



IMPACTO DO TAMANHO DE VOXEL E MÉTODO DE SEGMENTAÇÃO NA
ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SAPOS DO GÊNERO BRACHYCEPHALUS PELA
TÉCNICA DE MICROCT

Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Nuclear.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Rio de Janeiro
Março de 2019

IMPACTO DO TAMANHO DE VOXEL E MÉTODO DE SEGMENTAÇÃO NA
ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SAPOS DO GÊNERO *BRACHYCEPHALUS* PELA
TÉCNICA DE MICROCT

Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

Prof. Davi Ferreira de Oliveira, D.Sc.

Prof. Joaquim Teixeira de Assis, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2019

Santos, Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos

Impacto do tamanho de voxel e método de segmentação na análise morfológica de sapos do gênero *Brachycephalus* pela técnica de microCT/ Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

IX, 65p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 59-65.

1. Aplicações de microCT e CT. 2. Pequenos animais e os *Brachycephalus*. 3. Materiais e Métodos. I. Lopes, Ricardo Tadeu. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente minha avó Rosilda Sorrentino, por todo carinho, torcida e por existir; à minha tia Rose e primo Eduardo, pelo apoio incondicional. Agradeço especialmente à minha mãe, a quem devo toda gratidão por todos sacrifícios realizados para a minha formação acadêmica e pessoal.

À minha mulher, Bianca, pelo companheirismo, imprescindíveis na realização deste trabalho. Também, pela compreensão e paciência nas diversas noites prejudicadas pela tela do computador.

À Mary Lu e vó Elenyr, por toda torcida e preces, meu muitíssimo obrigado!

Aos amigos que, direta ou indiretamente me ajudaram nesta jornada, sendo batendo um papo no zap enquanto no ônibus, ou na saudosa presença etílica, Luiz mineiro carioca, Ferdnando, Jorgin, Raphael cumpadre, Nath Selma, Marcello Nery, Deivid e Douglas Werly, Rafael Bode, Pedro Oliveira, Alam G. Zila, Ana Pimy, André Decanus e à Jurujeva, um muito obrigado e saibam que bebemorar esta ocasião é imperativo e será cobrado de todos!

Aos amigos da microCT, Olga, Luan, Cinthia, Aline, Thais, Tâmara e Luiz, pelos aprendizados e por manterem o ambiente de laboratório sempre agradáveldiariamente.

Aos que entraram comigo no programa, por toda troca de materiais e colaborações, especialmente aos amigos Leandro e Marcelo pelas diversas refeições no bandeijão desde a primeira semana de aula. Ainda, ao cara que me sugeriu vir para o programa, Alessandro, valeu!

Ao pessoal da secretaria do PEN, por serem sempre prestativos; em especial ao Washington e à Liliane por irem sempre além quando o assunto é nos ajudar com as burocracias do dia a dia.

Aos amigos e colegas do LIN, Carlos, Sandro, Osmar, Josué, Bira, Otacílio, Zé, André e todos que porventura não foram citados, por toda ajuda e ensinamentos no dia a dia do laboratório.

Aos professores do LIN na nossa área, professores Davi e Alessandra, por todos os ensinamentos, e por estarem sempre dispostos à ajudar este muitas vezes chatíssimo aluno. Também agradeço o prof. Edgar por estar sempre disposto a transmitir seus conhecimentos, no laboratório e na usina.

Ao professor Sérgio Reis, da Unicamp, por toda paciência em sanar minhas diversas dúvidas acerca dos sapos usados neste trabalho, bem como pela oportunidade de trabalhar com as amostras.

Finalmente, agradeço especialmente ao meu orientador, Ricardo, por ter confiado em mim desde o começo, pelos incomensuráveis ensinamentos, orientação e oportunidades, sem os quais nada disso seria possível.

Ao CNPQ pelo fomento, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/ UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

IMPACTO DO TAMANHO DE VOXEL E MÉTODO DE SEGMENTAÇÃO NA
ANÁLISE MORFOLÓGICA DE SAPOS DO GÊNERO BRACHYCEPHALUS PELA
TÉCNICA DE MICROCT

Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos

Março/2019

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Programa: Engenharia Nuclear

A Floresta Atlântica brasileira abriga muitas espécies do gênero *Brachycephalus*, e, dentre elas, a espécie *Brachycephalus ephippium*. A microtomografia computadorizada por raios X é uma técnica não destrutiva que permite a visualização e análise de microestruturas internas de amostras diversas. Esta técnica já foi e continua sendo aplicada nas áreas biológicas para o estudo destes animais, permitindo uma minuciosa descrição e caracterização de novas espécies. A espécie usada nesse estudo é particularmente especial, uma vez que foi a primeira do gênero a ser descoberta, tornando-a de certa forma a base comparativa entre espécies. O crânio é de fundamental interesse, sendo muito usado nos trabalhos de aplicação de microCT. Dentre as estruturas de interesse no crânio, algumas são da ordem do milímetro, podendo chegar a menos de meio milímetro. Os efeitos do tamanho de voxel de imagem então podem tornar-se relevantes, e foi isso que foi investigado nesse trabalho, tanto visualmente quanto quantitativamente. Foram usados dois métodos de segmentação de imagens bem conhecidos, o Global (manual) e o de Otsu (automático), e oito parâmetros morfométricos foram analisados. Verificou-se que a variação do tamanho de voxel implicou em perda substancial de informações nas imagens para a maioria dos parâmetros estudados, enquanto a variação quanto ao método de segmentação foi verificada somente para os parâmetros Tb.Pf e Obj.N.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.).

IMPACT OF VOXEL SIZE AND SEGMENTATION METHOD ON THE
MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF BRACHYCEPHALUS GENRE FROGS BY
THE USE OF MICROCT TECHNIQUE

Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos

March/2019

Advisor: Ricardo Tadeu Lopes

Department: Nuclear Engineering

The Brazilian Rainforest inhabits many species of the *Brachycephalus* genre and, among them, the *Brachycephalus ephippium* species. X-ray computed tomography is a nondestructive imaging technique which allows for the visualization and analysis of internal microstructures of various samples. This technique was and still is applied on biological research for the study of these animals, enabling thorough description and characterization of new species. The species used in this study is of particular interest, since it was the first of this genre to be discovered, which makes it in a way the interspecies comparative basis. The cranium is of fundamental interest and it's very used in microCT application works. Amid structures of interest in the cranium, some are of the order of the milimeter, sometimes less than half a milimeter. The effects of the voxel size of microCT images can therefore be relevant, and this is what was investigated in this work, both visually and quantitatively. Two well-known segmentation methods were used: Global (manual) and Otsu (automatic), and eight morphometric parameters were analyzed. There was significant variation due to voxel size alone, which led to information loss on the images for most evaluated parameters, while segmentation did not represent significant variation for most parameters, only for Tb.Pf. and Obj.N.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – Aplicações de CT e microCT.....	4
2.2 – Pequenos Animais e os <i>Brachycephalus</i>	6
CAPÍTULO 3	9
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
3.1 – Os raios X.....	9
3.1.1 – Interação com a matéria.....	10
3.2 – A microtomografia computadorizada	14
3.2.1 – Tubo de raios X	16
3.2.2 – Detectores.....	18
3.3 – Imagem digital.....	19
3.4 – Desempenho de Sistemas de MicroCT.....	20
3.4.1 – Tamanho Focal.....	20
3.4.2 – Magnificação.....	22
3.4.3 – Relação Sinal - Ruído.....	23
3.5 – Análise de dados.....	25
3.5.1 – Processamento	25
3.5.2 – Segmentação de imagem.....	26
3.5.3 – Limiarização (<i>Thresholding</i>)	26
CAPÍTULO 4	31
MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 – Equipamento	31
4.2 – A Amostra (<i>Brachycephalus Ehippium</i>).....	34
4.3 - Parâmetros estudados	35
4.4 – Programas Utilizados.....	37
4.4.1 – Aquisição – Datos x Acquisition	37

4.4.2 – Reconstrução – <i>Datos/x Reconstruction</i>	41
4.4.3 – Alinhamento do Conjunto de Imagens – <i>Dataviewer</i>	42
4.4.4 – Análise das Imagens - CTan.....	44
CAPÍTULO 5	47
RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1 – Discussão Qualitativa	47
5.2 – Análise dos Parâmetros.....	50
CAPÍTULO 6.....	57
CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIA	Erro! Indicador não definido.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A microtomografia computadorizada é uma técnica não destrutiva de produção de imagens tridimensionais através do uso de raios X, que possibilita a visualização e análises quantitativas de estruturas internas de amostras variadas.

Historicamente, a microCT tem suas raízes na tomografia computadorizada, CT, desenvolvida para aplicação na área médica já há mais de quatro décadas (Landis et al., 2010). Apesar de ainda ser intensamente usada nas áreas médicas e odontológicas (Pires et al., 2018; Aboud et al., 2018), são diversas as áreas de pesquisa que já foram e são beneficiadas com aplicações da técnica. O caráter não invasivo a torna extremamente útil em estudos nos quais não é possível seccionar a amostra, e.g. amostras animais (Aristide et al., 2015, Alba-Tercedor, 2016), arqueológicas (Machado et al., 2017) ou até mesmo não terrestres, como o ensaio feito com o meteorito marciano NWA 6963 (Nascimento-Dias et al., 2017). Ademais, vale ressaltar o uso da técnica no estudo de rochas de variados tipos, e.g. rochas carbonáticas (Santos et. al, 2018) e arenitos (Sales et al., 2008), bem como na caracterização de elementos multi materiais (Araújo et al., 2018).

Por outro lado, a técnica também tem forte uso industrial (Assis, 1992, Lopes et al., 1997, Cesareo et al., 2003, Machado et al., 2016), uma vez que devido à sua alta capacidade de diferenciação de estruturas e falhas em uma imagem – da ordem de micrômetros –, e de que sistemas mais modernos de microCT conseguem realizar aquisições de imagens em relativamente pouco tempo, a técnica torna-se viável ferramenta na verificação de falhas estruturais de produtos diversos.

A microCT foi extensivamente usada na visualização de pequenos animais como um todo, possibilitando o aprofundamento da pesquisa em diversas áreas dentro das ciências naturais, como biologia e ecologia (Schambach et al., 2010, Gutiérrez et al., 2017). No caso de sapos do gênero *Brachycephalus*, a técnica foi e continua sendo usada em trabalhos diversos, como na busca do melhor entendimento da audição destes animais (Goutte et al., 2018), de padrões morfológicos associados aos processos

evolutivos deles como a hiperossificação (Clemente-Carvalho et al., 2009), e na caracterização de novas espécies (Ribeiro et al., 2017).

O gênero *Brachycephalus* é endêmico da Mata Atlântica das regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. São espécies diurnas, vivem no solo ou a alguns centímetros do chão, em cima de folhas. A maioria das espécies deste grupo tem habitat em regiões montanhosas, e muitas delas podem ser apenas encontradas no topo de uma ou poucas montanhas adjacentes, o que inclusive as coloca em potencial risco de extinção, quando soma-se a isto a destruição de seus habitats (Campos, 2011; Pie et al., 2018).

A microCT já é considerada parte importante no estudo destes animais, como mencionado anteriormente. Ao se investigar uma nova espécie, é necessária a comparação entre espécimes da suposta nova espécie com espécimes de espécies previamente descritas. Desta forma, é comum o uso de mais de uma dezena de espécimes para a avaliação de uma nova espécie (Ribeiro et al., 2015; Pie et al., 2018). A espécie utilizada neste trabalho foi a primeira espécie do gênero a ser descrita (Bornschein, 2016), tendo sido portanto seguramente a mais usada nestas comparações, e ainda o é toda vez que se deseja descrever uma nova espécie. Ao todo já são 35 espécies destes pequenos sapos (Pie et al., 2018), 22 das quais foram descobertas apenas na última década (Ribeiro et al., 2017). Segundo pesquisadores da área, a microtomografia computadorizada deve ser considerada etapa indispensável na taxonomia de sapos *Brachycephalus*, em especial no que concerne à visualização de estruturas internas de seus ossos (Condez et al. 2017).

Além da singularidade oriunda de ter sido a primeira espécie a ser descoberta do gênero, aplicações da microCT são realizadas na pesquisa de características peculiares a estes animais, como a recém descoberta de que são incapazes de ouvir o próprio som que emitem (Goutte et al, 2017).

O crânio é notoriamente região de fundamental interesse no que se refere à diferenciação entre espécies e no estudo do processo evolutivo destes animais, contendo (ao menos 15) identificadores morfológicos considerados representativos de características relevantes nos estudos supracitados (Clemente-Carvalho et al., 2011), e por esta razão foi escolhido como o volume de interesse para este trabalho.

O tamanho de voxel de aquisição e reconstrução é notoriamente um parâmetro de grande importância em qualquer uso de microCT, e muitos estudos já foram realizados voltados para o impacto que este tem sobre as imagens reconstruídas (Vidal et al., 2014, Kim et al., 2004). Contudo, não foi realizado ainda estudo com este escopo em sapos do gênero *Brachycephalus*.

Neste trabalho, o objetivo consistiu em verificar o impacto visual e quantitativo que o tamanho de voxel tem na reconstrução de imagens destas amostras. Bem como, foram usados dois métodos de segmentação para a análise, o Otsu e o Global (manual). Sendo o Otsu um método automático, foi usado em contraposição ao método Global, muito usado em aplicações da técnica.

No próximo capítulo é feita uma revisão bibliográfica concernente a este trabalho. Em seguida, é realizada a explicação dos fundamentos teóricos envolvidos na técnica de microtomografia computadorizada – da produção de raios X à imagem digital obtida. No capítulo IV, os materiais, amostras e métodos são descritos, incluindo o microtomógrafo usado neste experimento. Nos últimos dois capítulos são dispostos e discutidos os resultados obtidos, e conclusões.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é realizada uma revisão da bibliografia relacionada à microCT de raios X e suas aplicações. Na primeira seção é apresentado o estado da arte das técnicas de tomografia e microtomografia computadorizada (CT e microCT, respectivamente). Na segunda parte são comentados trabalhos em que a técnica foi aplicada tanto no estudo de pequenos animais de um modo geral, como na verificação do impacto do tamanho de voxel na imagem destes tipos de amostras; também sobre o uso da técnica em sapos do gênero *Brachycephalus* e, especificamente, à espécie *Brachycephalus ephippium*, usada nesse trabalho.

2.1–Aplicações de CT e microCT

No começo da década de 1970, a tomografia computadorizada foi introduzida em práticas médicas. CT tem mostrado forte avanços tecnológicos, de performance e uso clínico, contradizendo as predições feitas por muitos na época, que pensaram que na década de 1980 a técnica seria deixada de lado, em prol da técnica de ressonância magnética. De lá pra cá, a tecnologia que envolve a tomografia computadorizada cresceu muito, desde a tecnologia dos detectores, dos tubos geradores de raios X, aos algoritmos de reconstrução. (Kalender, 2006) fez uma revisão sobre a evolução histórica da técnica, em ordem cronológica, focando no desenvolvimento tecnológico, qualidade de imagem e aplicações clínicas, tratando da história da técnica desde seu começo, na CT, à microCT.

A CT e microCT têm sido usadas, já há quatro décadas, em estudos envolvendo animais, especialmente a microCT devido à alta resolução atingida. As aplicações vão desde a simples visualização de estruturas internas à efetiva quantificação de parâmetros que possibilitam averiguar uma característica específica de interesse.

Tendo sido inicialmente usada como forma de visualizar estruturas ósseas para viabilizar estudos ligados à densidade e anatomia óssea – tais como pesquisas avaliando a osteoporose, renegeração óssea e outros –, a técnica evoluiu de modo a também permitir a análise quantitativa e informações sobre a estereologia, volume e arquitetura

trabecular de ossos à resolução de micrômetros. Para estimar acerca da densidade volumétrica óssea é preferível o uso do método *ex vivo* (i.e. o uso da técnica em amostras mortas). Devido à sua característica não invasiva, a técnica também permite avaliações múltiplas da amostra, o que é muito útil quando se deseja avalia-la anterior e posteriormente ao uso de alguma substancia enquanto esta ainda está viva (método *in vivo*), como um medicamento em camundongos onde se deseja averiguar os efeitos da droga nos ossos dos animais – o que acarreta uma limitação quanto à potência do feixe, não sendo possível submeter as amostras a altas energias. Todavia, não é somente em trabalhos relacionados aos ossos que a técnica vem sendo usada. Pelo menos 60 trabalhos relacionados à avaliação da vasculatura em pequenos animais foram publicados, desde o fim da década de 1990. A aplicação da técnica em estudos vasculares é extensa e diversa, tendo sido usada em diversos órgãos animais, tanto em condições saudáveis quanto enfermos. Essas aplicações, no entanto, requerem em sua maioria o uso de algum agente químico (i.e. contraste), que deve ser administrado na amostra antes da mesma ser escaneada, de modo a possibilitar maior diferenciação entre os tecidos de interesse e ruído por parte do sistema (Schambach et al. 2010).

(Simões e Campos, 2013) realizaram uma revisão sobre a influência do tamanho de voxel na qualidade de imagens produzidas pela técnica de tomografia computadorizada (CT) em pesquisas envolvendo radiodiagnósticos. Nestes tipos de aplicações preocupa-se também com a dose de radiação recebida pelo paciente ao passar por um exame de imagem. Os tamanhos de voxel tratados nos trabalhos revistos pelos autores são da ordem de 0,1-2 mm, evidentemente muito maiores do que o conseguido na microCT. Em suas conclusões, os autores ressaltam que a qualidade de imagem foi superior nos casos em que o tamanho de voxel era menor, porém a diminuição do tamanho de voxel está quase sempre associada à uma maior corrente e tempo de exposição. Em equipamentos mais modernos seria possível reduzir o tamanho de voxel sem elevar a corrente, mas alguns estudos mostraram não haver diferença na qualidade de imagem quando se trata de voxels maiores, uma vez que isso aumentaria a espessura da estrutura.

(Christiansen, 2016) fez um estudo sobre o efeito do tamanho de voxel na microCT na microestrutura trabecular de ossos de camundongos. As amostras escolhidas por ele foram a vertebra L5 de camundongos adultos. Cada amostra passou por uma série de cinco escaneamentos, tendo sido mantidos todos parâmetros de

aquisição exceto o tamanho de voxel, que variou entre os valores: 6, 10, 15, 20 e 30 μm . Suas regiões de interesse foram feitas manualmente, contornando a camada cortical interna em cortes bidimensionais. Em sua análise, realizou a segmentação das imagens de duas maneiras: a que chamou de “Selecionado Qualitativamente” – onde um operador experiente, através da comparação entre os cortes originais em escalas de cinza com os respectivos segmentados binarizados, selecionou o *threshold* que lhe pareceu melhor representar a imagem original –, e outro que denominou como sendo quantitativo, onde foi usado estritamente o histograma como forma de separar o material ósseo do não ósseo. Nesse segundo método descrito, o autor identificou dois picos em seu histograma, sendo um referente ao material ósseo e outro ao material não ósseo em sua imagem e, com isso, usou seu *threshold* como sendo a região compreendida no mínimo no vale entre os picos e o pico ósseo. Sua análise focou em oito parâmetros morfométricos, cuja análise permitiu que comparasse como o tamanho de voxel impactou os diferentes parâmetros, com ambos os métodos. Concluiu que houve um forte impacto nos valores obtidos de parâmetros como espessura trabecular, densidade de conectividade e densidade de tecido ósseo ao mudar o tamanho de voxel de escaneamento; enquanto parâmetros como número de trabéculas, separação trabecular e densidade mineral óssea aparente não sofreram grandes alterações na mudança de voxel compreendida entre 6-20 μm . A 30 μm , todos resultados demonstraram alguma variação, o que era esperado uma vez que este já é da dimensão das trabéculas. Quanto aos dois métodos de segmentação avaliados, ele notou que usando tamanho de voxel menores, os *thresholds* foram similares, porém percebeu discrepâncias fortes quando olhou para tamanhos de voxel maiores. Atribuiu a isto fato de que o pico referente ao material ósseo diferiu muito entre 6 e 30 μm , enquanto o pico referente ao material não ósseo não divergiu tanto, resultando em uma maior região efetiva de diferenciação para o material ósseo nos casos de alta resolução. Como limitações, o autor apontou que como foi usada somente um tipo de amostra óssea, a generalização dos resultados foi severamente dificultada e apontou que uma análise mais rigorosa poderia usar outros tipos de ossos de camundongos também.

2.2– Pequenos Animais e os *Brachycephalus*

(Clemente-Carvalho et al., 2009) analisaram estruturas microscópicas e padrões de variação macroscópicos em espécies de sapos do gênero *Brachycephalus*, incluindo a

espécie *Brachycephalus ephippium*. Neste trabalho dois equipamentos foram usados para a realização das tomografias: um do tipo Sincrotron (SR μ CT) e um de microfoco (descrito nesse trabalho). Também fizeram uso de microscopia eletrônica para o estudo histológico de dois espécimes de maior relevância. Os autores pontuaram que apesar da altíssima qualidade das imagens geradas pelo sistema SR μ CT, este é um sistema de custo muito elevado e, por esta razão, apenas duas amostras foram tomografadas por ele de um total de dezenas, cujas tomografias foram obtidas através do equipamento com microfoco. Com o tubo de microfoco, usaram potencial na fonte de 25 kV e corrente de 250 μ A. As imagens produzidas possibilitaram a análise histológica e óssea das amostras, levando os autores a encontrarem relações entre os padrões evolutivos relacionados às variações morfológicas nos ossos destes animais.

(Ribeiro et al., 2017) usaram a técnica de microCT na descrição de uma nova espécie do grupo *Brachycephalus pernix*, da Floresta Atlântica no estado do Paraná. As tomografias possibilitaram a descrição minuciosa das estruturas ósseas destes animais, tais como crânio, mandíbula, patas e outras. Uma parte importante na descrição de uma nova espécie é estabelecer quanto a considerada nova espécie varia em relação a outras. Parte desta diferenciação é feita medindo determinadas partes em um procedimento padrão, comparando-as posteriormente com as medidas respectivas de outras espécies. Tais medidas envolvem desde o comprimento rostro-anal (da ordem de 10-20 mm), o comprimento das patas (poucos milímetros) até pequenas estruturas no crânio (menores que meio milímetro). Os autores usaram um Phoenix vltomexlm (GE's Measurement & Control business, Boston, MA, EUA) com tubo de 180 kV, alvo de diamante-tungstênio, onde usaram um feixe de 65kV e 175 μ A, tempo de exposição de um segundo, média de 3 imagens por rotação e tamanhos de voxel no intervalo 7,5-11,5 μ m. As reconstruções, visualizações e análises foram feitas com o programa VG StudioMax 3.0.3 (Volume Graphics, Heidelberg, Alemanha). Realizar as diversas medições na estrutura das espécimes que resultam na descrição de uma nova espécie é uma tarefa extremamente complexa, que é muito facilitada pela microCT uma vez que esta possibilita a visualização e análise tridimensional, bem como corte a corte bidimensional, das amostras com tamanho de voxel extremamente pequenos, como realizado neste trabalho.

(Goutte et al., 2017) aplicaram a técnica de microCT no estudo da sensibilidade auditiva de duas espécies de *Brachycephalus*, o *B. ephippium* e o *B. pitanga*. Para viabilizar a visualização do ouvido médio das espécimes, os autores combinaram a microCT com a técnica de contraste DICE (*diffusible iodine-based contrast-enhanced*) para melhor detecção de tecidos leves. O uso do contraste permite melhor diferenciação entre tecidos não ósseos como músculos, cartilagem e nervos quando combinada com um escaneamento tomográfico. Com esta metodologia, e com imagens de tamanho de voxel de 14,5 μm , os autores foram capazes de obter imagens de alto grau de diferenciação entre estruturas do ouvido dos *Brachycephalus* com as de sapos de outra espécie na qual é conhecida a capacidade auditiva, levando-os a concluir que os partes importantes do ouvido interno das duas espécies avaliadas são sub-desenvolvidos de tal modo que estes são incapazes de ouvir seu próprio chamado. Os autores sugeriram, para explicar por que os sapos emitem sons inaudíveis para eles próprios, que a comunicação visual pode ter substituído a comunicação sonora, já que estes são sapos bem coloridos e diurnos.

CAPÍTULO 3

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

No presente capítulo serão discutidos os princípios teóricos básicos relativos à microtomografia computadorizada. Começando com uma breve descrição da produção de raios X, incluindo sua formação e como se dá a interação destes com a matéria, percorre-se sobre os fundamentos da microCT, passando pelos principais componentes envolvidos na aplicação da técnica.

3.1– Os raios X

Os raios X foram primeiramente identificados pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923) enquanto pesquisava sobre raios catódicos (que mais tarde descobriu se tratar dos elétrons). Em seu artigo (Röntgen, 1895), Röntgen chamou de “X” por se tratar de um novo fenômeno físico – de certa forma misterioso, uma vez que não conseguiu mudar a trajetória do feixe com a aplicação de campo elétrico nem observar fenômeno de interferência, associado a ondas –, e “Raio” por brevidade. Sua descoberta lhe rendeu o primeiro prêmio Nobel, em 1901. Os trabalhos de muitos outros cientistas da época ajudaram a entender melhor não só os raios X, como também a física atômica e nuclear até chegar ao entendimento atual.

Os raios X são ondas eletromagnéticas, cuja origem pode se dar a partir da interação de partículas carregadas (particularmente o elétron) com outras partículas carregadas (como elétrons de um átomo ou o núcleo do mesmo), de modo que sofrem desaceleração (ou aceleração), perdendo energia por emissão de ondas eletromagnéticas – radiação de frenagem (*Bremsstrahlung*). Quanto maior é o número atômico do elemento com o qual os elétrons estão interagindo, maior será a parcela de energia que o elétron perderá em forma de radiação de frenagem, de modo que para se obter raios X de altas energias não basta que a energia inicial dos elétrons seja alta, mas também que o número atômico do material com o qual estão interagindo seja consideravelmente alto. Uma forma particular deste fenômeno é a chamada Radiação Síncrotron, que é a radiação eletromagnética emitida quando partículas carregadas em velocidades relativísticas são aceleradas radialmente, e é produzida, por exemplo, em aceleradores de partículas (Chao et al., 2013, Lopes et al., 2003).

O outro fenômeno no qual há a formação de raios X é a emissão de raios X característicos. Quando um elétron (ou outra partícula carregada, como prótons ou íons) energético interage com um elétron de uma camada interna da eletrosfera de um átomo, uma vacância pode ser gerada como resultado desta colisão. Esta vacância é prontamente preenchida por algum elétron de uma camada mais externa do átomo, o que acarreta a emissão de um fóton de raios X característico. Este nome se deve ao fato de sua energia ser particular daquela reação – ou seja, a energia deste fóton é precisamente a diferença de energia entre as camadas inicial e final do elétron que preencheu a lacuna (e.g. camadas K e L), sendo portanto características do material alvo, o que inclusive pode e é muito usado na caracterização de materiais, na técnica de fluorescência de raios X (Knoll, 2000).

3.1.1 – Interação com a matéria

Nesta seção será feita uma breve explicação dos principais efeitos que caracterizam a interação dos raios X com a matéria. Na Figura 1 estão representados os

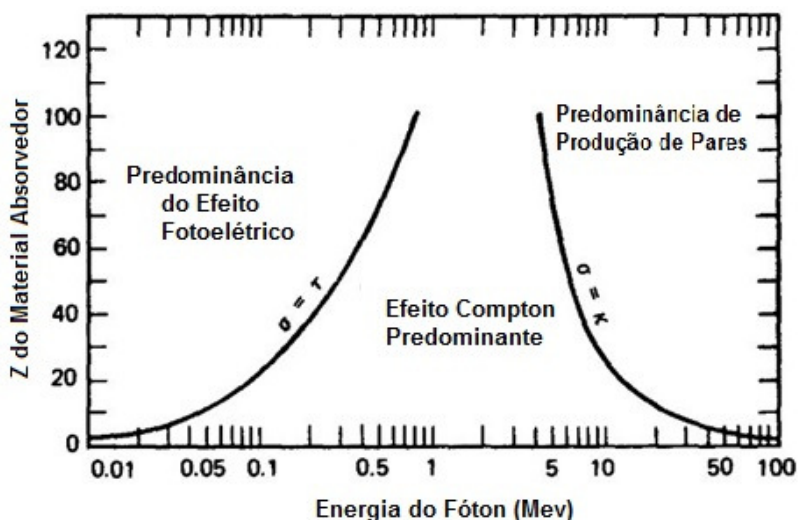


Figura 1 – Distribuições dos três fenômenos resultantes da interação da radiação eletromagnética com a matéria, de acordo com a probabilidade de ocorrência em função da energia (Knoll, 2000).

três fenômenos pelos quais a radiação eletromagnética pode interagir com a matéria, são eles: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares. É possível perceber, a partir da Figura 1, que para energias na faixa de dezenas de keV, as chances da produção de pares pode ser considerada nula, sendo este um fenômeno característico de fótons de energias acima de 1,022 MeV (o dobro da energia de repouso do elétron). Por esta razão, nesta seção serão discutidos apenas os outros dois fenômenos, que são os

fenômenos que efetivamente regem as interações concernentes a este trabalho, uma vez que a energia máxima de feixe usada foi de 50keV.

O efeito fotoelétrico é a forma de interação predominante a baixas energias. Este fenômeno ocorre quando um fóton atinge o elétron de um átomo, dando para ele toda sua energia, de modo que o elétron se desprende do átomo com energia dada por:

$$E_C = h\nu - E_B \quad (1)$$

onde E_C é a energia cinética resultante do elétron desprendido (denominado fotoelétrico), h é a constante de Planck, ν a frequência do fóton, $h\nu$ é a energia do fóton incidente e E_B é a energia de ligação do elétron na camada onde estava orbitando, também chamada de função trabalho, que absorverá parte da energia do fóton.

Da equação 1 nota-se que para que um fotoelétrico seja gerado é preciso que o fóton incidente tenha energia mínima de E_B , isso porque, segundo o famoso físico A. Einstein (quem descobriu este fenômeno em 1905, conferindo-o o Nobel de Física em 1921), um fóton não pode doar somente parte de sua energia ao elétron para que este efeito ocorra, de modo que se dois fótons cujas energias individuais sejam menores que E_B atinjam o elétron, mesmo que a soma de suas energias seja maior que E_B , só um deles irá interagir efetivamente com o elétron, sendo incapaz de removê-lo do material desta maneira. Vale ressaltar que o momento é conservado a partir do recuo (mesmo que desprezível na maioria dos casos) do material alvo, de modo que este processo não pode ocorrer com um elétron livre (Feynman et al., 2006).

A probabilidade na qual o efeito fotoelétrico ocorre não pode ser descrita por uma equação analítica para todos os materiais e faixas de energia, contudo há uma aproximação que pode ser usada,

$$P_{EF} \cong A \cdot \frac{Z^n}{E^{3,5}} \quad (2)$$

onde E é a energia do fóton incidente, Z é o número atômico do material alvo, n varia entre 4 e 5 e A é uma constante (Knoll, 2000). Portanto, quanto maior for a energia dos fótons incidentes e menor for o número atômico do alvo, menores serão as chances de se verificar esta interação, e vice-versa. Esta é considerada a reação mais provável para fótons de energias de até 100keV. Levando as equações 1 e 2 em consideração, nota-se

que para que haja efeito fotoelétrico o fóton incidente precisa ter energia superior à E_B (1), ao passo que conforme a energia aumenta, a probabilidade de ocorrência diminui rapidamente (2), portanto a maior probabilidade é verificada quando a energia do fóton é exatamente a função trabalho, E_B .

Ao observar o comportamento da interação destes fótons com a matéria percebe-se que, a baixas energias, descontinuidades na curva da seção de choque (que se relaciona com a probabilidade de ocorrência da reação) aparecem na faixa que corresponde às energias de ligação dos elétrons das diversas camadas do átomo alvo (Figura 2). O pico máximo corresponde à energia de ligação da camada eletrônica K. Para energias levemente maiores que a do pico, a energia do fóton é ligeiramente suficiente para que haja a emissão de um fotoelétron da camada K do átomo. Como para energias inferiores a esta o processo não é mais possível, verifica-se uma abrupta queda para valores imediatamente inferiores ao que corresponde ao pico (Knoll, 2000).

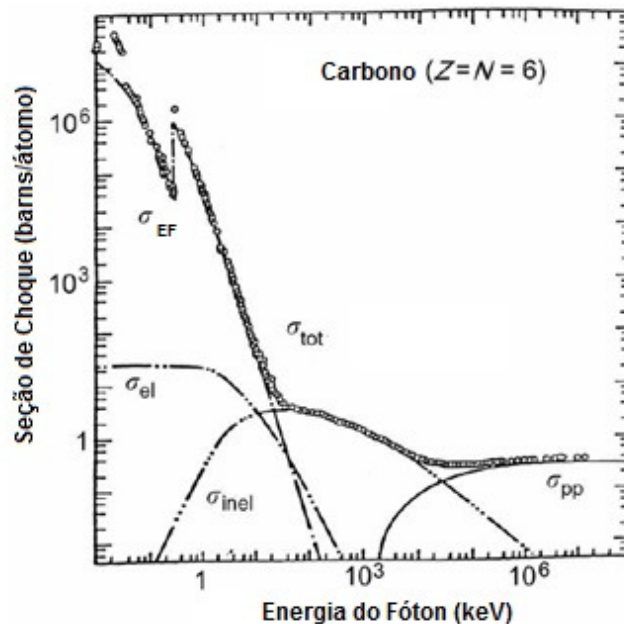


Figura 2–Dependência em energia das diversas interações dos fótons com o Carbono-12. (Adaptado: *International Tables of Crystallography, Vol. C*).

O efeito Compton (ou espalhamento Compton) se dá quando um fóton, ao interagir com um material, interage com um elétron livre do mesmo (uma vez que apesar de preso, elétrons em camadas mais externas da eletrosfera de átomos de número atômico relativamente alto se comportam aproximadamente como elétrons livres),

fazendo com que o fóton emergente tenha sua energia reduzida, e a diferença entre a energia deste com a que tinha antes da colisão, é transferida para o elétron.

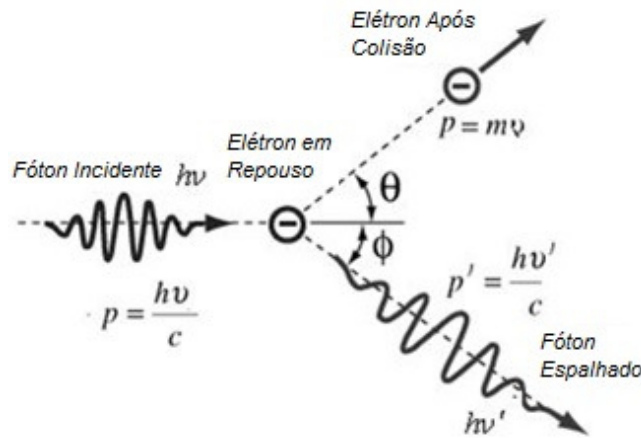


Figura 3 –Efeito Compton, p é o momento inicial do fóton, p' o momento final e p_0 o momento do elétron após colisão (Adaptado: Amita Mourya, 2015).

A partir das equações de conservação de momento e energia relativísticas, chega-se à conhecida relação entre a energia do fóton antes, $h\nu$, e depois de sofrer o espalhamento, $h\nu'$:

$$h\nu = h\nu' \left(1 + \frac{h\nu'}{m_0c^2} (1 - \cos\theta) \right) \quad (3)$$

onde θ é o ângulo entre a trajetória inicial e final do fóton, m_0 é a massa de repouso do elétron e c é a constante de velocidade da luz no vácuo.

Esta forma de interação ocorre menos que o efeito fotoelétrico a baixas energias, como mencionado anteriormente, e a probabilidade dela ocorrer é diretamente proporcional ao número atômico, Z , do material, e costuma diminuir com o aumento da energia do fóton (Knoll, 2000), como verificado pela relação

$$P_{EC} \cong \frac{Z}{E} \quad (4)$$

Como P_{EC} decresce com E^{-1} enquanto P_{EC} diminui com $E^{-3,5}$, apesar do efeito fotoelétrico ser predominante a baixas energias, conforme a energia dos fótons incidentes na matéria sobe, aumentam as chances do efeito Compton ocorrer, uma vez que o primeiro cai muito rápido conforme a energia cresce, de modo que apesar do Compton diminuir em valores absolutos, acaba se tornando mais provável do que o efeito fotoelétrico na região de energia perto de 100kV.

3.2 – A microtomografia computadorizada

A microCT (e CT) se baseia na emissão e absorção de raios X, através da qual as projeções bidimensionais são formadas, e na reconstrução matemática destas projeções em uma imagem 3D, o volume digital representativo da amostra que foi microtomografada.

Em um sistema de microCT, raios X são gerados em um tubo de raios X, que tem tensão controlada, o que permite saber a energia máxima atingida pelo feixe quando este sai do tubo. O feixe então atravessa a amostra, seus fótons interagem com a mesma das formas descritas na seção anterior, e são posteriormente captados por um detector, que transformará os diferentes sinais recebidos em sinais digitais, possibilitando a posterior integração que resultará no objeto reconstruído digitalmente.

Como a técnica é baseada na transmissão do feixe, vale começar a discussão teórica pela lei de Beer-Lambert, que em uma dimensão é dada por:

$$I = I_0 e^{-\mu\eta} \quad (i)$$

onde I e I_0 são as intensidades do feixe, antes e depois de sofrer atenuação linear de coeficiente μ através do caminho de comprimento η . Porém, a equação (i) só é válida para feixes monoenergéticos, o que não é o que ocorre para raios X de tubos usados em sistemas de microCT, que são convencionalmente policromáticos. Para este feixe, conforme a energia do feixe decresce, o coeficiente de atenuação também diminui, isso porque no feixe existem fótons menos energéticos que podem ser absorvidos no material, mas também tem fótons mais energéticos capazes de maior penetração, inclusive transmissão.

As amostras, no geral, costumam ser heterogêneas, i.e. não terão apenas um coeficiente de atenuação. A lei de Beer-Lambert para materiais compostos (mais de um coeficiente de atenuação na amostra) pode ser reescrita considerando, por exemplo, $\Delta\eta$, o segmento atravessado cujo coeficiente de atenuação é μ_i , onde existem $i = 1, 2, \dots, N$ materiais distintos na amostra. Ademais, considerando $\Delta\eta$ pequeno o suficiente, pode-se considerá-los como associados a um material homogêneo, permitindo que seja reescrita a eq. (i) para cada elemento.

$$I = I_0 (e^{-\mu_1\Delta\eta} e^{-\mu_2\Delta\eta} \dots e^{-\mu_N\Delta\eta}) \quad (ii)$$

Logo,

$$I = I_0 e^{-(\mu_1 \Delta\eta + \mu_2 \Delta\eta + \dots + \mu_N \Delta\eta)} \quad (\text{iii})$$

Se $\Delta\eta$ for infinitesimal, pode-se realizar a soma através de uma integração, tomando μ como uma função de η , $\mu(\eta)$, resultando em:

$$I = I_0 e^{-\int \mu(\eta) d\eta} = e^{-\ln(\frac{I_0}{I})} = e^P \rightarrow P = \ln(\frac{I_0}{I}) \quad (\text{iv})$$

Onde P é a projeção radiográfica obtida. A partir de (iv), tem-se que P é a integral de linha do coeficiente de atenuação linear ao longo do caminho percorrido pelo feixe, e pode ser calculada a partir do logaritmo natural da razão entre a intensidade do feixe atenuado pelo e que incide no material, sendo a energia incidente em um dos segmentos correspondente à exata energia que atravessou o segmento anterior, como na Figura 4-a (Teles, 2016, Bushberg et al., 2002).

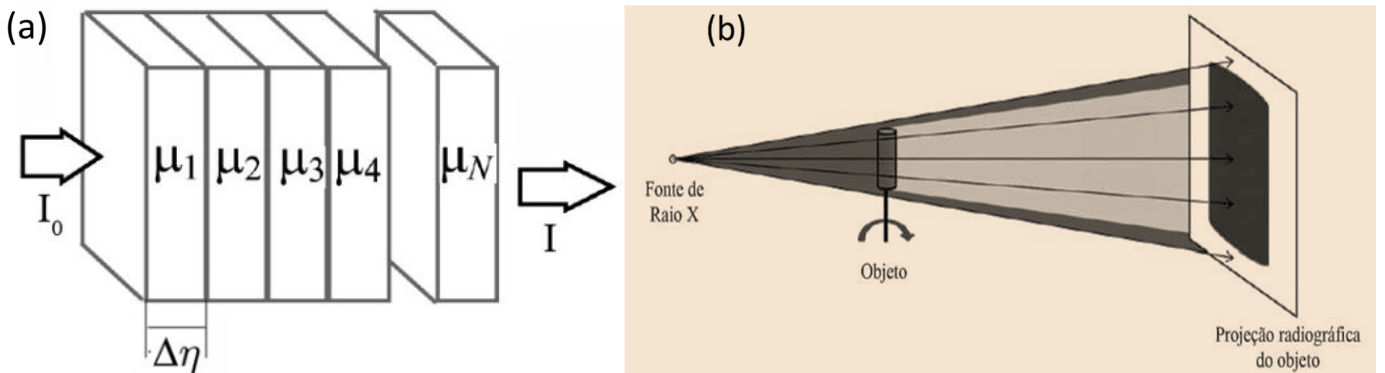


Figura 4– Ilustração da atenuação sofrida pelo feixe ao atravessar os N segmentos, de diferentes coeficientes de atenuação μ , infinitesimais $\Delta\eta$ do material, (a); e (b) a projeção radiográfica de um objeto tridimensional (Fonte: Teles, 2016).

A Figura 4-b ilustra a produção de uma projeção radiográfica, bidimensional. Em uma aplicação da técnica, são efetuadas diversas aquisições de projeções bidimensionais. Tais projeções possibilitam a reconstrução do volume, de modo que quanto maior o número de projeções, maior será a quantidade de informações obtidas pelo sistema, possibilitando, a princípio, reconstruir com maior sucesso o objeto. Assim, quanto menor o passo angular, menos informação é perdida e, em geral, melhor será a representação tridimensional atingida.

O algoritmo usado para as reconstruções neste trabalho foi o de Feldkamp, que é do tipo de retroprojeção filtrada (RPF), e é amplamente usado no processo de reconstrução de imagens em sistemas de tomografia de feixe cônico (Feldkamp et al., 1984). Seu funcionamento, no entanto, foge do escopo deste trabalho, mas uma explicação detalhada pode ser encontrada em (Kalender et al., 2011).

3.2.1 – Tubo de raios X

Os tubos de raios X podem ser de dois tipos em aplicações de microCT: de transmissão e direcional. O último é de principal interesse aqui, uma vez que foi o tipo usado neste estudo, e seu esquema geral é mostrado na Figura 5-b.

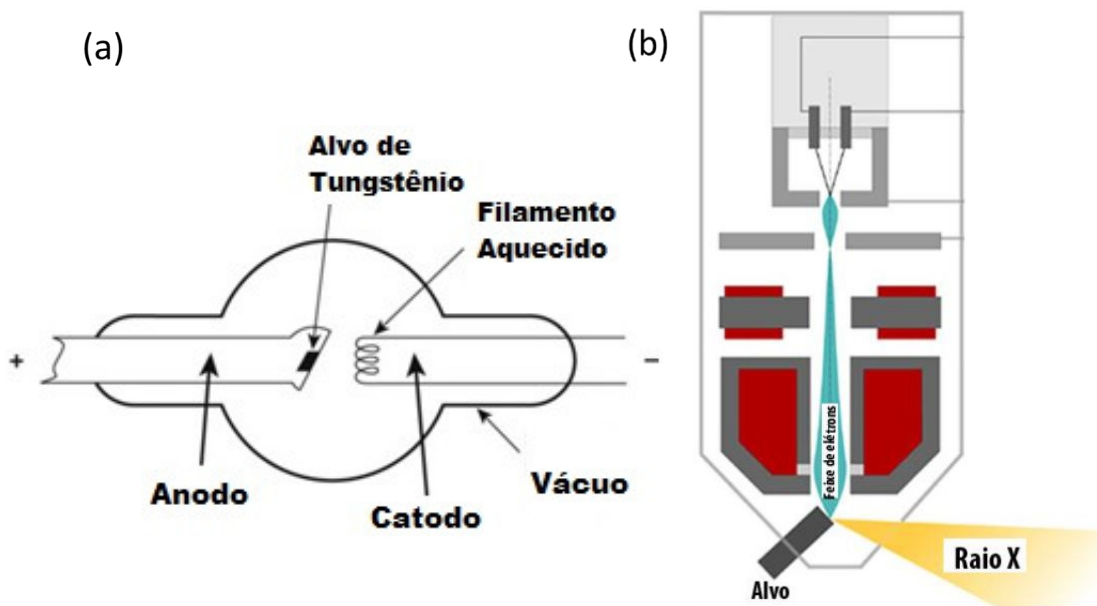


Figura 5–Funcionamento de um tubo de raio X. Ilustração reduzida, que possibilita melhor visualização do funcionamento principal (a) e esquema geral (b) de um tubo de raio X do tipo direcional.

Em um tubo de raios X, os componentes essenciais presentes na câmara são: catodo, o filamento aquecido e o anodo (alvo), como na Figura 5-a. Aos filamentos do catodo é aplicada uma corrente, que aquece os filamentos fazendo com que elétrons sejam desprendidos do material por reação termiônica. Uma vez soltos, os elétrons são então acelerados em direção ao alvo pelo campo elétrico gerado devido à diferença de potencial aplicada ao sistema. Há, também, a atuação de lentes magnéticas cuja função é manter o direcionamento do feixe de elétrons de modo que este avance em direção ao alvo sem colidir com as paredes internas do tubo. A intensidade do feixe de elétrons é controlada por quão aquecido está o filamento, de forma que no geral quanto maior for a temperatura dos filamentos, maior será a quantidade de elétrons desprendidos termionicamente destes. Na colisão com o alvo, os elétrons são completamente desacelerados, perdendo completamente sua energia cinética, que é transferida em parte para o alvo, e o restante é convertida em ondas eletromagnéticas na forma de raios X.

O sistema da Figura 5-a é revestido por material capaz de conter toda radiação que sai do tubo – comumente chumbo (Pb, $Z = 82$) –, e todo sistema interno é mantido a vácuo, garantindo que o feixe de elétrons não interaja com outras partículas além das do anodo.

O tubo direcional (Figura 5-b) possui um alvo de metal massivo. Sendo um alvo de maior área, o calor é dissipado de modo mais eficiente do que no tubo de transmissão, o que permite um maior fluxo de elétrons mais energéticos incidindo no alvo. Vale ressaltar que para otimização do processo de geração de raios X, o material do anodo deve ser tal que seja facilitada a condução térmica, melhorando a dissipação do calor absorvido ao colidir com os elétrons, e também deve ter número atômico alto – e, conseqüentemente, maior número de elétrons em sua órbita. O tungstênio (W, $Z = 74$) é comumente usado por ser um metal que possui tais características (Teles, 2016; Buzug, 2008).

Como mencionado anteriormente, elétrons energéticos podem, ao colidir com um alvo, interagir tanto com elétrons quanto com núcleos do material do alvo. Devido à alta carga negativa dos elétrons presentes no metal do anodo, as chances de que um elétron do feixe interaja diretamente com um núcleo é pequena, mas existe. Nessas ocasiões é que o fóton de raios X emitido terá energia máxima. Lembrando que um eLetronvolt é a energia que um elétron adquire ao ser sujeito à diferença de potencial de

1 Volt, o elétron acelerado pelo potencial no tubo adquire rapidamente a energia diretamente proporcional àquela tensão (eg. se a tensão é de 50kV, o elétron ganhará energia cinética chegando a 50keV). Assim, verifica-se um espectro contínuo de energia dos raios X emitidos, que está associado às perdas de energia que ocorrem quando os elétrons são desacelerados pela repulsão coulombiana proveniente da eletrosfera dos átomos do alvo, contudo também são gerados fótons cuja energia é a energia máxima (equivalente à tensão aplicada). Estes últimos são oriundos da interação dos elétrons com núcleos do material.

3.2.2 – Detectores

Após sofrerem atenuação ao atravessar a amostra, os fótons de raios X são parados nos detectores, onde interagem através de algum dos efeitos supracitados. Esta energia depositada, por sua vez, deveria idealmente gerar um sinal sem perdas de informação, o que não ocorre na prática. No geral, a eficiência de um detector é determinada basicamente por dois fatores: a eficiência geométrica - também chamada de *fill factor*, que é definido como a razão da área sensível à luz de um pixel por sua área total ou, tomando todo o detector, como a área sensível do detector pela área total do mesmo -; e a eficiência quântica - ou eficiência de captura, que está relacionada à fração de fótons que efetivamente contribuem para o sinal (Battiato et al., 2010; Burzug, 2011).

Em sistemas de microCT é comum o uso de detectores *flat panel* com funcionamento baseado em detectores cintiladores. Detectores cintiladores consistem em basicamente duas principais componentes: o meio cintilador e o detector de fótons. Primeiramente, uma onda eletromagnética de comprimento de onda pequeno (como os raios X), ao entrar no detector, é convertida em uma onda eletromagnética de comprimento de onda maior (luz visível) dentro do material cintilador. Através do efeito fotoelétrico, um fóton de raio x, ao interagir com o material do detector, gera um fotoeltron que perde sua energia interagindo com elétrons dos átomos, excitando-os, no interior do cintilador. Ao voltar ao seu estado fundamental, são emitidos fótons no espectro da luz visível. Tais fótons podem se propagar em qualquer direção, de modo que para que seja garantido o direcionamento deles aos fotodiodos na base do detector, o cintilador é revestido por material altamente refletivo.

Materiais tipicamente usados são o iodeto de céσιο (CsI), germanato de bismuto (BGO) e o tungstato de cádmio (CdWO₄). A escolha do material é de suma importância, e dependerá do que se espera obter no que se refere à eficiência quântica para a conversão de raios x para luz visível e na constante temporal do processo de conversão, que determina o efeito de *afterglow* do detector - ou brilho remanescente (Buzug, 2011; Teles, 2016).

3.3 – Imagem digital

A imagem digital bidimensional pode ser definida como uma função de duas variáveis (eg. x e y), cujos valores em cada coordenada (x,y) são as amplitudes desta função, representando o nível de cinza da imagem naquele ponto. Em uma imagem digital, tem-se uma matriz composta por pixels, sendo o pixel o menor elemento que compõe a imagem, e cada um deles carrega uma informação numérica referente a um tom de cinza (no vltomelx m, sistema usado neste trabalho, o nível de cinza assumido pelo pixel pode ser qualquer valor no intervalo $[0, 2^{14}-1]$). A imagem digital é armazenada através de dígitos binários, denominados bits, que podem assumir valores 0 ou 1, e um conjunto de bits é denominado byte, de modo que na imagem digital os pixels são representados por bytes. Dependendo de quantos bits tem a imagem, menor ou maior será a capacidade de diferenciação, em escala de cinza, que ela tem. Na Figura 6 estão representadas as relações entre os níveis de cinza, valores de pixel e bytes (Machado et al., 2015; Oliveira, 2010).

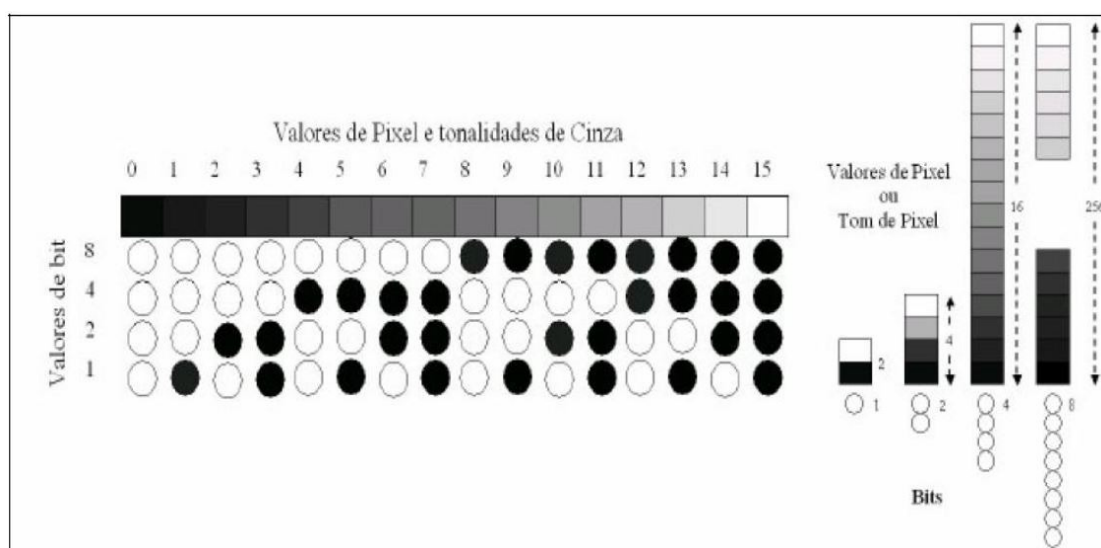


Figura 6 – Relações entre valores pixels, bits e tonalidades de cinza para o caso de 1 a 8 bits (Oliveira, 2010).

O mesmo princípio se aplica às imagens tridimensionais. Com a introdução de mais uma coordenada, torna-se possível a discretização de cada ponto através de uma função $f(x,y,z)$, sendo portanto a imagem 3D representada por uma série de imagens (ou cortes) 2D (Landis et al., 2010; Machado et al., 2015). Se no caso bidimensional o pixel, um objeto quadrado, é a menor célula em uma matriz 2D, no caso tridimensional o menor objeto na imagem é denominado voxel.

3.4 – Desempenho de Sistemas de MicroCT

Nesta seção é realizada uma breve discussão sobre os principais tópicos que impactam na limitação que um sistema de microCT possui em sua capacidade de produzir imagens que representem a amostra, ou seja, quão próximas da realidade estão as medidas. São eles o tamanho focal do tubo, nível de ruído e a magnificação.

3.4.1 – Tamanho Focal

A forma e o tamanho do foco de um sistema de microCT são fatores de grande relevância na qualidade da imagem gerada. Quanto menor o tamanho focal, menor é o efeito de penumbra, o que ajudará a produzir projeções 2D melhores. Um tamanho focal grande significa que os fótons que estão atingindo um dado pixel podem ser associados a raios X advindos de diferentes caminhos de transmissão através da amostra. Isso pode ser uma fonte expressiva de ruído na imagem reconstruída. Por esta razão, sistemas de microCT modernos usam tamanho focal de apenas alguns micrômetros ou menores.

O ponto focal é dado pela geometria do feixe de raios X no tubo, em particular pela orientação da superfície do anodo – ou seja, do ângulo que o feixe de elétrons faz com o alvo. Idealmente, o anodo seria disposto de modo que os elétrons colidissem em um único ponto, porém quanto maior o fluxo de elétrons (e maior a energia destes) em uma dada parte do alvo, maior é a temperatura nela e, com isso, mais difícil se torna a dissipação de calor, necessária para que não haja perda de informação e, especialmente, dano ao sistema por superaquecimento do alvo. Por isso, uma angulação é necessária no anodo, de modo que o tamanho de ponto focal ótico tem uma relação com o seno do ângulo que o anodo faz com o feixe de elétrons, como observado na Figura 7.

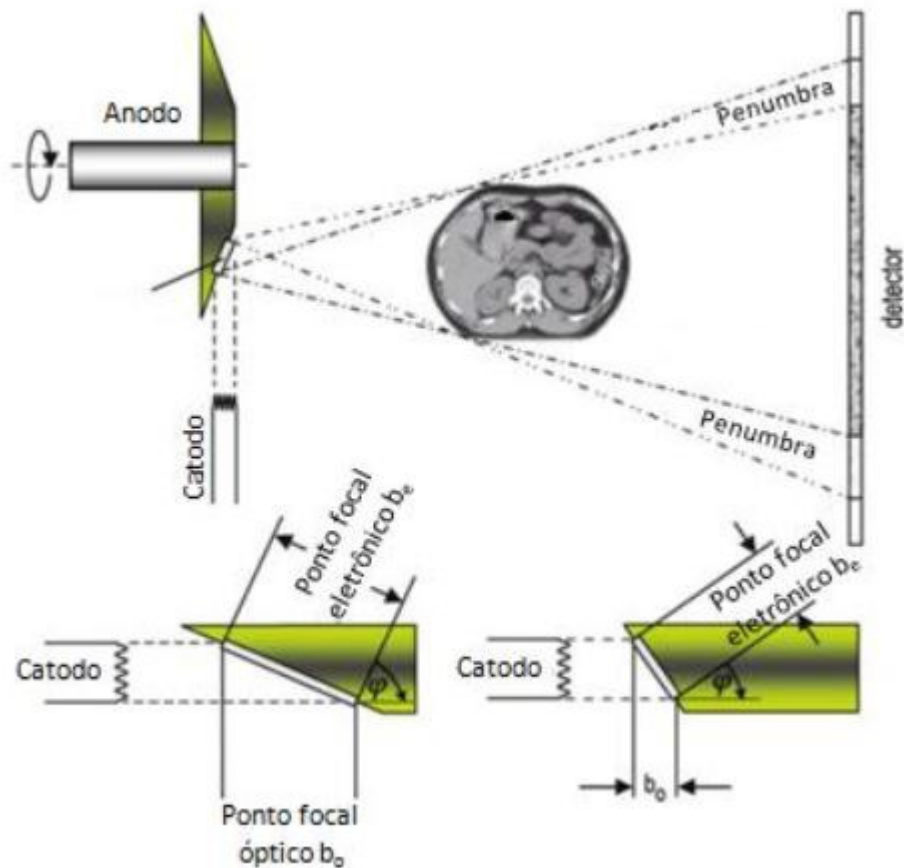


Figura 7 – Representação da formação do tamanho focal e a penumbra associada. Ponto focal óptico é definido pelo seno do ângulo que a superfície do anodo faz com a trajetória do feixe de elétrons (adaptado de Buzug, 2008).

A Figura 7 mostra também a relação do ponto focal óptico, do feixe de raios X, e o ponto focal eletrônico, que é a área do alvo na qual os elétrons colidem. É possível notar que em ambos esquemas o feixe de elétrons tem o mesmo tamanho, porém devido à diferença do ponto focal eletrônico nota-se que o ponto focal óptico no sistema da esquerda é maior que da direita, logo este último apresentará menor efeito de penumbra na imagem, mas também terá maior limitação quanto à potência com relação ao da esquerda, já que o ponto focal eletrônico é menor, o que resultará em menor capacidade de dissipação de calor (Buzug, 2008; Teles, 2016; dos Santos, 2017).

3.4.2 – Magnificação

Ao aproximar o objeto do ponto focal, tem-se a magnificação do mesmo. A Figura 8 mostra as relações geométricas gerais presentes em um sistema de microCT de feixe cônico. Para simplificação, a amostra possui simetria cilíndrica.

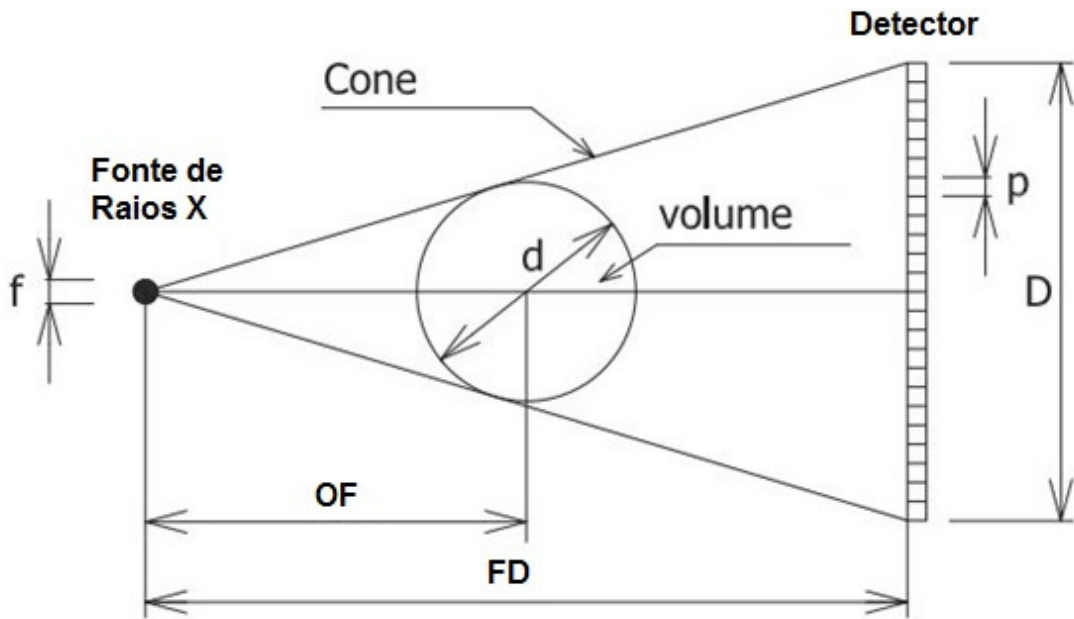


Figura 8 – Relações geométricas entre a fonte, amostra, imagem e o feixe cônico (adaptado de Müller, 2015).

A partir da Figura 8, pode-se notar que objeto (O), de diâmetro d , foi magnificada de modo que a imagem gerada no plano do detector (D) tem diâmetro D , sendo $D > d$. Por definição, a magnificação M é dada por:

$$M = \frac{FO+OD}{FO} = \frac{FD}{FO} \quad (5)$$

onde FO é a distância da fonte ao objeto; OD é a distância entre o objeto e o detector e FD é a distância da fonte ao detector.

O efeito de penumbra, no entanto, também aumenta com a aproximação do objeto à fonte, como ilustrado na Figura 9. A relação entre a magnificação e a penumbra, U_g , é dada por:

$$U_g = \frac{OD}{FD-OD} \cdot F \quad (6)$$

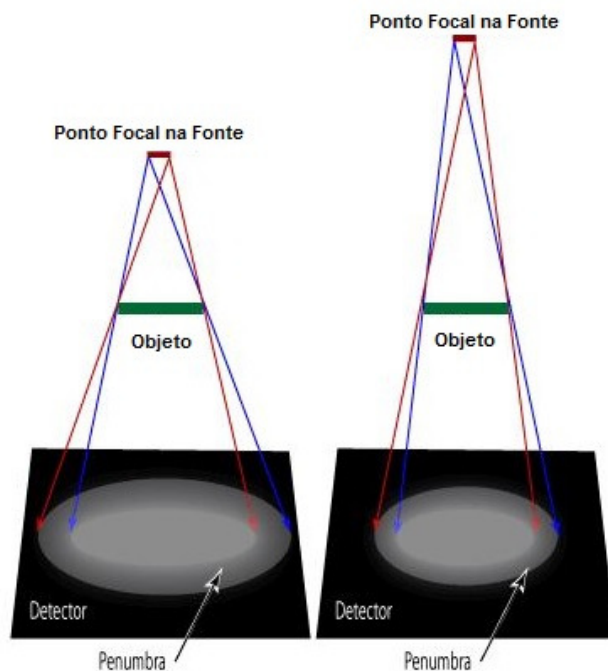


Figura 9 – Efeitos de penumbra provocados pelo mesmo objeto, verifica-se a diferença conforme aproximação da fonte (Adaptado de NDT Education Resource Center, 2012).

A partir da definição 5, 6 pode ser reescrita como:

$$Ug = F(M - 1) \quad (7)$$

Verifica-se, a partir da equação 7, que a penumbra aumenta conforme o ponto focal F e a magnificação aumentam. No entanto, na microCT é comum, como já mencionado, o uso de um tamanho focal da ordem de micrômetros. Desta forma, o acréscimo da magnificação torna-se geralmente desejável, uma vez que uma magnificação na ordem de dezenas já pode ser relacionada à uma imagem de baixa penumbra.

3.4.3 – Relação Sinal - Ruído

São diversas as fontes de ruídos em um sistema de microCT, que impactam negativamente nas imagens obtidas, onde por ruído entende-se qualquer sinal indesejado que degrade a imagem. Antes de chegar à formulação de uma relação sinal ruído, SNR (*Signal to Noise Ratio*, em inglês), faz-se necessário uma explicação de algumas destas fontes de ruídos inerentes à técnica.

Em última instância, a interação que permite a geração de imagens é de natureza quântica, isto porque o sinal gerado é baseado na produção de fótons, como mencionado anteriormente. Devido à natureza probabilística da física quântica, torna-se impossível fazer previsões determinísticas acerca das medidas que são realizadas pelo sistema (i.e. não se pode assumir que, para um dado pixel, duas observações independentes consecutivas, de duração T , retornarão a mesma contagem de fótons). A distribuição de probabilidade para p fótons em um intervalo observacional de T segundos é dada por:

$$P(p|\rho, T) = \frac{(\rho T)^p e^{-\rho T}}{p!} \quad (8)$$

Onde ρ é a intensidade, medida em fótons por segundo. Como consequência, mesmo que todas outras fontes de ruído fossem eliminadas, esta ainda restaria, mesmo nas melhores condições laboratoriais.

Há ainda uma outra fonte de ruído cuja natureza é aleatória, mas esta envolve os elétrons livres oriundos do aquecimento do detector. Tais elétrons, sujeitos à vibrações térmicas, se desprendem e podem posteriormente ser capturados pelo sistema de detecção, sendo indistinguíveis dos fotoelétrons provenientes da interação do feixe em si. Este tipo de ruído pode ser consideravelmente diminuído através da refrigeração do sistema, e a distribuição de probabilidade de ocorrência destes elétrons térmicos também segue a equação (8), sendo neste caso a taxa uma função crescente da temperatura (Young et al., 1995).

Durante todo o processo de aquisição da imagem, há a presença de ruído eletrônico, apesar de ocorrer em maior intensidade na leitura do sinal a partir dos sensores, e afeta significativamente o desempenho do sistema como um todo. No entanto, através do uso de taxas apropriadas de leitura de informação pelo sensor é possível reduzi-lo (Teles, 2015).

É possível mensurar o quanto a imagem é influenciada pela presença destes sinais indesejados. Tal medida é realizada comparando o nível de ruído com a intensidade do sinal através do cálculo da relação sinal-ruído, como a seguir:

$$SNR = \frac{S}{\sigma} \quad (9)$$

sendo S o valor do sinal e σ o do ruído. Quanto maior o valor desta razão, portanto, melhor a qualidade da imagem. Em uma imagem digital, pode-se tomar S como o valor médio do sinal em uma dada região, enquanto σ é o desvio padrão do sinal nesta mesma região. As equações que representam o valor do sinal e do ruído em uma imagem digital são, respectivamente:

$$S = \frac{\sum_{x=1}^m \sum_{y=1}^n s_{i,j}}{m.n} = \bar{s} \quad (10)$$

$$\sigma = \frac{\sum_{x=1}^m \sum_{y=1}^n (s_{i,j} - \bar{s})^2}{m.n} \quad (11)$$

onde m e n são os números de pixels nas direções x e y da região da imagem, respectivamente, usada para definir a SNR , ao passo que $s_{i,j}$ são os valores da intensidade do sinal no i,j -ésimo pixel (Teles, 2016).

3.5–Análise de dados

3.5.1 – Processamento

O interesse em métodos de processamento de imagens digitais decorre de duas áreas principais de aplicação: melhoria de informação visual para a interpretação humana e o processamento de dados para percepção automática. Serão descritos a seguir os passos do processamento de imagem, baseado em (GONZALEZ e WOODS, 2000) que ilustraram, através de um diagrama, os diversos passos e caminhos presentes no processamento de imagem, Figura 10.

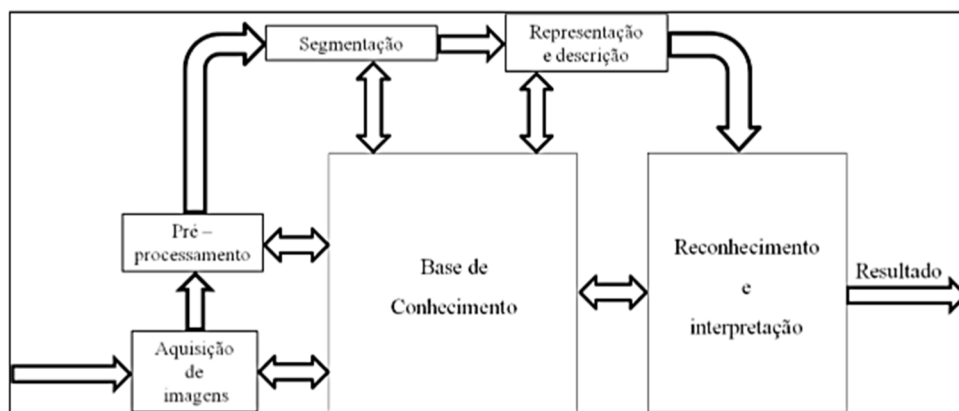


Figura 10 – Diagrama da sequência dos passos de processamento de imagem (GONZALEZ e WOODS, 2000).

Na etapa de pré-processamento da imagem, tenta-se melhorar a esta, realizando procedimentos como, por exemplo, a remoção de ruído, realce de contraste por manipulação do histograma de níveis de cinza e uso de cores. Após o pré-processamento, dá-se a segmentação, discutida a seguir.

3.5.2 – Segmentação de imagem

Em geral, a segmentação é uma das tarefas mais difíceis no processamento de imagens digitais. O dado de saída da segmentação é em forma de pixels, o que corresponde tanto a fronteira de uma região como a todos os pontos dentro da mesma. É necessário converter os dados de forma adequada ao processamento computacional. Primeiramente deve-se decidir qual será a representação dos dados, fronteira ou regiões completas. A representação por fronteira é adequada em situações onde o interesse é nas características da forma externa, como cantos e inflexões, já a representação por regiões é adequada para propriedades internas, como textura ou a forma do esqueleto. Em algumas aplicações essas representações coexistem (GONZALEZ e WOODS, 2000).

3.5.3 – Limiarização (*Thresholding*)

No processamento de imagem, a limiarização é uma das mais importantes abordagens para a segmentação de imagens (GONZALEZ e WOODS, 2000). Nessa etapa é escolhido um valor de limiar que separa duas regiões, usualmente conhecido como *Threshold* (TH). A limiarização é uma forma de extrair objetos de interesse através da análise de similaridade dos níveis de cinza da imagem e da escolha de um nível que separa os grupos de tons de cinza (Sales et al., 2010). A escolha do nível de threshold tem uma enorme influência nos cálculos dos parâmetros morfológicos possíveis de serem calculados através da microCT como, por exemplo, a porosidade e volume total (Hara et al., 2002).

A seguir serão apresentados dois métodos de limiarização. O primeiro, e mais comum, o método visual, ou global. E o segundo, o método de Otsu, que também foi usado nesse estudo.

3.5.3.1 - Método de Segmentação Visual

Muitos pesquisadores ainda buscam um método que padronize a escolha de um TH ótimo para realizar a binarização das imagens que são usadas na quantificação. Entretanto, até o presente momento não existe nenhuma técnica padrão para tal escolha. O método mais usado ainda hoje é o método Global, em que o operador varia o valor do TH e compara com a imagem original em escala de cinza até encontrar o valor considerado por ele satisfatório. Entretanto, esse método não é muito preciso devido tanto à liberdade quanto à subjetividade do operador na escolha do TH, podendo obter valores super ou subestimados (dos Santos, 2017).

Uma proposta de melhoria no método foi a definição de um TH mínimo e um TH máximo, escolhido pelo operador, de forma que quando comparado com a imagem original em escalas de cinza não ocorra grandes alterações. Avaliadas essas condições o valor médio do TH pode ser considerado o TH que otimiza o process (Sales et al., 2010).

3.5.3.2 - Método de Segmentação de Otsu

O método de Otsu é um método automático de limiarização de histograma e segmentação de imagens. Sendo um método automático, atua através de um algoritmo, não havendo participação do usuário neste processo. Tal algoritmo, inventado por Nobuyuki Otsu, em 1979, parte do pressuposto de que a imagem consiste apenas em objeto e fundo, correspondendo a branco e preto, respectivamente, após a binarização. A heterogeneidade e diversidade do fundo são ignorados (Yousefi, 2015).

O método pertence à categoria de métodos baseados na classificação, isto é, o preto e o branco na imagem são consideradas as duas classes existentes na imagem. Aqui, a variância associada ao nível de cinza (no histograma) na imagem, é separada em dois tipos de variâncias: a variância intragrupo, associada à variância dos níveis de cinza dentro de cada classe; e a variância entre as classes, relacionada com o quanto as duas classes, preto e branco, serão separadas. Baseado nessas classificações, Otsu propôs que a limiarização fosse feita de modo a minimizar a variância entre as classes, fazendo a soma ponderada das variâncias das duas classes. Efetivamente, pela sua limiarização a diferença entre dois níveis de cinza adjacentes seria maximizada de modo a separar com

máxima precisão estes níveis próximos. Com isso, a variância entre as classes de níveis de cinza adjacentes seria maximizada e, assim, seria dada a binarização da imagem, classificando pixels como pretos ou brancos. A seguir é feita uma breve discussão de como funciona o algoritmo.

Considerando que uma dada imagem é representada em L níveis de cinza $[1, 2, \dots, L]$, o número de pixels em um dado nível i é denotado por n_i , e o número total de pixels N é dado pela soma $N = n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_L$. A distribuição de probabilidade pode ser escrita como

$$p_i = \frac{n_i}{N} \quad (12)$$

onde p_i tem as propriedades: $p_i \geq 0$ e $\sum_{i=1}^L p_i = 1$

Neste método, o pixel é dividido em duas classes, C_0 e C_1 – fundo (preto) e objeto (branco) ou vice-versa –, por um threshold em um nível k . C_0 representa os pixels nos níveis $[1, \dots, k]$, enquanto C_1 os pixels nos níveis $[k+1, \dots, L]$. Sendo w_0 a probabilidade que C_0 ocorra e w_1 a de que C_1 ocorra, as probabilidades que cada classe tem de ocorrer podem agora ser determinadas a partir das relações:

$$w_0 = \sum_{i=1}^k p_i = w(k) \quad (13)$$

e

$$w_1 = \sum_{i=k+1}^L p_i = 1 - w(k) \quad (14)$$

A variável desse problema será então o valor k do tom de cinza que melhor separa essas classes. Sendo assim, o valor médio da classe C_0 e C_1 é dado por, respectivamente:

$$\mu_0 = \sum_{i=1}^k \frac{i p_i}{w_0} = \frac{\mu(k)}{w(k)} \quad (15)$$

$$\mu_1 = \sum_{i=k+1}^L \frac{ip_i}{w_1} = \frac{\mu_T - \mu(k)}{1 - w(k)} \quad (16)$$

A princípio parece um tanto estranho dividir uma probabilidade normalizada pelo valor da primeira classe, contudo a distribuição de probabilidade está normalizada para todo o intervalo de tons de cinza, e não para cada classe individualmente. Assim, é necessário introduzir um fator de peso associado a cada classe. Dessa forma, a média total da imagem original é dada por:

$$\mu_T = \mu_0 w_0 + \mu_1 w_1 \quad (17)$$

O valor da média da classe μ_1 pode ser encontrado substituindo os valores da classe μ_0 em termos de $w(k)$. E por analogia a tudo que se tem feito até aqui, existirão também as variâncias associadas a cada classe, isto é:

$$\sigma_0^2 = \sum_{i=1}^k (i - \mu_0)^2 p_i / w_0 \quad (18)$$

$$\sigma_1^2 = \sum_{i=k+1}^L (i - \mu_1)^2 p_i / w_1 \quad (19)$$

Pela análise de discriminantes, tem-se com isso dois novos tipos de variâncias: a variância dentro das classes (σ_ω) e a entre classes (σ_B), definidas como:

$$\sigma_\omega^2 = w_0 \sigma_0^2 + w_1 \sigma_1^2 \quad (20)$$

$$\begin{aligned} \sigma_B^2 &= w_0 (\mu_0 - \mu_T)^2 + w_1 (\mu_1 - \mu_T)^2 \\ &= w_0 w_1 (\mu_1 - \mu_0)^2 \end{aligned} \quad (21)$$

Onde a variância total é expressa como:

$$\sigma_T^2 = \sigma_\omega^2 + \sigma_B^2$$

(22)

Deste modo, o problema do método de Otsu se resume em maximizar a variância σ_B^2 (Goh et al., 2017).

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão discutidas as etapas associadas aos aspectos metodológicos adotados neste trabalho. Inicialmente, uma breve descrição da parte anterior à aquisição das imagens. Na segunda parte é comentado o uso dos programas, que vão desde as aquisições aos resultados das análises.

4.1 – Equipamento

Nesta seção será descrito o equipamento usado na realização das microtomografias, o vltomelx m, desenvolvido pela General Electric (*GE Sensing & Inspection Technologies GmbH*, Wunstorf, Alemanha, Figura 11). O tomógrafo possui dois tubos de raios X: um de alta potência e microfoco, que foi o utilizado neste trabalho, com alvo direcional que pode chegar até 300 kVp a 500 W e; um tubo de nanofoco de raios X, com alvo de transmissão que pode chegar até 180 kVp a 15 W.

A confecção das imagens é realizada por um feixe cônico, proporcionando uma magnificação geométrica no detector, que é definida de acordo com as relações mencionadas anteriormente. O menor tamanho de pixel efetivo de imagem alcançável no sistema com o uso do tubo de microfoco é de cerca de 2 μm , enquanto para o tubo nanofocal é menor que 1 μm . Aqui o tamanho de pixel é puramente determinado pela geometria. O tubo de microfoco consegue detectar detalhes menores que um micrômetro em tamanho, onde o detalhe detectável é o menor objeto que ainda pode ser visto em uma imagem, mesmo sendo menor que o tamanho de voxel. Isso é particularmente alto para regiões da amostra em que há grande diferença de densidade em uma pequena área, de modo que se verifica alto contraste entre pixels vizinhos, e.g. no limiar entre o fim do osso do crânio e o começo da pele, ou do limite entre a pele e o vazio (ou suportes usado para manter a amostra fixa, que são sempre materiais de baixíssima densidade).



Figura 11 - Sistema de microCTPhoenix v|tome|x m da GE (General Electric).

Os dois tubos de raios X usam um filamento de tungstênio. O tubo de nanofoco possui um alvo de transmissão com espalhamento em uma janela de diamante, que permite um ponto focal consideravelmente menor, distribui calor mais eficientemente, e permite maior potência em um ponto focal menor. O menor tamanho de ponto focal no caso do tubo nanofocal é de aproximadamente $3 \mu\text{m}$, e para o tubo de microfoco é de cerca de $7 \mu\text{m}$. Isso permite que imagens de alta resolução sejam coletadas rapidamente. O sistema de refrigeração do tubo de raios X promove alta estabilidade do feixe à potências altas com feixes pequenos em tamanho. Raios X são detectados por um detector digital de temperatura estável, do tipo GE DXR250RT, com matrix de 2014×2024 , onde os pixels têm $200 \mu\text{m}$ cada (Singhal et al., 2013).

A rápida taxa de produção de quadros e tempo de leitura do detector (30 quadros por segundo) permite a visualização, uma vez acionado o feixe, de imagens ao vivo da amostra no campo de visão (*Field of View*, FOV) durante o estágio de preparo do experimento, facilitando o alinhamento da amostra, bem como permitindo verificar em tempo real o histograma na região de interesse, possibilitando uma estimativa quanto ao contraste que será alcançado naquele dado FOV (Singhal et al., 2013).

O instrumento tem uma mesa que comporta amostras robustas, com posicionamento em quatro eixos, resolução de translação de $1 \mu\text{m}$. A Figura 12 mostra a

relação linear entre a distância da amostra ao ponto focal (que pode ser considerado o maior diâmetro possível da amostra) como uma função do tamanho de voxel atingível. Além disso, a potência do tubo (produto da diferença de potencial com a corrente no filamento) para qualquer aquisição de imagem é limitada pelo tamanho de voxel efetivo, porque tanto o tubo micro quanto o nanofocal tem tamanho de ponto focal que aumenta dinamicamente com a potência.

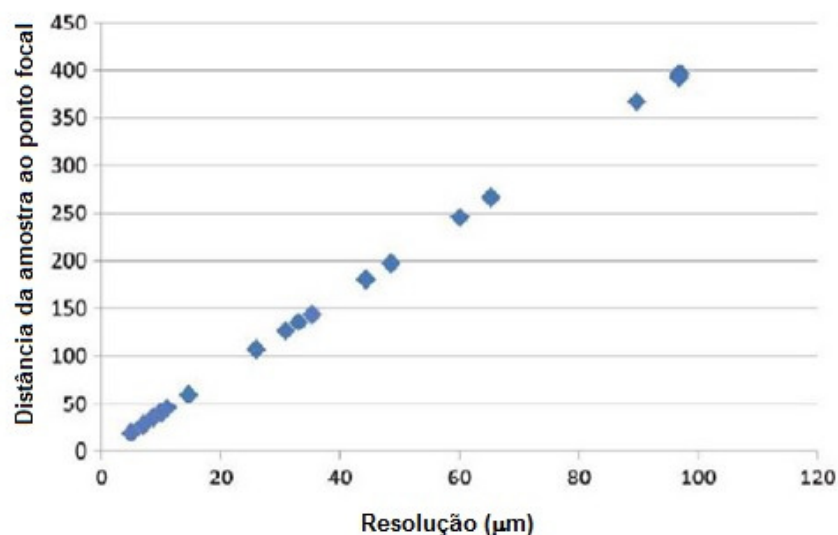


Figura 12– Gráfico de como varia a distância da amostra ao ponto focal com a resolução (Adaptado de Singhal et al., 2013).

Um ponto focal maior que o tamanho de voxel resulta em borramento da imagem de CT. Portanto, para objetos de alta densidade, menor resolução pode ser verificada como resultado se o potencial aplicado for aumentado para atingir maior poder de penetração.

A qualidade das imagens pode ser ainda melhorada ou ajustada durante a reconstrução pela aplicação de filtros matemáticos. O programa comercial da Phoenix, o Datoslx, também tem correções de endurecimento de feixe pré calibradas, bem como filtros de redução de artefato de anel. Estes filtros tem que ser usados com cautela de modo que não promovam a redução artificial da imagem.

Os volumes reconstruídos são tipicamente exportados em formato 32-bit, em .tif, e lidos no programa Volume Graphics Studio Max. Contudo, para otimização do tamanho do volume do arquivo, um volume no formato 16-bit também pode ser usado (Singhal et al., 2013).

4.2 – A Amostra (*Brachycephalus ephippium*)

Sapos do gênero *Brachycephalus* são endêmicos em áreas de Mata Atlântica em todo território nacional. São conhecidos popularmente como pingo de ouro, e habitam desde a Bahia ao Paraná (Haddad e Sazima., 1992). Foi primeiramente descrito já no primeiro quarto do século XIX pelo biólogo alemão Johann Baptist Ritter von Spix (Pombal et al., 2010), fruto de sua viagem ao Brasil em 1817. Posteriormente estudado por (Miranda-Ribeiro, 1920), que aprimorou a descrição feita pelo alemão, até que no final do século passado, (Heyer et al., 1990) refinou e modernizou a descrição desta espécie (Pombal et al., 1994).

Por ter sido o primeiro do gênero, esta espécie constituiu a base de estudos que levou à diferenciação de dezenas de novas espécies ao longo das últimas décadas. A microCT tem sido amplamente usada nessas caracterizações, o que certamente impactou o nível de detalhamento atualmente necessário para a aceitação de uma descrição específica por parte da comunidade científica (Ribeiro et al., 2015, Ribeiro et al., 2017).

Neste estudo foram utilizados três amostras de sapos, da espécie *Brachycephalus ephippium*, com comprimento do corpo (ou *snout-vent length*, SVL) de 12,81 mm a 12,99 mm, comprimento do crânio de 4,42 mm a 5,01 mm e largura craniana de 5,23 mm a 5,88 mm. Os espécimes foram encontrados em São Francisco Xavier - SP, tendo sido catalogadas com os acrônimos e identificadores SFX 015, SFX 017 e SFX 025. As amostras são preservadas imersas em álcool etílico a 70 %, tendo sido retiradas apenas durante as aquisições de imagens. Devido ao seu tamanho tão pequeno (Figura 13), é necessário extremo cuidado no manuseio das amostras durante a preparação pré-escaneamento. Para que as amostras permanecessem imóveis durante o escaneamento, foi usado molde de isopor confeccionado de modo a guardar as amostras como em um pequeno caixão. O isopor não interfere na qualidade das imagens, uma vez que não havia interesse no tecido mole, como pele e órgãos, estes sim com densidade próxima à do isopor. A densidade óssea das amostras foi facilmente destacada no histograma da imagem reconstruída, como discutido mais a frente.



Figura 13– Foto de *Brachycephalus ephippium* em seu habitat (Fonte: Diogo B. Provete, 2008).

4.3 – Parâmetros estudados

Esse estudo tem como objetivo avaliar a influência dos parâmetros de aquisição na qualidade da imagem, em relação a contraste e resolução, e, conseqüentemente, nos resultados obtidos, além de comparar os métodos de binarização usados, *Otsu* o método global. A seguir serão descritos os parâmetros morfométricos usados neste trabalho.

Para facilitar a visualização, na Tabela 1 estão listados todos os parâmetros avaliados para cada caso (tamanho de voxel e método de segmentação). Onde o 9,5 μm foi o tamanho de voxel usado como o representativo do estado da arte da aplicação da técnica usando o equipamento descrito anteriormente. Por esta razão, este foi usado como forma de comparar quão representativos são os outros tamanhos de voxel.

Tabela 1 - Tabela dos parâmetros estudados.

Tamanho de Voxel (μm)	BV (mm^2)		Tb.Th (mm)		BS (mm^2)		Tb. N (mm^{-1})	
	Global	Otsu	Global	Otsu	Global	Otsu	Global	Otsu
9,50	4,10	4,55	0,10	0,11	143,88	147,07	0,23	0,25
19,00	4,31	4,94	0,11	0,12	133,48	135,96	0,24	0,27
38,00	4,84	5,80	0,14	0,16	121,26	125,26	0,22	0,24
σ	0,38	0,64	0,02	0,03	11,32	10,90	0,01	0,02
Tamanho de Voxel (μm)	BS/BV (mm^{-1})		Tb. Sp (mm)		Tb. Pf (mm^{-1})		Obj. N	
	Global	Otsu	Global	Otsu	Global	Otsu	Global	Otsu
9,50	35,76	33,01	1,84	1,82	6,77	3,52	973,67	394,33
19,00	31,59	28,29	1,63	1,61	3,97	1,55	523,33	249,33
38,00	25,36	21,93	1,70	1,69	1,69	1,48	163,33	120,67
σ	5,24	5,56	0,11	0,10	2,55	1,16	406,00	136,91

O volume ósseo (BV, *Bone Volume*) é o volume total de objetos binarizados em um dado volume de interesse (VOI), sendo o volume 3D obtido através do uso do modelo de *Marching Cubes* (Lewiner et al., 2003) no VOI. A superfície óssea (BS, *Bone Surface*) é, analogamente, a área superficial de todos objetos sólidos dentro do VOI. A razão BS/BV (*Bone Surface / Bone Volume*).

O fator de padrão trabecular (Tb.Pf, *Trabecular Pattern Factor*) é uma medida inversa da conectividade, definida inicialmente para aplicações em ossos trabeculares por (Hahn et al., 1992). Esta quantidade é resultado do cálculo de um índice de concavidade ou convexidade relativa da superfície óssea total, levando-se em consideração que concavidade indica conectividade (nós), e convexidade indica a presença de estruturas desconectadas isoladas (hastes). Esta é uma quantidade calculada somente na análise tridimensional, e compara o volume e superfície do sólido já binarizado antes e depois da dilatação de um único voxel. A Equação 16 nos dá a definição:

$$Tb.Pf = \frac{S1 - S2}{V1 - V2} \quad (23)$$

Onde S e V representam a superfície e o volume do sólido e 1 e 2 indicam antes e depois da dilatação, respectivamente.

Tem-se como resultado disso que pequenos valores de Tb.Pf significam melhor conexão da estrutura trabecular, enquanto maiores Tb.Pf indicam maior distância entre as trabéculas.

A espessura de trabécula (Tb.Th, *Trabecular Thickness*) foi outro parâmetro avaliado na análise tridimensional das amostras. A definição da espessura local em um dado ponto no sólido foi definida por Hildebrand e Ruesgsegger, em 1997 como sendo o diâmetro da maior esfera na qual duas condições são satisfeitas: a esfera envolve o ponto - sem que o ponto esteja necessariamente no centro da esfera; e a esfera é inteiramente ligada com as superfícies sólidas. Nos resultados, o programa fornece uma distribuição de Tb.Th, na forma de um histograma de espessuras com intervalo de dois pixels, e através dessa distribuição pode-se caracterizar a forma de estruturas complexas, como os crânios analisados. A separação trabecular (Tb.Sp, *Trabecular Separation*) é definida como a espessura dos espaços, ou seja, dos vazios presentes na

imagem binarizada. Esta quantidade é medida de modo idêntico ao da Tb.Th, porém tomando vazios e não objetos sólidos.

O número trabecular (Tb.N, *Trabecular Number*), também chamado de densidade linear da estrutura, é definida por

$$Tb.N = \frac{1}{(Tb.Th + Tb.Sp)} \quad (24)$$

Qualitativamente, é definida como sendo o número de caminhos percorridos através de uma trabecula ou estrutura sólida feita por unidade de comprimento em um caminho linear aleatório no VOI (Skyscan, 2009).

4.4 – Programas Utilizados

Aqui é iniciada uma descrição do uso dos programas usados no experimento, desde o utilizado para o controle do tomógrafo na aquisição ao usado para as análises.

4.4.1 – Aquisição – Datoslx Acquisition

O programa usado no controle do equipamento é o *Datoslx acquisition*, versão 2.5.0 (GE Sensing & Inspection Technologies). Na Figura 14 está disposta a interface do programa tal qual é vista pelo usuário durante a operação do equipamento.

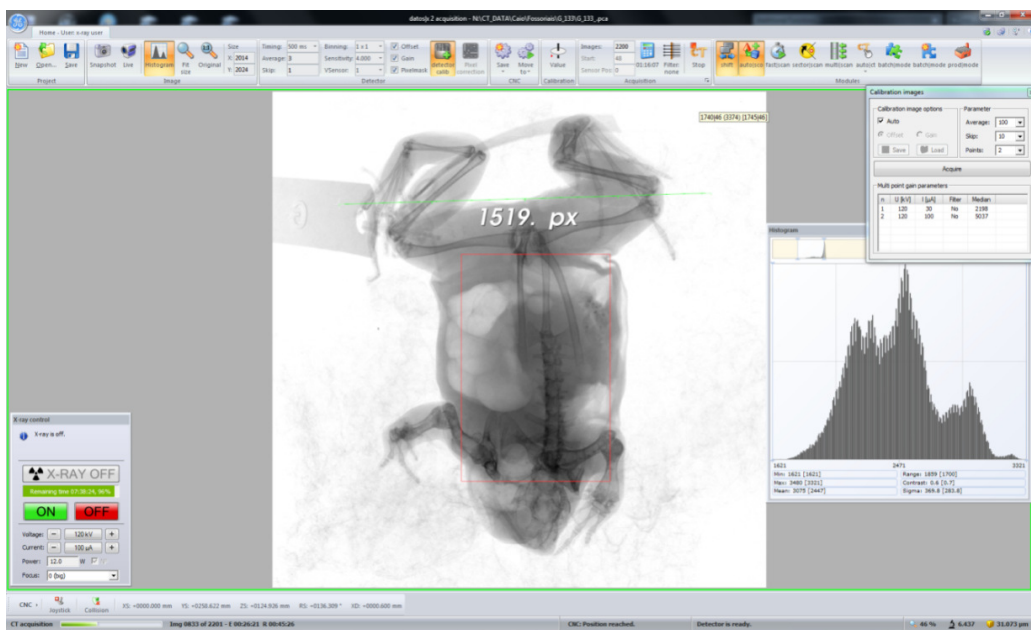


Figura 14 - Interface do Datoslx Acquisition (General Electric).

São muitas as funções imbutidas neste programa, entretanto aqui serão comentadas somente as consideradas de maior importância no processo de aquisição de imagens. Começando pelas funções associadas ao detector no canto superior esquerdo, em *Size*, na Figura 14, seleciona-se a área do detector, em pixels, que será usada durante o escaneamento (valores máximos de X e Y são 2014 e 2024, respectivamente). Isso permite reduzir a área útil do detector, fazendo o sistema desconsiderar fótons fora da área selecionada e, conseqüentemente, gerando um conjunto de imagens de tamanho menor, possibilitando economizar espaço em disco rígido sem perder qualidade da imagem.

A cada passo angular, o sistema produz um ou mais quadros, que por sua vez serão usados na formação da imagem correspondente àquele passo angular. Em *Timing*, seleciona-se o tempo de exposição – ou tempo de integração por quadro, i.e. o intervalo de tempo no qual será realizada a aquisição na formação de cada quadro (ou *frame*). A seguir, *Average* é o número de quadros dos quais será feita a média – que efetivamente significa uma integração – que resultará na imagem final de um dado passo angular. A princípio, quanto maior este número menor será o ruído, porém também maior será o tempo de aquisição. Na realidade, no entanto, existe um limiar no qual além deste o ganho pode ser considerado desprezível, de modo que deve-se, de modo geral, buscar a melhor relação entre tempo de aquisição e qualidade da imagem.

Ao fim da coluna, o *Skip* é um número que determina quantos quadros serão “pulados”, esta é uma função que preza pela amenização o efeito de *afterglow*, que é o brilho remanescente de uma aquisição – correspondente à corrente que, após a formação de um quadro, ainda persiste no detector –, e que pode acarretar erros de medida, especialmente em regiões de elevada mudança de densidade na amostra (como regiões tecido/ar e tecido/osso). Em cintiladores, a queda da luminescência não segue uma exponencial simples, podendo armazenar luminescência da ordem de 10^{-4} daquela relativa a do feixe que incidiu, levando cerca de centenas de nanossegundos para se dissipar (National Academy Press [NAP], 1996).

O *Binning* da aquisição também pode ser definido. Neste processo, pixels vizinhos são combinados de modo a formar um único pixel, maior (eg. 0 = 1x1, 1 = 2x2, 2 = 4x4). O uso desta função pode diminuir ruído e tempo de aquisição, apesar de também poder acarretar em perda na resolução (quando o tamanho do foco for da ordem

do tamanho de voxel). Quatro níveis de sensibilidade também podem ser escolhidos (em *Sensitivity*). Ao aumentar a sensibilidade, aumenta-se o ruído associado, mas também cresce o número de níveis de cinza da imagem. Apesar deste acréscimo, a relação sinal-ruído permanece aproximadamente a mesma (datoslx acquisition, 2017).

O programa permite a calibração do detector a partir dos valores selecionados pelo usuário (janela no canto superior direito na Figura 14). Após selecionados os parâmetros de aquisição, deve-se calibrar o detector. Na seção de detecção, primeiro é realizado um *offset*, que é a aquisição de imagens sem que o feixe esteja ligado. Isso permite que o sistema compute respostas remanescentes no detector que possibilitarão que, durante a aquisição, isto seja levado em consideração para que sejam levados em conta os níveis de cinza efetivos, descartando portanto estas respostas remanescentes (que se traduzem em erros na imagem). Após o *Offset*, o feixe é acionado na fase de calibração chamada *Gain* (ou “ganho”), onde o sistema toma as diferentes respostas dos pixels à exposição de raios X, o que varia de acordo com os parâmetros selecionados para o feixe e suas características, já que a interação dos raios X com a matéria, como previamente discutido, varia de acordo com a energia dos fótons.

Na área de aquisição (*Acquisition*, na Figura 14) é determinado o número de projeções que serão realizadas no quadro *Images*. Isso determina o passo angular (passo angular = $360^\circ / n^\circ$ de projeções), que a princípio quanto menor, melhor, uma vez que um número maior de projeções em um dado intervalo angular resultam em uma integração mais rica no momento da reconstrução das imagens, como mencionado. O que impede de se usar um número de projeções muito alto é o tempo de aquisição, que aumenta quanto maior for o número de projeções.

O módulo *detector|shift* é uma ferramenta usada para reduzir artefatos posicionados mais ao meio da imagem. Ela faz com que o detector se mova para uma posição diferente para cada imagem, de forma aleatória (em um alcance de ± 10 pixels). Desvios não lineares de pixels individuais são então distribuídos nas diferentes regiões do volume para serem reconstruídos e não mais emergir como anéis – reduzindo, portanto, o artefato de anel – provocado pela presença de pixels mortos na região de detecção. Outro módulo importante e muito usado é o *autolsco*, que diferentemente do outro módulo cuja atuação é a de basicamente reduzir um tipo de artefato de imagem, este melhora a qualidade da imagem de um modo geral. Apesar do sistema possuir

mecanismos idealizados para prevenir efeitos térmicos durante os escaneamentos (como o pré-aquecimento e o sistema de refrigeração do tubo), tais efeitos não podem ser totalmente evitados quando o tempo de aquisição é muito longo e a magnificação é muito alta. Por causa da expansão do tubo, a amostra sofrerá desvios e será redimensionada na imagem, comparada com começo daquele escaneamento e isso causará artefatos no volume reconstruído. O módulo, associado à função de mesmo nome no programa de reconstrução (discutido na próxima seção), fornece formas de compensar os efeitos descritos anteriormente. No entanto, o método mais simples de se corrigir é comparando a imagem correspondente ao 0° no começo da aquisição com a da mesma posição, ao final, 360° (datoslx acquisition, 2017).

A janela intitulada *X-ray control* contém dois dos principais parâmetros na aquisição: a corrente e a tensão. Quanto maior a corrente, maior a taxa de número de eventos (fluxo) – ou seja, maior o número de fótons produzidos no interior do tubo, conseqüentemente mais fótons são transmitidos e atingem o detector –, o que no geral aumenta os níveis de cinza presentes na imagem. Ademais, a tela mostra a potência (produto da tensão pela corrente), que influencia no tamanho focal do feixe. Quanto maior a potência, maior o tamanho focal, e o tamanho focal determina a resolução de uma tomografia computadorizada.

É importante no momento da aquisição a realização de testes de configurações diferentes dos diferentes parâmetros. A situação ideal seria aquela com maior níveis de cinza na imagem, com transmissão completa, ruído minimizado, tempo de aquisição e arquivo total de imagens relativamente pequeno. Contudo, tais condições são extremamente difíceis de serem obtidas no cotidiano laboratorial, de modo que torna-se necessário escolher os parâmetros de modo a obter a melhor relação possível entre as variáveis supracitadas. Como os sapos usados neste trabalhos tem comprimento da ordem de poucos centímetros e possuem tecido bem leve, não foi necessário o uso de alta diferença de potencial. Além disso, como foi também usado um tamanho de voxel pequeno, para não causar saturação no detector e conseqüente perda de qualidade, foram usados tempos de exposição e corrente relativamente pequenos, o que também possibilitou chegar a um tempo de aquisição relativamente curto – aproximadamente 30 minutos. Os parâmetros utilizados neste trabalho estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Tabela dos parâmetros utilizados.

Parâmetro de Aquisição	Valor Usado
Tensão	50 kV
Corrente	180 μ A
Tempo de Exposição	250 ms
Tamanho de Pixel Efetivo	9,5 μ m
Frames (<i>Averaging/Skip</i>)	5 / 2
N° de Projeções	1000
Rotação Total	360°

4.4.2 – Reconstrução – *Datoslx Reconstruction*

As imagens geradas pela aquisição formam um conjunto de imagens das projeções no formato .tif, bem como um arquivo .pca – característico do programa –, no qual as informações de aquisição estão contidas. O programa de reconstrução da General Electric, *Datoslx Reconstruction*, é então usado para visualizar as projeções e reconstruir o volume. A Figura 15 mostra a interface do programa, após abrir um conjunto de imagens.

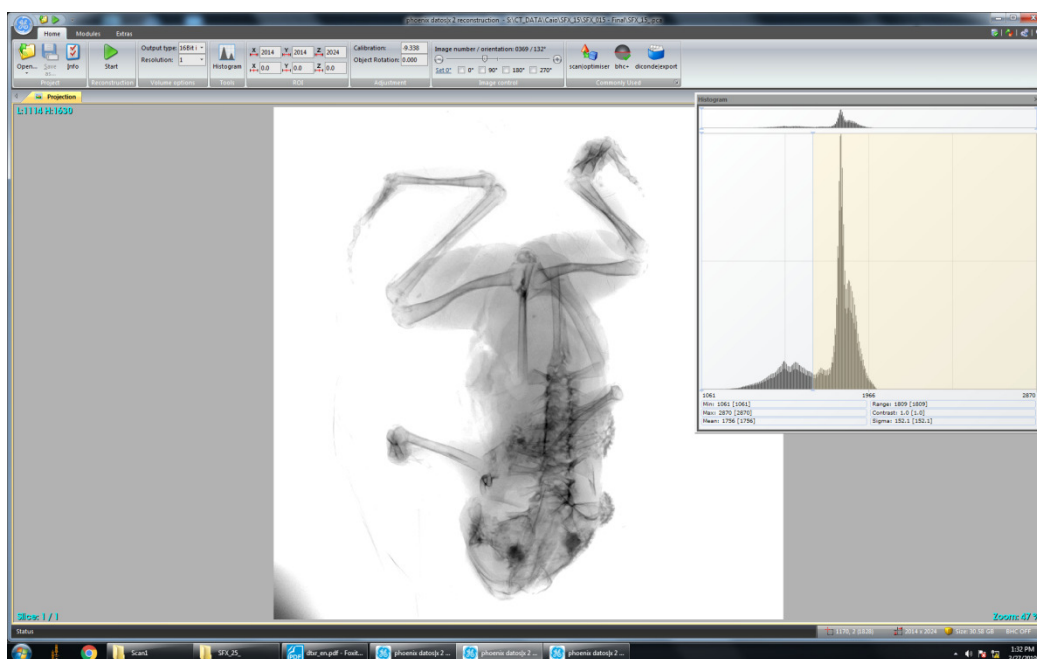


Figura 15 - Interface do programa de reconstrução utilizado, *Datoslx Reconstruction*.

Inicialmente, verifica-se as projeções – o que pode ser feito usando a barra em *Image Control* ou selecionando os quatro ângulos abaixo desta –, podendo visualizar no histograma em níveis de cinza de cada projeção. Este é um programa muito eficaz, uma vez que após selecionada a janela onde a reconstrução efetivamente ocorrerá, pode-se realizar a otimização da imagem a partir da função *Scan/Optimiser*, que irá computar a configuração que melhor se adequa à imagem, restando ao usuário apenas avaliar se os valores são realmente os melhores – o que comumente ocorre –, e aceitar a correção proposta. As correções serão então aplicadas a todas as projeções. Após isso, volta-se para a função *bhc+*, cuja função é minimizar o artefato de endurecimento do feixe. Escolhe-se então o valor que minimiza este artefato e, então, basta escolher uma pasta para salvar o volume e começar a reconstrução. Após reconstruído, o volume pode ser aberto no mesmo programa, o que permite a exportação do conjunto de cortes transaxiais em formato .dicom. Também é possível selecionar uma região de *threshold* no histograma antes da exportação, permitindo já um primeiro tratamento nas imagens. A exportação foi realizada para posterior alinhamento das imagens, procedimento que será discutido na próxima seção.

4.4.3 – Alinhamento do Conjunto de Imagens – *Dataviewer*

As imagens exportadas em .dicom podem já ser usadas para análise ou construção de um volume. No entanto, é interessante antes realizar um alinhamento destas imagens, de modo a otimizar o uso do programa de análise, consideravelmente reduzindo o tempo de trabalho por análise, uma vez que criar traçar um ROI em uma imagem desalinhada, que já é assimétrica, pode ser exaustivo (Figura 16).



Figura 16 Dataviewer, ao abrir o conjunto de imagens.

A Figura 16 é parte do conjunto de imagens de uma das amostras usadas neste trabalho, e ilustra a interface visualizada ao abrir um dado conjunto de cortes. Verifica-se facilmente que a imagem não está alinhada pela falta de simetria dos ossos. A Figura 17 mostra as projeções relacionadas aos três eixos cartesianos (x, y, z).

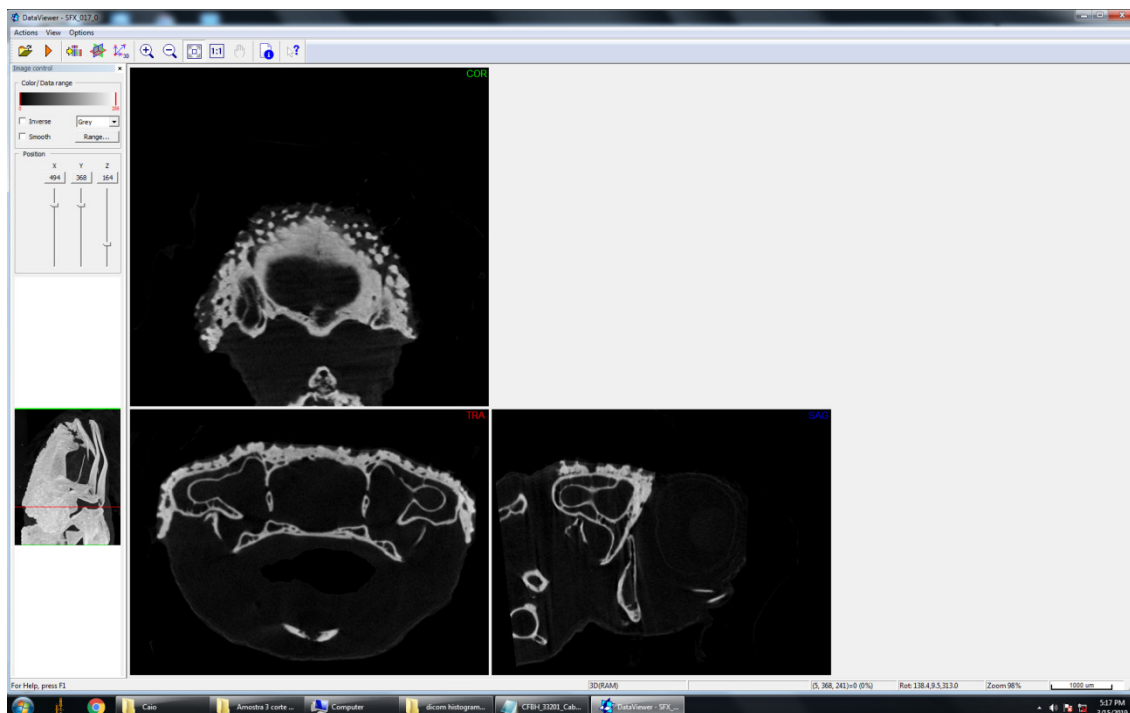


Figura 17 -Dataviewer, após alinhamento das imagens.

O programa permite que o usuário faça modificações em qualquer uma das três projeções, o que provoca alterações simultaneas nas outras. A partir da visualização de onde, no volume, o corte está situado (pequeno quadro à esquerda) pode-se mais facilmente navegar nas imagens, especialmente em imagens de pouca simetria como é o caso de sapos. alinhar a projeção de interesse. Na Figura 17 percebe-se uma maior simetria na imagem associada ao eixo z (no meio), quando comparada à imagem anterior, o que sugere um melhor alinhamento.

Finalizado o alinhamento, exporta-se os cortes no eixo selecionado no formato de imagem de interesse (aqui, eixo z e .bmp), que serão usados na análise, discutida na próxima seção.

4.4.4 – Análise das Imagens - CTan

Com o conjunto de cortes devidamente alinhados, é chegado o momento da análise. Ao abrir as imagens no programa CTan, cuja interface do programa está ilustrada na Figura 18, um corte do crânio é mostrado na escala de cinza original. É possível selecionar qual será o conjunto de cortes que efetivamente será analisado. Caso nenhum seja selecionado, o programa analisará todo o conjunto. Pode-se também determinar a região de interesse (ROI), dentro da qual a análise se dará, imagem a imagem, permitindo a exclusão de partes da imagem que não são do interesse do usuário.

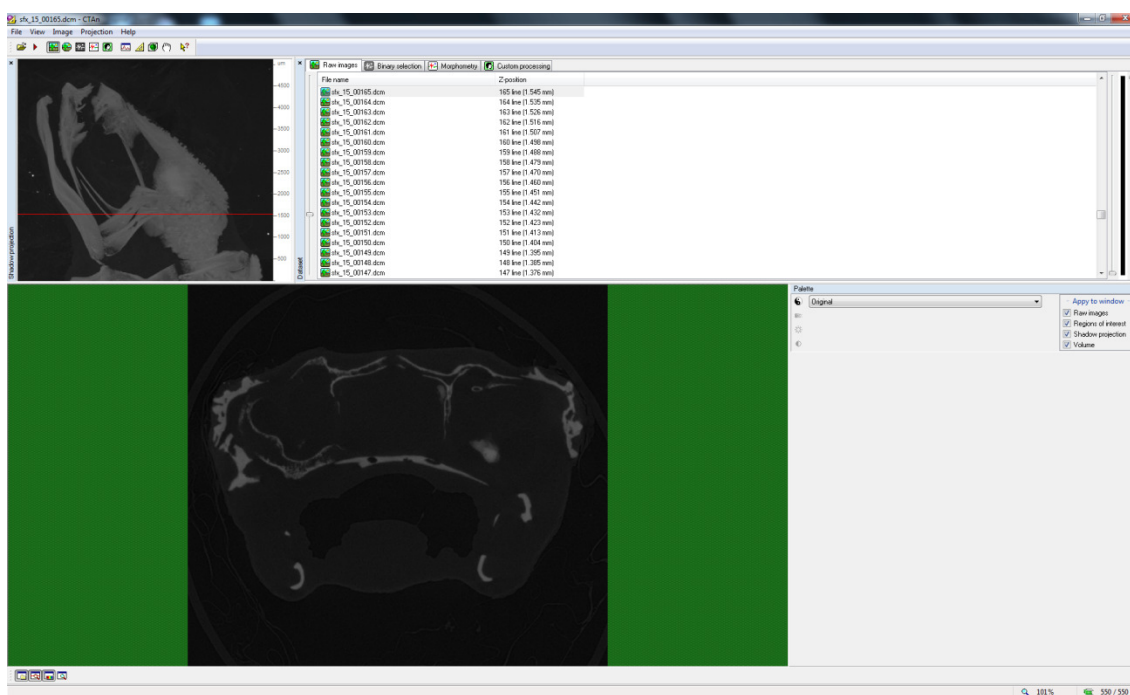


Figura 18 -Programa usado para análises, CTan. Corte em escalas de cinza.

Em seguida, são selecionadas as funções imbutidas no programa que se deseja aplicar às imagens (Figura 19). Neste trabalho, foram usadas as funções: *Thresholding*, *3D Analysis*, *Save Bitmaps* e *Histogram*. A ordem aqui é importante, por isso *Thresholding* deve ficar à frente de modo que o que seja analisado sejam as imagens já binarizadas em preto e branco. É comum salvar as imagens binarizadas e o histograma gerado em tons de cinza para posterior avaliação, qualitativa e quantitativa, da segmentação. Como ilustração, na Figura 19 foi usado o método Otsu de segmentação. No caso do Global, manual, é necessário comparar a imagem segmentada a partir de

uma seleção manual de limiarização com a imagem original (como na Figura 16) até encontrar o intervalo mais adequado.

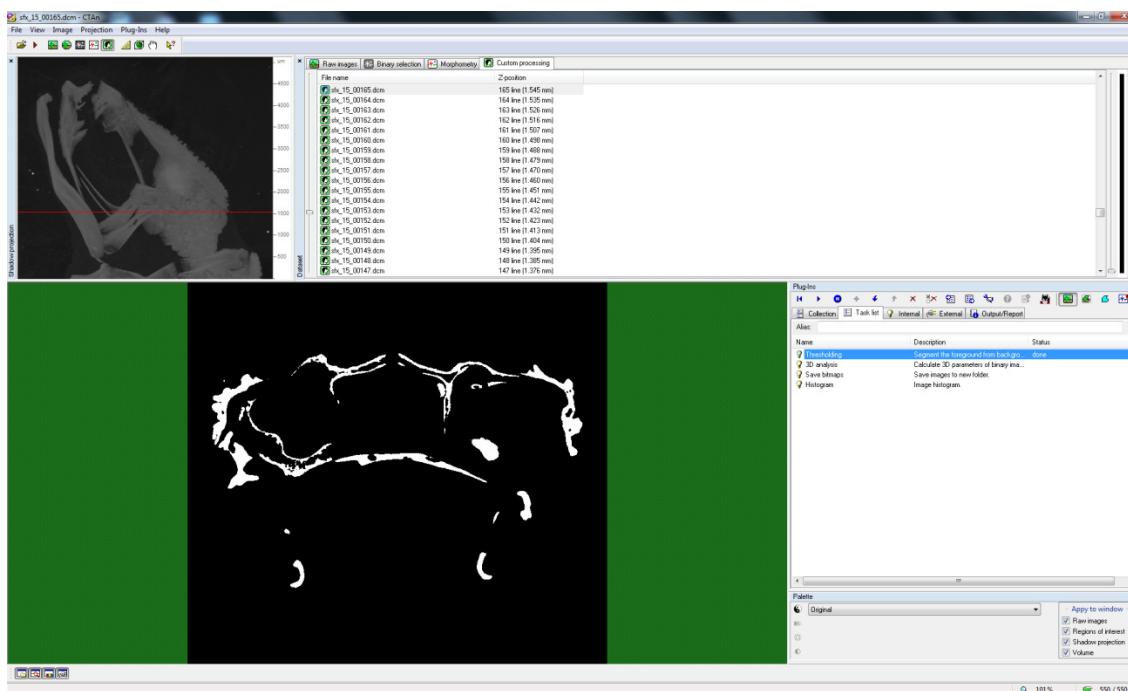


Figura 19 -CTan, imagem já binarizada em preto e branco. Janela mostra as funções do programa usadas nas análises.

A ferramenta *3D Analysis* contém uma série de parâmetros morfométricos que podem ser usados na análise, dentre eles os usados neste trabalho. Também permite que sejam salvas imagens da Espessura Trabecular, o que foi feito para a geração de um volume ilustrativo da distribuição da espessura trabecular, mostrado mais à frente. Ao fim da análise, os resultados podem ser encontrados em um arquivo .txt. Vale ressaltar aqui que, apesar da visualização do usuário ser a dos cortes em duas dimensões, o programa gera um volume a partir dos cortes e realiza sobre este volume as análises.

Vale ressaltar duas funções particularmente interessantes do ponto de vista do processamento de imagens, que é a criação de um volume de interesse (VOI) no CTan, que pode ser selecionado manualmente de forma detalhada traçando ROI's em cada imagem; e a outra é a possibilidade de salvar o conjunto de ROI's usados em um conjunto de imagens, sendo possível aplicá-lo a outros conjuntos de imagens, garantindo que o mesmo ROI será usado em diferentes conjuntos de imagem e, portanto, aumentando a confiabilidade nos resultados obtidos. Ambos procedimentos foram realizados neste trabalho.

O programa também permite o enfileiramento de análises, sendo possível selecionar diferentes grupos de imagens a serem analisados, ou uma análise após o uso de um método de segmentação, seguida da reinicialização do processo: segmentação diferente e análise. Isso otimiza o tempo levado para efetuar as análises, que podem variar dependendo da qualidade das imagens e número de imagens. Diversas outras funções de processamento, visualização e análise de imagem constam no programas mencionados nesta seção, contudo foram escolhidos os principais aspectos usados neste trabalho.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo serão avaliados os resultados obtidos na variação dos tamanhos de voxel de reconstrução, comparando também a diferença entre os resultados devido ao método de segmentação adotado em cada caso. Começa-se com uma discussão qualitativa, tendo como base somente diferenças visuais nas imagens. Em seguida, discuti-se a variação de cada parâmetro analisado, bem como distribuições e histogramas.

5.1–Discussão Qualitativa

A microCT possibilita a magnificação de estruturas microscópicas de variados objetos. Em aplicações de cunho biológico e ecológico, a técnica muitas vezes permite a visualização de estruturas internas outrora desconhecidas, possibilitando a elucidação e desenvolvimento de modelos evolutivos nestas áreas de pesquisa. Nesta seção é realizada uma breve discussão qualitativa sobre as imagens obtidas no uso da técnica em espécimes da espécie *B. ephippium*.

A partir de uma análise qualitativa dos cortes da Figura 20, nota-se que tanto a imagem original quanto as binarizadas, dos dois métodos, sofrem notável impacto quanto à resolução. Também pode-se perceber que o método de Otsu tende a superestimar mais do que o Global - que tende mais a subestimar -, em todas as imagens. Nota-se também que no pior cenário, o Global é mais representativo da imagem original, o que é esperado já que nesses casos o histograma perde muito do seu caráter bimodal, dificultando portanto a otimização do algoritmo do método Otsu.

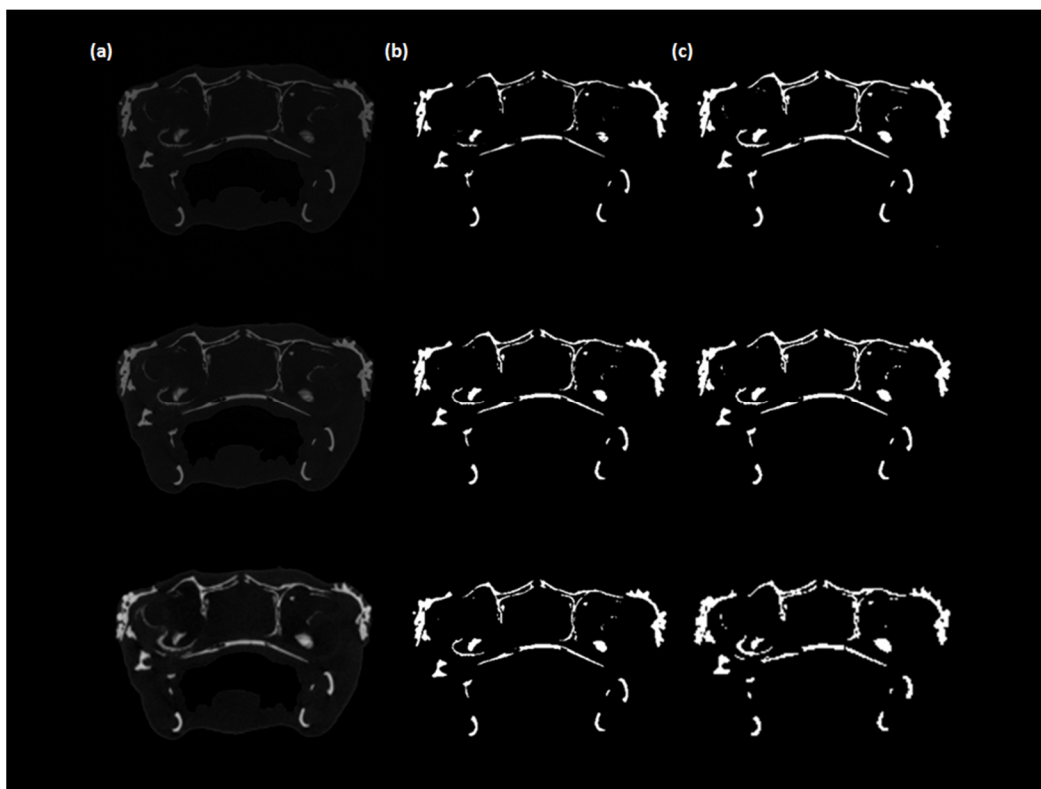


Figura20 - Imagens de cortes feitos na mesma posição da amostra. Menor tamanho de voxel está no topo e maior embaixo. Na coluna (a) estão os cortes das imagens originais, em escala de cinza; na coluna (b) estão os respectivos cortes segmentados pelo método Global; e em (c) os segmentados pelo método Otsu.

Pode-se perceber também, a partir da Figura 20 que entre o menor tamanho de voxel ($9,5 \mu\text{m}$) e o intermediário ($19 \mu\text{m}$), o Global difere consideravelmente, tomando mais regiões para o segundo tamanho de voxel. Já no Otsu não há grande variação e as imagens são bem semelhantes. Isso é indicativo que no uso da segmentação automática do método Otsu, para este VOI, é possível usar o tamanho de voxel intermediário sem grande perda de informação se o propósito for apenas a visualização. O mesmo não pode ser dito sobre o método Global, que parece subestimar na primeira e superestimar na segunda imagem. Por outro lado, quando se compara o intermediário com o último ($38 \mu\text{m}$), é invertida a relação: o Global apresenta consideravelmente menor diferença do que nas imagens do Otsu. É importante notar que a segmentação precisa dessas regiões é de extrema dificuldade, dada sua heterogeneidade, o que por sua vez também possibilita verificar melhor as diferenças após a segmentação.

Nas imagens da Figura 21 estão apresentadas as imagens tridimensionais de uma das amostras estudadas, com tamanho de voxel de $9,5\mu\text{m}$. A alta resolução permite a

inspeção visual de detalhes de poucos micrômetros. O contorno esverdeado é a pele do animal. Todo o resto foi mantido em escalas de cinza.



Figura 21 –Imagens de corpo inteiro de uma das amostras estudadas. Visão das costas (esquerda) e frontal (direita)

Na Figura 22 pode-se ver o interior do crânio em um corte realizado na região apontada pela seta da Figura 21.



Figura22–Visualização do interior do crânio a partir de um corte transversal, na posição da Figura 21.

5.2–Análises dos Parâmetros

Os resultados de espessura trabecular (Trabecular Thickness, Tb.Th), número de trabéculas (Trabecular Number, Tb.N), volume ósseo (Bone Volume, BV), superfície óssea (Bone Surface, BS), separação trabecular (Trabecular Separation, Tb.Sp), número de objetos (Number of Objects, Obj.N) e fator de padrão trabecular (Trabecular Pattern Factor, Tb.Pf) obtidos são dispostos nessa seção.

A maioria dos parâmetros apresentou variação significativa com o aumento do tamanho de voxel, o que resultou em uma diferença visível substancial nas reconstruções dos volumes dos crânios (Figura 23), se comparado a primeira (9,5 μm) com a última (38 μm). Entre as duas primeiras é possível ver diferença, porém não é relativamente alta, pelo menos ao avaliar a superfície em questão na Figura 23.

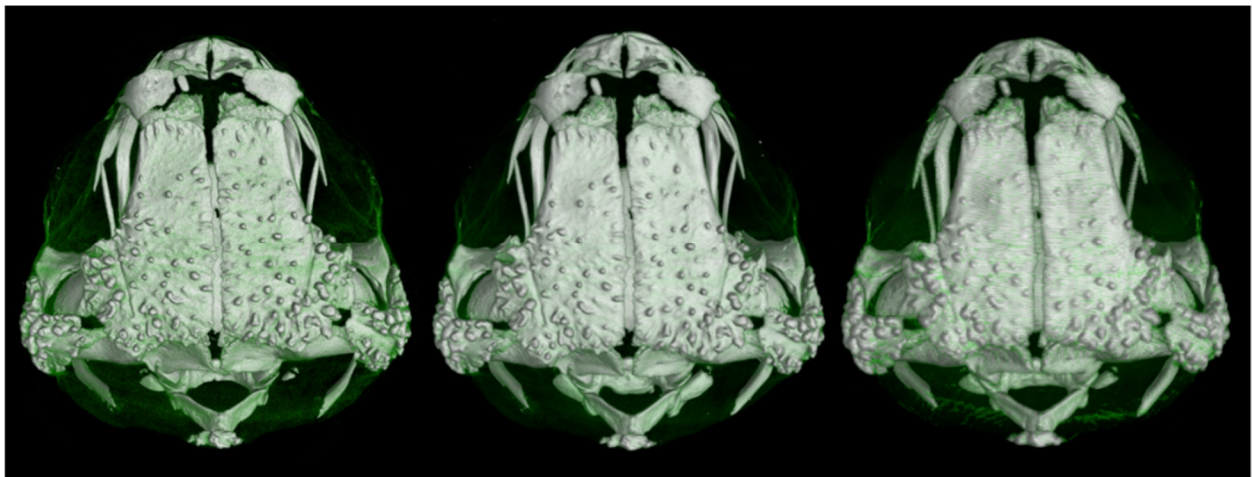


Figura23 - Reconstruções dos crânios, do menor tamanho de voxel (esquerda) até o maior (direita).

Os parâmetros BV e BS são de particular interesse nas aplicações em pequenos animais (Figura 24). Isso porque boa parte dos estudos envolvendo o uso de microCT destes animais tem expressivo foco na superfície e volume cranianos.

A superfície óssea decresceu conforme o tamanho de voxel cresceu com ambos métodos de segmentação (Figura24 - esquerda). Isso nos leva a crer que essa quantidade sempre decrescerá, nesta região de tamanho de voxel, não importa qual método de segmentação utilizado.

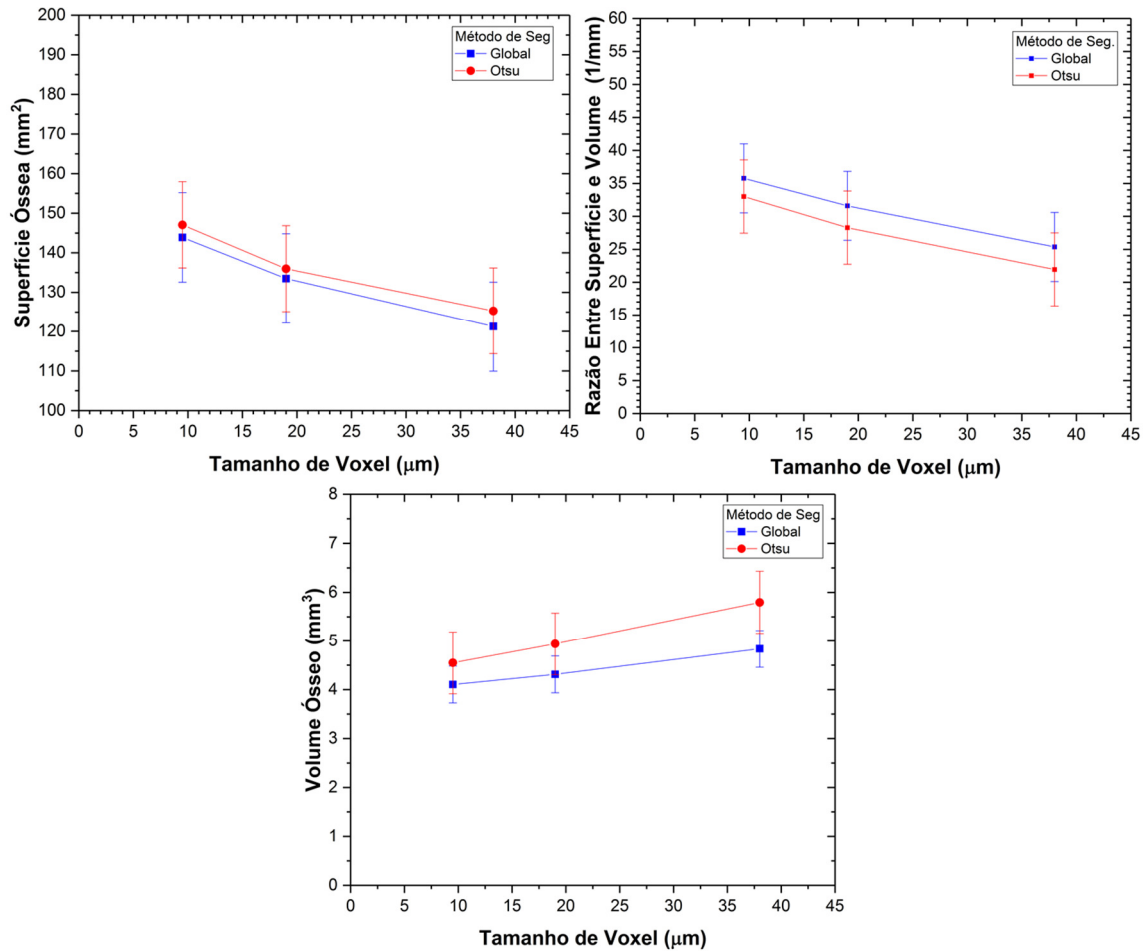


Figura 24 - Gráficos comparativos de parâmetros ósseos: superfície óssea (esquerda), volume ósseo (baixo) e a razão entre eles (direita).

Isso pode ser explicado pelo fato de que, tomando um volume qualquer, um tamanho de voxel maior significa menos cubos serão usados para representar aquele volume, e quando o programa de análise for contar quantos objetos existem na superfície, slice a slice, contará menos objetos. No entanto, a variação não é exatamente a mesma, verificou-se que os valores da curva do método Otsu são superiores aos do método Global, ainda que dentro das barras de erro. Quando se avalia a variação no volume ósseo, ve-se que este cresce conforme o tamanho de voxel cresce, o que ocorre por motivo similar ao do decréscimo de BS, mas ao contrário, uma vez que ao representar um volume com voxel maior, a reconstrução associada irá superestimar o volume.

Quanto ao método de segmentação, vê-se que o método Global apresenta variação mais sutil que o método Otsu, cuja diferença é de aproximadamente 10%. Comparando com a Figura 20, observa-se que os resultados apresentados na Figura 24 corroboram a avaliação qualitativa. O fato dos valores das curvas do método Otsu serem superiores é representativo da superestimação observada nos cortes na seção anterior. E a menor variação da qualidade de imagem no uso do método Global pôde ser verificado também pela evolução mais sutil de BV neste caso. O gráfico da direita mostra que, também independente do método, em ambos casos a razão será decrescente com o aumento do tamanho de voxel, o que não é novidade visto os outros dois gráficos, já que BS diminui enquanto BV aumenta em todos casos observados.

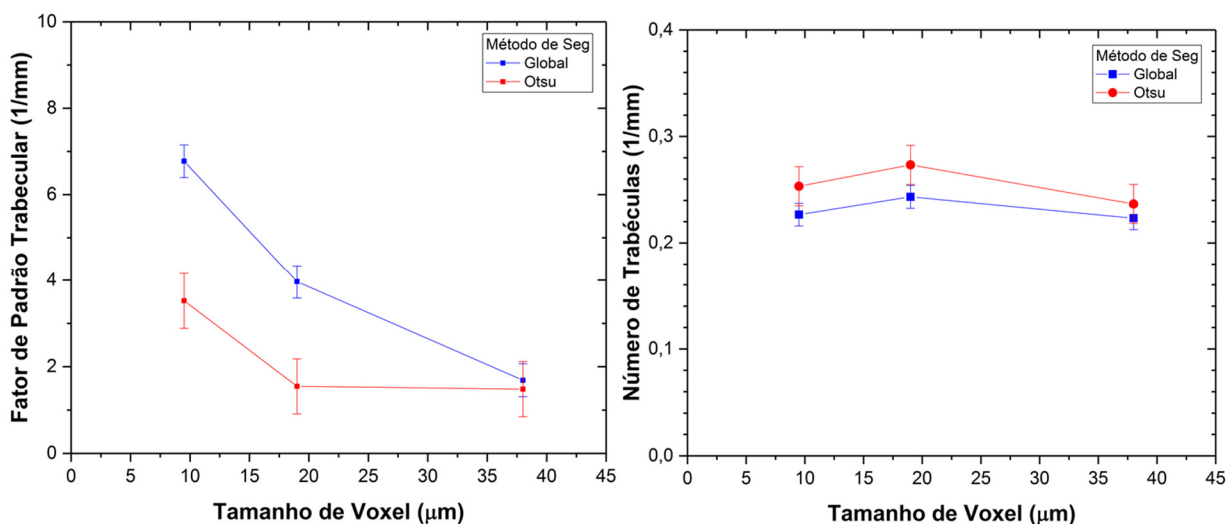


Figura 25 - Gráficos comparativos dos parâmetros Trabecular Pattern Factor (esquerda), Trabecular Number (direita).

O fator de padrão trabecular (Tb.Pf) demonstrou expressiva diferença entre os métodos de segmentação. Tomando a razão entre os valores para o tamanho de voxel menor e o maior, a razão é de 4,02 e 2,38 para o método Global e Otsu, respectivamente. Este parâmetro está intrinsecamente relacionado à conexão estrutural trabecular, de modo que quanto menor o índice mais conectados estão as trabéculas (ou malha trabecular). Percebe-se pela Figura 25, esquerda, que existe um valor mínimo, onde convergem os valores dos dois métodos, para o voxel de 38 μm. Ve-se então que com o tamanho de voxel deste tamanho a informação para esse parâmetro é praticamente toda perdida, uma vez que, no voxel menor a diferença entre os

resultados de Tb.Pf é de $3,25 \text{ mm}^{-1}$ e se torna $0,23 \text{ mm}^{-1}$ no pior. Este é o parâmetro mais afetado pela mudança de método de segmentação.

O número de trabéculas (Tb.N) varia de forma semelhante entre os métodos de segmentação, sem grandes alterações. Este é o parâmetro que mais se demonstrou constante quando avaliada a diferença entre o menor e maior tamanho de voxel. Pode-se verificar que não há expressiva diferença no cálculo deste parâmetro para estes tamanhos de voxel. Vale notar mais uma vez que o método de Otsu contou espaçamento menor (ou contou mais “cheios” – maior Tb.N) entre os vazios (menor Tb.Pf), indicando que de modo geral estimou mais regiões como sendo ósseas que no método Global. A razão pela qual ambas curvas crescem e decrescem será comentado à frente.

O número de objetos (Obj.N, Figura 26) decresceu de modo geral, conforme o tamanho de voxel aumentou. No entanto, a variação pelo método Global foi significativamente maior, indicando maior perda de informação com relação ao método Otsu. Lembrando que o número de objetos equivale à quantidade de objetos brancos, considerados osso, que foram observados, percebe-se uma perda com relação ao voxel para ambos os casos. No pior voxel, os resultados se igualam quando as barras de erros são consideradas. É possível observar que para tamanhos de voxel muito altos não há grande diferença em qual método de segmentação é usado, o que é reforçado pelos resultados da Tb.Pf.

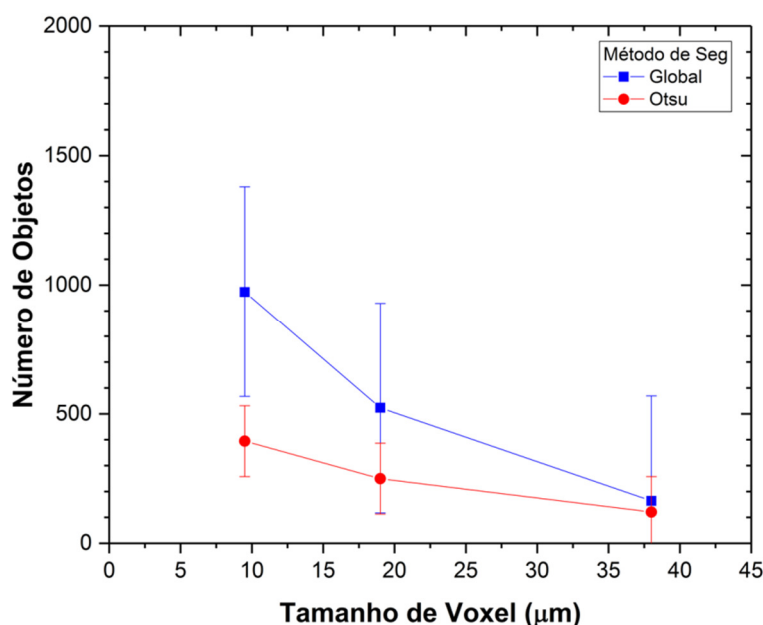


Figura 26 - Variação do número de objetos em função do tamanho de voxel.

A evolução dos valores médios da separação trabecular, Tb.Sp, estão demonstrados na Figura 27. Este parâmetro é intrinsecamente ligado ao Tb.Th, uma vez que efetua o mesmo cálculo, porém focando em vazios. Sua distribuição apresenta portanto as mesmas variações que as discutidas sobre Tb.Th.

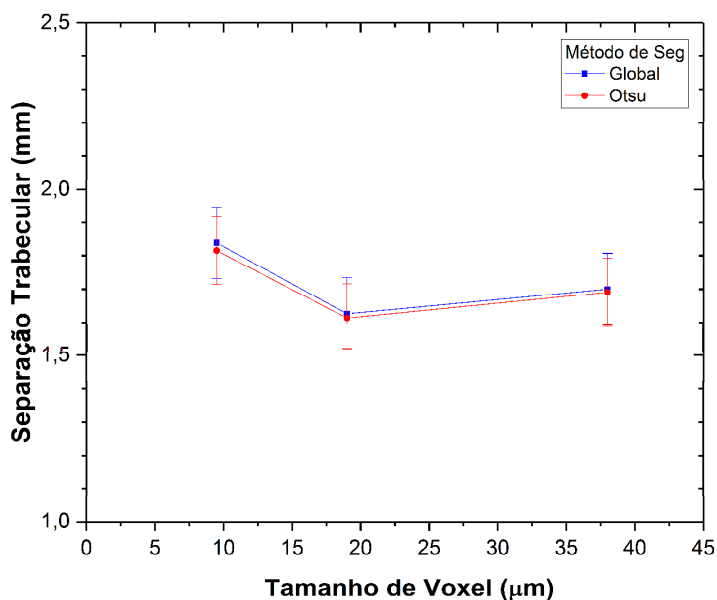


Figura 27 - Variação de separação trabecular pelo tamanho de voxel.

Finalmente, discute-se as distribuições de espessura trabecular (Tb.Th, Figura 28) e da separação trabecular, Tb.Sp. As distribuições são, na verdade, intrinsecamente relacionadas, uma vez que Tb.Th tem seu cálculo focado em voxels sólidos, enquanto Tb.Sp foca em espaço vazio. Por conveniência, toma-se Tb.Th. Os gráficos começam na marca do dobro do valor do tamanho de voxel em questão ($19\mu\text{m}$ no topo, $38\mu\text{m}$ no meio e $76\mu\text{m}$ embaixo), isso porque os pontos usados nos gráficos foram feitos com as saídas do programa de análise supracitado, que calcula intervalos coordenada o ponto médio entre eles (por exemplo, sendo o voxel igual a $38\mu\text{m}$, o intervalo seria $38 - 114\mu\text{m}$ e o ponto médio é $76\mu\text{m}$). Na melhor resolução, ve-se um aumento significativo na contagem de material ósseo entre o primeiro e segundo ponto dos gráficos.

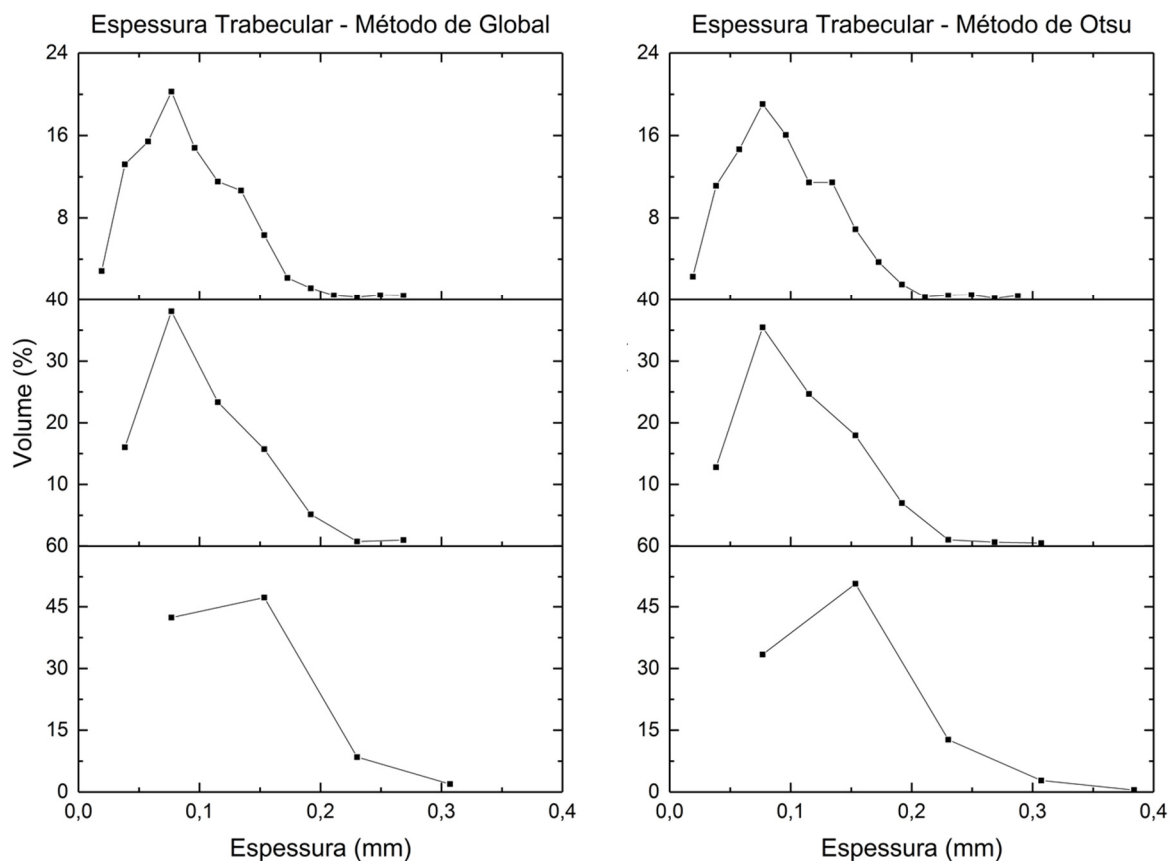


Figura 28 - Distribuições de Tb.Th ao longo do volume estudado.

A isso pode ser atribuído o fato de que, no primeiro ponto, a dimensão do material ósseo observado é muito próxima do tamanho de voxel daquelas imagens, o que certamente acarreta em perda de informação para objetos cujo comprimento esteja nessa faixa. Há portanto um abrupto aumento seguido de um máximo e posterior decréscimo. O pico indica que naquela região de espessura todos objetos são diferenciáveis.

Quanto a diferenças entre os métodos de segmentação, não há muita neste caso. Todavia, no método de Otsu são contados objetos de espessura maior que 0,3mm, ausentes nas distribuições do método Global com exceção do maior voxel. Ainda assim, na melhor resolução a diferença é ínfima até esta marca. Ainda no segundo a diferença é inexpressiva, sendo acentuada somente no último gráfico, quando no Global o primeiro ponto está acima de 40% e no Otsu este valor está em aproximadamente 33,4%.

Além dos valores absolutos e distribuições, o programa de análise também tem como possível saída um conjunto de imagens, binarizadas, a partir do cálculo da Tb.Th

em cada corte. Com isso é possível a verificação visual, no volume reconstruído, de como variam os valores de Tb.Th por toda imagem tridimensional.

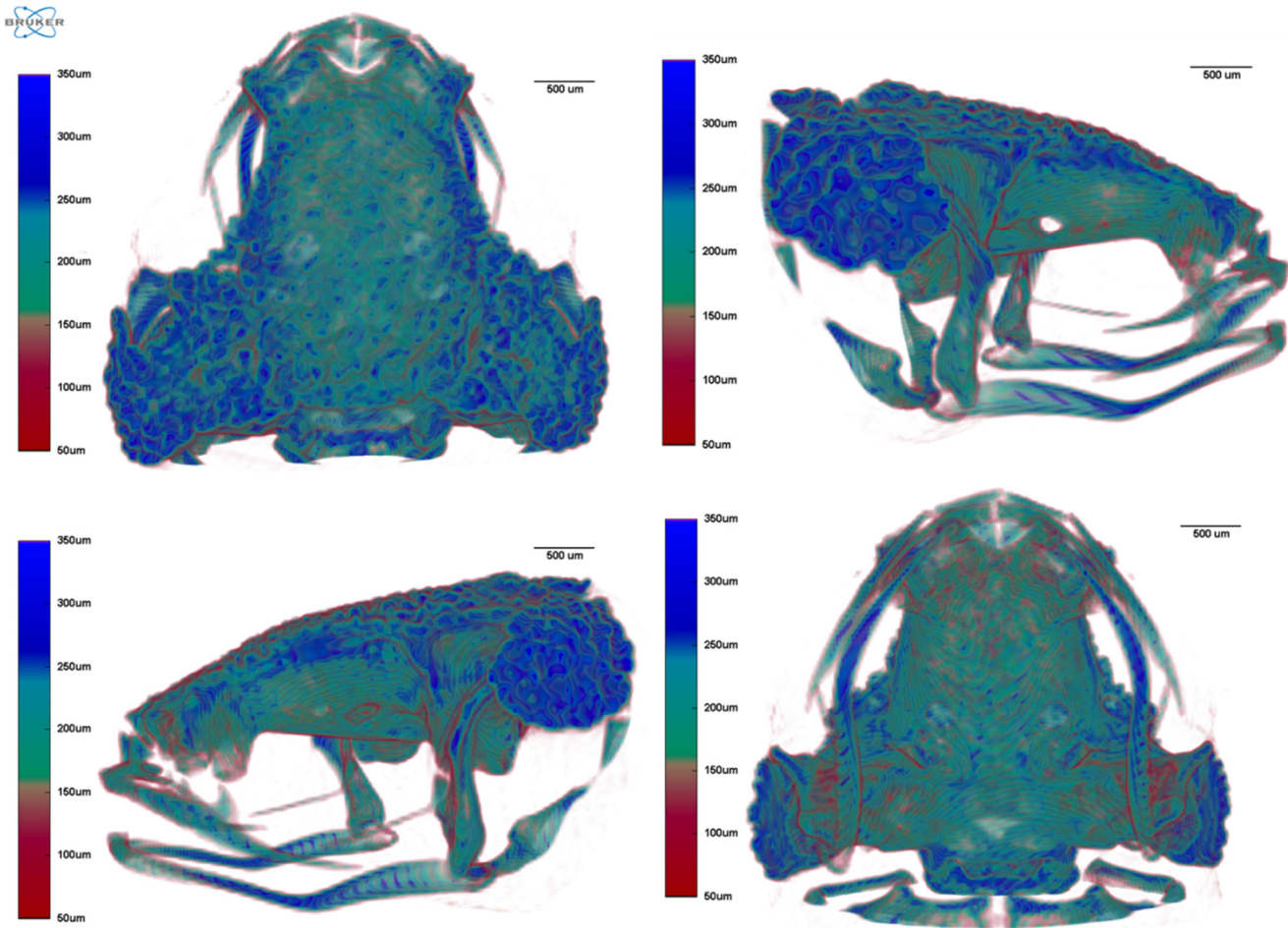


Figura 29 - Variação da Tb.Th em um crânio, gerado no programa *CTVOX (Bruker)*.

A seguir, são realizadas considerações finais sobre este trabalho.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Em relação ao tamanho de voxel em si, pode-se concluir através dos resultados obtidos que o uso do menor tamanho de voxel possível é apresenta melhor resultado visual. Também foi verificada diferença na maioria dos parâmetros estudados quanto à variação do tamanho de voxel em si. Portanto, tanto visualmente quanto quantitativamente, foi verificado impacto substancial no tamanho de voxel.

Através da comparação entre os dados obtidos pôde ser visto que dependendo do que se busca em um estudo, o método de segmentação pode influenciar muito nos resultados (Tb.Pf e Obj.N) ou ser relativamente indiferente (Tb.Sp). O estudo de cada parâmetro deve portanto se dar de modo individual, caso a caso, não sendo possível uma generalização que otimize o processo para todos parâmetros morfológicos analisados.

O método de Otsu é um método de binarização automático, que independe do usuário. O algoritmo presume que as imagens contém duas classes de pixels e, a partir do histograma, presumido bimodal, calcula o *threshold* que otimiza a separação entre as duas classes, de modo a minimizar a dispersão entre eles. A maior limitação desse método possivelmente se dá em aplicações em que não há, no histograma, dois picos com um vale muito bem definido (onde um corresponderia ao material ósseo e o outro ao não ósseo), uma vez que o algoritmo foi construído de modo a identificar um caráter bimodal na distribuição e aplicar o *threshold* a partir disso. Essa é a provavel razão de se ter visto a superestimação crescente com o tamanho de voxel do método discutida na seção anterior.

Por outro lado, como o método é automático e de segmentação binária (somente preto e branco), dependendo do que se deseja estudar com relação aos ossos destas amostras, esta pode ser uma boa opção, já que não raramente trabalhos realizados com animais usam um número relativamente grande de amostras – várias dezenas, por vezes chegando a mais de cem. Assim, é possível que se ganhe tempo no processamento e análise computacional de imagens destas amostras através do uso deste método.

Outro aspecto relevante no dia a dia em um laboratório que trabalha com imagens, é o espaço em disco. O conjunto de projeções – usadas para gerar o volume – de amostras como estas, que requerem alta magnificação, podem ocupar mais de 10 GB, ao que pode se adicionar mais 5 GB ao reconstruir o volume no tamanho de voxel original. No entanto, ao usar o tamanho intermediário, o espaço ocupado na reconstrução é inferior a 300 MB. Além disso, as análises das amostras de 9,5 μm duraram no mínimo uma hora, enquanto as reconstruídas com tamanho de voxel de 19 μm não passaram de 10 minutos. A isso, adiciona-se que para efeitos de visualização, a Figura 23 mostra que não há necessariamente relevante diferença, sendo possível concluir que o uso do tamanho de voxel intermediário nestes casos é uma saída viável para otimização do processamento e espaço em disco na aplicação da técnica nestas amostras. Vale mencionar que, para o maior tamanho de voxel, o espaço em disco ocupado pela reconstrução é inferior a 50 MB e o tempo de análise inferior a poucos minutos. A diferença entre este e o intermediário, no entanto, não é tão grande, ao passo que a perda de informação é considerável.

Após análise de todos os resultados, verificou-se que a escolha do *threshold* para segmentação ainda é um desafio para a aplicação da técnica de microtomografia computadorizada neste tipo de amostra. Entretanto, é uma técnica de ensaios não destrutivos que disponibiliza ferramentas capazes de gerar resultados qualitativos e quantitativos, como imagens 2D e 3D de estruturas externas e internas com detalhes da ordem de micrômetros, além de fornecer volumes, áreas e distribuições de espessura dos objetos presentes nas imagens.

REFERÊNCIAS

Aboud, L. R. L., Santos, B. C., Lopes, R. T., Viana, L. A. C., Scelza, M. F. Z., 2018, "Effect of Aging on Dentinal Crack Formation After Treatment and Retreatment Procedures: a Micro-CT Study." *Brazilian Dental Journal.*,v.29, n.6, pp.530-535.

Alba-Tercedor, J., 2016, "Microtomographic study on the anatomy of adult male eyes of two mayfly species.", *Zoosymposia.*, v. 11, pp. 101-120

Aristide, L., Reis, S. F., Machado, A. C., Lima, I., Lopes, R. T., Perez, S. I., 2015, "Encephalization and diversification of the cranial base in platyrrhine primates.", *Journal of Human Evolution.*, v. 81, pp. 29-40.

Araújo, O. M. O., Machado, A. S., Machado, A. C., Teles, A. P., Santos, T. M. P., LOPES, R. T., 2016, "Espectro de raios X simulados para sistemas de radiografia e tomografia.", *XXXIV - Congresso Nacional de Ensaaios Não Destrutivos e Inspeção.*

Araújo, O. M. O., Bastos, J. S., Machado, A., Santos, T., Ferreira, C., Claro, A. P. A., Lopes, R. T., 2018 J, "MicroCT parameters for multimaterial elements assessment." *Journal of Physics: Conference Series.*, 975, 012053.

Assis, J. T., 1992, *Microtomografia para Aplicações não Médicas. D.Sc, Tese, Programa de Engenharia Nuclear, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*

Battiato, S., Bruna, A. R., Messina, G., Puglisi, G., 2010, *Image Processing for Embedded Devices: From CFA Data to Image/video Coding*, Bentham Science Publishers, Universidade de Catania, Itália.

Bornschein, M.R., Ribeiro, L.F., Blackburn, D.C., Stanley, E.L., Pie, M.R., 2016, "A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from Santa Catarina, southern Brazil.", *Biota Neotropica.*, 18(3): e20170322.

Buzug, T. M., 2008, *Computed Tomography from Photon Statistics to Modern Cone-Beam CT*. 1 ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Campos, L. A., 2011, *Sistemática filogenética do gênero *Brachycephalus Fitzinger, 1826* (Anura: Brachycephalidae) com base em dados morfológicos. D.Sc, Instituto de Ciências Biológicas, UnB, Brasília, DF, Brasil.*

Cesareo, R., Brunetti, A., Lopes, R. T., Donepudi, G. G., Rao, V., Castellano, A., Gigante, G. E., Mascarenhas, S., Robert, R., Filho, V. S., Gilardoni, M., Silva, Hamilton P., Colosso, P. Q., 1999, "X- and gamma-ray tomography for nondestructive material testing.", *Proc. SPIE 3772., Developments in X-Ray Tomography II.*, 3772.

Clemente-Carvalho, R. B. G., Antoniazzi, M. M., Jared, C., Haddad, C. F. B., Alves, A. C. R., Rocha, H. S., Pereira, G. R., Oliveira, D. F., Lopes, R. T., Reis, S. F., 2009, "Hyperossification in Miniaturized Toadlets of the genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae): Microscopic Structure and Macroscopic Patterns of Variation.", *Journal of Morphology.*, v. 270, pp. 1285–1295.

Clemente-Carvalho, R. B. G., Klaczko, J., Haddad, C. F. B., Alves, A. C. R., Reis, S. F., 2011, "Molecular phylogenetic relationships and phenotypic diversity in miniaturized toadlets, genus *Brachycephalus* (Amphibia: Anura: Brachycephalidae).", *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, v. 61, pp. 79-89.

Chao, A. W., Mess, K. H. Tigner, Z., F. M., 2013, *Handbook of Accelerator Physics and Engineering*, 3 ed., World Scientific.

Christiansen, B. A., 2016, "Effect of micro-computed tomography voxel size and segmentation method on trabecular bone microstructure measures in mice." *Bone Reports.*, v. 5, pp. 136-140.

Condez, T. H., Monteiro, J.P. C., Haddad, C. F. B., 2017, "Comments on the current taxonomy of *Brachycephalus*(Anura: Brahycephalidae).", *Zootaxa.*, v. 4290, n. 2, p. 395-400.

Feldkamp, L. A., Davis, L. C., Kress, W., 1984, "Practical cone-beam algorithm.", *Jornal Optical Society of America.*, v. 1, n. 6, pp. 612-619.

Feynman, R., Leighton, R., Sands, M., 2006, *The Feynman Lectures on Physics*, def. ed., California Institute of Technology, Basic Books.

GE Sensing & Inspection Technologies, 2017, *datoslx acquisition, Acquisition software for computed tomography*, v. 2.5.0, General Electric Company.

GE Sensing & Inspection Technologies, 2017, *datoslx reconstruction, CT data optimisation and reconstruction software*, v. 2.5.0, General Electric Company.

- Goh, T. Y., Basah, S. N., Yazid, H., Safar, M. J., A., Saad, F. S. A., 2017, "Performance analysis of image thresholding: Otsu technique." *Measurement.*, v. 114, pp 298-307.
- Gonzalez, R. C., Woods, R. E., 2000, *Processamento de imagens digitais*, 1 ed., São Paulo, Edgard Blücher.
- Goutte, S., Mason, M. J., Christensen-Dalsgaard, J., Montealegre, F., Chivers, B. D., Sarria, F. A., Antoniazzi, M. M., Jared, C., Sato, L. A., Toledo, F. 2017, "Evidence of auditory insensitivity to vocalization frequencies in two frogs." *Scientific Reports.*, v. 7, n. 12121.
- Gutiérrez, Y., Ott, D., Töpferwien, M., Salditt, T., Scherber, C. 2017, "X-ray computed tomography and its potential in ecological research: A review of studies and optimization of specimen preparation." *Ecology and Evolution.*, v. 8, pp. 1-16.
- Haddad, C., Sazima, I., 1992, *Anfíbios anuros da Serra do Japi*, pp. 188-211, In: Morellato, L. P. C., *História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal do sudeste do Brasil*, Unicamp e FAPESP ed., Campinas.
- Hahn, M., Vogel, M., Pompeius-Kempa, M., Dellling, G., 1992, "Trabecular Bone Pattern factor—A new parameter for simple quantification of bone microarchitecture." *Bone.*, v. 13, pp. 327-330.
- Hara, T., Tanck, E., Homminga, J., 2002, "The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties.", *Bone*, v. 31, n. 1, pp. 107.
- Heyer, W., Rand, A., Cruz, C., Peixoto, O., Nelson, C., 1990, "Frogs of Boracéia.", *Arquivos de Zoologia.*, v. 31, n. 4, p. 231-410.
- Kalender, W. A., 2006, "X-ray computed tomography.", *Physics in Medicine & Biology.*, v. 51, n. 13, pp 29-43.
- Kalender, W. A., Hendee, W., 2011, *Computed tomography: Fundamentals, System Technology, Image Quality, Applications*, 3 ed., Erlangen, Publicis Publishing.
- Knoll, G. F., 2000, *Radiation Detection and Measurement*, 3 ed., John Wiley & Sons, Inc.

Landis, Eric N., Keane, Denis T., 2010, "X-ray microtomography.", *Materials Characterization.*, v. 61, pp. 1305-1316.

Lewiner, T., Lopes, H., Vieira, A. W., Tavares, G., 2003, "Efficient Implementation of Marching Cubes' Cases with Topological Guarantees.", *Journal of Graphics Tools.*, Vol. 8.

Lopes, R. T., Rodrigues, J. L., Assis, J. T. De, Jesus, E. F. O. de, Oliveira, L. F. de, 1997, "Evaluation of a Microtomography System with an X-ray Microfocus Tube.", *Applied Radiation and Isotopes.*, v. 48, pp. 1437-1442.

Lopes, R. T., Rocha, H. S., de Jesus, E. F. O., Barroso, R. C., de Oliveira, L. F., Anjos, M. J., Braz, D., Moreira, S., 2003, "X-ray transmission microtomography using synchrotron radiation". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerations, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment.*, v. 505, pp. 604-607.

Machado, A. S., 2015, *Caracterização geológica de rochas carbonáticas através da técnica de microtomografia computadorizada de raios-X. M.Sc, Dissertação, Programa de Engenharia Nuclear, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*

Machado, A.S., Machado, A. C., Teles, A.P., Araujo, O. M. O., Santos, T. M. P., Lima, I., Lopes, R.T., 2016, "Potenciais aplicações da técnica de microtomografia de computadorizada na industria." *Abende.*, v. 12, p. 36-43..

Machado, A. S., Oliveira, D. F., Filho, H. S. G., Latini, R., Bellido, A. V. B., Assis, J. T., Anjos, M. J. And Lopes, R. T., 2017, "Archeological ceramic artifacts characterization through computed microtomography and X-ray fluorescence.", *X-ray Spectrometry.*, v. 46, pp. 427-434.

Nascimento-Dias, B.L., Oliveira, D.F., Machado, A.S., Araújo, O.M.O., Lopes, R.T., dos Anjos, M.J., 2017, "Utilization of nondestructive techniques for analysis of the Martian meteorite NWA 6963 and its implications for astrobiology.", *X-Ray Spectrometry.*, v. 47, pp. 1-6.

Institute of Medicine and National Research Council, 1996, *Mathematics and physics of emerging biomedical imaging*, Washington DC, National Academic Press.

Oliveira, D. F., 2010, *Desenvolvimento de sistema de inspeção por técnicas radiográficas na análise de perda de adesão em dutos compósitos*. D.Sc, Tese, Programa de Engenharia Nuclear, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Otsu, N., "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms.", *IEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics.*, 1979, vol. 9, pp. 62-66.

Pie, Marcio R., 2018, "A new species of *Brachycephalus* (Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil." *Zootaxa.*, v. 4407, pp. 483-505.

Pires, P. M., Santos, T. P., Fonseca-Gonçalves, A., Pithon, M. M., Lopes, R. T., Neves, A. A., 2018, "A dual energy micro-CT methodology for visualization and quantification of biofilm formation and dentin demineralization.", *Archives of Oral Biology.*, v. 85, pp. 10-15.

Pombal, J. P. J., 2010. "A posição taxonômica das variedades de *Brachycephalus ephippium* (Spix, 1824) descritas por Miranda-Ribeiro, 1920 (Amphibia, Anura, Brachycephalidae).", *Boletim do Museu Nacional, Nova Série: Zoologia.*, v. 526, pp.1-12.

Pombal, J. P. J., Izecksohn, E., 2011, "Uma Nova Espécie de *Brachycephalus* (Anura, Brachycephalidae) do estado do Rio de Janeiro.", *Papéis Avulsos de Zoologia.*, v. 51, pp. 443-451.

Pombal, J. P. J., Sazima, I., Haddad, C. F. B., 1994," Breeding Behavior of the Pumpkin Toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae)". *Journal of Herpetology.*, v. 28, No 4, pp. 516-519.

Ribeiro, L. F., Bornschein, M., Belmonte-Lopes, R., Firkowski, C. R., Morato, S., Pie, M., 2015, "Seven new microendemic species of *Brachycephalus*(Anura: Brachycephalidae) from southern Brazil.", *PeerJ.*, 3, e1011.

Ribeiro, L. F., et al., 2017, "Two new species of the *Brachycephalus pernix* group (Anura: Brachycephalidae) from the state of Paraná, southern Brazil.", *PeerJ.*, 4.

Röntgen, W. C., 1895, "On a New Kind of Rays.", *Nature.*, v. 53, n. 1369, pp. 274-277.

- Sales, E.S., Bianco, L.C.B., Neto, J.C. Q.; Campos, E. F., Lopes, R. T., 2008, "Tomografia Computadorizada na Análise de Dano em Arenitos Inconsolidados.", In: *Avances em Análisis por Técnicas de Rayos X*, Arica, 2008. v. 14. p. 305-312.
- Santos, T. M. P., Machado, A. S., Araújo, O. M. O., Lopes, R. T., Ferreira, C. G., 2018 "Evaluation of the influence of acquisition parameters of microtomography in image quality applied by carbonate rocks.", *Journal of Physics: Conference Series.*, v. 975.
- Santos, T. M. P., 2017, *Otimização no processo microtomográfico para análise de rochas carbonáticas. M.Sc, Dissertação, Programa de Engenharia Nuclear, M.Sc, Dissertação, Programa de Engenharia Nuclear, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*
- Schambach, S. J., Bag, S., Schilling, L., Groden, C., & Brockmann, M. A., 2010, "Application of micro-CT in small animal imaging." *Methods.*, v. 50, pp. 2–13.
- Schambach, S. J., Bag, S., Groden, C., Schilling, L., & Brockmann, M. A., 2010, "Vascular imaging in small rodents using micro-CT.", *Methods.*, v. 50, pp. 26–35.
- Simões, C. C., Campos, P. S. F., 2013, "Influência do tamanho do voxel na qualidade de imagem tomográfica: revisão de literatura.", *Revista da Faculdade de Odontologia, (UPF).*, v. 18, n. 3, p. 361-364.
- Singhal, A., Grande, J. C., Zhou, Y., 2013, Micro/Nano-CT for Visualization of Internal Structures, *Microscopy Today*, v. 21, pp. 16-22.
- SKYSCAN: Skyscan 1173 – *Structural parameters measured by Skyscan CT – analyzer programa*, 2009. <<http://bruker-microct.com/products/downloads.htm>> Acesso em 30 mar 2018, às 10:00.
- Teles, A. P., 2016, *Aplicação sa microtomografia computadorizada de Raios X por Dupla-Energia na caracterização de materiais porosos. D.Sc, Tese, Programa de Engenharia Nuclear, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*
- Teles, A. P., Lima, I., Lopes, R. T., 2016, "Rock porosity quantification by dual energy X-ray computed microtomography.", *Micron.*, v. 83, pp. 72 – 78.
- Vidal, F., Assis, J. T., Lopes, R. T., Lima, I., 2014, "2D/3D Quantification of bone morphometric parameter changes using X ray microtomography with different pixel sizes.", *Radiation Physics and Chemistry.*, v. 95, pp. 227 – 229.

Young, I. T., Gerbrands, J. J., van Vliet, L. J., 2004, *Fundamentals of Image Processing*, Delf University of Technology.

Yousefi, Jamileh, 2015, Image Binarization using Otsu Thresholding Algorithm., *ResearchGate*, <https://www.researchgate.net/publication/277076039_Image_Binarization_using_Otsu_Thresholding_Algorithm> Acesso em 20 dez 2018, as 10:20.