Baixos sinais exigem forte amplificação, a qual também afeta o ruído. De acordo com MANNHEIMER (2002), uma boa resolução é obtida quando o contraste é cinco vezes o ruído. Para tal é necessário uma corrente mínima, que pode ser calculada, mas que é função de diversos parâmetros do MEV.

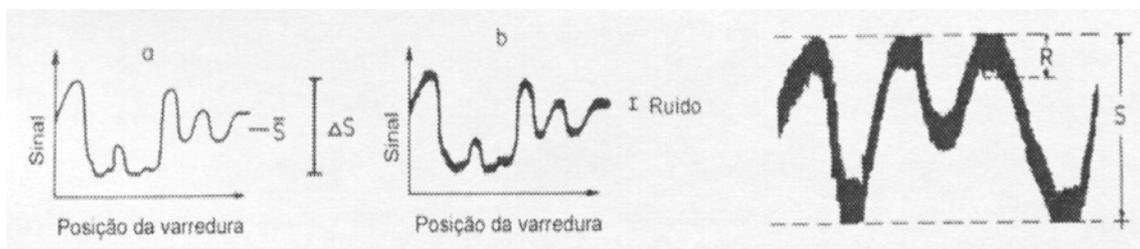


Figura 5-3: Sinal de um MEV a) sem ruído e com b) com ruído . Adaptado de MANNHEIMER (2002).

- **Círculo de menor confusão e círculo de Airy:**

A resolução e o contraste dependem do círculo de menor confusão produzido pela ação das lentes condensadoras no feixe primário. A este círculo é adicionado um círculo de Airy oriundo da difração produzida pelas pequenas aberturas dos

diafragmas usados para diminuição das aberrações das lentes eletromagnéticas. Em conjunto, o círculo de menor confusão e o de Airy estabelecem o limite inferior do diâmetro do feixe. Este limite depende principalmente do comprimento de onda dos elétrons (e portanto da tensão de aceleração) e do coeficiente de aberração esférica das lentes.

- **Volume de interação do feixe primário com a amostra:**

Finalmente, o volume de interação produzido pelos EP e a amostra também afeta a resolução. Os sinais do MEV não são gerados apenas na superfície da amostra, diferentes sinais secundários são gerados. Note que a área assinalada na Figura 5-4, por exemplo, para ES, não indica a região onde estes são gerados, mas sim aquela da qual, com sua reduzida energia, conseguem escapar para a superfície.

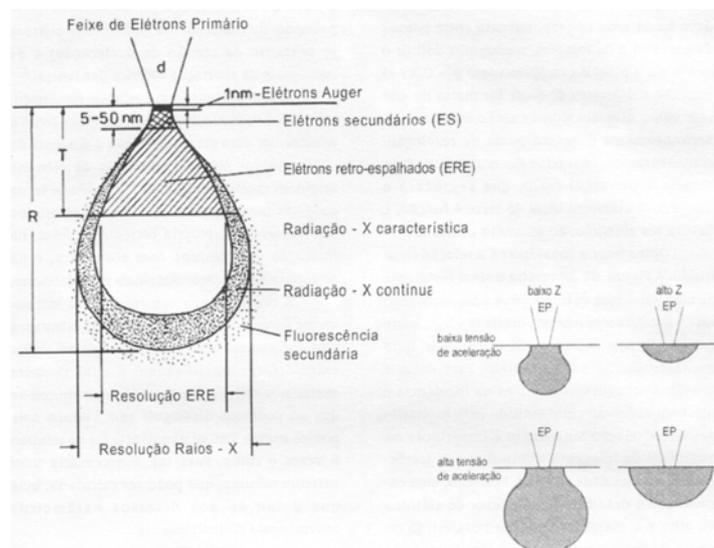


Figura 5-4: Volume de interação entre o feixe de elétrons primário e a amostra, bem como a região de onde os sinais resultantes são gerados. Adaptado de MANNHEIMER (2002).

ES são gerados em todo o volume de interação, no entanto aqueles oriundos das regiões mais profundas são novamente absorvidos. Este volume de interação depende da tensão de aceleração dos EP, do número atômico dos constituintes da amostra, e sobretudo do diâmetro do feixe primário. Ele pode ser simulado pelo método de Monte Carlo para amostras de substâncias puras e quanto a amostras compostas por ligas

pode ser feita uma ponderação dos elementos. Portanto, maior intensidade do feixe não necessariamente significa maior poder de resolução, pois há um maior volume de interação e produção de diferentes sinais (ERE, ES e outros) (JOY e JOY, 1996) que se interferem reduzindo o sinal no detetor. Isto exige maiores ampliações do sinal que aumentam o ruído e conseqüentemente diminuem a resolução.

Estabelecido a resolução, o contraste automaticamente é definido. Neste trabalho, o contraste em que estamos interessados é o topográfico e este pode ser obtido com ES⁴⁰ ou ERE. Ambos aumentam com a inclinação da direção normal de um ponto de amostra em relação ao feixe primário (Figura 5-5).

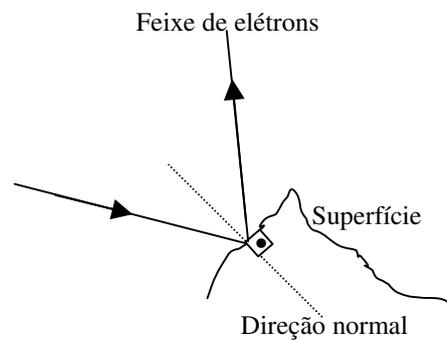


Figura 5-5: Representação de um feixe incidindo em uma superfície com uma determinada inclinação em relação a normal.

No caso de imagens obtidas por ES, deve-se destacar que o contraste topográfico é prejudicado devido à emissão de ERE aumentar com o número atômico do material da amostra ou alterar devido à orientação cristalográfica. Além disso, elétrons que permanecem na amostra, designados como elétrons absorvidos, ocasionam diferenças de potencial. Em regiões potencializadas negativamente, os ES sofrem repulsão da superfície, sendo acelerados na direção do detetor; caso contrário, nas regiões positivas apenas poucos ou nenhum ES deixam a amostra. O resultado são regiões, respectivamente, clara e escura. Para evitar isso os elétrons absorvidos devem ser descarregados para o aterramento.

⁴⁰ As imagens feitas com ES têm um aspecto muito semelhante à visualização com luz. Vale destacar que a analogia com um feixe de luz só pode ser feita se pensarmos que o detetor seja a fonte de luz, e a observação feita ao longo da coluna do MEV.

Quando as imagens são resultantes dos ERE, a influência da composição, da rede cristalina e magnetismo da amostra também persiste. Para separar os sinais gerados por fatores diferentes da topografia dois detetores semicondutores são colocados simetricamente em relação ao eixo da coluna do MEV. A subtração dos seus sinais resulta na imagem da topografia⁴¹. A região em que são gerados os elétrons retroespalhados é maior do que os elétrons secundários, no entanto, por possuírem maior energia são menos influenciados pela absorção de elétrons.

O uso dos ERE ou dos ES para obter um melhor contraste topográfico não é bem estabelecido na literatura devido ao grande número de variáveis envolvidas durante o imageamento pelo microscópio eletrônico. Podemos citar na literatura:

- Na página http://www.jeol.com/sem/docs/sem_guide/guide.pdf há a recomendação pelo uso dos ES, mas não especifica em quais condições de operação deve ser feita. No entanto, em RICHARD et al (2000) afirma que em um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo operando no modo de elétrons retroespalhados com uma corrente de emissão alta e uma aceleração menor que 5keV, os pares estéreo obtidos possuem uma riqueza de detalhes igual aos pares obtidos no modo de elétrons secundários com uma baixa voltagem, no entanto, com um contraste e sensibilidade direcional da estrutura observada maior. Estas análises foram realizadas com relação a riqueza de detalhes, a orientação angular da estrutura e a informação qualitativa da profundidade fornecida pelas imagens anaglíficas.

- WELLS (2002) cita em seu artigo a necessidade de não colocar o método de imageamento por microscopia eletrônica a baixas voltagens como sendo melhor de todos para estabelecer informações sobre a topografia. O ideal, continua o autor, é variar os parâmetros e se possível o detetor para que as informações obtidas em diferentes condições possam ser confrontadas e uma conclusão mais precisa sobre o relevo possa ser estabelecida.

⁴¹E a soma na imagem resultante da composição.

- MÜLLEROVÁ (1997) cita que um MEV convencional operando com voltagens de 15 KeV, com uma amostra a um potencial negativo e o detetor com uma pequena abertura aterrado, pode ser adaptado para operar como se fosse um MEV a baixas voltagens de aceleração.
- BOYES (2000) cita como melhores valores de tensão de aceleração do feixe de 0,5 V para imagear amostras de C.

Portanto, o equipamento disponível para usuário deve permitir várias configurações devido à grande variabilidade de morfologia das superfícies e da composição com o objetivo de estabelecer pares estéreo o mais epipolares possíveis e desta maneira permitir resultados melhores pela rotina de reconstrução a partir do paralaxe (ver a influência da geometria epipolar nos pares estéreo mais adiante no Capítulo 6).

5.2.3.LIMITAÇÕES DO MEV:

Reconhecida sua versatilidade, o MEV apresenta suas limitações: operação em baixas pressões⁴²; e a necessidade, em alguns casos, de recobrir amostras não condutoras.

Sob ação do feixe de elétrons, amostras não condutoras sofrem carregamento eletrostático quando o número de elétrons emitidos não é igual ao de elétrons incidentes. Esta relação depende da energia dos elétrons incidentes, e é característica para determinado material. Opera-se normalmente com aceleração consideravelmente maior, levando ao carregamento negativo da amostra e a descargas eletrostáticas (em casos extremos, até a interferência no feixe primário). Por este motivo materiais não condutores devem ser recobertos com uma fina camada de material condutor. Outras maneiras de contornar este problema são reduzir a corrente da sonda, abaixar a voltagem de aceleração ou rotacionar a amostra até encontrar uma posição ideal que

⁴² Em muitas publicações é usual o termo alto e baixo vácuo para designar sistemas com, respectivamente baixo e altos valores de pressão. No entanto, o significado da palavra vácuo é completo vazio, algo que não representa a situação descrita anteriormente, portanto, optamos por não usá-lo.

diminua os elétrons absorvidos (http://www.jeol.com/sem/docs/sem_guide/guide.pdf). Em amostras biológicas, malhas e pó o problema de elétrons absorvidos ocorre com grande frequência, e algumas soluções práticas podem ser citadas tais como o uso de suportes sobre os quais a amostra é colada com tintas de grafite (MANNHEIMER, 2002).

Além dos problemas com amostras não condutoras, o uso de sistemas que diminuem a pressão⁴³ (da ordem de 10^{-5} torr) no MEV danifica certas amostras, principalmente biológicas devido a água presente. Outras exalam substâncias que prejudicam o sistema de vácuo.

Para ampliar o uso, a partir da década de 80 foram desenvolvidos os denominados MEV ambiental (em inglês ESEM) ou MEV de baixas pressões (em inglês LV-SEM). Estes aparelhos possuem diferentes pressões na coluna que vai de valores pequenos na região do canhão de elétrons a valores maiores na região do porta-amostra (por exemplo, para manter uma amostra em presença de água no estado líquido, é necessário uma pressão de mínima de 4,6 torr a 0°C, e progressivamente maior a temperaturas mais altas). A maior capacidade de atender a este requisito é a principal diferença entre o ESEM (*Environment Scanning Electron Microscopy*) e o LVSEM (*Low Voltage Scanning Electron Microscopy*).

⁴³ Com o objetivo de proteger o filamento contra oxidação, evitar as descargas no canhão de elétrons e controlar o espalhamento dos elétrons na coluna

Capítulo

6

RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO PARALAXE

6.1.INTRODUÇÃO:

As rotinas de reconstrução de uma superfície através do paralaxe são feitas a partir de um par de imagens extraídas de uma mesma região sob ângulos diferentes. Para estabelecer as elevações, uma subregião é extraída de uma das imagens do par e depois é feita na outra imagem uma busca com o objetivo de identificar a região semelhante (Figura 6-1).

Durante essa busca, para cada deslocamento da subregião é calculado um valor a partir da equação de normalização dada pela Equação 6-1.

$$\frac{T_B}{T_A} - 1 \quad (6-1)$$

onde T_B é a transformada da subregião na imagem B do par e T_A é a transformada da subregião da imagem A, essas imagens são mostradas na Figura 6-1. O valor mais próximo de 1 que a razão $\frac{T_A}{T_B}$ assume estabelece a posição da região semelhante na imagem B do par estéreo.

Esse processo de normalização (colocar em uma escala entre 0 e 1) não leva em conta a diferença entre a somatória dos valores de brilho da região e a respectiva média como é feito em grande parte dos algoritmos de reconstrução a partir do paralaxe, por exemplo em RUSS (1992). Essa diferença normalmente é feita para compensar a não igualdade de brilhos existentes entre as imagens do par. No entanto,

acreditamos que o uso dessa diferença leva a uma falha devido à média ser feita em um conjunto de valores com grande dispersão não sendo, portanto, representativa desse conjunto.

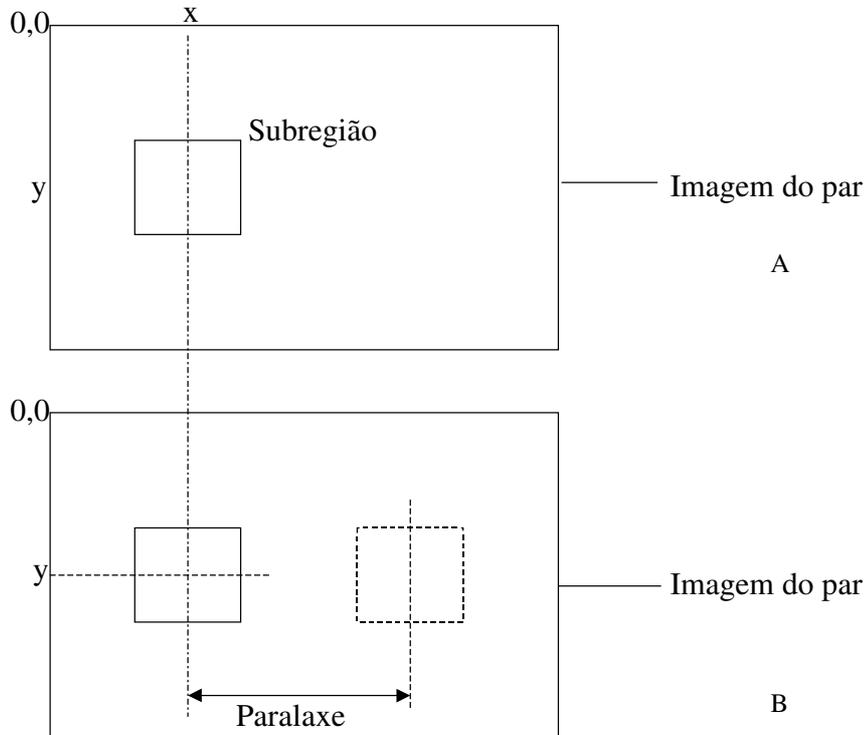


Figura 6-1: Desenho representado o processo de busca pela região semelhante.

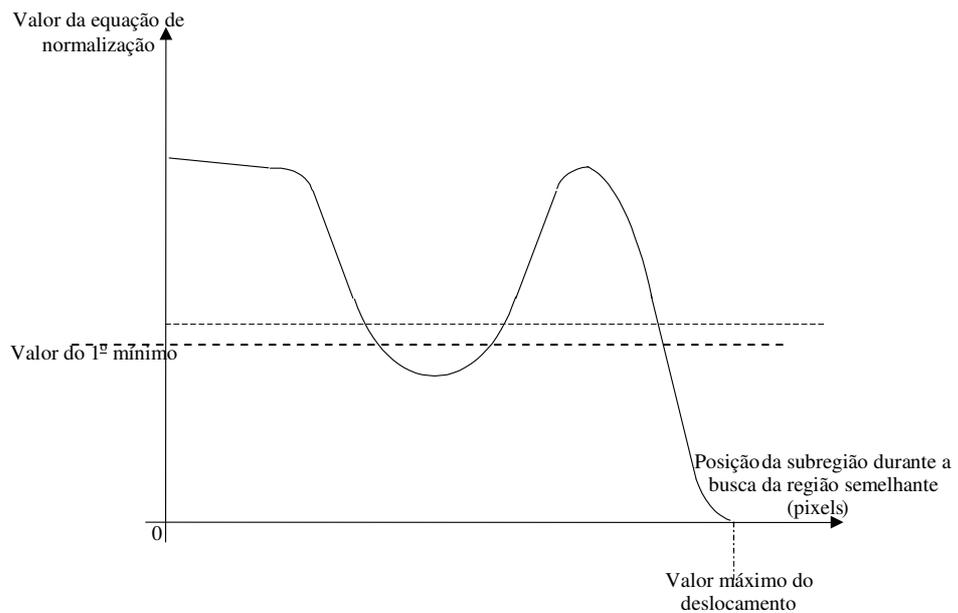


Figura 6-2: Representação gráfica do processo de busca da região semelhante.

A Figura 6-2 representa um exemplo dos valores obtidos a partir da equação de normalização durante um processo de busca. É constatado na literatura e também neste trabalho que a busca deve ser limitada ao primeiro mínimo da Figura 6-2 para ser correta.

Identificado a diferença de posição (paralaxe), a elevação é calculada através da Equação 6-1. A Equação 6-1 para determinar a elevação depende da geometria do sistema de imageamento. No nosso trabalho, o porta-amostra do MEV é rotacionado de $-\theta$ a $+\theta$ de acordo com a Figura 6-3.

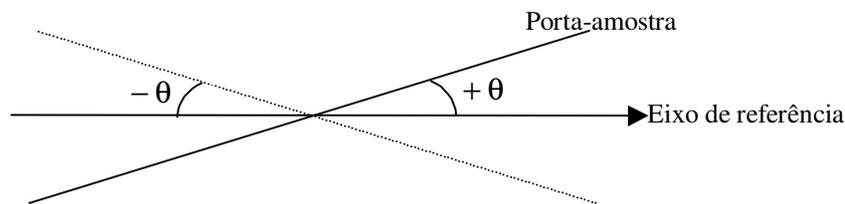


Figura 6-3 Esboço do deslocamento angular para obter as imagens do par estéreo.

A geometria descrita na Figura 6-3 leva a expressão⁴⁴ (EL-SOUDANI; BOYDE,1979)

$$Z = \frac{X_L - X_R}{2 \cdot \text{sen}\left(\frac{\Delta\theta}{2}\right)} \quad (6-1)$$

onde Z representa a elevação de um ponto da imagem, X_R é a posição desse ponto na imagem referência, X_B é a posição desse ponto na imagem de busca (o procedimento para estabelecer qual imagem do par é referência e de busca ver no item 6.3.2. do capítulo 6) e $\Delta\theta$ é o valor total do deslocamento angular.

A extensa aplicação da reconstrução tridimensional a partir de pares estéreo resultou em diferentes soluções nos algoritmos quanto a maneira de identificação

⁴⁴ Verificar a dedução dessa expressão no apêndice F.

das regiões semelhantes⁴⁵. De acordo com (CHENG et al., 2000), podemos classificá-las em dois grupos:

- Rotinas que identificam as regiões a partir dos contornos (*feature-based*) (RUICHEK et al.; PAJARES e CRUZ, 1998, 2000);
- Rotinas que realizam a identificação a partir da distribuição de brilhos (*area-based*) (AMMANN e BOUCHAD; HEIN; HEIN, 1998, 1999, 2001b),
- Rotinas que mesclam os métodos anteriores (CHENG et al., 2000).

A rotina deste trabalho está no segundo grupo e, portanto, produz um mapa denso de elevações, ou seja, podemos calculá-las para cada pixel. não havendo, a princípio, a necessidade de se realizar a interpolação como é feito nas rotinas do primeiro grupo.

Independente do grupo, na literatura pesquisada há uma característica desfavorável comum quanto ao processamento: o tempo para buscar a região semelhante. O mesmo problema do tempo de processamento ocorre hoje com o programa usado no Laboratório de Análise de Imagens de Materiais LAIMat (HEIN; HEIN et al.; HEIN, 1996a,1999b,2001c).

Para diminuí-lo os programadores fazem uso dos chamados limitadores (*constraints*) com a função de restringir o espaço de busca. Os clássicos⁴⁶, de acordo com (RUICHEK et al., 1998), são

- Unívoco (*uniqueness*): a busca pela região semelhante deve ter como resultado um único valor máximo (ou mínimo),
- Similaridade: a região procurada deve ser a mais semelhante possível,
- Sequencial (*ordering*): se uma região A tem sua semelhante B na outra projeção, então não é possível que uma outra região C, tal que $X_C < X_A$, possa encontrar sua semelhante D para $X_D > X_B$.
- Continuidade (*continuity*): pontos vizinhos possuem paralaxes com valores próximos

⁴⁵ Não usamos o termo congruente, pois estaríamos afirmando que a rotina não falha.

⁴⁶ Os limitadores sequencial, e de continuidade são típicos de superfícies lisas em que não há grandes variações de brilho.

Um limitador não citado como clássico por RUICHEK et al (1998), mas que tem grande uso em trabalhos de obtenção de superfícies a partir de imagens obtidas em MEV é o epipolar. Este limitador é usado para que a busca seja feita em uma única direção.

Um outro método usado para diminuir o tempo de processamento é o uso do espectro da potência ou função de autocorrelação obtidos a partir da transformada de Fourier. Essas funções possuem a característica de dar informações sobre a superfície seja ela aleatória ou não. Recentemente, uma grande quantidade de outras transformadas se apresentam como alternativas. Estas novas transformadas podem ser agrupadas em duas categorias:

- Mais rápidas e simples. Exemplos Walsh, Hartley, Hadamard e Haar.
- Transformadas que trazem mais informações. Exemplos, Wigner, ambiguity, wavelet e Gabor.

As pesquisas se concentram mais em Fourier e Hartley devido existirem formas de implementação mais rápidas de processamento destas duas transformadas. Na literatura não há um consenso sobre qual dessas transformadas é melhor para descrever superfícies. WIELAND et al. (2000) cita um trabalho que conclui que para a caracterização da superfície a transformada de Fourier é melhor do que as outras transformadas devido a convergência ser mais rápida. No entanto, existem trabalhos que citam Hartley como comprovadamente mais eficiente no cálculo dos momentos usados em descritores que identificam objetos na imagem e que podem ser usados nos processos de busca para identificação de regiões semelhantes (MILLANE, 1994). E entre as duas transformadas, Hartley⁴⁷ é citada na literatura por possuir o menor tempo de processamento (UNIYAL;MILLANE,1994, 1994).

Devido a característica de menor tempo de processamento, em nosso trabalho, implementamos uma modificação na transformada de Hartley bidimensional da plataforma ImageJ⁴⁸ (explicada no item 6.2.1. deste capítulo).

⁴⁷ Já existem estudos de como otimizá-la do ponto de vista de hardware (ERICKSON e FAGIN, 1992).

⁴⁸ Vale não desprezar que existem outras formas de implementar a transformada de Hartley que podem ser testadas para verificar o tempo de processamento bem como a eficiência em identificar as regiões semelhantes no algoritmo de reconstrução por paralaxe. Testamos apenas a forma Radix-4 do ImageJ.

Além do tempo de processamento, o cuidado na obtenção da imagem não deve ser descartado de acordo com HEIN (1996a). A correta identificação da região semelhante só ocorre se o imageamento feito pelo microscópio eletrônico de varredura não produzir grandes diferenças entre as imagens do par estéreo.

Portanto, dois procedimentos foram adotados:

- as imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura a baixas voltagens para evitar regiões com valores de brilho muito altos (regiões saturadas) mantendo, assim, a sua ótima profundidade de foco, necessária nesses estudos (JOY e JOY; NEWBURY e WILLIANS, FRANK, 1996, 2000, 1996).
- Através do desvio padrão do histograma das imagens pode-se verificar em determinados pares uma diferença de contraste⁴⁹ (Figuras 6-4 e 6-5). Isso prejudica muito o processo de reconstrução. Para reduzir isso equalizamos as imagens, ou seja, diminuimos a probabilidade de se encontrar regiões em que haja uma concentração de brilho.

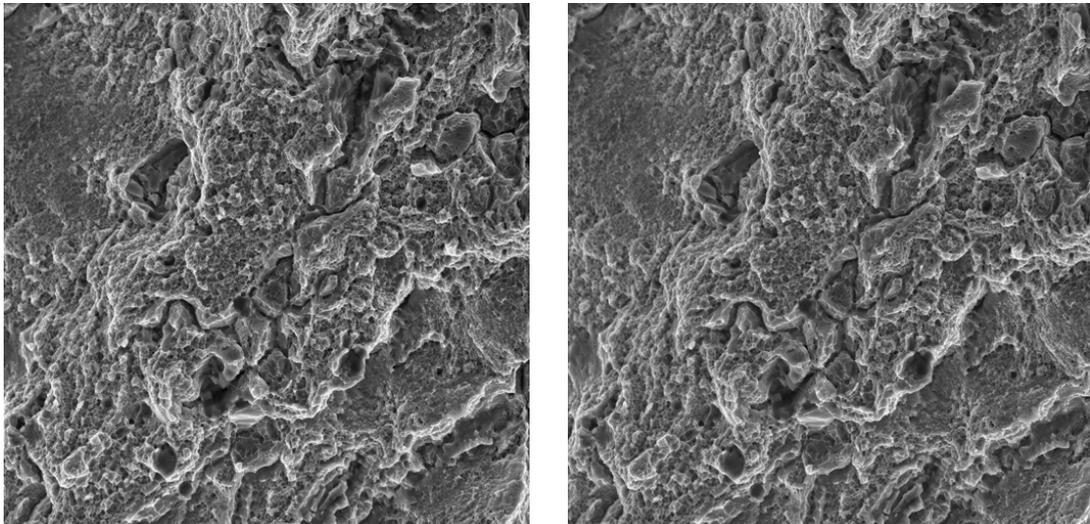


Figura 6-4: Par estéreo LT-+ 1000 X

⁴⁹ A diferença de contraste aumenta a probabilidade de que haja uma diferença nos brilhos de uma mesma subregião nas imagens do par.

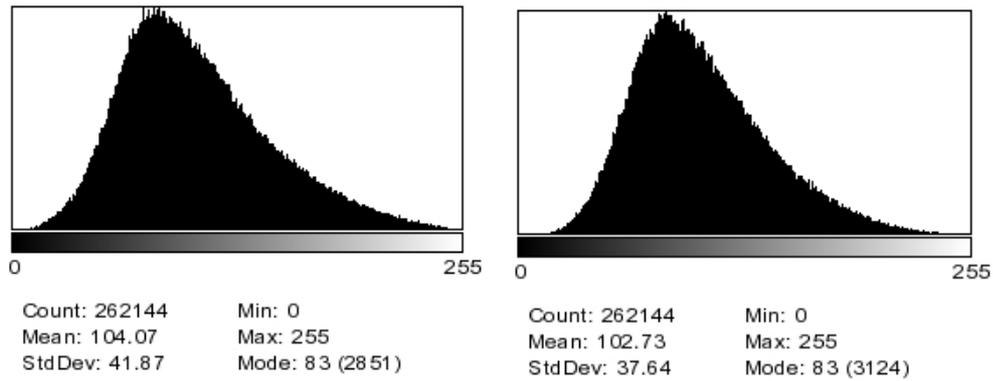


Figura 6-5: Histograma do par estéreo mostrado na Figura 6-4 onde se pode ver a diferença nos valores de desvio padrão: 41,87 para a projeção negativa e 37,64 para a projeção positiva.

6.2. TRANSFORMADA DE HARTLEY:

A transformada de Hartley foi estabelecida em 1942 por R.V.L Hartley. A versão discreta bidimensional⁵⁰ da transformada é dada pela expressão

$$H(\rho, \nu) = \frac{1}{w \cdot h} \sum_{x=0}^{w-1} \sum_{y=0}^{h-1} f(x, y) \text{cas} \left[\left(\frac{2\pi\rho x}{w} + \frac{2\pi\nu y}{h} \right) \right] \quad (6-2)$$

onde $\text{cas}(\theta) = \cos \theta + \sin \theta$; ρ e ν são, respectivamente, as frequências na direção horizontal e vertical presentes na imagem; x e y são as coordenadas, respectivamente, na direção horizontal e vertical; e w e h são o comprimento e a largura da imagem.

BRACEWELL (1986) implementou a versão rápida desta transformada baseada em técnicas já existentes e aplicadas na implementação da transformada de Fourier. Este algoritmo foi implementado na plataforma ImageJ e é estruturado em três partes:

- Determinação dos elementos⁵¹ das matrizes par e ímpar⁵² (*bit reversing array*): a execução da versão rápida de uma transformada (Fourier ou Hartley) requer posteriormente a esta etapa a divisão da matriz de elementos da imagem em dois grupos: os localizados em posições pares e outros nas ímpares com o objetivo de otimizar os cálculos. O agrupamento dos elementos da imagem é feito através da

⁵⁰ Note que definimos a transformada de Hartley a partir desta versão pois as imagens usadas em processamento digital são bidimensionais e formadas por um conjunto discreto de pontos (pixels).

⁵¹ Valores de brilho da imagem.

identificação do último *bit* significativo da posição do elemento da matriz em uma determinada linha. Este *bit* determina se a posição é par ou ímpar.

- Divisão dos elementos da matriz de brilho da imagem em suas componentes par e ímpar através das estruturas borboletas⁵³ (*butterflies operations*) (BRACEWELL, 1986).

- Rearranjo da transformada bidimensional em duas unidimensionais (*row-column process*):

Para estabelecer a última parte do algoritmo BRACEWELL (1986) em analogia à transformada bidimensional de Fourier, estabeleceu a expressão

$$T(\rho, \nu) = \sum_{x=0}^{w-1} \sum_{y=0}^{h-1} f(x, y) \operatorname{cas}\left(\frac{2\pi\rho x}{w}\right) \operatorname{cas}\left(\frac{2\pi\nu y}{h}\right) \quad (6-3)$$

a qual não representa a transformada de Hartley. No entanto, utilizando a identidade trigonométrica

$$2\operatorname{cas}(\theta + \phi) = \operatorname{cas}\theta \operatorname{cas}\phi + \operatorname{cas}\theta \operatorname{cas}(-\phi) + \operatorname{cas}(-\theta) \operatorname{cas}(\phi) - \operatorname{cas}(-\theta) \operatorname{cas}(-\phi) \quad (6-4)$$

temos

$$2H(\rho, \nu) = T(\rho, \nu) + T(w - \rho, \nu) + T(\rho, h - \nu) - T(w - \rho, h - \nu) \quad (6-5)$$

A partir da Equação 6-3 o mesmo procedimento de rearranjo usado na transformada de Fourier foi aplicado para se ter duas transformadas unidimensionais a partir de uma bidimensional. Usando, como exemplo, o primeiro termo da direita da Equação 6-5

⁵² Os termos par e ímpar referem-se à posição do elemento da matriz numa determinada linha.

⁵³ Aparentemente, este nome é dado ao processo de cálculo das componentes par e ímpar da transformada devido à sua representação em diagramas se assemelhar a uma borboleta (ERICKSON E FAGIN, 1992).

$$T(\rho, \nu) = t''(\rho, \nu) = \frac{1}{w} \sum_{x=0}^{w-1} \left\{ \frac{1}{h} \sum_{y=0}^{h-1} f(x, y) \text{cas} \left(\frac{2\pi \nu y}{h} \right) \right\} \text{cas} \left(\frac{2\pi \rho x}{w} \right) \quad (6-6)$$

ou

$$t'' = \frac{1}{w} \sum_{x=0}^{w-1} t'(x, y) \text{cas} \left(\frac{2\pi \nu x}{w} \right) \quad (6-7)$$

onde $t'(x, y) = \frac{1}{h} \sum_{y=0}^{h-1} f(x, y) \text{cas} \left(\frac{2\pi \nu y}{h} \right)$.

6.3.DESCRICÃO DO ALGORITMO IMPLEMENTADO NESTE TRABALHO:

O algoritmo é sensível somente a paralaxes horizontais, portanto se as imagens apresentarem paralaxes na vertical a imagem é rotacionada em 90° através IMAGE-ROTATE-ROTATE 90 do ImageJ.

Com as imagens equalizadas, o usuário pode optar por uma das três opções da primeira caixa de diálogo *Stereo Reconstruction*.

```
GenericDialog gd1=new GenericDialog ("Stereo_Reconstruction");
```

As opções são: *Alignment*, *Table* e *Reconstruction*. A opção *Alignment* permite reduzir o desalinhamento⁵⁴ das imagens. A segunda dá ao usuário a possibilidade de obter uma tabela com os valores de elevação em função das coordenadas. E a terceira realiza a reconstrução tridimensional a partir do paralaxe.

Antes de escolher por qualquer uma das opções, o usuário deve estabelecer a imagem referência e de busca do par estéreo. Para isso, o usuário deve escolher uma das imagens do par para abrir primeiro e rodar a rotina. Em seguida, essa mesma imagem deve ser aberta em segundo. Para cada situação, o mapa de elevações deve ser

⁵⁴ Uma maneira prática para se verificar se há um desalinhamento no par estéreo é através da visualização alternada das imagens do par. No ImageJ isto é feito acionando os comandos IMAGE-STACKS-START

comparado com a animação do par estéreo feito pelo comando STACKS-START ANIMATION do ImageJ para ele definir qual representa melhor.

A correção de um provável desalinhamento entre as imagens é feito para garantir, à princípio, a característica epipolar do par, ou seja, que o paralaxe seja em uma única direção no plano do porta-amostra. Isto garante uma maior rapidez no processo de busca pela região semelhante, pois elimina a procura na direção vertical. O desalinhamento ocorre devido à rotação e translação do porta-amostra no plano perpendicular ao plano de rotação do mesmo (Figura 6-6).

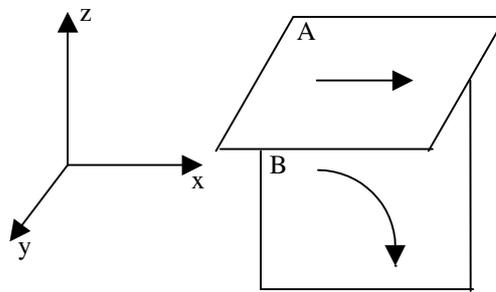


Figura 6-6: Desenho representando os planos onde ocorrem a translação (plano A) e o de rotação do porta-amostra (plano B).

Para realizar o alinhamento a rotina extrai uma janela da região esquerda superior da imagem referência e posteriormente procura na direção x e y a região semelhante na imagem de busca para estabelecer o ângulo a ser usado na correção da rotação e o valor de translação da imagem de busca. Para valores de rotação diferentes de 90° , o processo de alinhamento passa por uma interpolação bilinear.

Os parâmetros para realizar o alinhamento são dados pela caixa de diálogo *Parameters of Alignment*:

```
GenericDialog gd=new GenericDialog ("Parameters of Alignment");
```

Nessa caixa existem 4 parâmetros: *Dimension Kernel*, *Searching-x*, *Searching-y* e *Trunca*.

ANIMATION nesta seqüência. De acordo com AMORIM (2000) este efeito é conseguido, pois qualquer imagem projetada na retina do olho permanece sensível pelo cérebro durante o intervalo de 1/24 segundos.

```
gd.addNumericField("Dimension Kernel(square):",2,3);
gd.addNumericField("Searching-x:",(30),3);
gd.addNumericField("Searching-y:",(3),3);
gd.addNumericField("Trunca:",0.07,3);
```

O parâmetro *Dimension Kernel* estabelece as dimensões (comprimento e largura) da subregião da imagem referência usada na busca da região semelhante na imagem de busca e deve ser par devido a limitação imposta pela transformada rápida de Hartley. *Searching-x* dá o valor ,em pixels, da busca na direção horizontal. *Searching-y* fornece, em pixels, a busca na direção vertical.

Os valores desses parâmetros são armazenados, respectivamente, nas variáveis *maxN*, *matchx*, *matchy* e *trunca*.

```
int maxN=(int)gd.getNextNumber();
int matchx=(int)(gd.getNextNumber());
int matchy=(int)gd.getNextNumber();
float trunca= (float)gd.getNextNumber();
```

O parâmetro *Trunca* fornece o valor mínimo em

$$\left| \left(\frac{\text{convolve}}{\text{autoconvolve}} \right) - 1 \right|$$

que ao ser encontrado pela primeira vez durante a varredura estabelece a posição da região semelhante (limitador unívoco). Esse limitador é usado para evitar os falsos picos. Isto é obtido através de

```
if(matching<trunca){
    count++;
    if(count==1){
```

```

    tempmatching=matching;
    displax=searchx;
}
}

```

Ao encontrar a primeira região cujo *matching* for menor que *trunca*, *count* torna-se 1 e conseqüentemente o armazenamento da posição correta pela variável *displax* é feito. Regiões posteriores durante a varredura que tenham *matching* menores que *trunca* não são armazenados pois *count* é diferente de 1. Graficamente podemos representar este processo através da Figura 6-2.

A variável *matching* é que dá a provável similaridade entre as regiões comparadas (limitador similaridade), Essa variável é estabelecida pela equação de normalização, Equação 6-1, implementada por

$$matching=(double)Math.abs((convolve/autoconvolve)-1);$$

e que determina a região semelhante pelo valor mais próximo de 1 de $(convolve/autoconvolve)$, onde

$$autoconvolve=FFHT[0];$$

$$convolve=GFHT[0];$$

Ainda em relação a normalização, o fato de ser uma divisão pode levar uma falha quando o processo de varredura for muito grande. O programa pode encontrar erroneamente a região semelhante bem depois da posição correta devido o valor do produto no numerador da variável *matching* estar mais próximo do valor do respectivo denominador. Assim, o processo de varredura deve ser limitado pela variável *trunca* em torno do primeiro mínimo.

Os termos FFHT[0] e GFHT[0] representam as transformadas de Hartley (BRACEWELL, 1986) na origem, respectivamente, na projeção a esquerda e direita.

O programa implementado no ImageJ calcula as transformadas de Hartley da maneira descrita no item 6-2. A partir da compreensão do algoritmo usado nessa plataforma e que o paralelismo deve, a princípio, ser somente em uma direção modificamos o código original para calcular a transformada somente na direção horizontal através da não execução da transposição linha-coluna da matriz da imagem identificada na listagem do programa no trecho

```
public void transpose {
    for (r=0; r<maxN; r++) {
        for (c=r; c<maxN; c++) {
            if (r != c) {
                rTemp = x[r*maxN + c];
                x[r*maxN + c] = x[c*maxN + r];
                x[c*maxN + r] = rTemp;
            }
        }
    }
}
```

Portanto, na parte do programa que aciona a transposição da matriz descrita anteriormente

```
for (int row=0; row<maxN; row++)
    dfht3(x, row*maxN, inverse, maxN);
    progress(0.7);
    transposeR(x, maxN);
```

modificamos para

```
/*for (int row=0; row<1; row++)
    dfht3(x, row*maxN, inverse, maxN);
    progress(0.7);
```

```
transposeR(x, maxN); /*
```

onde /* indica que o trecho tornou-se comentário passando a não ser mais executada.

Quanto a obtenção das elevações, são precisos alguns parâmetros dados pelo usuário através de uma caixa de diálogo *Parameters of Stereo Reconstruction*,

```
GenericDialog gd=new GenericDialog ("Parameters of Stereo_Reconstruction");
```

Nessa caixa de diálogo existem quatro parâmetros de entrada: *Angle*, *Dimension Kernel*, *Searching-x* e *Trunca*.

```
gd.addNumericField("Angle:",0.0,3);
gd.addNumericField("Dimension Kernel(square):",2,3);
gd.addNumericField("Searching-x:",30,3);
gd.addNumericField("Trunca:",0.07,3);
```

O parâmetro *Angle* é a entrada do valor de rotação do porta-amostra para obter o par estéreo no MEV. Os outros parâmetros já foram explicados anteriormente. Esses parâmetros são armazenados, respectivamente, pelo algoritmo nas variáveis *theta*, *unit*, *maxN*, *matchx* e *trunca*.

```
short theta=(short) gd.getNextNumber();
int maxN=(int)gd.getNextNumber();
int matchx=(int)gd.getNextNumber();
float trunca= (float)gd.getNextNumber();
```

Armazenados os parâmetros de entrada, a rotina inicia a reconstrução propriamente dita no método *reconstruction*

```
public void reconstruction(...
```

A extração de janelas da imagem de referência é feita a partir de $\max N/2$ até $\text{height}-(\max N/2)$ em y ; e de $(\max N/2)+(\text{matchx}/2)$ a $\text{width}-(\max N/2)-(\text{matchx}/2)$ em x . Dessa forma a imagem do mapa de elevação resultante é um pouco menor que o par estéreo original: $\text{height}-\max N$ em y e $\text{width}-\max N-\text{matchx}$ em x .

```
for (int y=(maxN/2) ; y < height-(maxN/2); y++){
for(intx=(maxN/2)+(matchx/2);x<width-(maxN/2)-(matchx/2); x++){
```

As janelas de extração são armazenadas na matriz f . Note que é necessário identificar os elementos da matriz a partir de 0 (zero), caso contrário ocorre problemas na execução.

```
for(intx=(maxN/2)+(matchx/2);x<width-(maxN/2)-(matchx/2); x++){
for(introw=y-(maxN/2);row<y-(maxN/2)+maxN; row++){
for(intcol=x-(maxN/2);col<x-(maxN/2)+maxN; col++){
ff[(col-x+(maxN/2)+((row-y+(maxN/2))*maxN)]=pixels1[(col+(row*width))];
}
}
```

Em seguida é determinado a transformada rápida de Hartley de f .

```
double [] FFHT=fft(ip2,f,maxN);
```

Estabelecido a matriz FFHT, a rotina inicia o processo e busca de $x-(\text{matchx}/2)$ a $x+(\text{matchx}/2)$ e se deslocando de um em um pixel.

```
for(intsearchx=x-(matchx/2);searchx <=x+(matchx/2);searchx++){
```

Para cada nova posição na imagem de busca é extraída uma matriz g .

```

for(int rowg=y-(maxN/2); rowg <y-(maxN/2)+ maxN; rowg++){
for(int colg=searchx-(maxN/2);colg<searchx-(maxN/2)+maxN; colg++){
g[((colg-searchx+(maxN/2))+((rowg
y+(maxN/2))*maxN))]=pixels2[(colg+(rowg*width))];
}
}

```

Em seguida é aplicado o algoritmo alterado neste trabalho da transformada rápida de Hartley de g .

```
double [] GFHT=fft(ip2,g,maxN);
```

e depois o valor da variável *matching* é calculada conforme explicado anteriormente.

A rotina, então, estabelece a posição da região semelhante e posteriormente o valor da elevação a partir da Equação 6-1 implementado por

```
dis=(float) (max1/(2*Math.sin(delta/2.0)));
```

onde *dis* é a variável que armazena a elevação ao término de uma varredura; *max1* estabelece o paralaxe e *delta* é dado pelo parâmetro de *Angle* da caixa de diálogo *Stereo_Reconstruction*.

Esse valor é armazenado em uma matriz H e depois uma nova varredura recomeça. Terminada o cálculo das elevações para uma determinada dimensão de Kernel, novas elevações são calculadas a partir de uma Kernel de maior dimensão. Esse processo continua até que todas as dimensões dadas pela caixa de diálogo *Dimensions used* sejam usadas. Cada novo conjunto de elevações é somado ao anterior até obter o mapa híbrido final que é a média aritmética simples de todos os mapas.

A rotina ainda possui a opção de obter uma tabela das elevações em função das coordenadas (x,y) para posterior uso em outros softwares.

```
showtable(cal,ip3, imp,width,height,scalex, scaley);
```

No entanto, o tamanho da tabela obtida é muito grande para ser usado em softwares comerciais como o Excel e, portanto, em uma segunda versão da rotina torna-se necessário implementar a opção pela reconstrução de regiões de interesse (*Regions of Interesse, ROI*).

6.4.MATERIAIS, ANÁLISE E RESULTADOS:

6.4.1.INTRODUÇÃO:

Aplicamos a rotina de reconstrução por paralaxe em dois casos: 05 superfícies rugosas geradas por fratura descritas no item 6.3.1. e uma lisa (nanofio de 240nm de diâmetro cedida pela North Western University) para estabelecer a capacidade da rotina em casos extremos. Em especial, o nanofio foi utilizado com o intuito de determinar o erro ocasionado pela rotina no cálculo das elevações.

6.4.2. SUPERFÍCIES RUGOSAS:

As imagens⁵⁵ sobre as quais trabalhamos foram fornecidas pelo Engenheiro Dr. Cesar R. de Farias Azevedo, responsável pelo Laboratório de Metalografia e Análise de Falhas (LMAF) do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) do Estado de São Paulo e mostradas nas Figuras 6-7 a 6-11. Dentre as atividades desse laboratório estão “...a caracterização microestrutural de produtos metalúrgicos (incluindo engenharia reversa), análise de falha de produtos metalúrgicos e parcerias tecnológicas...”. Este contato por parte do IPT através do Dr. César Azevedo foi feito para verificar a possível ampliação na gama de análises realizadas por este instituto através da introdução da fractografia quantitativa através da reconstrução 3D a partir do paralaxe. Não nos preocupamos em estabelecer o material, pois o objetivo deste trabalho se restringe ao desenvolvimento da técnica de caracterização e não a amostra.

⁵⁵ A nomenclatura utilizada nas imagens foi dada no próprio IPT e resolvemos mantê-la.

As imagens foram obtidas de um MEV JEOL 5600 LV com uma voltagem de aceleração de 15 kV.

Dentro da bibliografia pesquisada, não constatamos uma apresentação de tantas reconstruções (5 no total) feitas com um mesmo algoritmo e em um mesmo trabalho. É de se concluir que outras rotinas apresentam uma aplicabilidade limitada a determinadas situações.

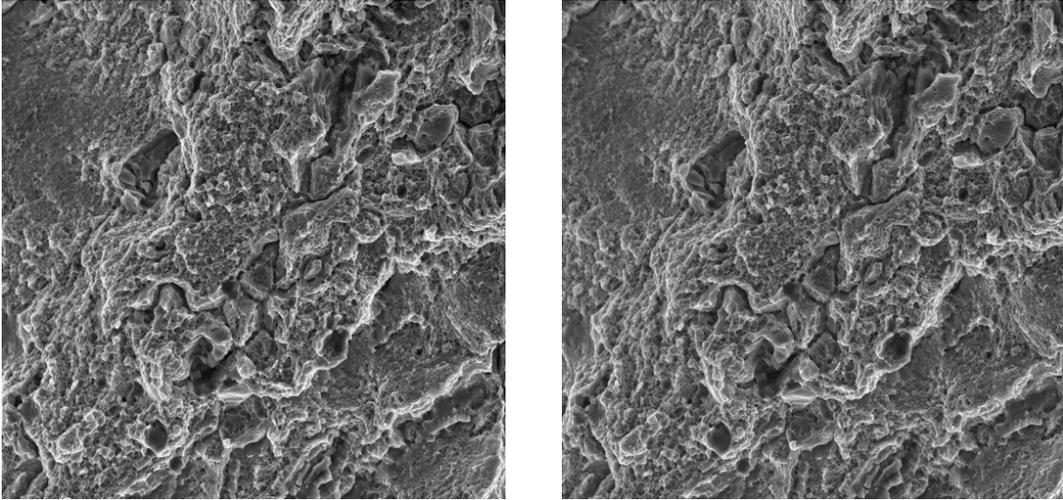


Figura 6-7: a) LT -3 1000x e b) LT +3 1000x

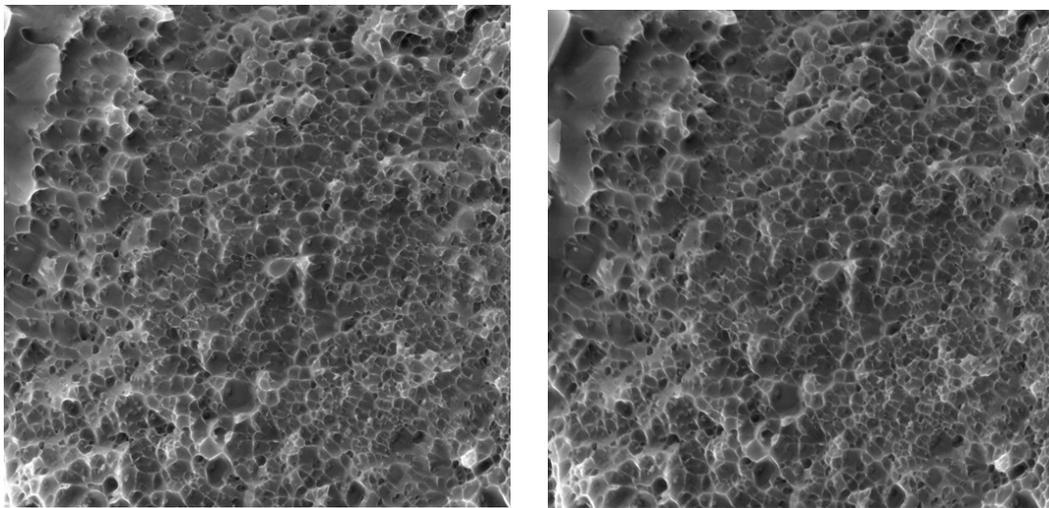


Figura 6-8: a) LT-3 5000X e b) LT+3 5000X.

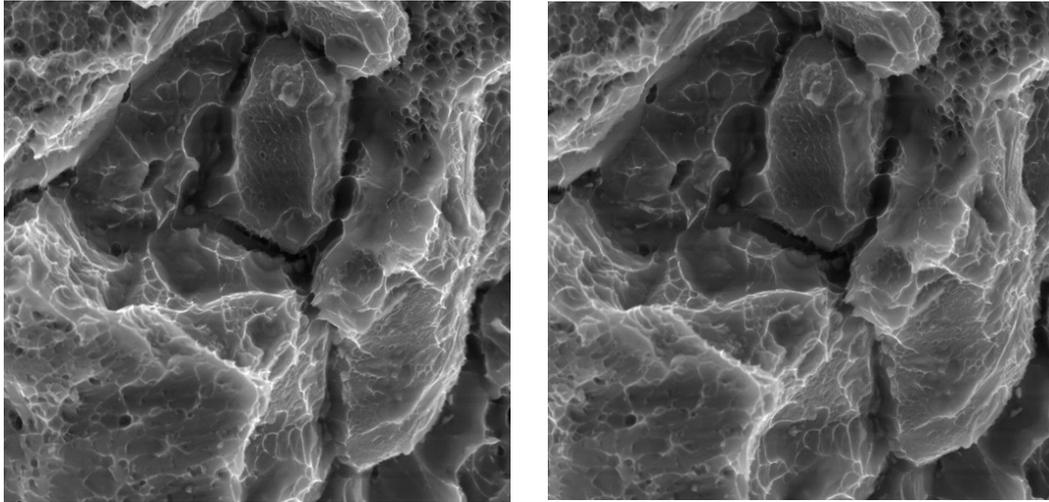


Figura 6-9: a) LT-3 5000X_2 e b) LT+3 5000X_2

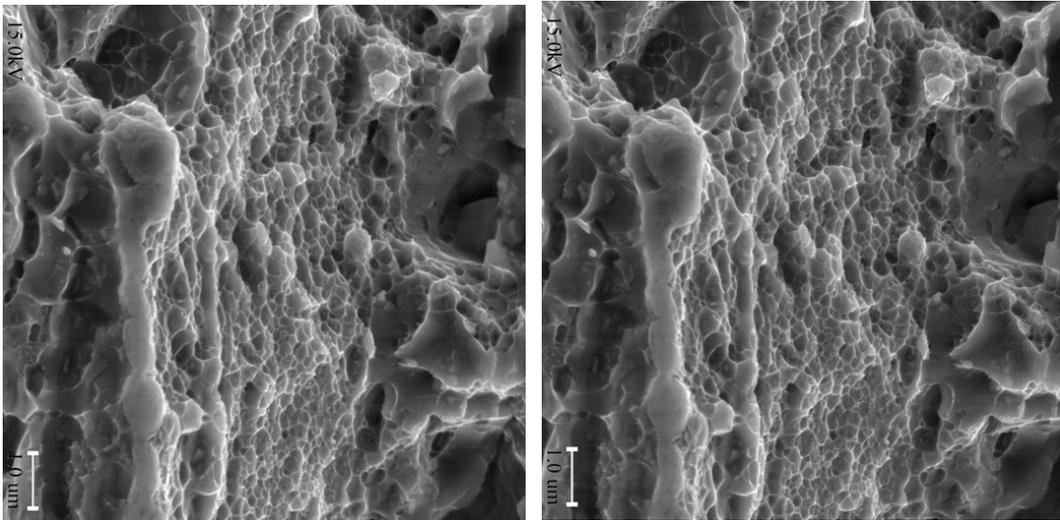


Figura 6-10: a) TL 15KV 5000x tilt-3 e b) TL 15KV 5000x tilt+3

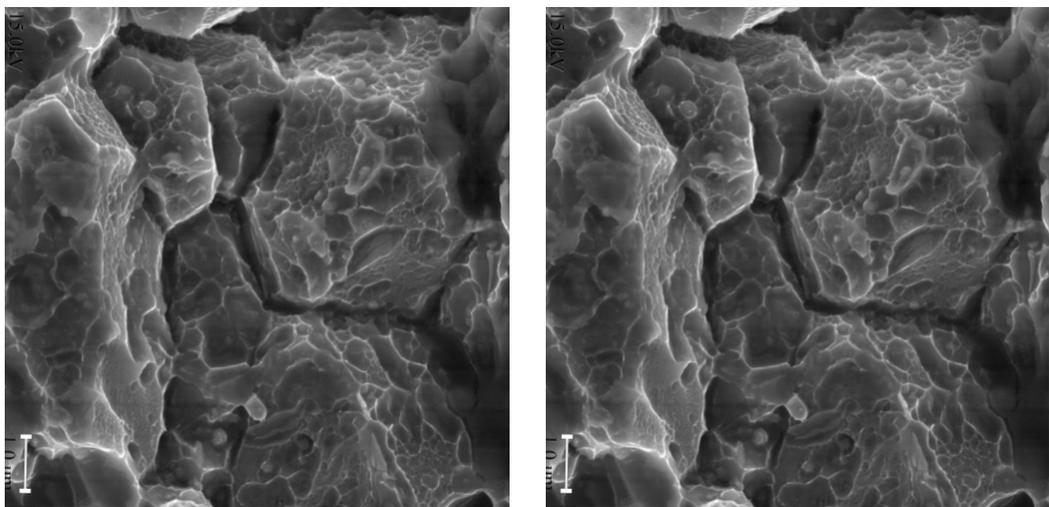


Figura 6-11: a) TL 15KV 5000x tilt+3 Recristal e b) TL 15KV 5000x tilt+3 Recristal.

As Figuras 6-12 a 6-16 são os mapas de elevação, respectivamente, sobre os pares apresentados nas Figuras 6-7 a 6-11. Todos foram feitos usando os seguintes parâmetros do algoritmo:

- Deslocamento durante a identificação pela região semelhante: 30 pixels,
- Deslocamento angular do porta-amostra do MEV: 6 graus,
- Valor mínimo para estabelecer a região semelhante: 0,07.

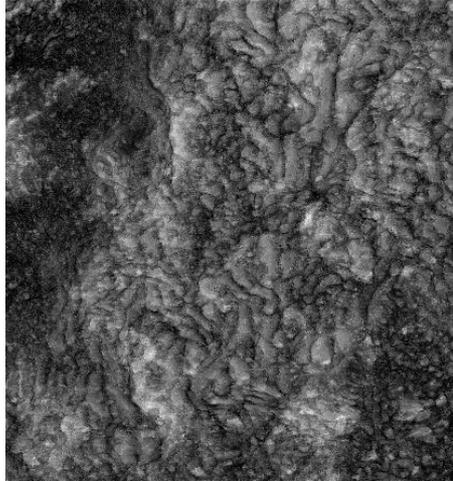


Figura 6-12: Mapa de elevação do par LT +3 1000X.

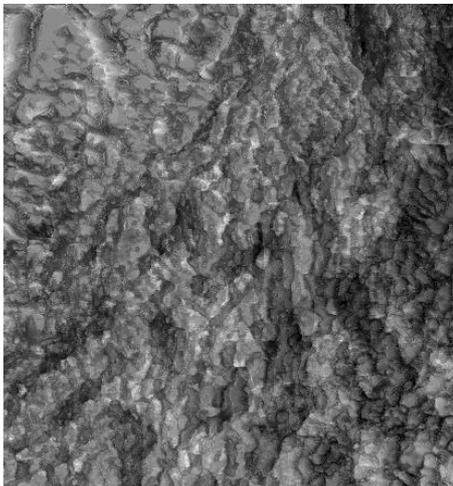


Figura 6-13: Mapa de elevação do par LT+3 5000X.

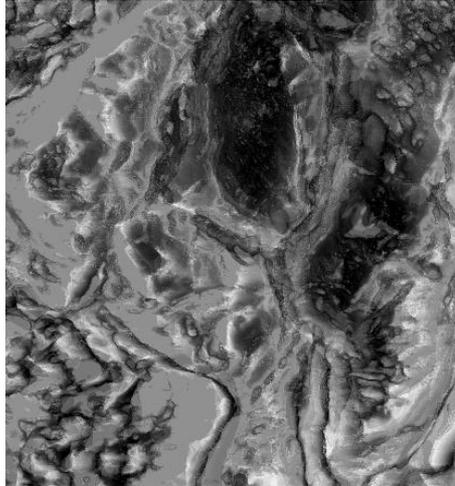


Figura 6-14: Mapa de elevação do par LT+3
5000X_2.

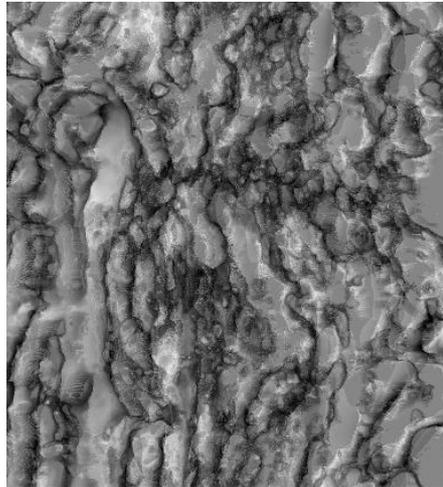


Figura 6-15: Mapa de elevação do par TL 15KV
5000x tilt+3 Recristal anteriormente alinhado

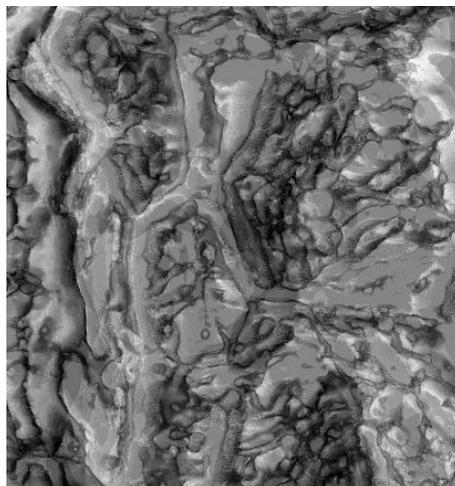


Figura 6-16: Reconstrução do par TL 15KV
5000x tilt+3 Recristal.anteriormente alinhado.

Qualitativamente, comparando os mapas de elevação das Figura 6-12 a 6-16 com os pares estéreo originais constata-se a reprodução da morfologia da superfície.

Além de estabelecer o mapa de elevação com todas as frequências estudadas, a rotina permite ao usuário verificar os mapas gerados por uma determinada frequência. Para exemplificar, as Figuras de 6-17 a 6-19 mostram uma série dos mapas individuais no caso da reconstrução do LT +3 1000x onde podemos ver as componentes de diferentes frequências presentes no relevo.

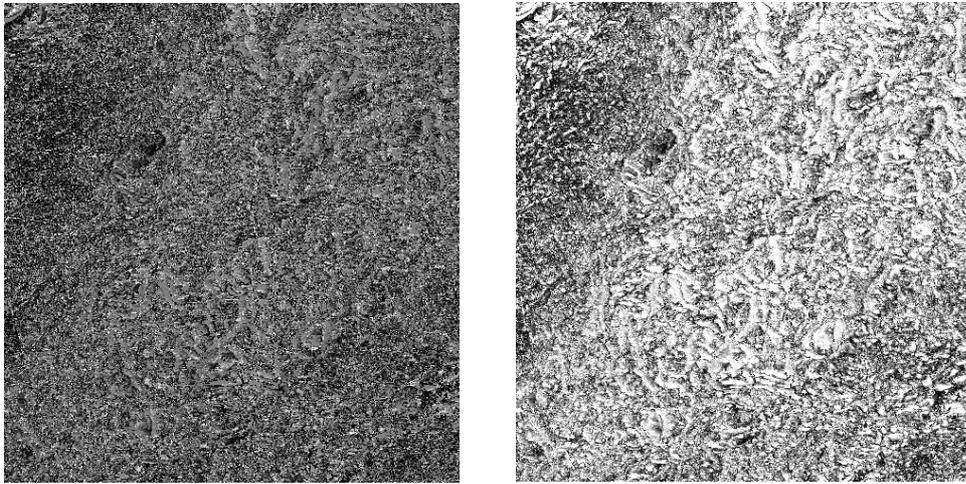


Figura 6-17: Mapas de elevação obtidos com Kernel de dimensão 2x2 (direita) e 4x4 (esquerda).

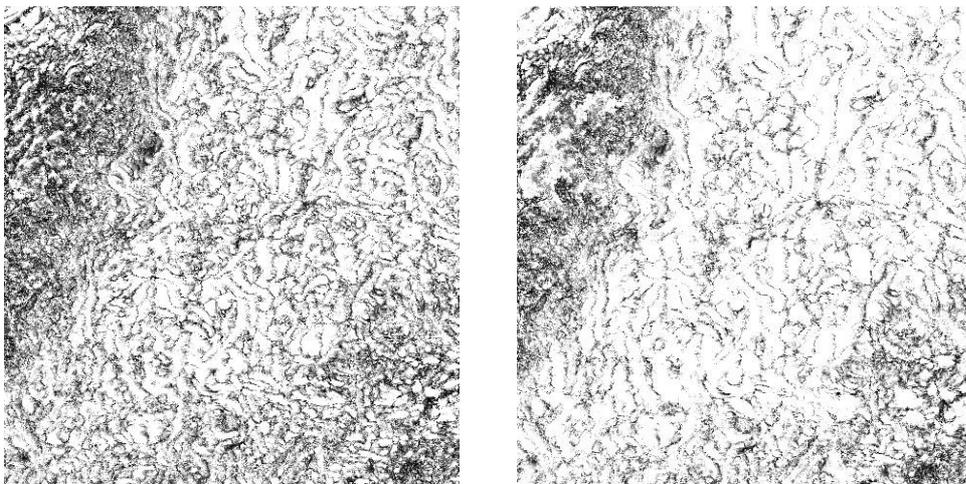


Figura 6-18: Mapas de elevação obtidos com Kernel de dimensão 8x8 (direita) e 16x16 (esquerda).

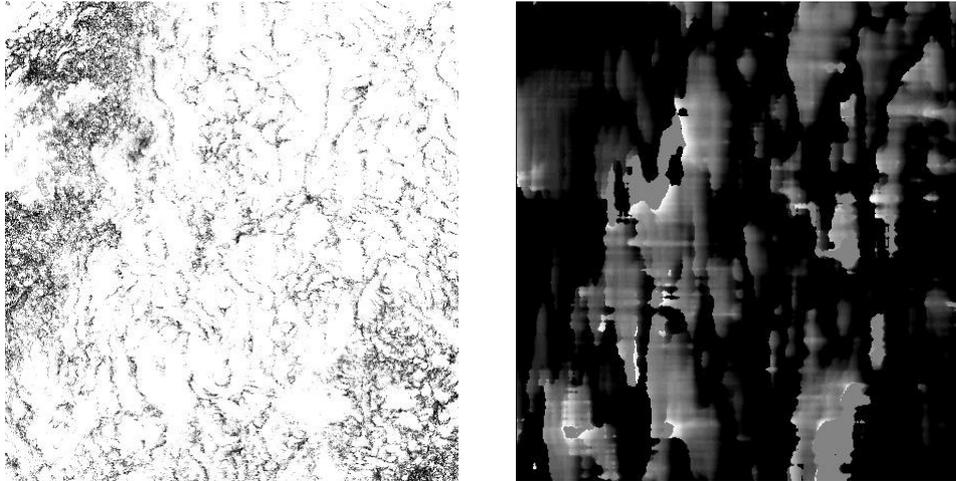


Figura 6-19: Mapas de elevação obtidos com Kernel de dimensão 32x32 (direita) e 64x64 (esquerda).

O tempo médio de processamento para obter esses pares foi de 5400 segundos em um computador DELL Dimension 4400 com processador Intel pentium 4 e memória RAM de 512 Mbytes. Este valor sem dúvida é muito menor do que o observado na literatura.

A precisão do programa foi medida através da comparação de alguns valores (15 pontos) do mapa de elevação com a medição visual do paralaxe a partir do par estéreo original pois não conhecemos os valores das elevações da superfície para estabelecer o erro como foi feito em LUO e LIOU (1998).. Esta comparação foi realizada somente nos pares que não foram alinhados, pois nos outros a análise visual fica prejudicada pela perda da referência devido a rotina de alinhamento. Alguns artigos usam imagens artificiais para estabelecer os erros, no entanto não existem imagens artificiais que simulem a oclusão de regiões e distorções geométricas (ver Figura 6-20) nas imagens obtidas em MEV (LACEY et al., 1998) que é o principal problema citado na literatura e confirmado neste trabalho.

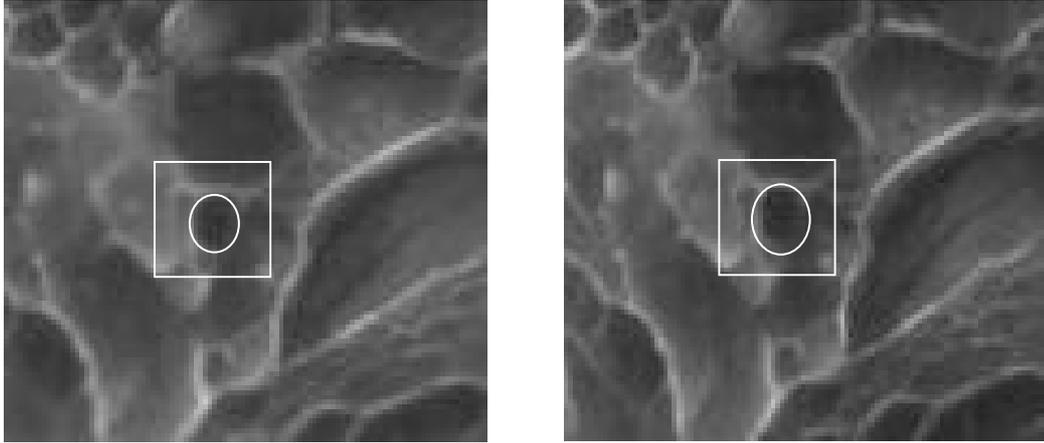


Figura 6-20: Detalhe do par estéreo LT+-3 5000X onde está destacado uma região que possui uma distorção geométrica a) projeção a direita e b) projeção a esquerda

Na análise do LT+-3 5000X o erro percentual encontrado foi de $25 \pm 24\%$. Para a amostra LT +- 1000X o erro médio entre o valor estabelecido pela rotina e a inspeção visual foi de $378 \pm 344\%$. E finalmente para amostra LT+-3 5000X_2 o erro médio observado foi $21 \pm 22\%$. Vale observar que estes valores são de regiões de alta frequência, pois são de fácil identificação visual, portanto não houve como estabelecer o erro de regiões de baixa frequência.

A verificação visual permitiu também constatar que o maior problema que influenciou nas medidas feitas pela rotina foi o deslocamento na vertical da região entre as imagens do par, ou seja, a perda da característica epipolar do par estéreo. Quando as regiões eram epipolares o erro encontrado era em torno de $5 \pm 2\%$. Por exemplo, um deslocamento na vertical de 1 pixel levava a um erro na medida de paralaxe de $40 \pm 10\%$.

6.4.3.SUPERFÍCIES LISAS:

A mesma rotina também foi empregada na reconstrução de um nanofio cuja superfície é lisa, ou seja, de baixa frequência. O diâmetro do fio é de 230 nm e a rotina estabeleceu um diâmetro médio com erro de $9 \pm 8\%$. Observando a Figura 6-23 pode-se verificar que a morfologia estabelecida pela rotina apresenta uma depressão não existente no centro do nanofio e uma textura. Esta falha ocorreu porque o algoritmo ao

passar do centro do fio identifica a região semelhante em uma posição anterior a correta devido a iluminação simétrica em um objeto liso. Para entender melhor veja a Figura 6-21.

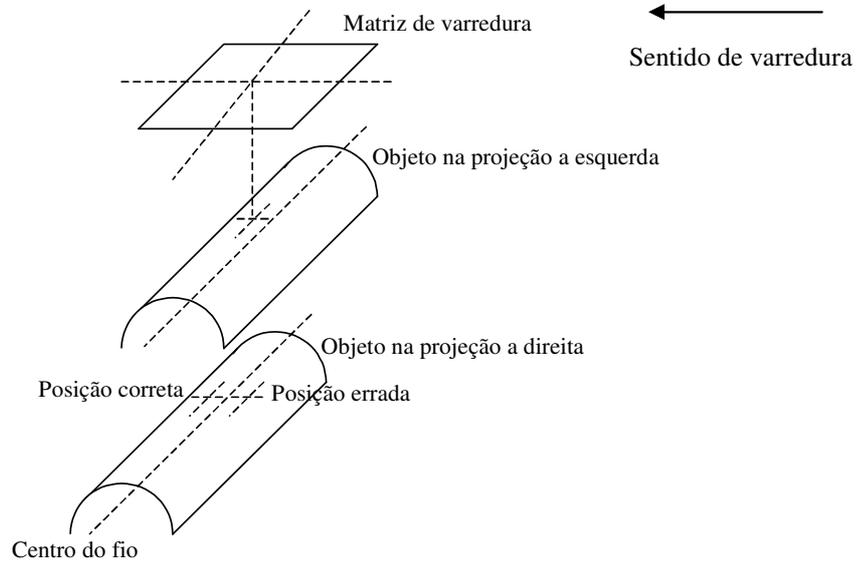


Figura 6-21: Falha do algoritmo quando há regiões lisas com iluminação simétrica. Uma solução para este caso é introduzir uma iluminação não simétrica. A empresa JEOL na página http://www.jeol.com/sem/docs/sem_guide/guide.pdf cita que objetos longos colocados em uma direção paralela a face do detector fornecem tal iluminação.

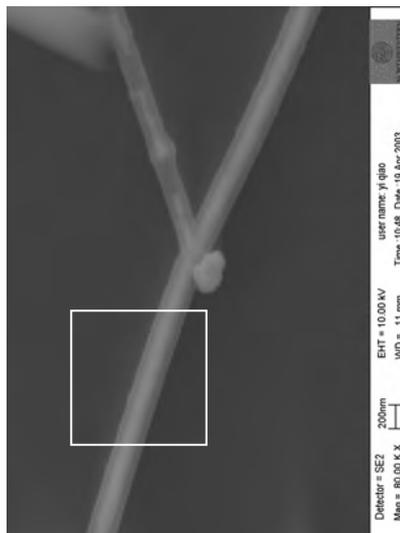


Figura 6-22: Imagem de um nanofio com 240 nm de diâmetro.

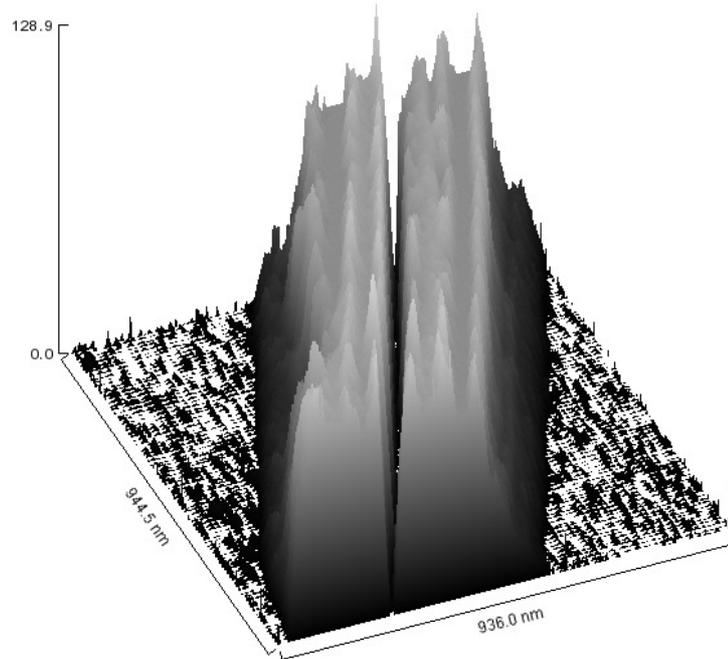


Figura 6-23: Morfologia da região nanofio destacada no quadro da Figura 6-22. As elevações foram determinadas pela rotina de reconstrução por paralaxe desenvolvida neste trabalho.

Portanto, a modificação na maneira de imagear o fio pode melhorar a qualidade da reconstrução obtida. A Figura 6-24 mostra o mapa de elevação completo do fio mostrado na Figura 6-22.



Figura 6-24: Mapa de elevação resultante da aplicação da rotina de reconstrução a partir do paralaxe aplicada no nanofio mostrado na Figura 6-21.

7.1.RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO FOCO:

- Não há o melhor método para reconstruir superfícies a partir do foco. O ideal é permitir ao usuário ter acesso a vários para que ele decida pelo critério que resulte em uma curva de foco unimodal e mais delgada.
- O uso de polarizador e analisador diminuiu sensivelmente a quantidade de ruídos no mapa de elevações como foi mostrado na Figura 4-1 devido ao fato do analisador ter uma direção de polarização que atenua alguns dos raios provenientes da amostra diminuindo as interferências construtivas no plano do CCD as quais podemos verificar que é uma das principais fontes de ruído nas imagens capturadas.
- O algoritmo implementado neste trabalho permite uma maior aplicabilidade se comparado a outros métodos devido ao fato de que permite o aumento da matriz usada para estabelecer o critério de foco e portanto, permite analisar superfícies com rugosidades de diferentes frequências.
- A descrição dos parâmetros usados na câmera (*White Balance, GetFlatfield Image* entre outros) e do microscópio (objetivas) é de extrema importância, pois permite que outros pesquisadores possam comparar os resultados obtidos neste trabalho com outros nas mesmas condições.
- As medidas feitas por esta rotina possuem uma resolução horizontal $0,5 \mu\text{m}$ (dada pelo critério de Rayleigh) e resolução vertical de $0,91 \mu\text{m}$ (dada pelo profundidade de campo da objetiva).

7.2.RECONSTRUÇÃO A PARTIR DO PARALAXE:

- A restrição do processo *row-column* da transformada de Hartley para que fosse feito somente na horizontal permitiu um ganho no tempo de processamento. Para se ter uma idéia, o algoritmo existente hoje no LaiMat realiza a reconstrução em uma região de 256x256 pixels em 19 horas enquanto que o algoritmo implementado faz a reconstrução em uma região de 1600x1200 pixels em 9 minutos.
- O algoritmo implementado possui um erro de $5 \pm 2\%$ quando os pontos são epipolares.
- Novamente, a descrição dos parâmetros usados na câmera e no microscópio é de extrema importância, pois permite que outros pesquisadores possam comparar os resultados obtidos neste trabalho com outros nas mesmas condições.

Capítulo

8

Trabalhos Futuros

- Durante o trabalho com a reconstrução a partir do foco, foi constatado que o método deve ser automatizado uma vez que o processamento é muito cansativo devido ao grande número de imagens geradas. A automatização deste processo começa por se ter uma mesa controlada por um motor de passo em que a captura seja feita aleatoriamente e a cada pilha adquirida o processamento seja feito logo em seguida. Esta automatização descrita pode ser feita usando alguns plugins já existentes na plataforma ImageJ e adaptando outros.
- As reconstruções a partir do foco foram realizadas somente em um modo de imageamento, ou seja, campo claro. Não fizemos em outros modos, mas de acordo com (GEUSEBROEK, 2000) o critério de foco pode ter diferentes comportamentos uma vez que a razão sinal-ruído (SNR) muda. Logo, uma sugestão é a realização de como o critério se comporta, para uma mesma amostra, em diferentes modos (campo escuro, por exemplo).
- Outro estudo que pode ser realizado posteriormente, é a análise de diversas fontes de luz no que diz respeito ao consumo de energia versus qualidade da imagem. Acreditamos que como o CCD possui uma determinada sensibilidade espectral, o uso de fontes que produzem espectros com uma dispersão próxima a sensibilidade do mesmo podem ser mais eficientes do ponto de vista energético, pois as lâmpadas de xenônio produzem um amplo espectro (comparado a sensibilidade espectral do CCD) em que uma boa parte não é utilizada acarretando um consumo energético desnecessário (compare Figuras 3-25 e 4-5).
- Estudar as reconstruções obtidas a partir de pares estéreo variando os parâmetros do MEV (ângulo de rotação do porta-amostra, corrente de filamento, tensão de

aceleração entre outros). A ausência de um MEV na Unesp-Campus de Guaratinguetá não permitiu este trabalho. Ter um equipamento, desse cuja principal função seria a produção de imagens com vistas para o estudo de algoritmos, permite ao programador desenvolver de maneira mais rápida a compreensão de suas limitações, artefatos e características que influem no imageamento. Podemos ainda ressaltar que de acordo com o relatório Complexo Eletrônico: Balança Comercial em 1998 produzido pela Gerência Setorial do Complexo Eletrônico do BNDES, existe um déficit na balança comercial de 5 bilhões de reais na área de eletrônicos. O relatório ainda aponta a necessidade de se desenvolver aqui no Brasil os componentes utilizados na área eletrônica. Se uma das principais formas de caracterização dos *wafers*, que são a base para estes componentes, reside em técnicas por processamento de imagens então o uso deste equipamento e de outros exclusivamente para tais fins é de extrema importância⁵⁶.

- Outros trabalhos podem ser feitos a partir da análise da Transformada de Hartley implementada de forma diferente ao Radix-4 usado no ImageJ com vistas para estabelecer a melhor maneira de se obter menores tempos de processamento e permitir o uso de maiores resoluções espaciais.
- Ainda de acordo com a literatura há uma tendência para usar os dois métodos em conjunto de maneira que eles se complementem nos aspectos mais fracos. SCHECHNER (1998) mostra que a comparação entre os métodos de reconstrução a partir do foco e do paralaxe deve ser feito se as dimensões dos equipamentos envolvidos forem as mesmas. A dúvida em realizar esta comparação devido ao fato de serem equipamentos que trabalham com feixes diferentes não deve acontecer. De acordo com GOLDSTEIN et al. (2003), "...um objeto visto a partir de dois pontos de vistas distintos onde fica subtendido um ângulo θ em relação ao objeto é equivalente a capturar duas imagens a partir de um único ponto de vista mas rotacionando o objeto com um valor total igual a θ ". SCHECHNER (1998)

⁵⁶ Como as duas técnicas podem fornecer parâmetros de rugosidade de superfície e estes são aplicados na caracterização de materiais nos mais diversos setores econômicos a importância no estudo do processamento digital de imagens aumenta.

continua que nas mesmas dimensões, a chance de oclusão é maior para a reconstrução a partir do foco devido à dimensão da lente. Ele também cita que a diminuição do ângulo diminui o problema de oclusão de área para os dois métodos. Além disso, DAS (1993), após analisar as incertezas envolvidas na reconstrução a partir do par estéreo e do foco, afirma que os métodos possuem características que são complementares.

- Outra linha, mas que envolve áreas de conhecimento diferentes do processamento digital de imagens, é o desenvolvimento de dispositivos mais adequados para a reconstrução a partir do paralaxe e do foco. ELNAGAR (1998) cita que, teoricamente, o uso de CCDs com uma distribuição uniforme de fotosensores não é a maneira mais adequada para determinação de paralaxes.

Finalmente, uma última sugestão de trabalho futuro pode ser feita a partir da adaptação dos métodos descritos nesta tese para utilização nas análises de produtos durante o processo de fabricação (chamados *in-process*).

REFERÊNCIAS:

Manual Nikon Inverted Metalurgical Microscope Epiphot 200, Nikon Inc.

A Guide to Scanning Microscope Observation, JEOL, 2003.

ALMEIDA, A.C.R., **PhotoPixJ: Ambiente Independente de Plataforma para Execução e Integração de Algoritmos de Processamento Digital de Imagens**, Dissertação de Mestrado, UFMG, Belo Horizonte, MG (1998).

AMMANN, J.J., BOUCHAD, E., **Characterization of self-affine surfaces from 3D digital reconstruction**, The European Physical Journal Applied Physics 4, 133-142 (1998).

BAENA, J.M., VALDIVIA, J.F., GARCIA, J.A., **A multi-channel autofocusing scheme for gray-level shape scale detection**, Pattern Recognition, Vol.30, pp. 1769-1786, NO.10, (1997).

BAILER, W., **WritingImageJ Plugins-A Tutorial**, Versão 1.3, Tutorial de plugins do ImageJ obtido em <http://mtd.fh-hagenberg.at/depot/imaging/imagej/>.(2000).

BODDEKE, F.R., VLIET, L.J., NETTEN, H. and YOUNG, I.T., **Autofocusing in Microscopy based on the OTF and Sampling**, BioImaging, vol 2, no 4, 193-203 (1994)

BOYDE, A., **The Perception and Measurement of Depth in the SEM**, Scanning Electron Microscopy 67-78, 1979.

BOYES, E.D., **On Low Voltage Scanning Electron Microscopy and Chemical Microanalysis**, Microscopy and Microanalysis, 6, 307-316, (2000).

BRACEWELL, R. N., **Aspects of the Hartley Transform**, Proceedings of the IEEE, vol. 82, NO. 3, March 1994.

BRACEWELL, R.N., **Fast Two-Dimensional Hartley Transform**, Proceedings of the IEEE, Vol. 74, NO 9, September 1986.

BRACEWELL, R.N., **The Fast Hartley Transform**, Proceedings of the IEEE, Vol.72, NO 8, August 1984.

CHEN, Q., YANG, S., LI, Z., **Surface roughness evaluation by using wavelets analysis**, Precision Engineering, 23, 209-212, (1999).

CHENG, Y. , HARTEMINK, C.A, HARTWIG, J.H., Jr., C.F.D., **Three-dimensional reconstruction of the actin cytoskeleton from stereo images**, Journal of Biomechanics 33, 105-113, (2000).

CRUZ, T.G., **Caracterização Microestrutural de Cerâmicas de TiO₂ por Microscopia Óptica e Processamento Digital de Imagens**, Dissertação de Mestrado, Unesp (2003).

CWAJNA, J., STANISLAW, R., **Application of confocal laser scanning microscopy, atomic force microscopy, and the profilometric method in quantitative fractography**, Materials Characterization 46, 183-187, (2001).

DANUSER, G., **Super-resolution microscopy using normal flow decoding and geometric constraints**, Journal of Microscopy, Vol. 204, Pt 2, November 2001, pp.136-149.

DAS, S., AHUJA, N., **A Comparative Study of Stereo, Vergence, and Focus as Depth Cues for Active Vision**, IEEE, (1993).

DELLY, J.G., **Photography through the microscope**, Kodak Books, Eastman Kodak Company, Ninth Edition, (1998).

EFFORD, N., **Digital Image Processing- a practical introduction using JAVA™**, Addison Wesley, (2000).

ELNAGAR, A., **Optimal error discretization under depth and range constraints**, Pattern Recognition Letters 19, 879-888, (1998).

EL-SOUDANI, S. M., **Correction of Scanning Electron Image Distortions for Specimen Tilt and Fracture Surface Roughness.**

ERICKSON, A. C., FAGIN, B.S., **Calculating the FHT in Hardware**, IEEE Transactions on Signal Processing, Vol.40, NO.6, (June 1992).

FARSHAD, F., RIEKE, H., GARBER, J., **New developments in surface roughness measurements characterization, and modeling fluid in pipe**, Journal of Petroleum Science & Engineering 29,139-150, (2001).

FIRESTONE, L., COOK, K., CULP, K., TALSANIA, N. and PRESTON, K., **Comparison of Autofocus Methods for Automated Microscopy**, Cytometry 12:195:206(1991).

FRANK, L., **Real Image resolution of SEM and low-energy SEM and its optimization: distribution width of total surface emission**, Ultramicroscopy 62, pp. 261-269, (1996).

GEUSEBROEK, J.M., CORNELISSEN, F., SMEUULDERS, A W.M. and GEERTS, H, **Robust Autofocusing in Microscopy**, Cytometry 39:1-9(2000)

GOLDSMITH, N.T., **Deep Focus; A digital Image Processing Technique to Produce Improved Focal Depth in Light Microscopy**, Image Anal. Stereol. 19, 163-167, (2000).

GOLDSTEIN, J., JOY,D., LYMAN, C., ECHLIN, P., LIFSHIN, E., SAWYER, L., MICHAEL J., **SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND X-RAY MICROANALYSIS**, Third Edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, (2003).

GONZALEZ, R.C. e WOODS, R.E., **Digital Image Processing**, Addison-Wesley Publishing Company, Inc., (1992).

GONZALEZ, R.C. e WOODS, R.E., **Processamento Digital de Imagens**, Editora Edgar Blücher LTDA, (2000).

GROEN, F.C.A., YOUNG, I.T. and LIGTHART, G., **A Comparison of Different Focus Function for Use in Autofocus Algorithms**, Cytometry 6:81-91(1985)

HE, Y.J., CAI, A., SUN, J.A., **Real-Valued Hankel transform approach to image reconstruction from projections**, IEEE, Electronic Letters, Vol.29, NO. 20, (September,1993).

HEIN, L.R.O., **Estudo da Zona de Estiramento através de Técnica de Reconstrução Tridimensional**, Tese (doutorado)-Faculdade de Engenharia Mecânica-UNICAMP, (1996).

HEIN, L.R.O., **Investigação de falha em componentes de cinta metálica**, Parecer DMT 08/2003, (2003).

HEIN, L.R.O., **Quantitative fractography by digital image processing: NIH Image macro tools for stereo pair analysis and 3-D reconstruction**, Journal of Microscopy, Vol.204, Pt.1, 17-28, (2001).

HEIN, L.R.O., SILVA, F.A, NAZAR, AM.M., AMMANN, J.J., **Three-Dimensional Reconstruction of Fracture: Area Matching Algorithms for Automatic Parallax Measurements**, Scanning , Vol.21, 253-263, (1999).

HORSTMANN, C.S., CORNELL, G., **Core JAVA™-1.2-Volume I-Fundamentals**, Sun Microsystems Press, USA,(1992).

http://www.jeol.com/sem/docs/sem_guide/guide.pdf

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>

<http://www.alicon.com/>

<http://www.nikonusa.com/bluelink/BDPlan/EPIPHOT200300.pdf>

INOUE, S., SPRING, K., **Video Microscopy-The Fundamentals**, Plenum Press, New York, USA, (1997).

JONES, A.G., Taylor C.J., **Automated Interpretation of SEM Images**, citeseer.nj.nec.com/519937.html, (2003).

JOY, D. C., JOY, C.S., **Low Voltage Scanning Electron Microscopy**, Micro., Vol.27, N^o 3-4, pp. 247-263, (1996).

KOPAC, J., BAHOR, M., **Interaction of the technological history of a workpiece material and the machining parameters on the desired quality of the surface roughness of a product**, Journal of Materials Processing Technology 92-93, pp. 381-387, (1999).

KRIETE, A., **Image Quality**, Journal of Computer-Assisted Microscopy, Vol.10, NO.4, pp.167-171, (1998).

LACEY, A.J., THACKER, N.A., CROSSLEY, S., YATES, R.B., **A Multi-Stage Approach to the dense Estimation of Disparity from Stereo SEM Images**, Image and Vision Computing 16, 373-383, (1998).

LUO, P.F., LIOU, S.S., **Measurement of curved surface by stereo vision and error analysis**, Optics and Laser in Engineering 30, 471-486, (1998).

MANNHEIMER, W.A., **Microscopia dos Materiais-Uma Introdução**, Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise (2002).

MASSOUMIAN, F., JUŠKAITIS, R., NEIL, M.A.A., WILSON, T, **Quantitative polarized light microscopy**, Journal of Microscopy, Vol. 209, Pt. 1, pp. 13-22, January (2003).

MATULA, P., KOZUBEK, M., STAIER, F., HAUSMANN, M., **Precise 3D image alignment in micro-axial tomography**, Journal of Microscopy, Vol.209, Pt.2, February, 2003, pp. 126-142.

MILLANE, R.P., **Analytic Properties of the Hartley Transform and their Implications**, Proceedings of the IEEE, Vol. 82, NO.3, March (1994).

MÜLLEROVÁ, I., **Microscopy with Slow Electrons**, Journal of Computer Assisted Microscopy, pp. 97-100, Vol.9, N^o2, (1997).

NEWBURY, D.E., WILLIAMS, D.B., **The Electron Microscope: The Materials Characterization Tool of The Millenium**, Acta mater. 48, 323-346, (2000).

NICOLIS, F.C., JAGER, G., SEWELL, B.T., **Use of general imaging model to achieve predictive autofocus in the scanning electron microscope**, Ultramicroscopy 69, 25-37, (1997).

NOGUCHI, M., NAYAR, S.K., **Microscopic Shape from Focus Using a Projected Illumination Pattern**, Math. Comput. Modelling, Vol.24, NO.5-6, pp.31-48, (1996).

OHLSSON, R., WIHLBORG, A., WESTBERG, H., **The accuracy of fast 3D topography measurements**, Machine Tools & Manufacture 41, pp. 1899-1907, (2001).

PAJARES, G., LA CRUZ, J.M., **A New Learning Strategy for stereo Matching Derived From a Fuzzy Clustering Method**, Fuzzy Sets and Systems, 110, 413-427, (2000).

PENTLAND, A.P., **A New Sense for Depth of Field**, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Inteligence, Vol.PAMI-9, NO.4, (1987).

PIRARD, E., LEBRUN V., NIVART, J., **Optimal Acquisition of Video Images in Reflected Light Microscopy**, Microscopy and Analysis, July 1999, pp. 19-21.

RICHARDS,R.G.,Wieland, M., TEXTOR, M.,**Advantages of stereo imaging of metallic surfaces with low voltage backscattered electrons in a field emission scanning electron microscope**, Journal of Microscopy, Vol.199, pt 2, August 2000, pp.115-123.

RUICHEK Y., POSTAIRE, J.G., BRUYELLE, J.L., **A neural Approach for Obstacle Detection with a Linear Stereoscopic Sensor**, Mathl. Comput. Modelling, Vol.27, N^o 9-11, pp.215-228, (1998).

RUSS, J.C., **An inexpensive Teste of Image Quality**, Journal of Computer Assisted Microscopy , Vol. 9, N° 4, 1997.

RUSS, J.C., RUSS, J.C., **Letter to Editor**, Journal of Microscopy, Vol. 199, pt2, August 2000, pp.87-89.

RUSS, J.C., **Computer-Assisted Microscopy**, Plenum Press, New York-USA, (1992).

SAHWI, S.Z., MEKAWI, A.M., **Effect of Noise on Surface Roughness Measurements**, IEEE Instrumentation and Measurement, pp. 232-235, (1996).

SCHAPER, D., **Automated quality control for micro-technology components using a depth from focus approach**, V IEEE Southwest Symposium on Image Analysis and Interpretation (SSIAI'02), 2002.

SCHECHNER, Y.Y., KIRYATI, N., **Depth from Focus vs. Stereo: How Different Really are They ?**, Proceedings-Fourteenth Internacional Conference on Pattern Recognition 16, Vol.2, p. 1784-1786, (1998).

SEDGEWICK, J, **Resolution Confusion**, Microscopy Today, pp. 14-16, 2002

Spot Insight User Guide-Windons and Mac-V.3.5, Spot Diagnostic Instruments, Inc

STELZER, E.H.K., **Contrast, resolution, pixelation, dynamic range and signal-to-noise ratio:fundamental limits to resolution in fluorecence light microscopy**, Journal of Microscopy, Vol. 189, Pt1, pp. 15-24,(1998).

THOMAS, T.R., **Trends in Surface Roughness**, J.Mach.Tools Manufact., Vol.38, Nos 5-6, pp. 405-411, (1998).

UNIYAL, P.R., **Transforming Real-Valued Sequences: Fast Fourier versus Fast Hartley Transform Algorithms**, IEEE Transactions on Signal Processing, Vol.42, NO. 11, (November 1994).

VALDECASAS, A.G., MARSHALL D. and BECERRA, J.M., **Extend Depth-of-Focus Algorithms in Brightfield Microscopy**, Microscopy and Analysis, September 11-13 (2002)

VALDECASAS, A.G., MARSHALL, D., BECERRA, J.M., TERRERO, J.J., **On the extend depth of focus algorithms for bright field microscopy**, Micron 32 559-569 (2001).

WELLS, O.C., **Low Voltage Scanning Electron Microscopy and Jack Ramsey`s Principle**, Microscopy Today, pp. 27-28, Issue#02-3, May-June 2002

WHITEHEAD, S.A., SHEARER, A.C., WATTS, D.C., WILSON, N.H.F., **Comparison of two stylus methods for measuring surface texture**, Dental Materials 15, pp. 79-86, (1999).

WIDJAJA, J.,JUTAMULIA, S., **Use of wavelet analysis for improving autofocusing capability**, Optical Communications, 151, 12-14, (1998).

WIELAND, M., HÄNG, P., HOTZ, W., TEXTOR, M., KELLER, B.A., SPENCER, N.D., **Wavelength-dependent measurement and evaluation of surface topographies: application of new concept of window roughness and surface transfer function**, Wear 237, 231-252, (2000).

WONG,P.L.,LI, K.Y., **In-process roughness measurements on moving surfaces**, Optics & Laser Technology 31, 543-548, (1999).

www.mct.gov.br/cct/prospectar/Relatório3/sumario. **Estudo ProspeCtar-Relatório de Materiais**, Anexo VIII do Relatório Final do estudo ProspeCtar do Ministério da Ciência e Tecnologia-Instituto Nacional de Tecnologia (INT), Instituto de Pesquisas Espaciais (INPE) e Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), (2002).

ABERRAÇÕES ÓPTICAS

A.1.INTRODUÇÃO:

Sistemas ópticos sofrem com distorções nas imagens devido à geometria esférica das lentes. Existem dois tipos principais que estão associados com a orientação das frentes de onda e dos planos focais em relação ao eixo óptico do microscópio: concêntrico (*on-axis*) e excêntrico (*off-axis*). No primeiro estão incluídos a aberração cromática e esférica e no segundo o coma, astigmatismo e a curvatura de campo.

A.1.ABERRAÇÃO CROMÁTICA:

A aberração cromática (Figura A1) ocorre porque as lentes não refratam comprimentos de onda diferentes sob o mesmo ângulo. Portanto, o comprimento focal para o comprimento de onda vermelho é maior do que das outras cores. O tamanho do objeto passa a ser função da cor (diferença cromática da ampliação), e passa a ter franjas coloridas ao seu redor.

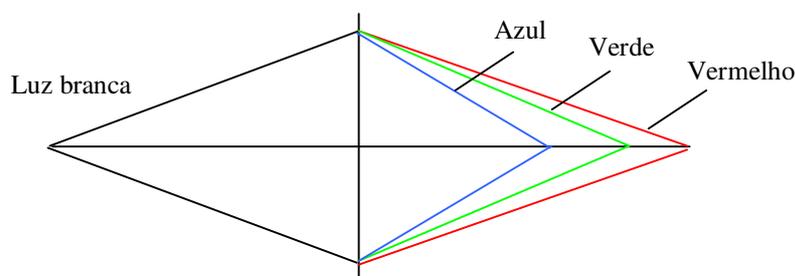


Figura A1: Representação de uma lente com aberração cromática do ponto objeto.

A.2.ABERRAÇÃO ESFÉRICA:

A aberração esférica (Figura A2) ocorre quando um mesmo comprimento de onda é refratado sob ângulos diferentes dependendo de onde incida na lente. Quanto mais na periferia da lente maior é o ângulo. O resultado é que o plano imagem deixa de existir e o objeto não pode ser corretamente focalizado. Este efeito pode ser reduzido limitando a exposição da lente com diafragmas.

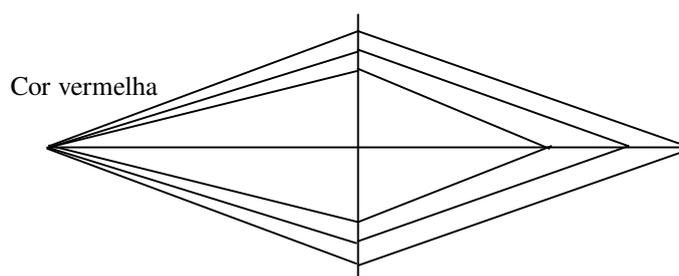


Figura A2: Representação de uma lente com aberração esférica do ponto objeto.

A.3.ABERRAÇÃO DE COMA:

Coma (Figura A3) é similar à aberração esférica mas são encontrados em sistemas onde o ponto objeto não está alinhado com o eixo óptico da lente. Esta aberração é agravada quanto maior for a curvatura da lente. O nome é dado pois o efeito produzido é muito parecido com a cauda de um cometa. O efeito produzido é uma assimetria nos objetos da imagem. Ocorre devido a diferenças na refração dos raios de luz ao passarem pela lente obliquamente. O grau de coma é maior para lentes com pequenas aberturas e pode ser corrigido, em parte, pela redução do tamanho da abertura do diafragma.

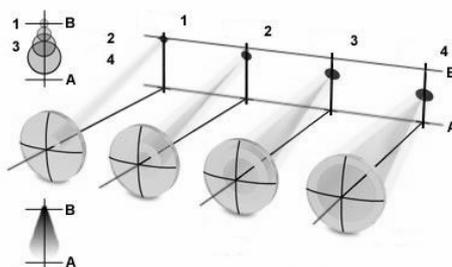


Figura A3: Exemplo da forma da figura de Airy resultante do imageamento de um ponto objeto por uma lente com aberração de coma.

A.4.ASTIGMATISMO:

Astigmatismo (Figura A4) é similar ao coma, porém não é sensível à abertura do campo e depende mais fortemente da obliquidade dos raios que incidem na lente. Causa uma imagem de linha ou elipse a partir de um ponto. Dependendo do ângulo que a luz incide na lente a imagem resultante pode apresentar duas direções: meridional ou equatorial. A intensidade do brilho, o contraste e a resolução diminuem à medida que se distancia do centro óptico.

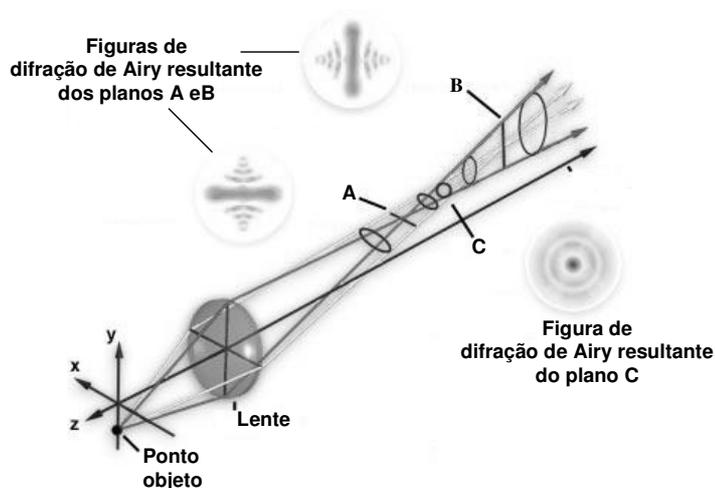


Figura A4: Imagens formadas com astigmatismo a partir de um ponto objeto que não está no eixo óptico da lente. Nele destaca-se os planos A) equatorial, B) meridional e o C) plano onde se forma o círculo de menor confusão.

A.5.CURVATURA DE CAMPO:

Curvatura do campo (Figura A5) é o efeito causado pela lente ter superfície curva. O plano da imagem resultante é curvo. Sucessivas regiões podem ser focadas mas não todas de uma vez e portanto acarreta um problema para dispositivos compostos por superfícies planas tais como sensores CCD ou CMOS. A maneira mais usual de diminuir este efeito é o uso de lentes do tipo Plan.

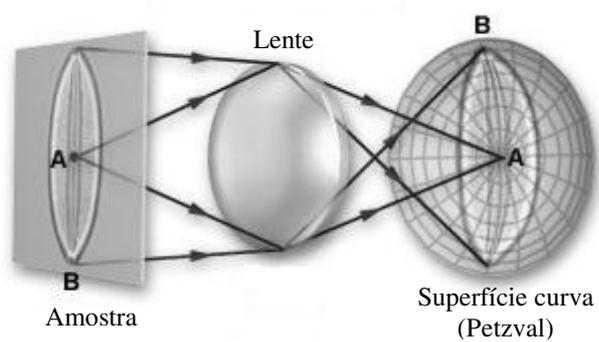


Figura A5: Pontos A e B conjugados em uma superfície curva através de uma lente que sofre dessa aberração.

B

FUNÇÃO DE TRANSFERÊNCIA ÓTICA (*OPTICAL TRANSFER FUNCTION*)

É definida como a habilidade do sistema de transferir contraste do objeto para a imagem. É determinada pelo produto da função transferência de contraste⁵⁷ e uma parte imaginária que é chamada de função de transferência de fase (*Phase Transfer Function*, PTF). Em termos gerais

$$OTF = CTF \cdot e^{i\phi(f)} \quad (B-1)$$

Um sistema óptico perfeito tem um CTF igual a 1 (um) para todas as frequências e simultaneamente PTF igual a zero.

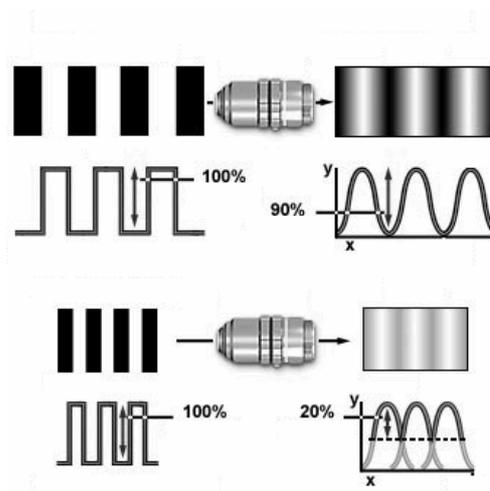


Figura B1: Exemplo de contraste (valores representados por setas com pontas duplas) de duas grades após serem imageadas por um sistema óptico. O eixo y indica valores de brilho e o eixo x a posição na imagem. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>.

⁵⁷ Em inglês *Contrast Transfer Function*, CTF.

Um sistema óptico livre de aberrações tem uma abertura circular e um eixo óptico centralizado que produzem uma função de transferência de fase nula para todas as frequências e em todas as direções. Neste caso é necessário somente determinar a função de transferência de contraste que é diferente para cada modo de microscopia.

A Figura B1 mostra a variação de contraste após o imageamento de duas grades com frequências diferentes por um sistema óptico. O gráfico obtido após o imageamento relaciona o brilho (eixo y do gráfico) em função da posição (eixo x do gráfico) na imagem. Note que há uma queda no valor do contraste de 100% para 90% ou 20%. Se obtivermos vários desses gráficos para diferentes grades (diferentes frequências espaciais), podemos estabelecer o gráfico (a) da Figura B2. A partir desse gráfico é estabelecido o CTF (gráfico b) da Figura B2 do sistema óptico relacionando o contraste obtido e as frequências espaciais.

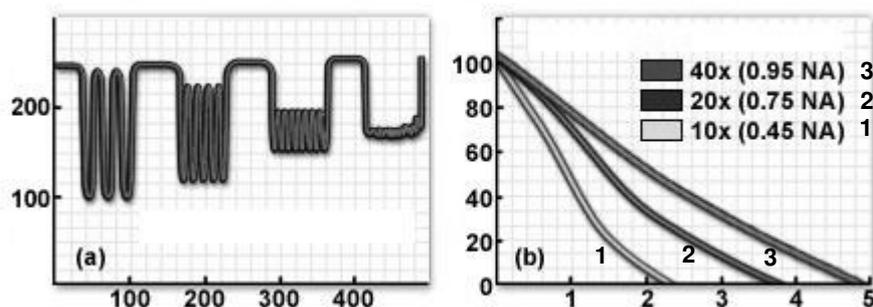


Figura B2: A direita Intensidade (y) em função dos pixels (x). A esquerda contraste (%) em função da frequência espacial. Note a influência da NA. Adaptado de <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>.

Do gráfico (b) da Figura B2, podemos destacar o chamado valor de corte⁵⁸ (*cutoff*) a partir do qual o sistema óptico não consegue estabelecer um contraste. Isto ocorre devido aos efeitos de difração nas pupilas das objetivas limitarem a resposta da frequência espacial.

A função de transferência de contraste está também relacionada a função de espalhamento do ponto (*point spread function*)⁵⁹.

⁵⁸ Este valor é inversamente proporcional a resolução.

⁵⁹ Imagem de um ponto objeto imageado.

A Figura B3 mostra um exemplo da função de transferência de contraste e a função de espalhamento de ponto. A medida que o sistema óptico consegue distinguir os dois picos (linhas pontilhadas), a distância “s” da origem do eixo (zero) aumenta. Em consequência o contraste também. Se relacionarmos “s” e o contraste obtemos as curvas do tipo b) da figura B3. Em contrapartida, se relacionarmos $1/s$ e o contraste obtemos as curvas c). Note que a medida que diminui a frequência ($1/s$) aumenta a distinção dos dois picos pontilhados. Esta é uma propriedade típica das transformadas de Fourier: o comprimento da função é inversamente proporcional ao comprimento de sua transformada.

Portanto, ao se obter as CTFs de um sistema óptico é só estabelecer a transformada para determinar a função espalhamento de ponto.

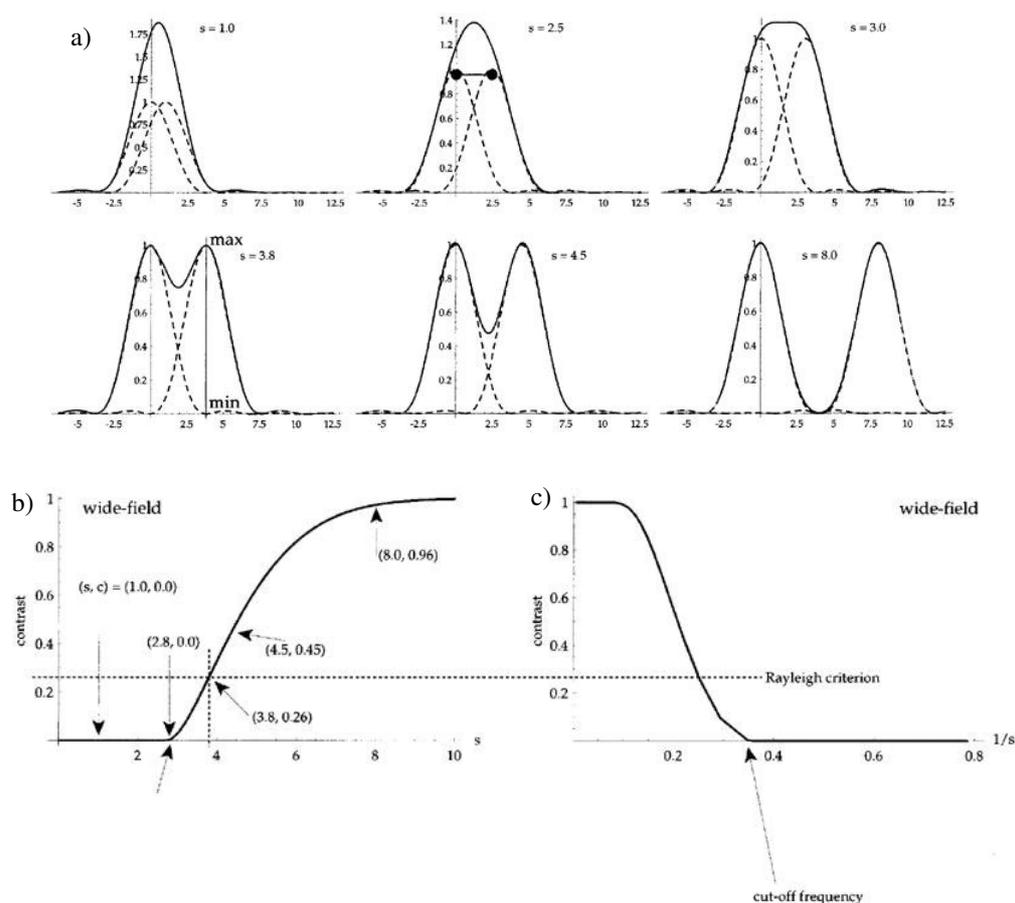


Figura B3: Esboço de um a)PSF, b)das curvas de contraste x distância e c)CTFs. Adaptado de (STELZER, 1998).

Na prática, as medidas da função de transferência de contraste são feitas através do uso de figuras de teste (Figura B4) que consistem de grades de linhas periódicas de alto contraste variando de $0,1\mu\text{m}$ a vários mm. Detetores no plano imagem estabelecem a distribuição de brilho em todo plano, ou seja, o gráfico CTF da Figura B2.

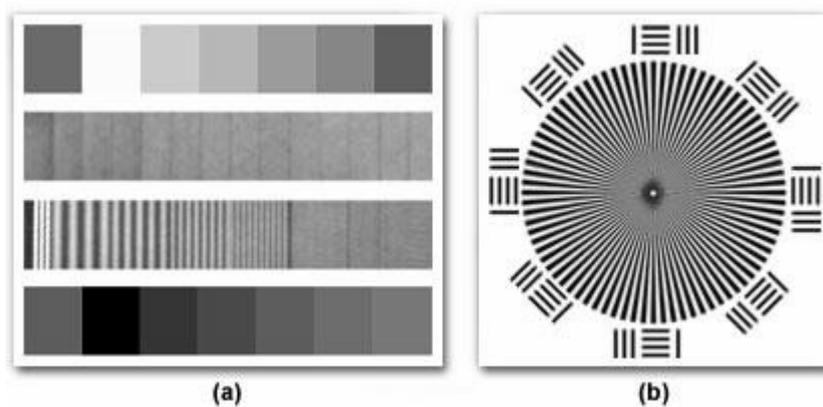


Figura B4: Figuras testes sinusoidal (a) e estrela (b). Adaptado de <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>.

Apêndice

C

DISCOS DE AIRY

São as figuras formadas quando um ponto objeto é imageado por um sistema óptico. Este fenômeno é causado pela difração ou espalhamento pelas partes da amostra e da parte posterior da objetiva. O máximo central é chamado de disco de Airy⁶⁰ e corresponde a 84% da intensidade da luz incidente. A Figura C-1 mostra os discos de Airy e sua distribuição de intensidade em função da separação (parte superior da figura). A parte inferior mostra as respectivas funções de espalhamento de ponto. A Figura C-1(a) mostra um disco de Airy com um máximo central de ordem zero circundado por máximos de 1^a, 2^a, etc ordens. Dois discos de Airy e suas distribuições de intensidade no limite da resolução óptica são mostrados na Figura C-1(b). Na Figura C-1(c) é mostrado dois discos em que a distância entre os picos é menor que a largura da base da distribuição de intensidade.

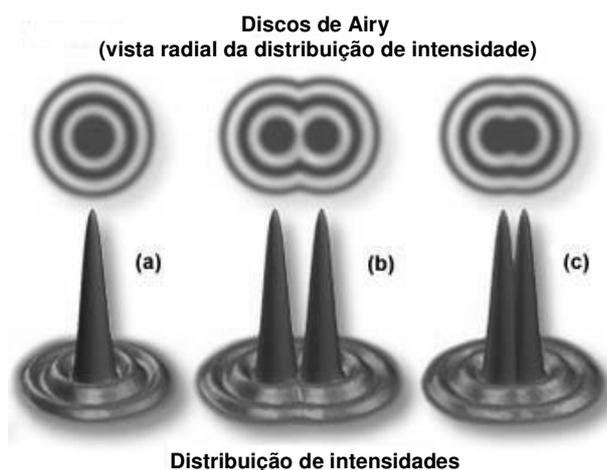


Figura C-1: Parte superior mostra as figuras formadas pela vista radial da distribuição de intensidade luminosa de um ponto conjugado por um sistema óptico. A parte inferior mostra essa distribuição vista em 3D.

⁶⁰ Corresponde a secção transversal da função espalhamento de ponto de um ponto objeto imageado por um sistema óptico.

Apêndice

D

ESPECIFICAÇÕES USADAS

O microscopista pode identificar as propriedades da objetiva através das inscrições feitas no cilindro. Essas informações podem ser agrupadas nas seguintes categorias descritas na Tabela D-1⁶¹.

Abreviação	Tipo
Achro, Achromat	Achromatic aberration correction
Fluor, Fl, Fluor, Neofluor, Fluotar	Fluorite aberration correction
Apo	Apochromatic aberration correction
Plan, Pl, Achroplan, Plano	Flat Field optical correction
EF, Acroplan	Extended Field (field of view less than Plan)
N, NPL	Normal field of view plan
Plan Apo	Apochromatic and Flat Field correction
UPLAN	Olympus Universal Plan (BF, DF, DIC, Polarize)
LU	Nikon Luminous Universal (BF, DF, DIC, Polarized Light)
L, LL, LD, LWD	Long Working Distance
ELWD	Extra-Long Working Distance
SLWD	Super-Long Working Distance
ULWD	Ultra-Long Working Distance
Corr, W/Corr, CR	Correction Collar
I, Iris, W/Iris	Adjustable numerical aperture (with iris diaphragm)
Oil, Oel	Oil Immersion
Water, WI, Wasser	Water Immersion
HI	Homogeneous Immersion
Gly	Glycerin Immersion
DIC, NIC	Differential or Nomarski Interference Contrast
CF, CFI	Chrome-Free, Chrome-Free Infinity-Corrected (Nikon)
ICS	Infinity Color-Corrected System (Zeiss)
RMS	Royal Microscopical Society objective thread size
M25, M32 ⁶²	Metric 25-mm e Metric 32-mm objectives thread
Phase, PHACO, PC	Phase Contrast
Ph 1, 2, 3, etc.	Phase Condenser Annulus 1, 2, 3, etc.
DL, DLL, DM, BM	Phase Contrast: Dark Low, Dark Low Low, Dark medium, Bright M
PL, PLL	Phase Contrast: Positive Low, Positive Low Low

⁶¹ Mantivemos a nomenclatura original em inglês devido ao receio de que a tradução pudesse dificultar trabalhos posteriores que usem a referida tabela como fonte de consulta

⁶² Quase todas as objetivas possuem roscas padronizadas pela Royal Microscopical Society (RMS). As abreviações normalmente usadas são RMS, M25 (rosca métrica de 25 mm), M32 (rosca métrica de 32 mm).

Abreviação	Tipo
PM, PH	Phase Contrast: Positive Medium, Positive High Contrast
NL, NM, NH	Phase Contrast: Negative Low, Neg. Medium, Neg. High Contrast
P, Po, Pol, SF	Strain-Free, Low Birefringence, for Polarized Light
U, UV, Universal	UV transmitting (down to approximately 340 nm)
M	Metallographic (no coverslip)
NC, NCG	No Coverslip
EPI	Oblique or Epi illumination
TL	Transmitted Light
BBD, HD, B/D	Bright or Dark Field (Hell, Dunkel)
D	Darkfield
H	For use with a heating stage
U,UT	For use with a universal stage
DI, MI, TI	Interferometry, Noncontact, Multiple Beam (Tolanski)

Tabela D-1: Designação das objetivas. Extraída de <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>

Os fabricantes de microscópios identificam suas objetivas com cores para auxiliar a identificação rápida da ampliação e do meio em que a objetiva deve trabalhar de acordo com a Tabela D-2.

Ampliação	Código de cor
1/2x	Sem cor
1x	Preto
1.25x	Preto
1.5x	Preto
2x	Marrom (ou laranja)
2.5x	Marrom (ou laranja)
4x	Vermelho
5x	Vermelho
10x	Amarelo
16x	Verde
20x	Verde
25x	Turquesa
32x	Turquesa
40x	Azul claro
50x	Azul claro
60x	Cobalto azul
63x	Cobalto azul
100x	Branco
150x	Branco
250x	Branco
Meio de imersão	Código de cor
Óleo	Preto
Glicerina	Laranja
Água	Branco

Tabela D-2: Designação de cores das objetivas. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>

E

ELEVAÇÃO A PARTIR DO PARALAXE DE PAR ESTÉREO OBTIDO EM MEV

Considere uma mesma elevação sob ângulos diferentes

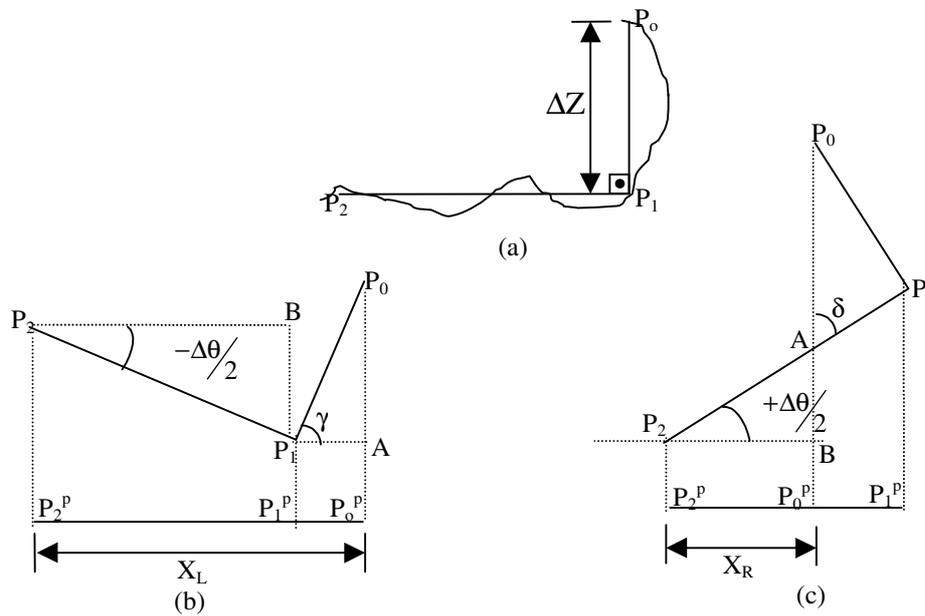


Figura E-1: Ilustração adaptada de El-Soudani que mostra três pontos P₀, P₁ e P₂ de uma superfície (a) e a rotação da amostra para obter a projeção à esquerda (b) e a projeção à direita (c).

Na Figura E-1 a projeção à esquerda (b), a partir do triângulo P₁AP₀ formado, podemos concluir que

$$\cos(\gamma) = \cos\left(90 - \frac{\theta}{2}\right) = \frac{\overline{P_1^p P_0^p}}{\Delta Z} \quad (F-1)$$

e do triângulo P₂BP₁

$$\cos\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{\overline{P_2^p P_1^p}}{\overline{P_2 P_1}} \quad (F-2)$$

Portanto,

$$X_L = \Delta Z \cdot \cos\left(90 - \frac{\theta}{2}\right) + P_2 P_1 \cdot \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{F-3})$$

Na projeção à direita, a partir do triângulo AP_1P_0 formado, podemos concluir que

$$\text{tg}\left(90 - \frac{\theta}{2}\right) = \frac{\Delta Z}{AP_1} \quad (\text{F-4})$$

e do triângulo ABP_2

$$\cos\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{X_R}{AP_2} \quad (\text{F-5})$$

Portanto,

$$\overline{P_2 P_1} = \overline{AP_2} + \overline{AP_1} = \frac{X_R}{\cos\left(\frac{\Delta\theta}{2}\right)} + \frac{\Delta Z}{\text{tg}\left(90 - \frac{\Delta\theta}{2}\right)} \quad (\text{F-6})$$

Substituindo os resultados de F-4, F-5 em F-6 e posteriormente retornando a F-3, temos

$$X_L = \Delta Z \cdot \cos\left(90 - \frac{\theta}{2}\right) + \left(\frac{X_R}{\cos\left(\frac{\Delta\theta}{2}\right)} + \frac{\Delta Z}{\text{tg}\left(90 - \frac{\Delta\theta}{2}\right)} \right) \cdot \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{F-7})$$

e fazendo as devidas substituições obtemos

$$\Delta Z = \frac{X_R - X_L}{2 \cdot M \cdot \text{sen}\left(\frac{\Delta\theta}{2}\right)} \quad (\text{F-8})$$

F

TEMPERATURA DA COR

O modelo da temperatura da cor é baseado na relação entre a temperatura teórica de um material ideal, corpo negro⁶³, e a distribuição de energia da radiação emitida pela fonte de luz.

Temperatura da cor de uma fonte de luz é a moda da distribuição espectral⁶⁴ (dada em kelvin, ou K) quando esta se encontra dentro da faixa de variação do espectro de um corpo negro.

Há dois pontos importantes com relação a temperatura da cor. Este valor refere-se somente ao espectro visível, mas não necessariamente descreve o efeito da fonte nas fotografias ou nas imagens digitais. Também, a temperatura da cor não leva em conta a morfologia da distribuição espectral produzida pela fonte. Por exemplo, fontes usadas em fluorescência não tem a distribuição espectral semelhante a de um a corpo negro (são discretas). Portanto, o uso somente do parâmetro temperatura da cor para estabelecer quais filtros⁶⁵ serão usados para casar a sensibilidade espectral do sensor com o da fonte da luz não é adequado. Nestes casos a comparação da eficiência quântica destas fontes é mais eficiente para estabelecer os filtros e posteriormente definir o equilíbrio da cor na imagem (*color balanced*)⁶⁶.

Em sistemas digitais este parâmetro não é usado devido o dispositivo de imageamento permitir o ajuste do equilíbrio da cor branca (ver Capítulo 3).

⁶³ O corpo negro absorve toda radiação incidente, sem qualquer transmissão ou reflexão, e então re-emite toda energia na forma de um espectro contínuo.

⁶⁴ Também chamado de cromaticidade.

⁶⁵ Estes filtros são fabricados pela Kodak (série 80), Nikon (série NCB) e Olympus (série LBD) e são normalmente usados para aumentar ou diminuir a temperatura da cor da distribuição espectral da fonte de luz.

⁶⁶ O equilíbrio da cor se refere ao fato das coincidências na posição e na forma das distribuições da fonte de luz e do sensor.

G

PARÂMETROS DE RUGOSIDADE

A superfície dos materiais são geralmente descritas em termos da composição química, morfologia ou da topografia.

Essas propriedades são de extrema importância em aplicações tais como formabilidade, adesão, tribologia (desgaste e lubrificação), óptica e biocompatibilidade (WIELAND, et al, 2000).

Os algoritmos estudados neste trabalho procuram estabelecer as duas últimas propriedades da superfície e uma das maneiras de se apresentar os resultados dos algoritmos é através dos parâmetros de rugosidade 2D da superfície. Estes parâmetros podem ser divididos em três grupos⁶⁷:

- Amplitude: descrevem as características verticais da superfície, por exemplo, R_a ⁶⁸, R_q , R_{max} ou R_{ZDIN} .
- Espaciais: descrevem as características horizontais da superfície, por exemplo, S_m .
- Híbridos: incluem informação sobre os planos vertical e horizontal da amostra, por exemplo, S_k , K ou L_r .

Vale lembrar que são dependentes da escala e do intervalo de amostragem.

A chave para estabelecer melhor a rugosidade da superfície a partir do perfil 2D é a linha de referência. Ela deve ser composta por alguns componentes de baixa frequência da superfície, incluindo a forma, o erro da forma e o waviness representados em KOPAC e BAHOR (1999).

Existem quatro tipos de linhas, citados como clássicos por (CHEN et al, 1999):

- a linha média dos mínimos quadrados

⁶⁷ Em WIELAND et al. (2000) há uma excelente descrição detalhada destes parâmetros.

⁶⁸ Na literatura também são encontradas as abreviações CLA (*center line average*) e AA (*arithmetic average*) (KOPAC e BAHOR, 1999).

- a linha da média aritmética simples que variam em função do comprimento de amostragem e da localização da amostra
- a linha por regressão polinomial que tem sua limitação determinada pelo grau do polinômio usado para estabelecê-la
- a linha derivada do método de filtragem que exige usualmente um filtro especial para cada tipo de superfície.

O autor estabelece uma quinta, a linha de referência a partir da wavelet do perfil 2D que, de acordo com o ele, atende as exigências descritas anteriormente para a linha de referência.⁶⁹

Da literatura podemos concluir que não há a melhor maneira de se obter essas elevações, mas a mais adequada para cada situação. Por exemplo, WIELAND et al. (2000) cita alguns problemas relacionados quanto a obtenção da topografia da superfície

- As medidas de rugosidade em faixa de escala que vai de nm a mm é geralmente prejudicada devido a limitação da resolução vertical e ou horizontal do instrumento; deformação da superfície por equipamentos que realizam as medidas através do contato; artefatos nas imagens produzidas por instrumentos ópticos introduzidos devido a microgeometria, inclinação ou reflectância da superfície. A conclusão é de que o uso de diferentes técnicas pode dar uma visão melhor da topografia em diferentes escalas⁷⁰.
- Certas topografias, por exemplo cavidades provocadas por corrosão do tipo pite, são melhor descritas através da representação 3D ao invés dos parâmetros de rugosidade.
- Superfícies completamente diferentes (quanto a morfologia) podem apresentar parâmetros iguais e contribuições da ordem menores que micro podem não ser identificadas. Assim já há trabalhos optando por parâmetros dependentes do comprimento de onda ao contrário dos parâmetros integrais.

Podemos acrescentar a essa lista que quanto maior a ampliação, menor é a região estudada e existem trabalhos que estabelecem conclusões a partir de uma única

⁶⁹Ele se baseia em dados obtidos em um equipamento desenvolvido na sua instituição cujas características (resolução vertical, horizontal entre outras) não são descritas. Isto dificulta a comparação dos resultados por ele obtidos com outros, no entanto, não diminui o mérito da nova proposta.

imagem da amostra. Estatisticamente falando, o espaço amostral é muito pequeno diante do espaço universo. No entanto, estes equipamentos com maiores ampliações normalmente possuem grande poder de resolução vertical e horizontal.

Na tese trabalhamos apenas com dois R_A e R_T implementados a partir da modificação de um plugin existente na plataforma do ImageJ. A modificação era necessária pois no plugin o cálculo era feito em um mapa de elevação em que os valores individuais de elevação eram medidos em relação a linha média. Já nas rotinas implementadas pelo autor as elevações são medidas em relação ao menor vale.

⁷⁰ Existem trabalhos (CONDEÇO; OHLSSON et al, 2001, 2001) sobre identificar a mesma região para que diferentes equipamentos possam estudá-la.