



ROBSON PIERANGELI GODINHO

**ALTERNATIVAS PARA A IMPLEMENTAÇÃO
DA ANÁLISE DO *SPECKLE LASER* EM TEMPO
REAL**

**LAVRAS – MG
2012**

ROBSON PIERANGELI GODINHO

**ALTERNATIVAS PARA A IMPLEMENTAÇÃO DA ANÁLISE DO
SPECKLE LASER EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Sistemas, área de concentração em Metrologia *Laser*, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Roberto Alves Braga Junior

**LAVRAS – MG
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Godinho, Robson Pierangeli .

Alternativas para a implementação da análise do *speckle laser* em
tempo real / Robson Pierangeli Godinho. – Lavras : UFLA, 2012.
61 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
Orientador: Roberto Alves Braga Júnior.
Bibliografia.

1. *Speckle*. 2. *Biospeckle*. 3. Imagem histórica de movimento. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 621.366

ROBSON PIERANGELI GODINHO

**ALTERNATIVAS PARA A IMPLEMENTAÇÃO DA ANÁLISE DO
SPECKLE LASER EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Sistemas, área de concentração em Metrologia *Laser*, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2012

Dr. Danton Diego Ferreira	UFLA
Dr. Giovanni Rabelo	UFLA
Dra. Juliana Vilela Lourençoni Botega	CEFET

Dr. Roberto Alves Braga Junior
Orientador

**LAVRAS – MG
2012**

*A minha esposa Cássia e aos meus filhos Rafael e Miguel pela compreensão na
ausência do lar.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Engenharia pela oportunidade concedida para realização do mestrado. Ao CEDIA pela cessão do espaço para os experimentos. Ao Prof. Dr. Roberto Braga pela paciência nesses 3 anos de trabalho e convivência. Ao Michel Silva e José Roberto Nozela pelo companheirismo, apoio e ajuda nos trabalhos, desenvolvimentos e experimentos realizados. À Greice pela ajuda com as tramitações do departamento. À Rosana Massahud pelas orientações nas formatações. A minha irmã Rossana pelo apoio no texto final.

RESUMO

O uso do *speckle laser* dinâmico, também denominado de *biospeckle laser* (*BSL*), apresenta vários desafios para a sua adoção eficiente, como é o caso de sua utilização em tempo real e o ajuste da configuração experimental. A técnica de análise do *BSL* mais adotada em tempo real apresenta redução de resolução espacial da imagem capturada, enquanto o ajuste de preparação de um experimento ainda demanda o julgamento de um especialista. Neste trabalho foram propostas duas abordagens para melhorar a eficiência do *BSL* em tempo real e para dar suporte aos ajustes da configuração experimental. A proposta de uso do método conhecido como imagem histórica do movimento (*MHI – Motion History Image*), foi testada com um conjunto de imagens conhecidas do *BSL*. O *MHI* foi a base para a implementação de uma interface gráfica para a identificação em tempo real de áreas de atividade, marcando as regiões de interesse. Os resultados mostram que o *MHI* é eficiente na reprodução das atividades dos padrões de *speckle* em tempo real sem redução da resolução da imagem, além de servir de instrumento para marcação das regiões de atividade, apoiando o analista na escolha dos ajustes de iluminação e captura de imagens.

Palavras-chave: *Speckle*. *Biospeckle*. Imagem histórica de movimento.

ABSTRACT

The use of dynamic speckle laser, also called biospeckle laser (BSL), presents a series of challenges to its adoption such as the case for its use in real time or during the adjustment of the experimental setup. The analysis of the BSL adopted in real time reduces the spatial resolution of the processed image and the adjustment of an experiment still demands the trial of a specialist. In this work two approaches were proposed to improve the efficiency of BSL on real-time as well as a guide to adjust to support the experimental configuration. The use of the method known as historical image of the movement (Motion History Image – MHI), was tested with a collection of known images of the BSL. The MHI was the basis for the implementation of a graphical interface for real-time identification of areas of activity, delimiting the regions of interest. The results showed that the MHI was effective in the reproduction of the activities of speckle patterns in real time without reducing image resolution, and delimiting the regions of activity, both achievements supporting the analyst in the choice of the lighting adjustments and the capture of the images.

Keywords: Speckle. Biospeckle. Motion history image.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aplicação do <i>LASCA</i> com janela de 5x5 em uma semente de milho iluminada pelo <i>laser</i> (GODINHO; BRAGA, 2010) 13
Figura 2	Efeito da alteração do tempo de integração (DAVIS, 2002)..... 16
Figura 3	Imagem em níveis de cinza de uma pessoa com as siglas na camiseta significando Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada (CEDIA)..... 18
Figura 4	Silhueta gerada pela subtração de duas imagens em sequência. ... 19
Figura 5	Limiarização da silhueta demonstrada na Figura 4 20
Figura 6	Imagem histórica de movimento (<i>MHI</i>) formada pelas silhuetas limiarizadas aplicadas armazenadas no banco de imagens. 21
Figura 7	Exemplo da função Gaussiana para o filtro bidimensional 26
Figura 8	Processo de detecção de bordas por <i>Canny</i> 27
Figura 9	Exemplo de curva Gaussiana e sua derivada..... 28
Figura 10	(a) Imagem de um texto impresso. (b) Bordas determinadas pelo algoritmo <i>Canny</i> (DING; GOSHTASBY, 2001). 29
Figura 11	Arranjo experimental de iluminação <i>Back-Scattering speckle</i> 31
Figura 12	Arranjo experimental de iluminação <i>Forward-Scattering speckle</i> 32
Figura 13	Resultado do DG sobre o experimento da semente de milho..... 33
Figura 14	Diagrama da secagem da tinta e de volatilização do álcool sobre uma moeda..... 35
Figura 15	Fluxo do processo de criação da imagem histórica de movimento (<i>MHI</i>) 36

Figura 16	Ajuste do Parâmetro Tamanho do banco de imagens. a) Resultado do <i>MHI</i> com Tamanho do banco de imagens igual a 2. b) Resultado do <i>MHI</i> com Tamanho do banco de imagens igual a 8.....	42
Figura 17	Variação do Parâmetro Sensibilidade. a) Resultado do <i>MHI</i> com Sensibilidade 50 b) Resultado do <i>MHI</i> com Sensibilidade 5.....	43
Figura 18	Resultado da aplicação do suavização gaussiana antes do processamento de separar regiões. a) Imagem Resultante do <i>MHI</i> . b) Resultado da suavização gaussiana de raio 4 sobre a imagem “a”. c) Resultado do algoritmo de separação de regiões sobre a imagem “a”. d) Resultado do algoritmo de separação de regiões sobre a imagem “b”.....	44
Figura 19	Limiarização para realização do processamento para separar regiões. a) Resultado da limiarização por 0. b) Resultado da limiarização por 110. c) Separação das Regiões da imagem a. d) Separação das Regiões da imagem b.....	45
Figura 20	Sobreposição da linha sobre a imagem original.....	46
Figura 21	Método DG aplicado no experimento da moeda.....	47
Figura 22	Região de maior atividade no experimento do monitoramento da Raiz de milho. a) Imagem original do experimento. b) Imagem Resultando do método de análise DG. c) Imagem resultando do método de delimitação das áreas de maior atividade.....	48
Figura 23	Regiões mais ativas no experimento da Raiz do Café. a) Imagem original do experimento. b) Resultado do método de análise DG. c) Resultado do método que identifica regiões mais ativas.....	48

Figura 24	a) Imagem original do experimento de iluminação da semente de milho; b) DG do experimento; c) <i>MHI</i> do experimento	49
Figura 25	a) Suavização gaussiana da Figura 24c; b) filtro de limiar aplicado na Figura 25a	50
Figura 26	a) Bordas encontradas pelo algoritmo <i>Canny</i> ; b) Bordas com erosão aplicada	51
Figura 27	a) Bordas sobrepostas na imagem original; b) DG do experimento	52
Figura 28	Imagem do milho colorida artificialmente e histograma mostrando a saturação ocorrida no experimento	53
Figura 29	Imagem Histológica do câncer no tecido da pata do gato (MEUTEN, 2002).....	54
Figura 30	a) Imagem resultante do DG no experimento do Câncer no tecido da pata do gato; b) Bordas delimitantes da área de atividade determinadas pelo <i>MHI</i>	54
Figura 31	Interface do <i>Speckle Tool</i>	56
Figura 32	Interface do Colorir Imagem Artificialmente.....	57
Figura 33	Paleta de cores de conversão de imagens em tons de cinza para imagens coloridas	58
Figura 34	Exemplo de coloração artificial de imagem	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivo específicos	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	O contraste do <i>speckle laser</i>	12
3.2	A técnica de análise do contraste do <i>biospeckle (LASCA)</i>	14
3.3	Abordagem temporal com análise de mais de uma imagem	15
3.3.1	Processamento das imagens que compõe o <i>MHI</i>	17
3,3,2	Os parâmetros do <i>MHI</i>	22
3.4	Limitações dos equipamentos	23
3.5	Determinação de bordas em imagens	24
3.6	Arranjos de iluminação	30
3.6.1	<i>Back-scattering speckle</i>	30
3.6.2	<i>Forward-scattering speckle</i>	31
3.7	Método diferenças generalizadas	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Uso de informação temporal para melhorar a imagem processada	35
4.1.1	Monitoração da raiz de milho	37
4.1.2	Monitoração da raiz de café	38
4.1.3	Identificação de atividade interna da semente de milho	38
4.1.4	Identificação de células cancerígenas em tecido animal	38
4.2	Determinação das áreas de atividade	39
4.3	<i>Softwares</i> desenvolvidos	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

5.1	Detecção e delimitação das áreas ativas no experimento da moeda	41
5.2	Resultados em aplicações biológicas.....	47
5.3	Programas desenvolvidos durante o projeto	55
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

Em 1980, um grupo de óptica na Universidade de Essen, na Alemanha, sob a liderança de A. F. Fercher tentava encontrar métodos não invasivos de diagnóstico de problemas do olho humano. Um dos projetos era direcionado à medição do fluxo sanguíneo da retina, uma ferramenta de diagnóstico de vários problemas oftalmológicos. Nesse projeto, ocorreu ao grupo que poderia ser possível de explorar um efeito já observado há alguns anos antes e que era relacionado ao padrão de interferência criado pelo espalhamento do *laser* em uma superfície rugosa e com o movimento relativo de seus dispersores de luz. Os resultados iniciais foram encorajadores e surgiu então a análise da fotografia da área iluminada pelo *laser*.

Esse padrão de interferência produzido pela dispersão da luz na superfície de um de material iluminado com uma fonte de luz altamente coerente, geralmente um *laser*, é conhecido como *speckle laser*. Capturando a imagem dessa superfície iluminada, obtém-se o padrão do *speckle laser*, que se torna dinâmico e proporcional à atividade dos dispersores de luz, gerando o termo *speckle laser* dinâmico, ou *biospeckle laser (BSL)*, quando se trata de um material biológico.

Por volta de 1990, com o avanço das técnicas digitais de captura de imagens, a análise da fotografia do *speckle* ganhou nova perspectiva. Com o estágio da fotografia comum, sendo eliminado pelas novas tecnologias de fotografia digital, a imagem passou a ser processada quase que imediatamente após a captura. A Universidade de Kingston foi pioneira na utilização dessa técnica e como o processo já não se baseava mais na fotografia comum, um novo nome foi atribuído a técnica: *Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA)*. O objeto sob investigação passou a ser capturado por uma câmera *CCD (Charge Coupled Device)*, onde a imagem era transferida a um computador e processada.

O processamento da imagem, dependendo da resolução da captura, pode levar alguns milissegundos, fazendo com que essa técnica se torne eficaz em tempo real.

Além do *LASCA*, foram desenvolvidas outras técnicas para processamento dessas imagens, com a finalidade de extrair informações sobre a atividade do material iluminado e que podem ser classificadas como gráficas ou numéricas, em tempo real ou não, no domínio do tempo ou no domínio da frequência. As técnicas de *Fujii* e DG (Diferenças Generalizadas) são difundidas entre aquelas que apresentam os melhores mapas de atividade, mas esbarram na necessidade de ter um banco de imagens extenso que impede a análise em tempo real.

A técnica de *LASCA*, por outro lado, tem uma abordagem que permite uma análise rápida da flutuação do *BSL* em uma única imagem criando uma interface com resposta em tempo real (ou quase real). A abdicação de um banco de dados compromete a qualidade da saída gráfica do *LASCA* que tem a sua resolução espacial reduzida, e que ainda depende dos ajustes do tempo de abertura, ou tempo de integração, do sensor óptico.

Observa-se então que a habilidade de apresentar a resposta de análise do *BSL* em tempo real está ligada ao tamanho da base de dados e à qualidade das imagens processadas.

Na busca por um processamento com tais habilidades, introduz-se a técnica da imagem histórica de movimento (*Motion History Image, MHI*), que apresenta um grande potencial de aplicação para monitorar a movimentação dos grãos do *speckle laser* em tempo real.

A técnica *MHI* pode ser utilizada com os equipamentos de aquisição de imagens tecnologicamente mais simples e o processamento das imagens pelo algoritmo do *MHI* pode ser realizado por computadores pessoais. Dessa forma, a captura e o tratamento de uma imagem se tornaram tarefas simples e comuns,

fazendo com que métodos que antes eram complexos e de alto custo computacional se tornassem facilmente tangíveis pelos pesquisadores. Além de simplificar o processo de captura e processamento das imagens e reduzir drasticamente o banco de imagens necessário para sua aplicação, o *MHI* adiciona parâmetros controláveis aos equipamentos tecnologicamente mais simples. O controle de tempo de integração e o controle de sensibilidade são controlados na captura das imagens, sem perder a capacidade de processamento em tempo real e sem a perda de informações espaciais.

Este trabalho buscou apresentar alternativas para a análise do *biospeckle laser* em tempo real utilizando a técnica do *Motion History Image*, avançando para a delimitação de áreas de atividade e a criação de uma interface gráfica de apoio ao pesquisador.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Propor alternativas para a implementação da análise do *speckle laser* em tempo real.

2.2 Objetivo específicos

- a) Usar imagens com informação temporal do *BSL* para a construção do mapa de atividade com a técnica *MHI* (*Motion History Image*).
- b) Evidenciar as regiões com alta atividade para comparações dos métodos aplicados.
- c) Propor interface gráfica de apoio ao pesquisador.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O contraste do *speckle laser*

O argumento básico da técnica de análise de contraste é que, em uma imagem capturada de uma amostra iluminada pelo *laser*, o padrão de *speckle* em uma área onde está ocorrendo atividade será borrado, pois o tempo de exposição da fotografia promove a integração da luz que atinge a câmera. O padrão de *speckle* em uma área de ausência de atividade, por outro lado, continuará a ser de alto contraste. Assim, as distribuições dos níveis de atividade deverão ser mapeadas de acordo com as variações de contraste *speckle*. Em uma análise preliminar, produziram-se alguns resultados promissores e sugerem que seria possível em uma única exposição mapear a atividade da amostra.

Para caracterizar o processamento do contraste na técnica *LASCA* (BRIERS; WEBSTER, 1996), leva-se em consideração para o cálculo do contraste: o tempo de exposição, o número de *pixels* usados para o cálculo do contraste e a escala de cores do mapa de contraste. Depois de definidos tais parâmetros de captura para a imagem, determina-se a dimensão do filtro passa-baixa que será usado na equação do *LASCA*, 7×7 ou 5×5 *pixels* são normalmente escolhas padrões para esse tipo de filtro (GONZALEZ; WOODS, 2008). A escolha do número de *pixels* para calcular o contraste do *speckle* é importante, pois se forem poucos *pixels*, o resultado é questionável e se forem muitos a resolução espacial resultante será muito reduzida. A redução da resolução espacial da imagem é inversamente proporcional ao tamanho do quadrado utilizado, ficando a cargo do especialista verificar o melhor ajuste para não prejudicar a análise da imagem processada.

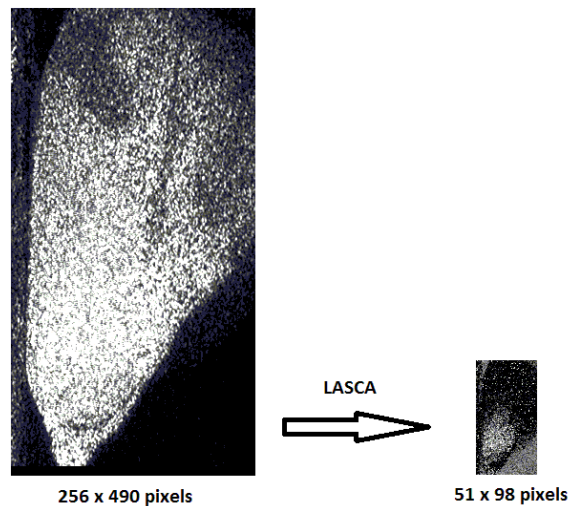


Figura 1 Aplicação do *LASCA* com janela de 5x5 em uma semente de milho iluminada pelo *laser* (GODINHO; BRAGA, 2010)

O *LASCA* tem sido muito utilizado na busca por metodologias de análise em várias situações. Algumas dessas aplicações são feitas na área médica como pesquisas sobre o monitoramento do fluxo sanguíneo cerebral durante os experimentos com animais (DUNN et al., 2001, 2005; PAUL et al., 2006; SENG; PAUL, 2004; SHIN et al., 2006) e as investigações sobre a enxaqueca (BOLAY et al., 2002). Outras aplicações médicas incluem investigações da microcirculação (CHENG et al., 2004; GONIK; MISHIN; ZIMNYAKOV, 2002), a caracterização de placas ateroscleróticas (NADKARNI et al., 2005) e para os problemas oftalmológicos (FLAMMER et al., 2002; NAGAHARA et al., 2001).

Existem outros esforços para melhorar o resultado final da imagem processada com a técnica *LASCA*, por exemplo, pelo *sLASCA* (*Spatially Derived Contrast Using Temporal Averaging*) e pelo *tLASCA* (*Temporally Derived Contrast*) (LE et al., 2007).

No *sLASCA*, o contraste é baseado na técnica original do *LASCA*, sendo que o contraste da imagem final é construído pela média dos contrastes de várias imagens históricas do *speckle*. O *tLASCA* trabalha sobre as estatísticas dos valores de contraste ao longo de vários frames na dimensão temporal, onde é capaz de manter a resolução da imagem original.

3.2 A técnica de análise do contraste do *biospeckle* (*LASCA*)

Utilizando apenas uma imagem da área iluminada pelo *laser*, sabe-se que se existir movimento na superfície iluminada, haverá mudanças no padrão de *speckle*, que serão gravadas na imagem capturada. As mudanças produzidas pelo movimento dos grãos de *speckle*, que estão relacionadas a uma área de alta atividade, provocarão um efeito borrado na figura da interferência se o tempo de captura da imagem permitir uma integração das mudanças nos grãos de *speckle*. O tempo de captura pode ser ajustado em função do tempo do obturador da câmera que vai agir como tempo de integração para as mudanças de padrão do *speckle* e é a única informação temporal presente na imagem, como verificado por Yuan et al. (2005).

A técnica de análise do contraste do *speckle laser* (*LASCA*) consiste em calcular o contraste do *speckle* de uma pequena janela deslizante, de 5x5 ou 7x7 *pixels*, que percorre toda a imagem capturada. O contraste é quantificado pela razão entre o desvio padrão e a média das intensidades (filtro passa-baixas) (GONZALEZ; WOODS, 2008) registradas para cada *pixel* da janela deslizante. O valor desse contraste é atribuído a um *pixel* de uma nova imagem, na mesma sequência do deslizamento da janela. Repetindo o processo para cada passo do deslizamento, compõe-se uma nova imagem. Essa imagem é um mapa de cores falsas do contraste do *speckle* e, portanto, um mapeamento da atividade da amostra que está sendo analisada. Na prática, o tempo de exposição pode ser

muito curto, geralmente 0,02 segundos, e o tempo de processamento é inferior a um segundo para todo o quadro (BRIERS, 2006).

O contraste do *speckle* é dado por:

$$\kappa = \left(1 - \frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} \right) \quad (1)$$

onde κ é o contraste resultante, σ_s o desvio padrão e $\langle I \rangle$ a média da intensidade da janela deslizante.

Dessa maneira, a redução da resolução da imagem fica inversamente proporcional ao tamanho dessa janela deslizante (BRIERS, 2001). Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** exemplifica-se o efeito da redução da imagem processada pelo *LASCA*, onde a imagem do *speckle* de uma semente de milho apresenta maior atividade na área do embrião (nível de cinza mais claro) e a menor atividade na área do endosperma (nível de cinza mais escuro).

3.3 Abordagem temporal com análise de mais de uma imagem

Nessa abordagem propõe-se o uso da técnica da imagem histórica de movimento (*Motion History Image – MHI*) (GODINHO et al., 2011).

A técnica *MHI* constrói a imagem final acumulando, como se fosse em camadas, as imagens previamente capturadas, obedecendo a regra de que cada *pixel* (x, y) no *MHI* é marcado com o instante corrente (hora, minuto, segundo e milissegundo) e será removido se ele não variar depois de um parâmetro de tempo.

O *MHI* é um modelo de imagem estática, onde o contraste do *pixel* é uma função da recência de movimento em uma sequência. Partindo do conceito da sobreposição dessas imagens, os resultados serão bem aproximados aos desejáveis para a determinação de um movimento, ou seja, a imagem se tornará borrada nos locais onde existe movimentação.

O processo consiste em manter um pequeno banco de imagens históricas e essa lista determina o tempo de integração final da imagem, um parâmetro variável. Imagens armazenadas nesse banco serão submetidas a um pré-processamento (item 0) e posteriormente serão sobrepostas na sequência temporal para gerar a imagem final do *MHI*. Quando o banco estiver cheio, a primeira imagem inserida, a que tem mais tempo em existência, será removida e as outras serão movidas em cadeia, de forma que uma nova imagem seja colocada na última posição do banco e assim sucessivamente.

Nessa técnica existem parâmetros importantes para determinação da movimentação. Um deles é o tempo de integração, ou seja, por quanto tempo passado da aquisição da imagem o contraste deve decair (Figura 2). Exemplificando, se 4 imagens históricas forem usadas, a imagem mais antiga deve ter seu contraste diminuído em relação à imagem mais nova e assim por diante. Por fim, somam-se todas as imagens para compor a imagem final.

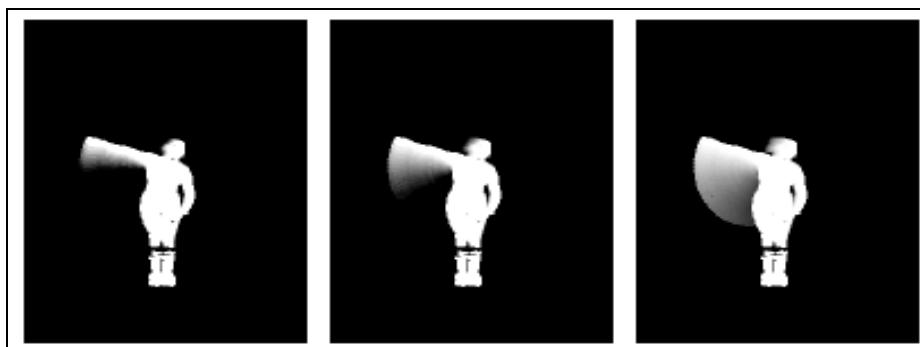


Figura 2 Efeito da alteração do tempo de integração (DAVIS, 2002)

3.3.1 Processamento das imagens que compõe o *MHI*

O primeiro passo no processamento da imagem é transformá-la do espectro de cores *RGB* (*Red, Green, Blue*) para o espectro de cores *HSI* (*Hue, Saturation, Intensity*) (GONZALEZ; WOODS, 2008), onde o objetivo é obter a imagem em tons de cinza, tal como apresentado na Equação (2), e representada pelo componente *I* (intensidade) da *HSI*.

$$I = (0,30 * R) + (0,59 * G) + (0,11 * B) \quad (2)$$

onde *R*, *G* e *B* representam os níveis de cor vermelho, verde e azul em 8 *bits* para cada *pixel*.

Na Figura 3, uma imagem em níveis de cinza é representada usando apenas o componente de intensidade representando uma pessoa após levantar seu braço. O movimento do braço ajuda a entender a construção da *MHI*, relacionando as mudanças na imagem ao longo do tempo e no espaço, as siglas na camiseta ajudam a ver pequenas mudanças que podem ser capturadas pelo *MHI*.

Quando o braço se movimenta de baixo para cima, a coleção de imagens pode ser manipulada pelo processo do *MHI* em alguns passos descritos a seguir. A Equação (3) representa a diferença entre duas imagens sucessivas I_j e I_{j+1} , conhecida como *silhueta*.



Figura 3 Imagem em níveis de cinza de uma pessoa com as siglas na camiseta significando Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada (CEDIA)

A geração da silhueta S_j (GONZALEZ; WOODS, 2008) é mostrada na Figura 4.

$$S_j = I_j - I_{j-1} \quad (3)$$

onde j representa o índice da imagem.



Figura 4 Silhueta gerada pela subtração de duas imagens em sequência

Na imagem da silhueta S_j , aplica-se um filtro de limiar (GONZALEZ; WOODS, 2008), demonstrada pela Equação (4), obtém-se o resultado representado na Figura 5.

$$T_j(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{se } S_j(x, y) > Z \\ 0 & \text{se } S_j(x, y) \leq Z \end{cases} \quad (4)$$

onde Z é o parâmetro de corte e $T_j(x, y)$ é o resultado do limiar da imagem em cada momento j .

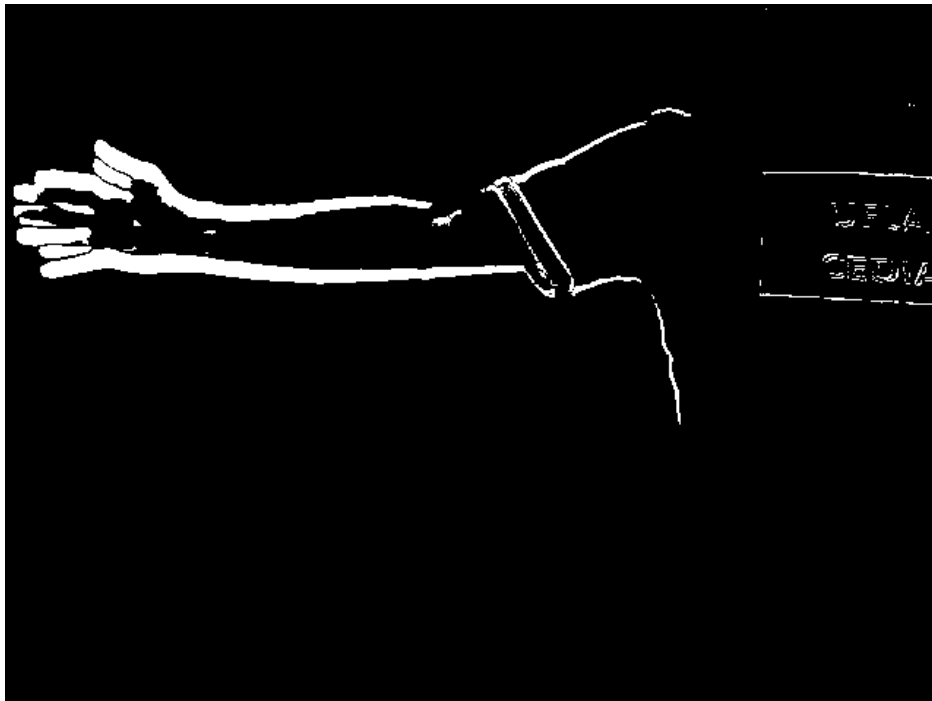


Figura 5 Limiarização da silhueta demonstrada na Figura 4

O procedimento *MHI* final é a soma das imagens dentro dos limites do banco de imagens, sendo que o contraste de cada imagem é multiplicado por uma constante k_j que representa o tempo de vida da imagem no momento j , conforme representado na Equação (5) (GODINHO et al., 2011).

$$MHI(x, y) = \sum_{j=1}^n T_j \cdot k_j \quad (5)$$

O valor da constante k_j será

$$k_j = \begin{cases} 0 & \text{se } t_{\text{imagem}} > \text{duraçãoMHI} \\ \frac{t_{\text{imagem}}}{t_j - t_{\text{imagem}}} \cdot 255 & \text{caso - contrário} \end{cases} \quad (6)$$

onde t_{imagem} é o instante de captura da imagem e t_j o instante atual.

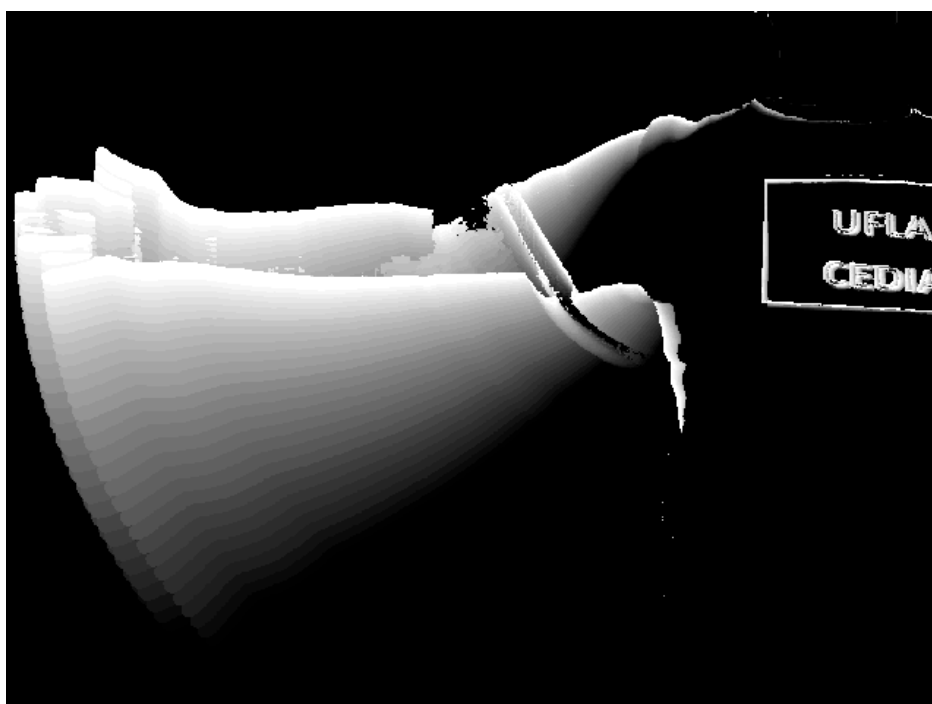


Figura 6 Imagem histórica de movimento (MHI) formada pelas silhuetas limiarizadas aplicado armazenadas no banco de imagens

Na Figura 6, é possível ver o resultado do movimento realizado pelo braço e induzido na camisa (siglas) em uma coleção de 32 momentos. Pode-se observar o rastro do movimento feito pelo braço e a intensidade em tons de cinza que representam os movimentos recentes. No movimento do braço para cima, no nível mais alto, é possível ver as áreas mais claras relacionadas com o fim do movimento e as mais escuras relacionadas com o início do movimento. Os sinais

na camiseta são mostrados em cinza claro uma vez que acontecem pequenas mudanças ao longo do tempo enquanto o braço muda a sua posição.

3,3,2 Os parâmetros do *MHI*

A duração do *MHI* e o controle de sensibilidade (GODINHO et al., 2011) serão detalhados para melhor entendimento.

- a) Duração do *MHI*: a duração do *MHI* determina qual será a vida (tempo em segundos) de uma imagem capturada. O parâmetro determina como a intensidade da imagem será ajustada e usada para a construção da imagem histórica do movimento. Um cálculo automático desse valor é feito seguindo a ideia de que a vida da imagem capturada irá começar no primeiro e terminar na última posição do banco de imagens. Sendo assim, o valor da duração do *MHI* é dado pela razão entre o Tamanho do Banco de Imagens e Taxa de Aquisição ou Quadros Por Segundo (FPS), segundo a Equação (7).

$$DuraçãoMHI = \frac{TamanhoBanco}{FPS} \quad (7)$$

Caso o valor de duração do *MHI* for menor que essa razão, inutiliza-se parte do banco de imagens, fazendo que as últimas posições do banco não contribuam com suas imagens, ou seja, essas terão o contraste no mínimo e não acrescentarão nenhuma informação da construção do *MHI*. Caso o valor seja maior que a proporção da equação (7), irá ocorrer uma saturação, ou seja, as

últimas imagens do banco de imagens terão alto contraste e não agregarão a informação temporal relativa ao decaimento do contraste na construção do *MHI*.

A duração do *MHI* é usada para ajustar a análise de fenômenos com diferentes intensidades. Para se analisar um fenômeno lento é preciso de um tempo maior de iluminação e um tempo menor para fenômenos rápidos, ou seja, um banco de imagens maior para fenômenos lentos e um banco de imagens menor para fenômenos rápidos.

- b) Controle de sensibilidade: o controle de sensibilidade estabelece o quão sensível a uma atividade o algoritmo será. Esse parâmetro está diretamente ligado à aplicação da limiarização da silhueta, explicado no item 0, ou seja, quanto menor o valor de corte, maior número de *pixels* da imagem capturada participarão na composição da imagem e vice-versa.

3.4 Limitações dos equipamentos

O tempo de vida das imagens é relacionado ao número de quadros por segundo (FPS). O FPS que se pode conseguir em um microscópio eletrônico ou uma *webcam* conectados via *USB (Universal Serial Bus)* é menor do que o que está listado nas especificações da mesma. O FPS constante de uma câmera é o máximo teórico que o sensor de imagem da câmera pode fazer não o FPS real que um computador pode obter. Isso impacta diretamente nos tempos envolvidos nos cálculos do *MHI*, afetando a resolução do controle do tempo de integração, pois a unidade de tempo desse controle é um segundo dividido pelo FPS obtido pelo computador.

Enquanto o sistema eletrônico do sensor de imagem é normalmente capaz de obter a taxa de quadros total das especificações, existem outros pesos a considerar: a eletrônica de processamento da câmera, a largura de banda dos *USB*, a carga do processador central do computador, outros programas em execução no computador, o *software* de específico do dispositivo, a memória disponível para a câmera e o sistema operacional, tudo vai impactar no FPS real que será finalmente exibido. O fator mais importante afetando o FPS é o tamanho da imagem selecionada. Quanto maior a imagem, mais lenta a taxa de quadros. O segundo fator importante na taxa de quadros é o quão rápido o computador consegue acompanhar o fluxo de dados provenientes da câmera.

Um computador lento, que tem muitos programas em execução em segundo plano, ou um que tem muitos dispositivos conectados por meio da *USB*, afetará substancialmente a taxa de quadros. Supondo que o sistema operacional do computador esteja em perfeitas condições, a *webcam* é o único equipamento conectado na *USB* e usando um tamanho mediano na imagem, melhora-se a capacidade de obter a maior taxa de frames. No entanto, os programas de *webcam* não são projetados para capturar as imagens mais rápido do que 15 quadros por segundo. Para obter uma alta taxa de quadro com uma imagem grande, deve-se considerar o uso de algum outro dispositivo ao invés de uma *webcam* como a fonte de captura (*FireWire*, ou um regime especial) (BAI et al., 2005).

3.5 Determinação de bordas em imagens

Existem vários algoritmos para determinação de bordas em imagens, nessa pesquisa optou-se pelo algoritmo *Canny* (CANNY, 1986), que é amplamente utilizado em visão computacional para localizar alterações de intensidade acentuada e os limites de objetos encontrados em uma imagem.

As bordas em uma imagem é o resultado de mudanças em alguma propriedade física ou espacial de superfícies iluminadas. A maioria das técnicas de detecção de bordas emprega operadores diferenciais de primeira ou de segunda ordem, que ressaltam os contornos das bordas, mas também amplificam o ruído da imagem. Grande parte dos operadores de borda utiliza algum tipo de suavização da imagem antes da operação diferencial, sendo o filtro de *Canny* um filtro de convolução que usa a primeira derivada. Na sua implementação o filtro de *Canny* suaviza o ruído e localiza as bordas, combinando um operador diferencial com um filtro Gaussiano, otimizando o equilíbrio entre a filtragem de ruídos e localização da borda.

O filtro Gaussiano é um tipo de filtro para desfocagem de imagem que usa uma função de *Gauss* (que também é utilizada para a distribuição normal nas estatísticas) para o cálculo de uma transformação para aplicar a cada *pixel* da imagem. A equação de Gaussiana em uma dimensão é:

$$G(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad (8)$$

Em duas dimensões, é o produto de duas Gaussianas, uma para cada direção:

$$G(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (9)$$

onde x é a distância entre a origem no eixo horizontal, y é a distância entre a origem no eixo vertical e σ é o desvio padrão da distribuição de *Gauss*.

Quando aplicada em duas dimensões, essa fórmula produz uma superfície cujos contornos são círculos concêntricos com uma distribuição de

Gauss partir do ponto central. Os valores dessa distribuição são usados para construir uma matriz de convolução, que é aplicada à imagem original. O novo valor de cada *pixel* é definido como uma média ponderada da vizinhança do *pixel*. O valor do *pixel* original recebe o maior peso (com o valor mais elevado de *Gauss*) e *pixels* vizinhos recebem pesos menores de acordo com sua distância do *pixel* original. Isso resulta em um borrão que preserva os limites e as bordas. Em teoria, a função de *Gauss* em cada ponto da imagem será diferente de zero, o que significa que a imagem inteira precisa ser incluída nos cálculos para cada *pixel*. Na prática, ao computar uma aproximação discreta da função Gaussiana, *pixels* a uma distância de mais de 3σ são pequenos o suficiente para ser considerada efetivamente zero. Assim, as contribuições de *pixels* fora dessa faixa podem ser ignoradas.

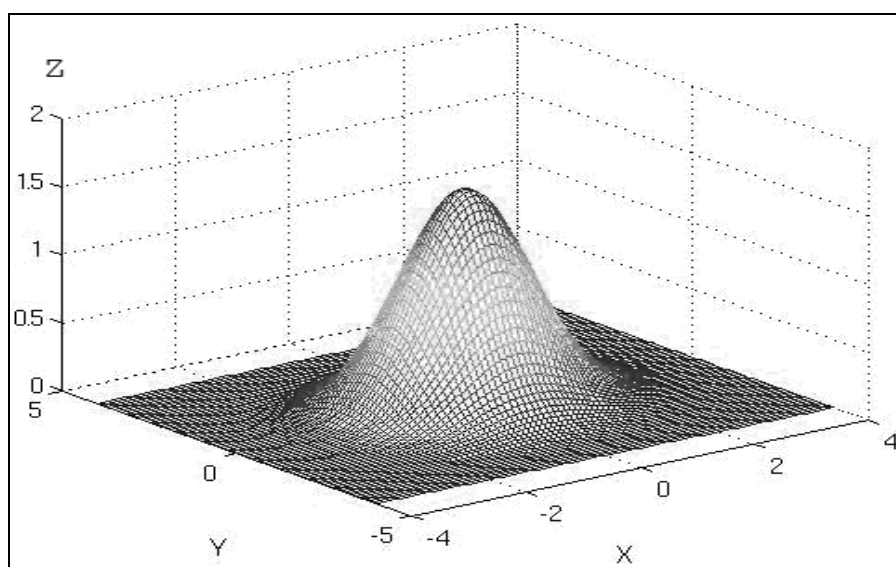


Figura 7 Exemplo da função Gaussiana para o filtro bidimensional

Considere uma borda de uma dimensão como demonstrado na primeira imagem de cima para baixo da Figura 8. Se ela for operada por convolução com a função Gaussiana, o resultado será uma variação contínua do valor inicial ao

final, com uma inclinação máxima no ponto onde existe o "degrau", como representado na segunda imagem da Figura 8. Se essa função, agora suavizada, for diferenciada em relação à x , a inclinação máxima indicará o máximo da nova função em relação à original, a última linha da Figura 8 demonstra esse resultado.

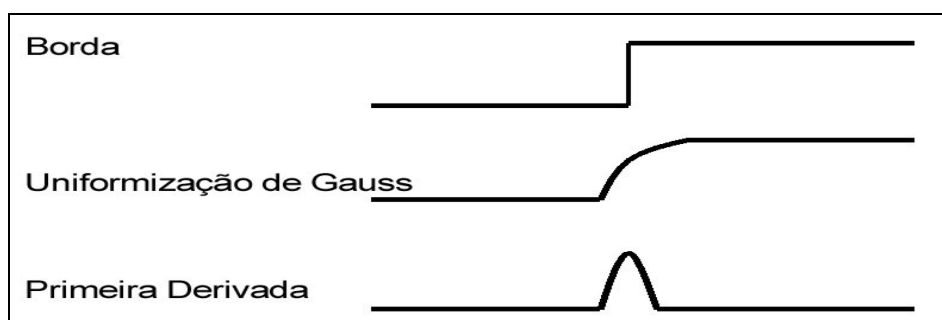


Figura 8 Processo de detecção de bordas por *Canny*

Os pontos de máximos depois da convolução indicarão as bordas na imagem, e esse processo pode ser realizado por meio do uso de uma função Gaussiana em duas dimensões, ou uma função em uma dimensão na direção de x e depois na direção y . As formas das máscaras Gaussianas dependem da escolha do desvio padrão (σ). A função gaussiana em uma dimensão é expressa pela Equação (8) e sua primeira derivada é dada por:

$$G'(x) = \frac{-x}{\sqrt{2\pi\sigma^3}} e^{\frac{-x^2}{2\sigma^2}} \quad (10)$$

A forma das duas expressões, a Gaussiana e sua derivada, são representadas na Figura 9.

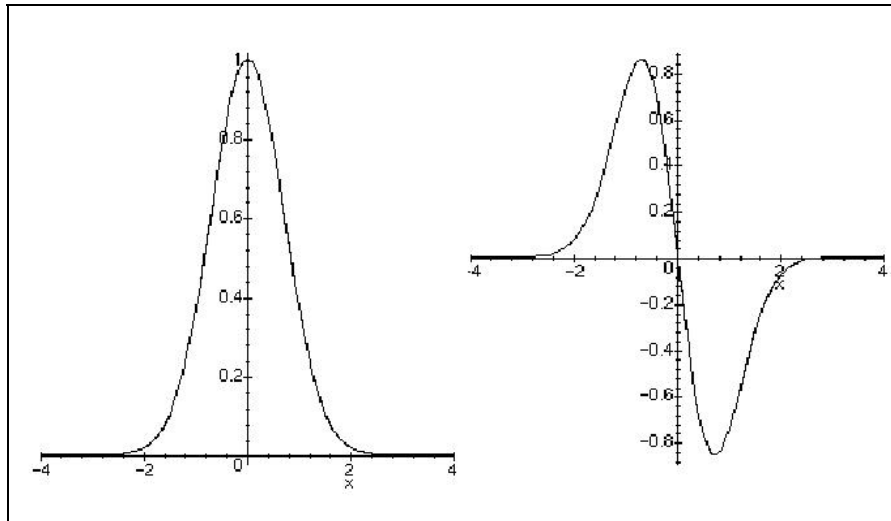


Figura 9 Exemplo de curva Gaussiana e sua derivada

Fazendo a operação de convolução da imagem com $G'(x)$ obtêm-se uma imagem que mostrará as bordas, mesmo na presença de ruído.

Em uma imagem bidimensional tem-se o produto de duas gaussianas:

$$G(x) = \frac{1}{2\pi\sigma_x\sigma_y} e^{\frac{-x^2}{2\sigma_x^2} - \frac{y^2}{2\sigma_y^2}} \quad (11)$$

Na imagem bidimensional, as gaussianas bidimensionais dependem da escolha dos desvios padrão nas duas direções x e y que, geralmente, são usados desvios iguais nesse caso. Fazendo $\sigma_x = \sigma_y = \sigma$, reduz-se a Equação (11) para a Equação (9).

A convolução é relativamente simples de ser efetuada, mas tem custo computacional elevado em duas dimensões. Entretanto, uma convolução com a máscara gaussiana de duas dimensões, pode ser separada em duas convoluções

de uma dimensão, tornando o processamento mais rápido e trazendo resultados para o tempo real.

Considera-se como um segmento de borda, todo valor situado acima de determinado limite superior, rejeitando todo valor situado abaixo de um limite inferior. Pontos situados entre os dois limites serão aceitos como de borda se eles estiverem relacionados fortemente com os *pixels*. A Figura 10 demonstra o resultado da aplicação do método de *Canny*, com máscaras em uma dimensão.

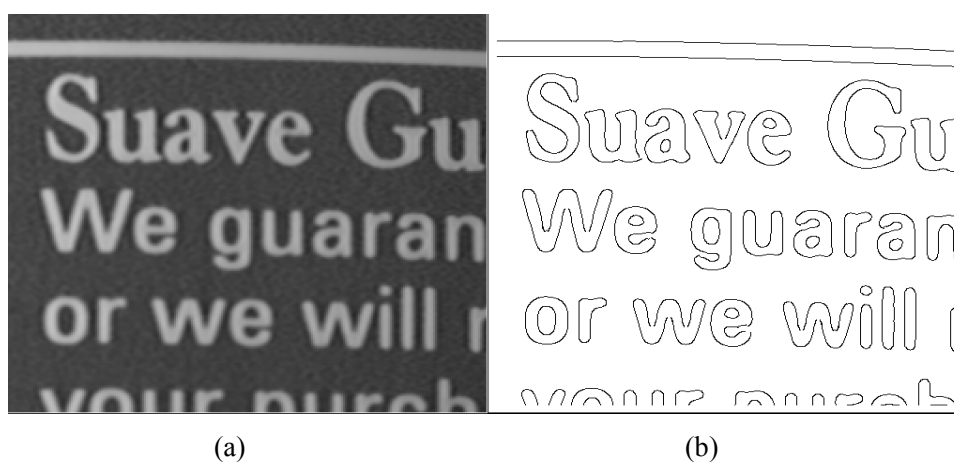


Figura 10 (a) Imagem de um texto impresso. (b) Bordas determinadas pelo algoritmo Canny (DING; GOSHTASBY, 2001)

O algoritmo Canny é adaptável a vários casos. Seus parâmetros permitem que seja adequado ao reconhecimento das bordas dependendo das exigências particulares de uma dada aplicação, como é o caso das bordas das áreas com atividade previamente identificadas pelas técnicas aplicadas no *speckle laser*.

Com os algoritmos processando em tempo real, a aplicação do Canny nas imagens resultantes, traz imediatamente a região onde a atividade está mais elevada.

3.6 Arranjos de iluminação

Os arranjos de captura de imagens do *BSL* são compostos por um *laser*, para iluminar a amostra, uma câmera para aquisição das imagens e um computador para armazenamento das imagens. Basicamente existem duas disposições clássicas na montagem da iluminação do *BSL* que dependem do tipo do material a ser analisado: o *back-scattering* e o *forward-scattering*.

Esses arranjos envolvem diversas variáveis como a distância e o ângulo entre a câmera e a amostra, polarização do feixe *laser*, intensidade da luz e tamanho do grão de *speckle* no padrão de interferência (RABELO, 2000).

3.6.1 *Back-scattering speckle*

Nesse tipo de arranjo a amostra é iluminada pelo feixe *laser*, posicionado no mesmo lado de onde se encontra a câmera (Figura 11). Desse modo, o feixe de *laser* ilumina a amostra e a luz que retorna é capturada pela câmera (RABAL; BRAGA JUNIOR, 2008).

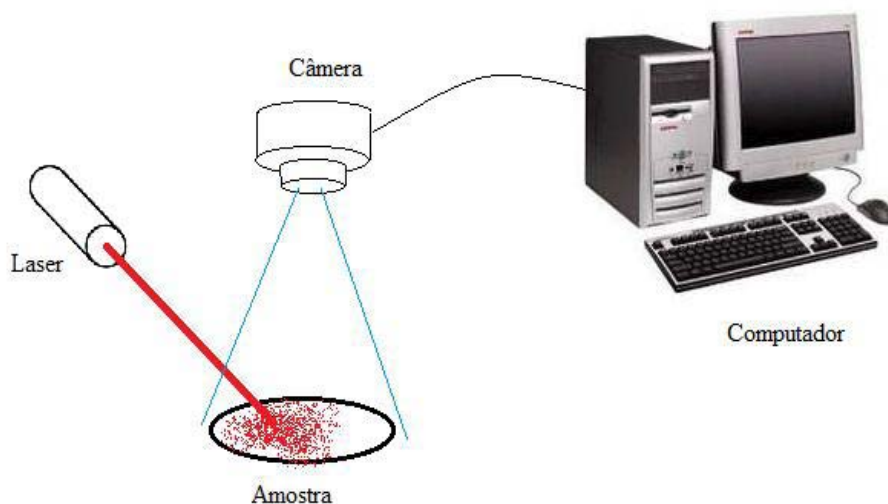


Figura 11 Arranjo experimental de iluminação *Back-Scattering speckle*

3.6.2 *Forward-scattering speckle*

No *Forward-scattering* o *laser* e a câmera ficam em lados opostos em relação à amostra (Figura 12). O material se comportará como uma grande e densa rede, difratando a luz e na medida em que a atividade ocorre, as mudanças serão exibidas pelo *speckle* dinâmico. Observa-se que, se a amostra é um material que pode absorver a luz, a iluminação deverá ser ajustada para compensar a perda. Caso o material seja transparente, deve-se prever a saturação do *CCD* da câmera e aplicar filtros para impedir a deterioração do experimento (RABAL; BRAGA JUNIOR, 2008).

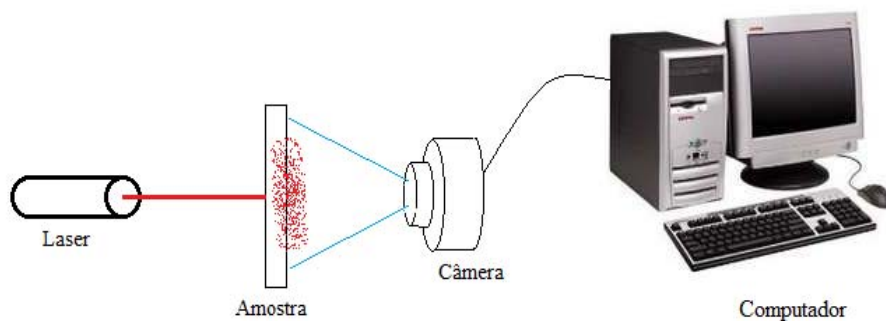


Figura 12 Arranjo experimental de iluminação *Forward-Scattering speckle*

3.7 Método diferenças generalizadas

Existem vários métodos para geração do mapa de atividade do *BSL* (RABAL; BRAGA JUNIOR, 2008) que dependem de um banco de imagens que fornecem resultados comprovados na identificação das áreas de atividade em uma amostra biológica. Dentre eles optou-se pelo método Diferenças Generalizadas (DG) para comparação entre os resultados deste trabalho. O DG gera um mapa da atividade da amostra iluminada pelo *laser* somando as diferenças entre os *pixels* de uma sequência de imagens capturadas (RABAL; BRAGA JUNIOR, 2008).

A intensidade resultante de cada *pixel* (x,y) é calculada por meio do módulo da diferença entre o mesmo *pixel* (x,y) de todas as imagens previamente capturadas ao longo do tempo (Equação (12)), sendo N o número de imagens que compõe o banco de imagens capturadas durante o período e $I_{DG}(x,y)$ é o valor da intensidade do *pixel* em escala de cinza, que varia de 0 a 255 na imagem final do DG.

$$I_{DG}(x,y) = \sum_{k=1}^N \sum_{l=1}^N |I_{Gray_k}(x,y) - I_{Gray_{k+l}}(x,y)| \quad (12)$$

O cálculo da soma das diferenças de intensidade dos *pixels* faz com que as zonas de maior atividade fiquem com tons de cinza mais claros na imagem resultante, porque o mesmo *pixel* mudará sua intensidade mais vezes ao longo do tempo. O que não acontece nas zonas de baixa atividade e assim elas ficarão com tons de cinza mais escuros, porque os *pixels* que as compõe pouco variaram suas intensidades.

Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** pode-se observar o resultado do processamento do DG sobre 64 imagens de *speckle* de uma semente de milho. Observam-se nitidamente as áreas de maior atividade em relação às áreas de menor atividade.

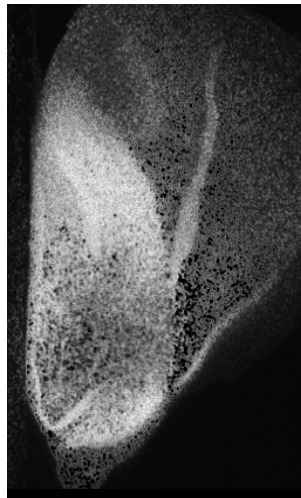


Figura 13 Resultado do DG sobre o experimento da semente de milho

Embora seja caracterizado como um método para ser usado em imagens previamente capturadas, o método DG será usado para comparação de resultados neste trabalho por ser um algoritmo consolidado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado no Centro de Desenvolvimento de Instrumentação aplicada à Agropecuária, ProInfra Finep 2005, situado no Departamento de Engenharia da UFLA.

4.1 Uso de informação temporal para melhorar a imagem processada

O experimento principal para demonstrar o *MHI* aplicado ao *BSL* foi a monitoração da secagem da tinta e de volatilização do álcool sobre uma moeda (Figura 14).

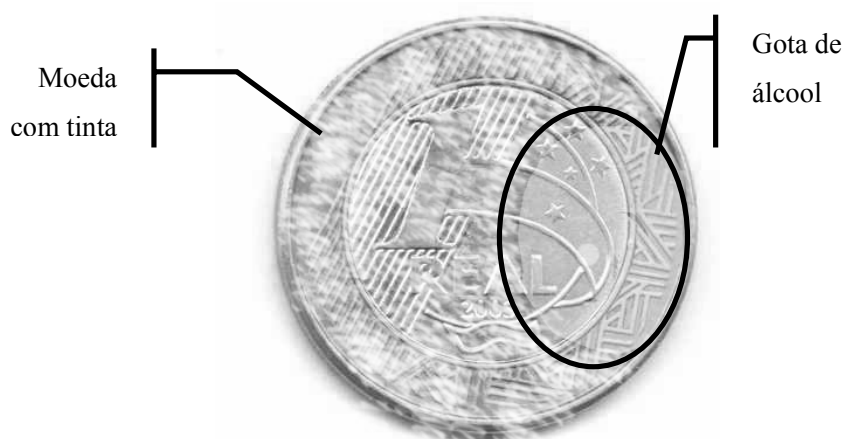


Figura 14 Diagrama da secagem da tinta e de volatilização do álcool sobre uma moeda

Um vídeo da amostra com iluminação *back-scattering* (Figura 11) foi capturado por um minimicroscópio eletrônico, com resolução VGA (Video Graphics Array) de 640x480 *pixels*, usando um *laser* de 635 nm de comprimento de onda e 5 mW de potência, o vídeo foi processado da seguinte forma:

- a) Passo 1: obter uma imagem do vídeo (um frame).
- b) Passo 2: passar a imagem para o espaço de cores *HSI* e utilizar o componente *I* (intensidade) como imagem.
- c) Passo 3: calcular a diferença entre a imagem atual e a última imagem, obtendo a silhueta.
- d) Passo 4: aplicar a limiarização na silhueta e armazenar a imagem resultante no banco de imagens.
- e) Passo 5: compor a imagem histórica de movimento, somando todas as imagens do banco de imagens, diminuindo o contraste de acordo com a recência de cada uma, sendo que a mais antiga recebe um contraste menor e a mais nova recebe um contraste maior.

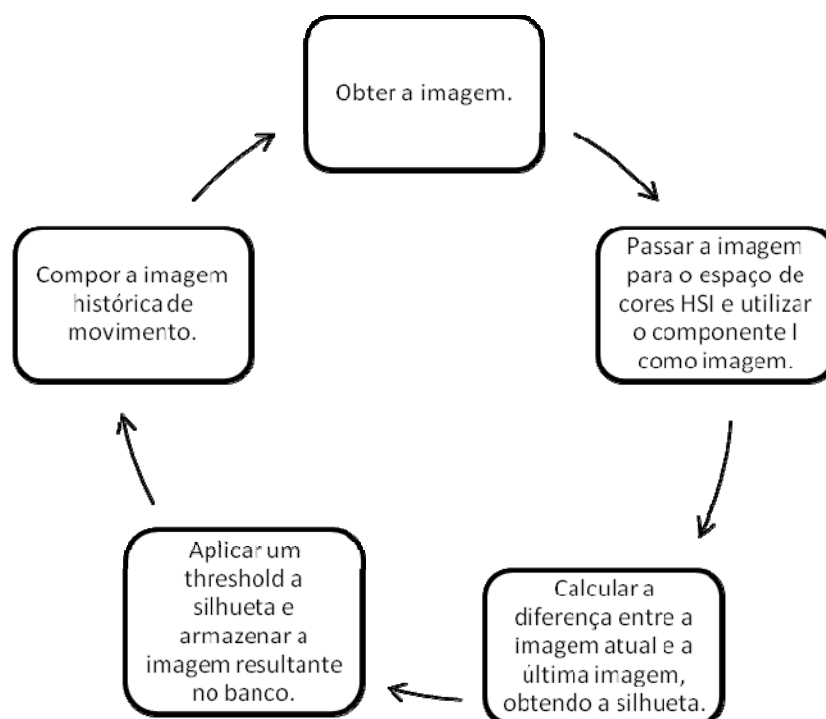


Figura 15 Fluxo do processo de criação da imagem histórica de movimento (*MHI*)

O vídeo, salvo em disco no formato “.avi”, posteriormente foi decomposto em uma sequência de 128 imagens do tipo “.bmp” para formar um banco de imagens. Essas imagens, após convertidas escala de cinza, foram processadas com o método DG. O resultado desse processamento foi utilizado na comparação do mapa de atividade com o resultado encontrado no método *MHI*.

Os efeitos de cada parâmetro ajustável do *MHI* sobre o *BSL* foi avaliado, de forma a obter os melhores mapas de atividades nos experimentos. Para que o método *MHI* e os ajustes nos parâmetros fossem utilizadas em aplicações reais, foi desenvolvida uma ferramenta em ambiente computacional para auxiliar na técnica do *speckle laser* em tempo real.

Para testar a flexibilidade da aplicação do método do *MHI*, vários experimentos foram executados utilizando a ferramenta, as quais foram a monitoração de raízes de café e milho, identificação de atividade interna em semente de milho e identificação de áreas cancerígenas em tecidos animais.

4.1.1 Monitoração da raiz de milho

O experimento foi feito com um *laser* com comprimento de onda de 635 nm e 5 mW de potência e arranjo experimental *back-scattering*. A raiz estava se desenvolvendo do lado direito para o lado esquerdo da imagem, em um meio ágar. Um vídeo no formato “.avi” com resolução 1280x1024 *pixels* foi gerado a partir dessa configuração e foi salvo em disco. O vídeo foi convertido para um banco de 128 imagens em escala de cinza para a análise da atividade utilizando o método DG.

4.1.2 Monitoração da raiz de café

O experimento foi feito com o mesmo *laser* e arranjo do experimento da raiz de milho. O desenvolvimento da raiz foi da esquerda para a direita da imagem, também em um meio composto de ágar. O vídeo de resolução 640x486 foi salvo a partir dessa configuração e convertido para um banco de 128 imagens em escala de cinza para a análise da atividade utilizando o método DG.

4.1.3 Identificação de atividade interna da semente de milho

O experimento consiste em um banco de 64 imagens de 8 *bits* com resolução de 256x490 *pixels*, essas imagens foram convertidas em um vídeo para obtenção do *MHI*. Para a produção do experimento, a atividade biológica interna da semente foi aumentada para obter melhor atividade no embrião, para isso a umidade foi elevada para 20% e foi feito um corte longitudinal na mesma (BRAGA JUNIOR, 2000). A iluminação foi feita utilizando o arranjo experimental *back-scattering*, com um *laser* de 10 mW de potência e 632 nm de comprimento de onda. A captura foi realizada com uma câmera *CCD* (Dispositivo de Carga Acoplada, do inglês *Charge-Coupled Device*) com resolução de 256x490 *pixels*. O método DG também foi aplicado sobre essas imagens.

4.1.4 Identificação de células cancerígenas em tecido animal

O experimento foi conduzido utilizando o tecido animal, retirado cirurgicamente. As capturas dos vídeos do *BSL* foram realizadas antes das análises histológicas. As iluminações foram realizadas utilizando o arranjo experimental *back-scattering* e as capturas foram feitas com uma câmera *CCD*

com resolução 486x640 *pixels*. O *laser* utilizado para iluminar as amostras tinha 10 mW de potência e 632 nm de comprimento de onda. O vídeo foi decomposto em um banco de 128 imagens de 8 *bits* para ser realizada a análise do DG. Após a captura do vídeo, o procedimento para análise histológica foi feito e constatado o câncer presente nos tecidos. O mapa de atividade encontrado pelo DG e o resultado da análise histológica foram utilizados para validar o método proposto.

4.2 Determinação das áreas de atividade

Após a identificação dos mapas de atividade foram aplicados os métodos e técnicas computacionais para delimitar as áreas de maior atividade no experimento no momento da iluminação.

Antes de aplicar o algoritmo de detecção de bordas nas imagens geradas pelo *MHI*, um pré-processamento foi necessário, com a aplicação de uma suavização através de uma função gaussiana (item **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) na imagem gerada pelo *MHI* para que os grãos de *speckle* ficassem mais aglutinados nas regiões onde os algoritmos destacaram a alta atividade.

Após a formação dessa aglutinação foi necessária uma segmentação das regiões de diferentes intensidades de atividades, aplicando-se uma limiarização na imagem formada pela suavização gaussiana e, ajustando o parâmetro de corte da limiarização, segmentou-se as regiões de maior atividade das regiões de baixa atividade.

Com a região de alta atividade separada, aplicou-se o algoritmo Canny para a detecção das bordas e essas bordas, superpostas a imagem original, delimitavam as regiões de alta atividade, sendo que as linhas das bordas tiveram sua espessura aumentada aplicando uma erosão na imagem (GONZALEZ; WOODS, 2008).

4.3 Softwares desenvolvidos

Os *softwares* envolvidos neste trabalho foram desenvolvidos utilizando a linguagem C++ e C, em conjunto com a biblioteca de visão computacional *Open Source Computer Vision (OpenCV)* desenvolvida pela Intel em 2000 e liberada para uso acadêmico e comercial. Foi utilizado também a *IDE* QtCreator (*IDE* do inglês *Integrated Development Environment*) que inclui o *kit* de desenvolvimento de *software* “*QTopia*”, fornecido gratuitamente pela Nokia.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em uma análise do *speckle laser* os grãos de *speckle* em uma amostra de material biológico vivo se movimentam aleatoriamente, o *MHI* irá traduzir esse efeito em uma imagem com vários níveis de cinza, relativos à movimentação dos grãos do *speckle*, e serão mais intensos na região de maior atividade biológica. Aqui serão apresentados os resultados da aplicação do *MHI* e alteração de seus parâmetros na identificação das áreas de atividades no *BSL*. Serão demonstradas as aplicações em experimentos reais e a apresentação dos softwares desenvolvidos.

Como o *MHI* possui a capacidade de controlar o tempo de vida das imagens no banco de imagens e o tamanho deste banco, tem-se o controle do tempo de integração da captura da imagem do *speckle laser* (*MHI*duration na Equação (6)). Por outro lado, atuando no parâmetro *Z*, o nível de limiarização na Equação (4) é possível controlar a sensibilidade na formação do *MHI*, aumentando ou diminuindo o nível de corte dos níveis de cinza que, dessa forma, aumenta ou diminui a quantidade de *pixels* selecionados para participar da imagem.

5.1 Detecção e delimitação das áreas ativas no experimento da moeda

Seguindo os passos da determinação das áreas de atividade, descrita no item 0, consegue-se delimitar as áreas de atividade no experimento de secagem de tinta e volatilização do álcool sobre uma moeda

Um fenômeno rápido, como a volatilização do álcool, pode-se utilizar um tamanho de banco de imagens com 2 ou 4 frames e a secagem de tinta um banco de imagens com 6 ou 8 frames.

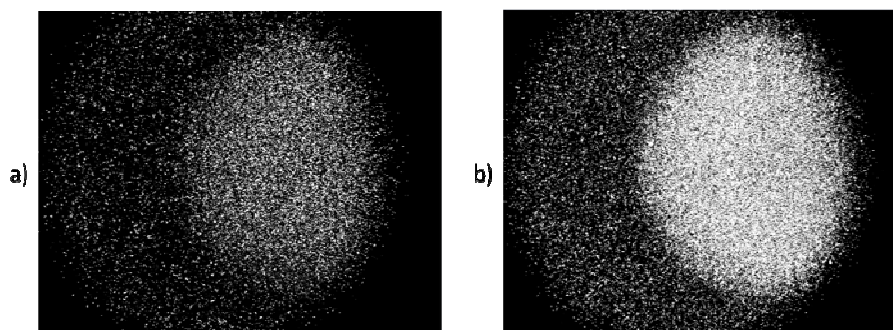


Figura 16 Ajuste do Parâmetro Tamanho do banco de imagens. a) Resultado do *MHI* com Tamanho do banco de imagens igual a 2. b) Resultado do *MHI* com Tamanho do banco de imagens igual a 8

Observa-se na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** os resultados do experimento de secagem de tinta e volatilização do álcool sobre uma moeda, diagrama ilustrado na Figura 14. Com um tamanho de banco de imagens sendo 2 a área onde está a secagem da tinta (fenômeno lento) não está evidente (**Erro! Fonte de referência não encontrada.a**). Com o tamanho do banco de imagens sendo 8 a atividade dessa área fica mais evidente (**Erro! Fonte de referência não encontrada.b**). Por outro lado, a alta atividade da área em que há a volatilização do álcool, fica evidenciada nas duas imagens e com diferentes intensidades, pois quanto maior a duração do *MHI* maior a saturação do contraste na região da gota de álcool. Como esperado, o resultado do *MHI* não acusa nenhuma atividade sobre a mesa inerte. Os parâmetros ajustados para esses resultados foram: controle de sensibilidade 20, taxa de aquisição 15 FPS e a duração do *MHI* que foi ajustada seguindo a Equação (7).

Por outro lado, mudando-se o valor da sensibilidade obtêm-se os resultados representados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** Quanto menor o valor do filtro de sensibilidade, mais atividade é evidenciada. Nesse caso utilizou um taxa de aquisição de 10 FPS, tamanho do banco de imagens igual a 4 e duração do *MHI* de 0,4 segundos.

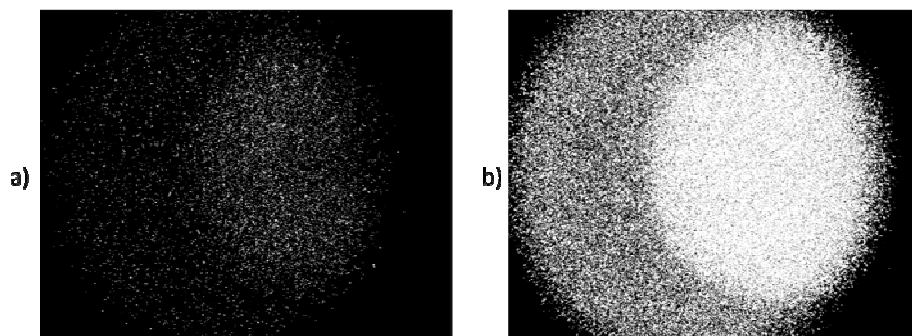


Figura 17 Variação do Parâmetro Sensibilidade. a) Resultado do *MHI* com Sensibilidade 50 b) Resultado do *MHI* com Sensibilidade 5

A semelhança com a duração do *MHI* (Figura 16) pode ser notado, mas não tem o mesmo efeito. A alteração no controle de sensibilidade significa intensificação dos resultados onde os ruídos também serão intensificados, diferente do tamanho do banco de imagens, o qual afeta a análise na linha temporal.

Ainda atuando na formação da imagem ideal para a detecção de bordas, observa-se (Figura 18a) que as imagens capturadas possuem alta granulometria, prejudicando a detecção das bordas das áreas de atividades devido aos espaços entre os grãos de *speckle*. Para aglutinar esses grãos aplica-se a técnica da suavização gaussiana. Quanto menor e mais dispersos forem os grãos, maior deve ser raio da suavização gaussiana, pois será necessária uma maior vizinhança para aglutinar as regiões dispersas, eliminando-as e formando regiões maiores e mais densas, como pode ser observado na Figura 18b.

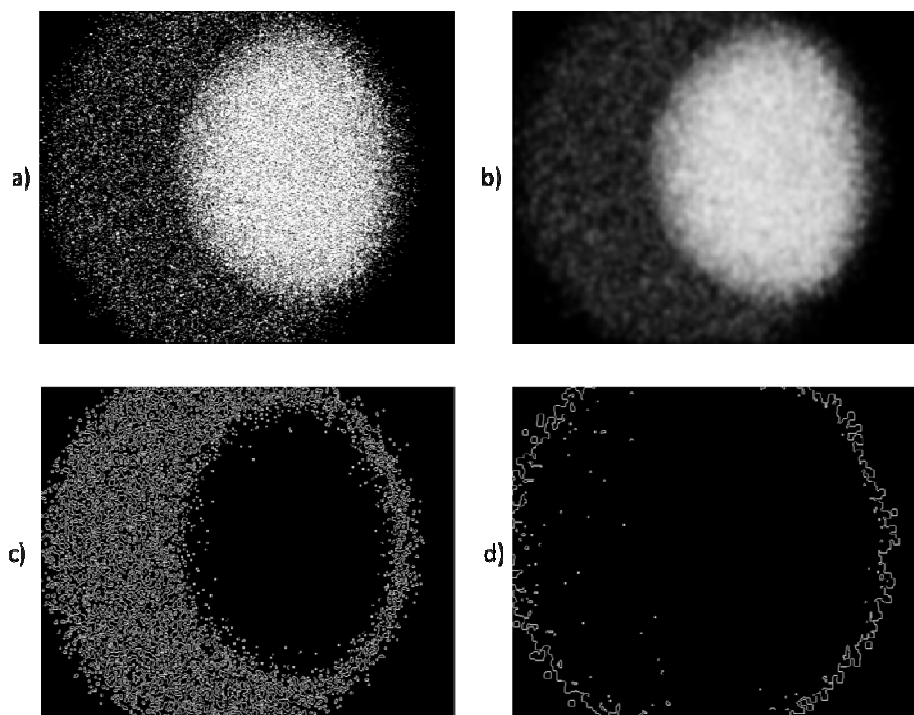


Figura 18 Resultado da aplicação da suavização gaussiana antes do processamento de separar regiões. a) Imagem Resultante do *MHI*. b) Resultado da suavização gaussiana de raio 4 sobre a imagem “a”. c) Resultado do algoritmo de separação de regiões sobre a imagem “a”. d) Resultado do algoritmo de separação de regiões sobre a imagem “b”

As imagens são compostas por tons de cinza (0 a 255 níveis) como dito na definição do processamento da técnica, nesse passo aplica-se um nível de limiarização para definição da maior aglutinação possível nas áreas de atividade. No caso deste experimento, aplicou-se a limiarização na Figura 18b para o tom de cinza nível 0 (zero), resultando na Figura 19a. O valor do nível de limiarização foi gradualmente ajustado e chegou-se no nível 110 que resultou na Figura 19b.

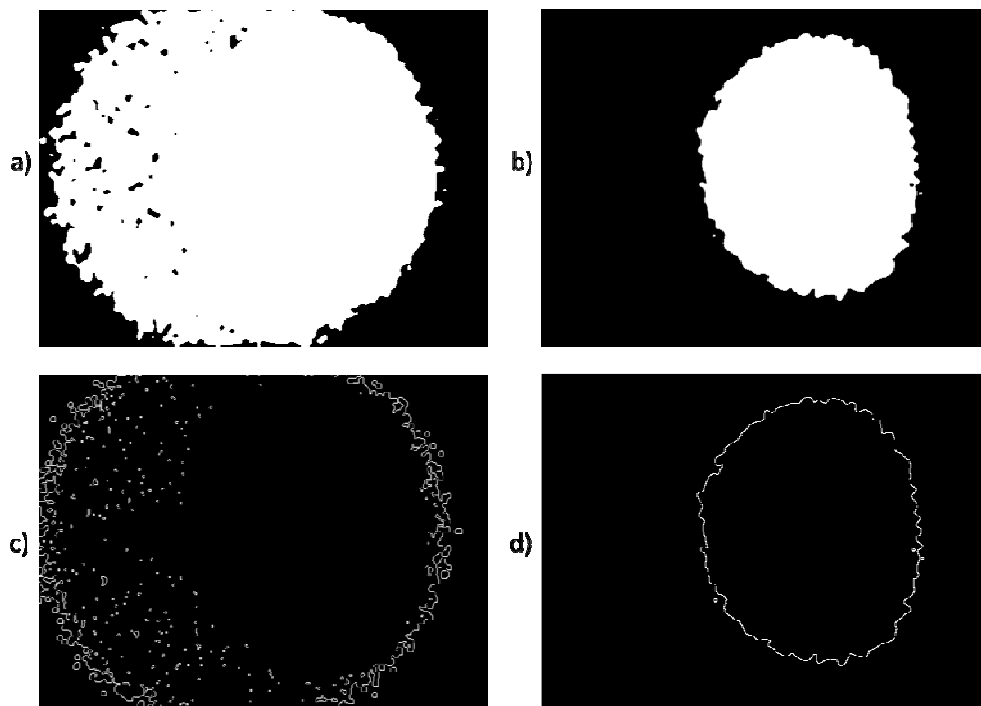


Figura 19 Limiarização para realização do processamento para separar regiões. a) Resultado da limiarização por 0. b) Resultado da limiarização por 110. c) Separação das Regiões da imagem a. d) Separação das Regiões da imagem b

Aplicando o algoritmo de detecção de bordas Canny (CANNY, 1986) na Figura 19a, onde o nível de limiarização foi 0 (zero), obtém-se a Figura 19c, delimitando toda a moeda, ou seja, toda região em que há atividade e/ou ruído. Na aplicação da detecção de bordas na Figura 19b, onde o nível de limiarização foi 110, a área delimitada foi somente a área onde estava ocorrendo a volatilização do álcool, a atividade mais intensa no experimento (Figura 19d).

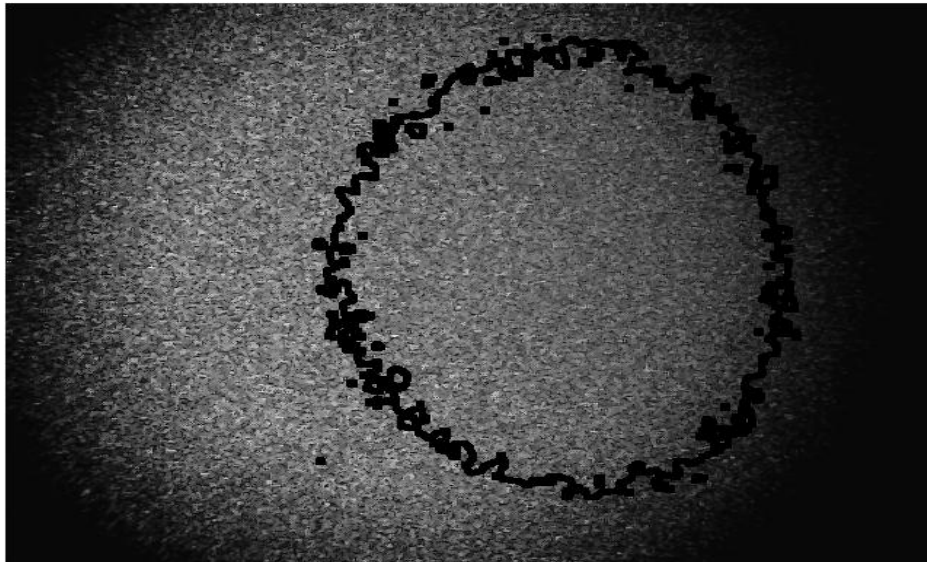


Figura 20 Sobreposição da linha sobre a imagem original

Para elucidar o resultado do método *MHI*, foi feita a sobreposição do contorno da região mais ativa sobre a imagem da câmera no momento da iluminação como descrito no item 0.

Comparando com o resultado calculado pelo método DG (Figura 21), nota-se que o método *MHI* tem resultado satisfatório na determinação das áreas de atividade.

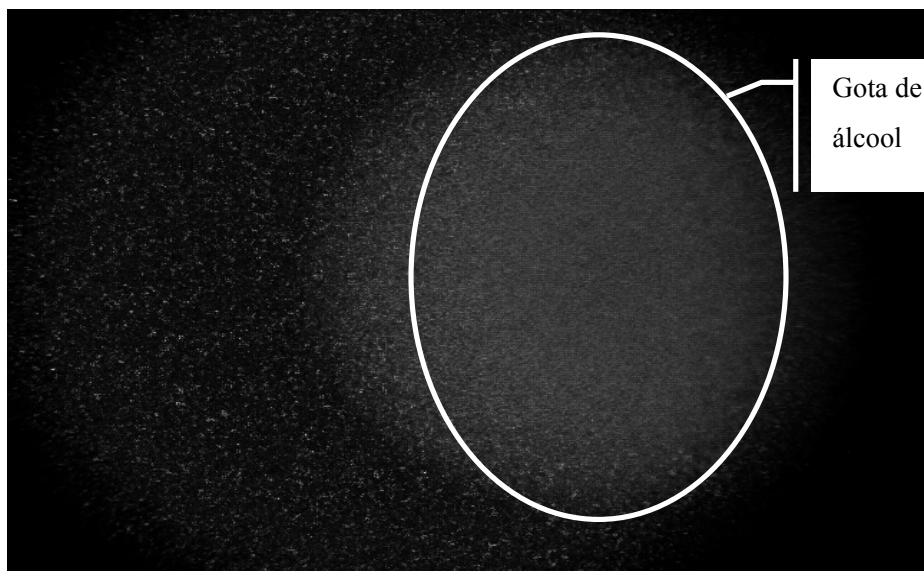


Figura 21 Método DG aplicado no experimento da moeda

5.2 Resultados em aplicações biológicas

Diante dos resultados do experimento acima mencionado, observa-se que o método proposto mostra ser de grande auxílio ao pesquisador na utilização do *BSL*.

Observa-se na Figura 22 o resultado da aplicação do método *MHI* sobre o experimento de monitoração de uma raiz de milho. A pouca atividade exibida neste experimento fez com que se utilizasse um valor elevado para o filtro de sensibilidade do *MHI*, que foi ajustado em 40, a fim de capturar o máximo de *pixels* em movimento. E devido à lentidão do movimento do *BSL*, foi necessário o uso de um banco de imagens com tamanho 10 para ter uma amostra temporal suficiente para construção do *MHI*. Como a granulometria do *BSL* desse experimento foi pequena, foi utilizado uma suavização gaussiana de raio 4.

Aplicando-se o *MHI*, observa-se que a delimitação das regiões de atividade mais altas é coerente com o resultado do método de análise DG.

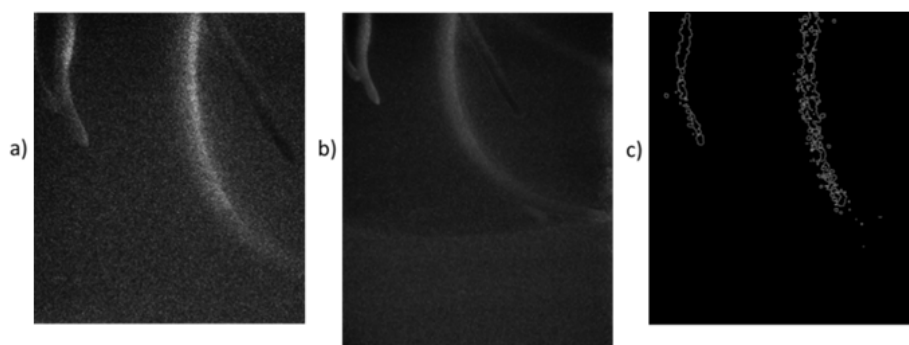


Figura 22 Região de maior atividade no experimento do monitoramento da Raiz de milho. a) Imagem original do experimento. b) Imagem Resultando do método de análise DG. c) Imagem resultando do método de delimitação das áreas de maior atividade

A mesma análise, agora procedida em uma raiz de café, cujo principal diferença é a intensidade da atividade, pode ser visualizada na Figura 23. Nesse caso, o tamanho do banco de imagens e o filtro de sensibilidade do *MHI* foram ajustados para 6 e 32, respectivamente. Outras informações sobre o experimento são: taxa de aquisição de 15 FPS, duração do *MHI* de 0,4s, nível de limiarização 40 e suavização gaussiana de raio 4. Nota-se que *MHI* delimitou as mesmas regiões encontradas pelo método de análise do DG, Figura 23c.

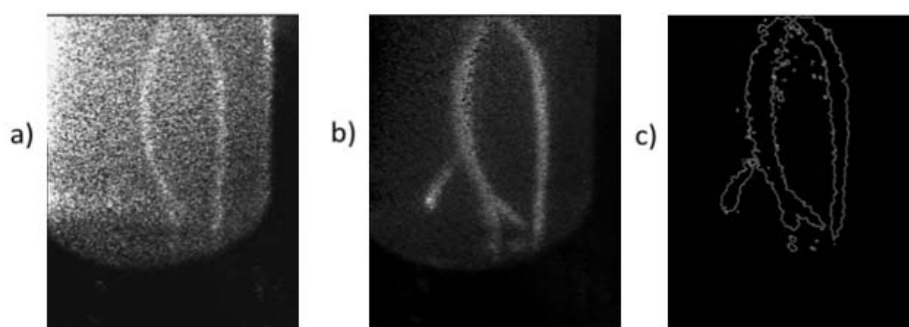


Figura 23 Regiões mais ativas no experimento da Raiz do Café. a) Imagem original do experimento. b) Resultado do método de análise DG. c) Resultado do método que identifica regiões mais ativas

Aplicando o *MHI* no experimento da semente do milho (item 0) e utilizando os parâmetros para o *MHI*: banco de imagens tamanho 4, sensibilidade de 98, taxa de aquisição de 15 FPS, tempo de duração do *MHI* de 0,3s, nível de limiarização 42 e raio 3 para a suavização gaussiana, observa-se a

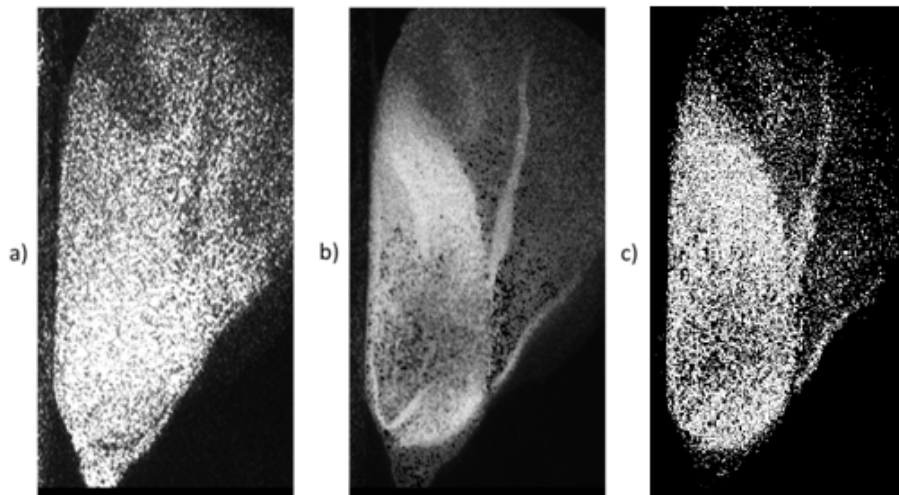


Figura 24.

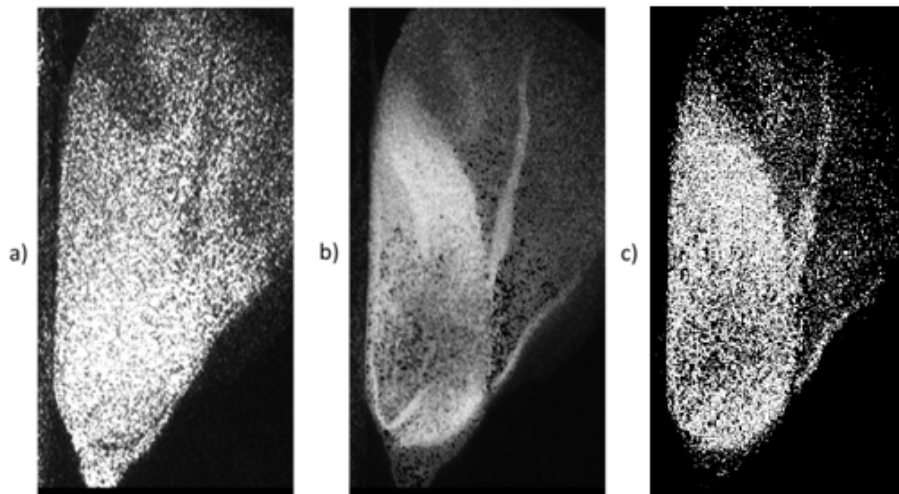


Figura 24 a) Imagem original do experimento de iluminação da semente de milho; b) DG do experimento; c) *MHI* do experimento

Nota-se que o *MHI* trouxe resultado muito semelhante ao método DG, mostrando que a metodologia *MHI* também se aplica a esse tipo de experimento. Assim sendo a metodologia para delimitar a área de atividade, aplica-se a suavização gaussiana na Figura 24c e obtém-se a Figura 25a. Seguindo a sequência do processamento, aplica-se a limiarização na Figura 25a obtendo-se a Figura 25b.

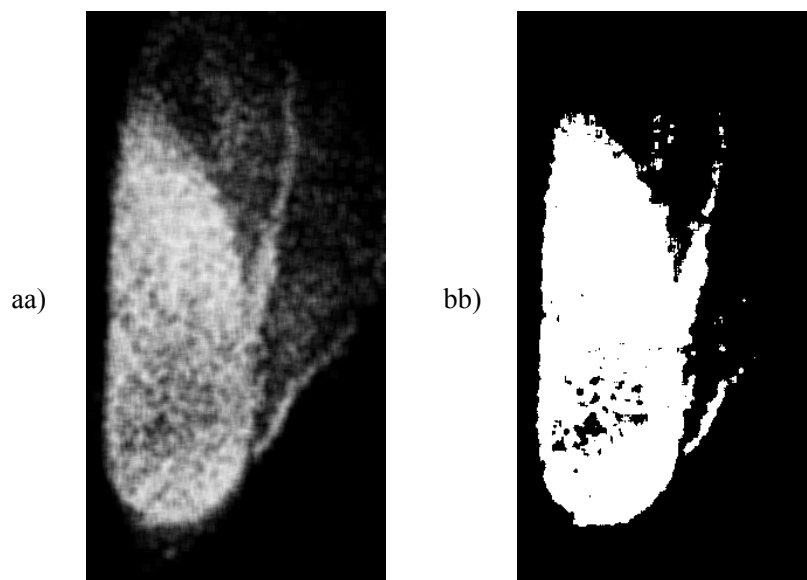


Figura 25 a) Suavização gaussiana da Figura 24c; b) filtro de limiar aplicado na Figura 25a

Desse modo, obteve-se a imagem com bordas claramente definidas e para delimitá-las, aplica-se o algoritmo Canny, resultando na Figura 26a. Com a fina espessura das linhas geradas pelo Canny, aplica-se uma erosão na Figura 26a, resultando na Figura 26b. Esse passo tem como objetivo a nitidez sobreposição final.

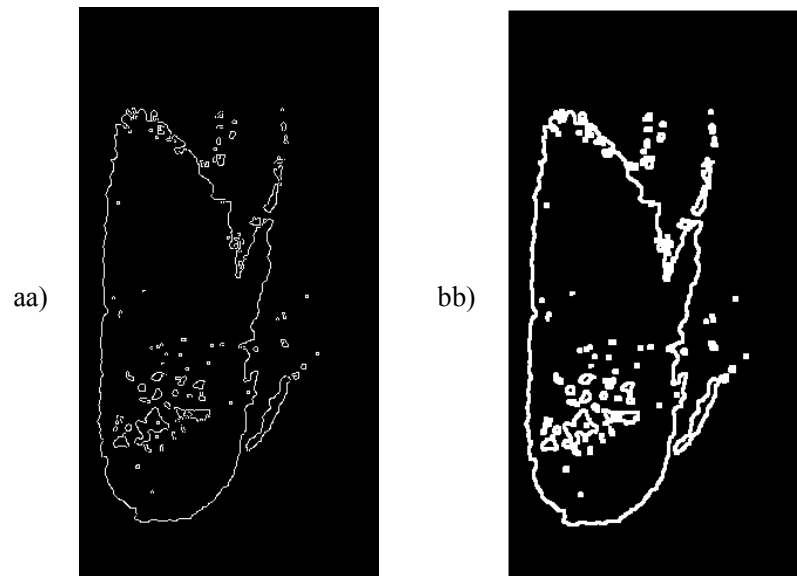


Figura 26 a) Bordas encontradas pelo algoritmo Canny; b) Bordas com erosão aplicada

Fazendo-se a sobreposição das bordas sobre a imagem original do experimento visualiza-se as áreas de maior atividade, ilustrada na Figura 27a.

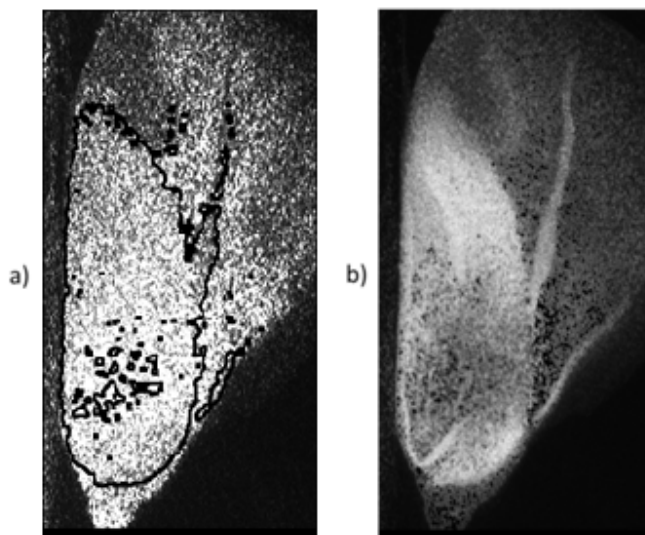


Figura 27 a) Bordas sobrepostas na imagem original; b) DG do experimento

Observa-se que a parte delimitada do embrião deveria ser homogênea, porém, é possível observar que próximo ao centro do embrião há uma área sem atividade (Figura 27a). Isso foi ocasionado pela saturação que ocorreu nas imagens capturadas e a intensidade dos *pixels* nessas regiões variou pouco, mascarando o resultado final. O método DG também mostra áreas escuras no interior da grande área clara, o que confirma esse resultado (Figura 27b).

Utilizando da coloração artificial de imagens, ficou nítida a predominância da cor vermelha nas regiões saturadas (Figura 28). Construindo um histograma de cores da imagem original em tons de cinza, confirma-se a saturação pelo pico no nível de cinza 255 (totalmente branco), como visto na Figura 28 à direita.

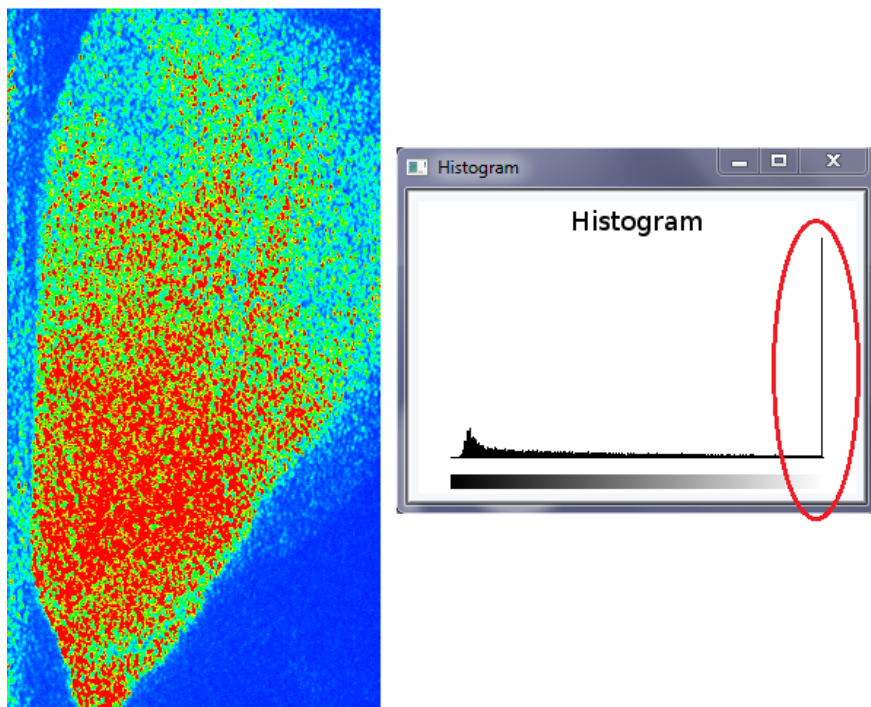


Figura 28 Imagem do milho colorida artificialmente e histograma mostrando a saturação ocorrida no experimento

Um experimento envolvendo tecido animal foi realizado, tratando-se de um câncer encontrado na pata de um gato. Como demonstrado na imagem da análise histológica (Figura 29), a parte não saudável do tecido é parte mais escura da imagem e a mais clara, que se prolonga parecendo uma cauda, é um tecido saudável.

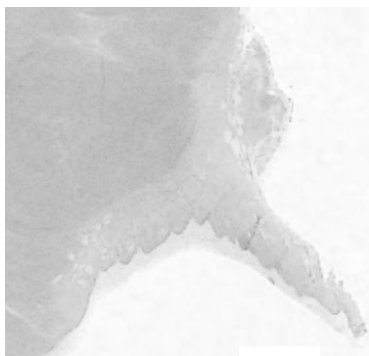


Figura 29 Imagem Histológica do câncer no tecido da pata do gato (MEUTEN, 2002)

Utilizando-se do método DG (Figura 30a) tem-se na região mais clara a alta atividade das células cancerígenas. Aplicando-se o *MHI* obtém-se a Figura 30b, mostrando a eficiência da delimitação do método. Devido à pequena área de atividade usou-se um nível de limiarização igual a 20 e um banco de imagens de tamanho 4 devido à atividade ser intensa. O experimento foi realizado com uma taxa de aquisição de imagens de 15 FPS e o tempo de duração do *MHI* de 0,3s. O raio da suavização gaussiana foi de 10, um valor alto devido às imagens capturadas serem de alta resolução, a qual ocasiona o aumento da granulometria do *BSL*.

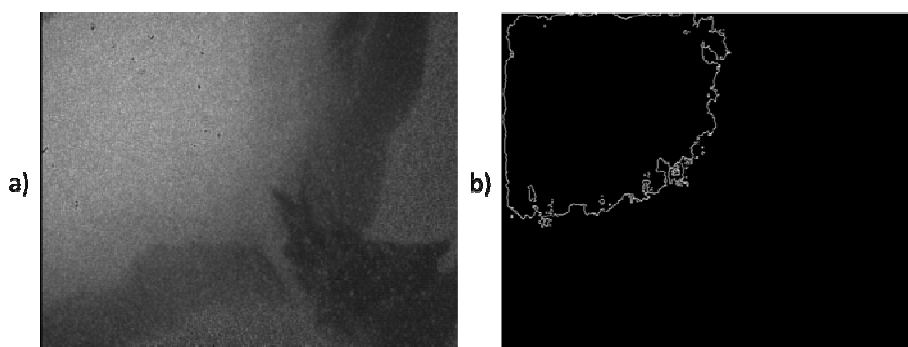


Figura 30 a) Imagem resultante do DG no experimento do Câncer no tecido da pata do gato; b) Bordas delimitantes da área de atividade determinadas pelo *MHI*

5.3 Programas desenvolvidos durante o projeto

O programa desenvolvido durante o projeto forneceu todas as imagens dos resultados aqui exibidos, com exceção dos resultados do método de análise DG, *Fujii* e *LASCA* e as imagens histológicas do câncer. O programa recebeu o nome de “*Speckle Tool*” (Figura 31) e se encontra em processo de registro no Instituto Nacional de Propriedade Industrial sob o nº de protocolo 014110003031.

O “*Speckle Tool*” possui os métodos de processamento *on-line* e ferramentas de auxílio na visualização e captura do *BSL*. A lista de funcionalidades incluídas na ferramenta é:

- a) Visualização da imagem da câmera de modo normal, escala de cinza ou colorido artificialmente.
- b) Visualização do método de análise *LASCA* em tempo real, com a opção de controlar a variável máscara e o passo. A visualização pode ser feita em tons de cinza, imagem de 8 *bits*, ou utilizando a coloração artificial de imagens, imagem *RGB*.
- c) Visualização do mapa de atividade encontrado pelo *MHI*, com o controle das variáveis tamanho do banco de imagens, duração do *MHI* e filtro de sensibilidade. O resultado pode ser visualizado como imagem em tons de cinza ou colorida artificialmente.
- d) Visualização do método de delimitação da área mais ativa proposto neste trabalho, com o controle das variáveis do nível de limiarização, espessura da linha, raio da suavização gaussiana e sobreposição das linhas à imagem da câmera.
- e) Visualização do histograma da imagem capturada pela câmera.
- f) Funções adicionais.

- g) Controle da taxa de aquisição da câmera.
- h) Gravação de vídeos utilizando codec de compressão DIVX (DIgital Video eXpress), com controle de tempo de gravação e FPS.
- i) Salva sequência de imagens de qualquer um das visualizações disponíveis.
- j) Abertura de vídeos no formato “.avi” para análise, com a opção de repetição infinita do vídeo.

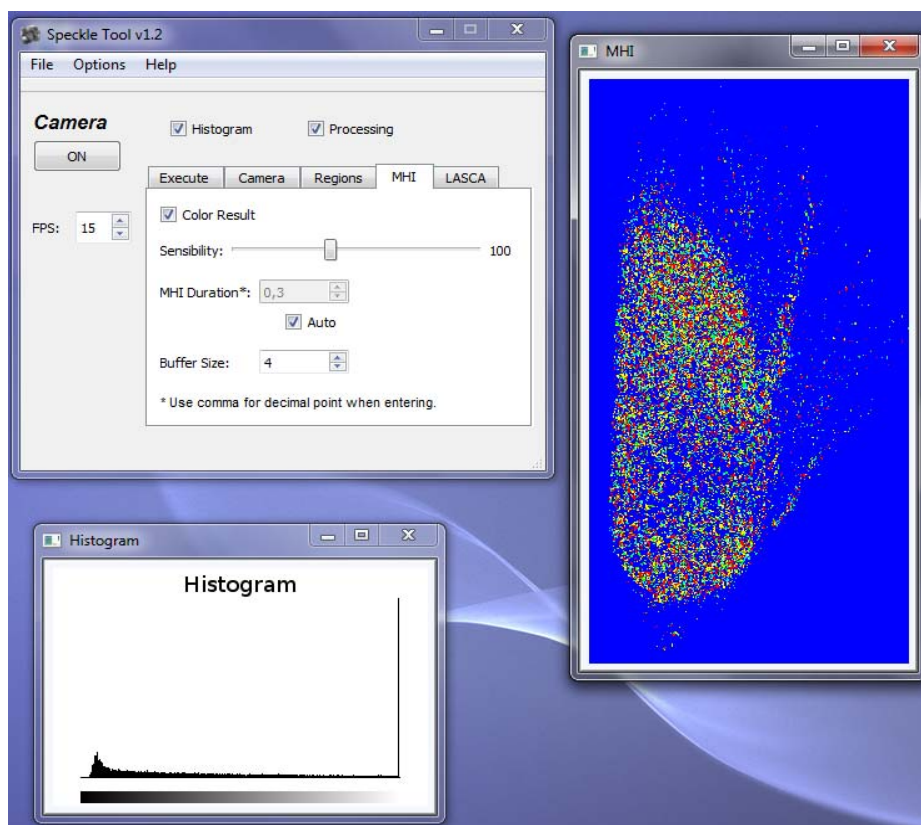


Figura 31 Interface do *Speckle Tool*

Outra ferramenta foi desenvolvida para colorir as imagens em tons de cinza, utilizando uma paleta de cores padrão, a qual consegue destacar

claramente as regiões de alta atividade, diminuindo o esforço visual. O programa abre uma imagem e aplica a paleta de cores da Figura 33, para gerar uma imagem colorida artificialmente (Figura 34). Ambos os *softwares* já estão em uso no CEDIA.

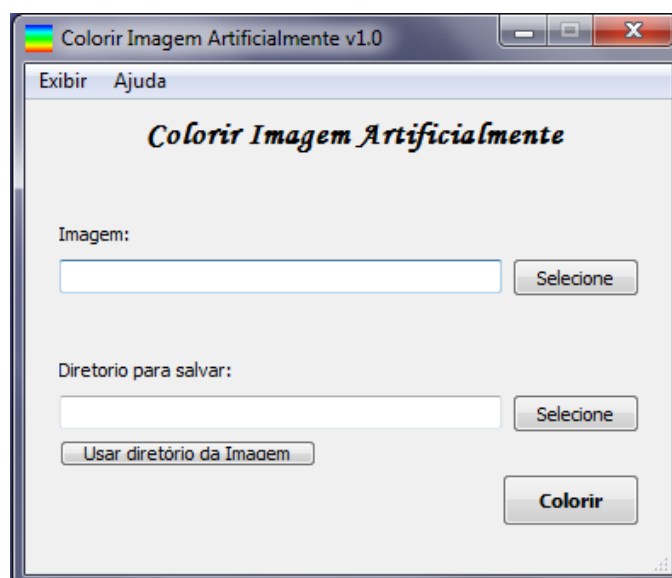


Figura 32 Interface do Colorir Imagem Artificialmente

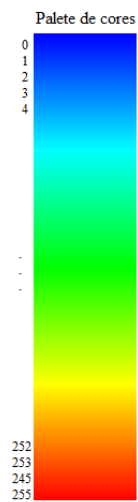


Figura 33 Paleta de cores de conversão de imagens em tons de cinza para imagens coloridas

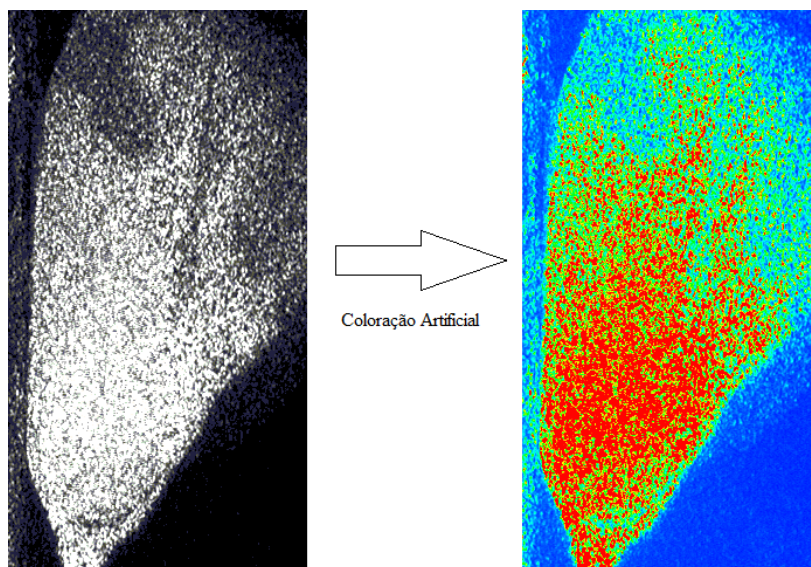


Figura 34 Exemplo de coloração artificial de imagem

6 CONCLUSÃO

A técnica *MHI* mostrou-se eficaz na determinação das regiões de atividade com resposta em tempo real para dados de materiais biológicos e não biológicos. A técnica permitiu ajustes dos parâmetros do tempo de integração e sensibilidade, mostrando nitidamente as áreas de atividade nas amostras e mantendo a resolução espacial da imagem sem alterações. Com ajustes nos parâmetros pode-se determinar desde áreas com baixa atividade e diferenciar áreas com diferentes frequências de atividade em tempo real, auxiliando na montagem da configuração para realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- BAI, Y. et al. Streaming of webcams for home networking performance measurement of video data. In: IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON NETWORKS JOINTLY HELD, 13.; MALAYSIA INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMMUNICATION, 7., 2005, Malaysia. **Proceedings...** Malaysia: IEEE, 2005. v. 1, p. 166-171.
- BOLAY, H. et al. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. **Nature Medicine**, New York, v. 8, n. 2, p. 136-142, 2002.
- BRAGA JUNIOR, R. A. **Biospeckle**: uma contribuição para o desenvolvimento de uma técnica aplicada a análise de sementes. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- BRIERS, J. D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. **Physiological Measurement**, Bristol, v. 22, n. 4, p. 35-66, Dec. 2001.
- _____. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow. **Optica Applicata**, Wrocław, v. 37, p. 328-332, Oct. 2006.
- BRIERS, J. D.; WEBSTER, S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow. **Journal of Biomedical Optics**, New York, v. 1, n. 2, p. 174-175, 1996.
- CANNY, J. A computational approach to edge detection. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, New York, v. 8, n. 6, p. 679-698, 1986.
- CHENG, H. et al. Laser speckle imaging of blood flow in microcirculation. **Physics in Medicine and Biology**, Bristol, v. 49, n. 7, p. 1347-1357, July 2004.
- DAVIS, J. Hierarchical motion history images for recognizing human motion. In: IEEE WORKSHOP ON DETECTION AND RECOGNITION OF EVENTS IN VIDEO, 1., 2002, London. **Proceedings...** London: IEEE, 2002. p. 39-46.
- DING, L.; GOSHTASBY, A. On the Canny edge detector. **Pattern Recognition**, Dayton, v. 34, n. 3, p. 721-725, 2001.
- DUNN, A. K. et al. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. **Blood**, New York, v. 21, n. 3, p. 195-201, June 2001.

_____. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex. **Neuroimage**, Orlando, v. 27, n. 2, p. 195-201, June 2005.

FLAMMER, J. et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. **Progress in Retinal and Eye Research**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 359-393, Dec. 2002.

GODINHO, R. P.; BRAGA, R. A. Three-dimensional image contrast using biospeckle. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, 20., 2010, Florianópolis. **Proceedings...** Florianópolis: Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, 2010. 1 CD-ROM.

GODINHO, R. P. et al. Online biospeckle assessment without loss of definition and resolution by motion history image. **Optics and Lasers in Engineering**, London, v. 50, n. 3, p. 1-7, Mar. 2011.

GONIK, M. M.; MISHIN, A. B.; ZIMNYAKOV, D. A. Visualization of blood microcirculation parameters in human tissues by time-integrated dynamic speckles analysis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 972, n. 1, p. 1749-6632, 2002.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Digital image processing**. 3rd ed. Upper Saddle River: Pearson/Prentice Hall, 2008. 954 p.

LE, T. M. et al. New Insights into image processing of cortical blood flow monitors using laser speckle imaging. **Imaging**, Leatherhead, v. 26, n. 6, p. 833-842, 2007.

MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4th ed. Ames: Iowa State University, 2002. 788 p.

NADKARNI, S. et al. Characterization of atherosclerotic plaques by laser speckle imaging. **Circulation**, Baltimore, v. 112, n. 6, p. 885-892, June 2005.

NAGAHARA, M. et al. The acute effects of stellate ganglion block on circulation in human ocular fundus. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, Hvidovre, v. 79, n. 1, p. 45-48, Feb. 2001.

PAUL, J. et al. Imaging the development of an ischemic core following photochemically induced cortical infarction in rats using Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA). **Neuroimage**, Orlando, v. 29, n. 1, p. 38-45, Jan. 2006.

RABAL, H. J.; BRAGA JUNIOR, R. A. **Dynamic laser speckle and applications**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2008. 304 p.

RABELO, G. F. **Avaliação da aplicação do “Speckle” dinâmico no monitoramento da qualidade da laranja**. 2000. 149 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SENG, E. Y. Y.; PAUL, J. S. Statistical measures based on Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) for quantification of vascular flow and perfusion changes during cortical stimulation. **Biomedical Engineering**, New York, v. 1, n. 2, p. 417, 2004.

SHIN, H. et al. Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, Hagerstown, v. 26, n. 8, p. 1018-1030, Aug. 2006.

YUAN, S. et al. Determination of optimal exposure time for contrast imaging. **Applied Optics**, New York, v. 44, n. 10, p. 1823-1830, Oct. 2005.