



**COPPE/UFRJ**

ESTUDO DA QUALIDADE ÓSSEA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE  
MICROTOMOGRAFIA E MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Erika da Silva Sales

Tese de Doutorado 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 Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Rio de Janeiro

Julho de 2010

ESTUDO DA QUALIDADE ÓSSEA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE  
MICROTOMOGRAFIA E MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Erika da Silva Sales

TESE 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 DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Examinada por:

---

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D.Sc.

---

Profa. Inayá Corrêa Barbosa Lima, D.Sc.

---

Prof. Joaquim Teixeira de Assis, D.Sc.

---

Prof. Marcelino José dos Anjos, D.Sc.

---

Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

JULHO DE 2010

Sales, Erika da Silva

Estudo da Qualidade Óssea Através das Técnicas de Microtomografia e Microfluorescência de Raios X/ Erika da Silva Sales. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2010.

XII, 194 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2010.

Referencias Bibliográficas: p. 135-151.

1. Microtomografia de Raios X. 2. Microfluorescência de Raios X. 3. Qualidade Óssea. I. Lopes, Ricardo Tadeu. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

"Eu acredito no Cristianismo, como acredito no brilho do sol, não simplesmente porque eu o veja, mas porque, através dele, posso ver todas as outras coisas." **C. S. Lewis**

## AGRADECIMENTOS

Durante todo o tempo deste trabalho, eu fui acompanhada e apoiada por várias pessoas. Agora, com grande prazer, tenho a oportunidade de agradecê-los.

Ao meu orientador, professor Ricardo Tadeu Lopes, por toda atenção, disponibilidade e credibilidade de trabalho. Muito obrigada pela oportunidade de ter sido mais uma vez sua orientada.

Ao meu segundo orientador, professora Inayá Corrêa Barbosa Lima, pelo incentivo, supervisão e dedicação durante toda a elaboração, desenvolvimento e conclusão desta tese.

Gostaria também de expressar minha grande gratidão ao professor Joaquim Teixeira de Assis, pela disponibilidade em me atender, por todo auxílio em Matlab, e por todas as discussões e críticas durante a preparação e conclusão da tese.

Ao professor Marcelino José dos Anjos, muito obrigada por toda sua atenção, cooperação e por todo aprendizado em fluorescência de raios X.

Agradeço ao Dr. Carlos Pérez, pelo suporte e orientação oferecidos nas medidas de fluorescência no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS/CNPq.

Ao professor Wagner Coelho de Albuquerque Pereira e ao Dr. Willfrido Gomez Flores, o meu muito obrigada pela grande contribuição na realização deste trabalho, no que diz respeito à limiarização de imagens.

Quero agradecer também ao Programa de Engenharia Nuclear da COPPE/UFRJ e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de trabalho e apoio financeiro.

Agradeço a minha família por todo apoio, mesmo muitas vezes não entendendo minhas escolhas, por todo amor e por ser sempre meu porto seguro. Papi, obrigada por ser meu grande incentivador. Te amo hoje e sempre!

Aos amigos de infância, Ioná, Lucy e Luciane por entenderem a minha ausência de suas vidas nos últimos anos. Aos amigos da igreja Comunidade de Jesus e Rio VIVO, por todo carinho, orações, lágrimas e sorrisos. A Rosana, amiga fiel em todos os momentos. Aos amigos de trabalho, Aline, Alessandra, Davi, Gabriela, Henrique, Roberta, Pedro Taam, Carlos Augusto e Sandro (minha dupla dinâmica), por todo apoio, sorrisos e palavras de incentivos. Em provérbios capítulo 17, versículo 17, diz assim: “Em todo tempo ama o amigo, e na angústia nasce o irmão” (Bíblia Nova Versão Internacional). Considero-me muito abençoada por Deus por ter tantos irmãos.

A Rebecca Greenwood, *my roommate*. Becky, você é a melhor *roommate* que eu poderia ter tido. Muito obrigada por toda a sua paciência, carinho e compreensão, principalmente nos últimos três meses. Claro que eu não poderia me esquecer de toda comidinha gostosa que você fez para mim. Brincadeira! Você é uma grande irmã.

E por último mas não menos importante, agradeço a Deus por tudo. Finalizo meu agradecimento a Deus com a seguinte citação do geneticista Francis S. Collins: “*Scientific discoveries are an opportunity to worship.*”.

Resumo de Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

## ESTUDO DA QUALIDADE ÓSSEA ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE MICROTOMOGRAFIA E MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Erika da Silva Sales

Julho/2010

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes

Programa: Engenharia Nuclear

Neste estudo foi feita a quantificação da densidade mineral, da morfologia e do conteúdo mineral de amostras ósseas provenientes de dois protocolos: hipertireoidismo e envelhecimento. A quantificação da densidade foi feita pela técnica de microtomografia de raios X. As imagens foram corrigidas para o efeito de endurecimento de feixe e calibradas em densidade com hidroxiapatita pura. A quantificação do conteúdo mineral foi feita por mapeamento bidimensional das concentrações dos elementos cálcio, ferro, zinco e estrôncio pela técnica de microfluorescência de raios X. Para a quantificação da morfologia óssea foram comparados três métodos de limiarização, um método visual, um método pelo cálculo da derivada igual a zero, e um método automático baseado na limiarização de Otsu.

Os resultados mostraram mudanças significativas na morfologia, na densidade mineral óssea e no conteúdo mineral para as amostras do protocolo de envelhecimento. Entretanto, para as amostras dos animais do protocolo de hipertireoidismo, não foi encontrado nenhum tipo de desordem. Todos os resultados foram analisados segundo o teste t-student com intervalo de confiança de 95%.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

STUDY OF BONE QUALITY BY X RAY MICROTOMOGRAPHY AND  
MICROFLUORESCENCE TECHNIQUES

Erika da Silva Sales

July/2010

Advisors: Ricardo Tadeu Lopes

Department: Nuclear Engineering

In this study it was done a quantification of the mineral density, the morphology and the mineral content of bone samples from two protocols: hyperthyroidism and aging. The density quantification was made by X ray microtomography technique. The images were corrected to beam hardening and calibrated in density with hydroxyapatite. The mineral content quantification was done by two-dimensional concentration mapping of the elements: calcium, iron, zinc and strontium by X ray microfluorescence technique. For bone morphology quantification, it was used three different methods of threshold: a visual method, a derived zero method and an automatic method based on Otsu's thresholding.

The results showed significant changes in morphology, bone mineral density and mineral content to samples from aging protocol. However, for samples of animals from hyperthyroidism protocol, it was not found any type of disorder. All results were analyzed using t-student test with 95% confidence interval.



# INDÍCE

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Objetivo .....	2
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Microtomografia Computadorizada de Raios X.....	4
2.2 Correções de Endurecimento de Feixe .....	6
2.3 Limiarização .....	9
2.4 Densidade Mineral Óssea .....	12
2.5 Microfluorescência de Raios X .....	15
CAPÍTULO 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....	18
3.1 O Tecido Ósseo .....	18
3.1.1 Processo de Remodelação Óssea.....	20
3.1.2 Qualidade Óssea .....	22
3.1.3 Patogenia da Fragilidade Óssea.....	22
3.1.4 Métodos de Análises da DMO .....	25
3.2 Microtomografia de Raios X .....	29
3.2.1 Imagem com Feixe Cônico.....	32
3.2.2 Métodos de Correções para Endurecimento de Feixe .....	35
3.2.2.1 Filtros.....	35
3.2.2.2 Dupla Energia.....	36
3.2.2.3 Linearização.....	38
3.3 Quantificação da Morfologia Óssea por $\mu$ TC .....	41
3.3.1 Parâmetros Histomorfométricos .....	43
3.3.2 Métodos de Limiarização .....	45
3.3.2.1 Método de Limiarização Visual .....	45
3.3.2.2 Método de Limiarização pela derivada igual a zero.....	48
3.3.2.3 Método de Limiarização OTSU .....	49
3.3.3 Operadores Morfológicos .....	51
3.4 Fluorescência de Raios X .....	54
3.4.1 Microfluorescência de Raios X .....	57

3.4.2 Análise Quantitativa por $\mu$ FRX.....	58
3.4.3 Limite de Detecção.....	63
3.5 A Radiação Síncrotron.....	63
CAPÍTULO 4. CORREÇÃO DE ENDURECIMENTO DE FEIXE E CALIBRAÇÃO DO SISTEMA DE MICROTOMOGRÁFIA .....	66
4.1 Equipamento para Microtomografia de Raios X.....	66
4.2 Correções de Endurecimento de Feixe .....	70
4.3 Calibração do Sistema de Microtomografia .....	74
CAPÍTULO 5. LIMIAÇÃO AUTOMÁTICA PARA SEGMENTAÇÃO DE IMAGEM MICROTOMOGRÁFICA .....	80
5.1 Algoritmo de Limiarização Automático.....	81
5.2 Simulação de Fantoma para Teste de Limiarização em Imagem $\mu$ TC.....	83
5.3 Comparação entre Métodos de Limiarização .....	86
CAPÍTULO 6. DENSIDADE MINERAL E MORFOLOGIA DE AMOSTRAS ÓSSEAS POR MICROTOMOGRÁFIA.....	91
6.1 Amostras Ósseas.....	91
6.2 Resultados por $\mu$ TC.....	94
CAPÍTULO 7. CONTEÚDO MINERAL DAS AMOSTRAS ÓSSEAS DE RATOS POR MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X .....	109
7.1 Curva de Sensibilidade do Sistema de $\mu$ FRX.....	113
7.2 Limite de Detecção das Amostras .....	115
7.3 Absorção e Cálculo das Concentrações Elementares .....	117
7.4 Análise de Amostra Certificada.....	120
7.5 Resultados de $\mu$ FRX para as amostras ósseas .....	121
CAPÍTULO 8. CONCLUSÃO .....	131
CAPÍTULO 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
ANEXO A .....	152

ANEXO B .....	172
ANEXO C .....	185
ANEXO D .....	187

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSE - Elétrons Retroespalhados  
BS/BV - Superfície Óssea  
BV/TV - Volume Ósseo  
CMO - Conteúdo Mineral Ósseo  
DEXA - Absorciometria de raios X por Dupla Energia  
DMO - Densidade Mineral Óssea  
DPA - Absorciometria por dupla emissão de fótons  
DXR - raio X digital  
FRX - Fluorescência de raios X  
 $\mu$ FRX - Microfluorescência de raios X  
 $\mu$ FRX-RS - Microfluorescência de raios X utilizando radiação Síncrotron  
NAA - Análise por ativação neutrônica  
PIXE - Emissão de raios X induzida por partículas carregadas  
pQCT - Tomografia Computadorizada Quantitativa Periférica  
QCT - Tomografia Computadorizada Quantitativa  
QMR - Ressonância Magnética Quantitativa  
RS - Radiação Síncrotron  
SPA - Absorciometria por fóton único  
SXA - Absorciometria por emissão simples de raios X  
Tb.N - Número de Trabéculas  
Tb.Th - Espessura Trabecular  
Tb.Sp - Separação Trabecular  
TC – Tomografia Computadorizada de raios X  
 $\mu$ TC – Microtomografia Computadorizada por raios X  
TH – Limiarização  
QUS – Ultra-sonografia quantitativa  
OMS – Organização Mundial de Saúde

## 1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo, assim como outros tecidos, apresenta um processo maturacional desde as primeiras semanas de vida embrionária até a idade adulta. Na infância e adolescência, a formação óssea ocorre de maneira mais acentuada, e na idade adulta o organismo alcança o pico de massa óssea, definido como o valor máximo de massa óssea atingida antes do início de sua perda. A partir dos 45-50 anos, a tendência natural do organismo é de sofrer uma redução gradativa da massa óssea. Esta perda pode ocorrer de forma exagerada, caracterizando a osteoporose, que tem como consequência o aumento da fragilidade esquelética e do risco de fraturas [1].

A avaliação da massa óssea de um indivíduo é um importante fator no diagnóstico de osteoporose. Uma forma de avaliar essa perda de massa é pela medida da densidade mineral óssea (DMO), ou seja, a quantificação da massa óssea pela área da região do esqueleto radiografada. Algumas técnicas para detectar a diminuição da DMO foram desenvolvidas ao longo dos anos. Atualmente os métodos disponíveis de absorciometria de raios X de dupla energia (DEXA) [2-5] e a tomografia computadorizada quantitativa (QCT) [6], apresentam resolução insuficiente para investigar as variações de mineralização do osso esponjoso. Já as imagens por elétrons retroespalhados (BSE) possuem alta resolução, mas a técnica é destrutiva [7-9], e a tomografia por radiação Síncrotron, apesar de não-destrutiva e com imagens de alta resolução com feixe de raios X monocromático, está disponível em uma base muito limitada [10].

O tecido ósseo saudável reflete uma integração entre a densidade mineral e as propriedades físicas e biológicas, que determinam a qualidade óssea. A qualidade óssea engloba outros aspectos além da densidade mineral, como a arquitetura macro e microscópica do osso, o metabolismo, a capacidade de acumulação de danos (por exemplo: microfraturas) e a composição da matriz óssea e mineral. [11].

Para avaliação da composição da matriz óssea e mineral, novas técnicas têm sido desenvolvidas, e dentre elas, a microfluorescência de raios X ( $\mu$ FRX) tem se destacado. A vantagem em usar a  $\mu$ FRX em relação a outras técnicas que usam elétrons ou

partículas carregadas para a análise multielementar de amostras biológicas, são: pouca dissipação de energia e praticamente nenhum dano térmico nas amostras a serem analisadas. As amostras também podem ser analisadas sem a necessidade de vácuo e baixo *background*, resultando em melhores limites de detecção [12,13].

O outro aspecto importante da qualidade óssea é arquitetura interna, e a microtomografia computadorizada de raios X ( $\mu$ TC) tem sido amplamente utilizada. Esta técnica não se destaca somente em aplicações biomédicas, ela também tem sido aplicada para gerar imagens em alta resolução de objetos volumétricos, tais como: rochas porosas e filtros cerâmicos [12, 14, 15], nos dando uma análise direta em duas e três dimensões de forma quantitativa e qualitativa da ordem de  $10^{-6}$  m. A  $\mu$ TC efetivamente tem se tornado a ferramenta padrão para quantificar a morfologia de materiais porosos, tais como o osso trabecular, apesar de ainda não ter um método de limiarização de imagem estabelecido [12].

## 1.1 Objetivo

O objetivo principal deste trabalho é utilizar as técnicas de microtomografia e microfluorescência de raios X para um estudo da qualidade em amostras ósseas. O diferencial deste trabalho está em usar a vantagem da alta resolução de imagem da técnica de microtomografia de raios X para quantificar a DMO na microarquitetura óssea. Além da DMO, são também quantificados e avaliados a morfologia e o conteúdo mineral ósseo.

A fim de alcançar o objetivo principal deste trabalho, foram estabelecidas as seguintes metas:

- a) A primeira meta é corrigir o efeito de endurecimento de feixe nas imagens microtomográficas e para isto é usado um método de linearização por polinômios. Também é necessária a calibração do sistema de  $\mu$ TC, onde as imagens microtomográficas são transformadas de níveis de cinza para densidade (massa por volume -  $\text{g}/\text{cm}^3$ ), para a quantificação da DMO.

- b) A segunda meta é testar alguns métodos de limiarização de imagem para que seja possível escolher o de melhor desempenho, já que este assunto é um dos mais importantes na quantificação e processamento de imagens.
- c) E a terceira meta é obter o mapeamento bidimensional da concentração do conteúdo mineral ósseo (CMO) pela  $\mu$ FRX das amostras ósseas analisadas.

No próximo capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica contemplando os assuntos de maiores relevância para alcançar o objetivo principal deste trabalho.

No capítulo 3 são apresentados os fundamentos teóricos tais como tecido ósseo, microtomografia de raios X, métodos de limiarização de imagens e microfluorescência de raios X.

Segue, no capítulo 4 a descrição da metodologia adotada na correção do efeito de endurecimento de feixe, e na calibração do sistema microtomográfico.

Posteriormente, no capítulo 5, é feita uma comparação do desempenho entre um método de limiarização de imagens automático e métodos de limiarização visual.

No capítulo 6 e 7 são apresentadas as quantificações da DMO, histomorfométricas e CMO por  $\mu$ TC e  $\mu$ FRX, de amostras ósseas provenientes de dois protocolos de estudo em ratos.

E por último, no capítulo 8 são apresentadas as conclusões deste trabalho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Microtomografia Computadorizada de Raios X

A microtomografia computadorizada de raios X é uma variante da tomografia de raios X convencional e surgiu com a necessidade de se inspecionar amostras com estruturas muito pequenas (da ordem de micrômetros).

Em 1989 FELDKAMP et al [16] desenvolveram um método para examinar a estrutura de ossos esponjosos utilizando a microtomografia 3D com a vantagem ser uma técnica não destrutiva. A quantificação das estruturas ósseas foi baseada na análise histomorfométrica que é fundamentada pelo conceito de esteorologia. Os parâmetros quantificados foram: razão entre o volume ósseo e volume total da amostra (BV/TV); a razão entre a superfície óssea e seu volume (BS/BV); a separação média entre as trabéculas (Tb.Sp); a densidade de trabéculas (Tb.N) e a espessura média das trabéculas (Tb.Th). A reconstrução tridimensional permitiu uma descrição compreensiva da variação estrutural óssea.

MÜLLER et al [17] fizeram um estudo comparativo entre quantificação histomorfométrica pela  $\mu$ TC e a histomorfometria convencional. Para isto, foram avaliadas biopsias de osso humano. Os resultados mostraram correlações lineares altamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre a histologia convencional e  $\mu$ TC para BV/TV ( $r = 0,93$ ), BS/TV ( $r = 0,91$ ), Tb.Th ( $r = 0,84$ ), e Tb.Sp ( $r = 0,91$ ). A diferença média percentual entre histologia e  $\mu$ TC variou de 2,5% (BV/TV)% para 6,1 (Tb.Th). Os autores ainda concluíram que a  $\mu$ TC é uma técnica não-destrutiva, rápida e muito precisa que permite a medição do osso esponjoso e compacto em biópsias ou pequenos ossos, bem como a determinação automática tridimensional dos índices morfométricos.

De ASSIS [18] em 1992 apresentou um sistema microtomográfico com características de um tomógrafo de primeira geração, com tubos de raios X convencionais e um subsistema mecânico (translação e rotação), com precisão micrométrica. Foi usada uma amostra de dente infantil para teste do sistema, e este conseguiu distinguir a camada de esmalte que recobre o dente e o diâmetro do canal



central. A análise revelou que era possível identificar regiões de interesses com resolução de 20  $\mu\text{m}$ .

YANG et al [19] avaliaram a influência da resolução espacial da microtomografia de ossos de ratos. Eles mostraram que com uma resolução de 15  $\mu\text{m}$  era possível notar uma mudança estrutural nas amostras de tíbias entre os dois grupos de amostras estudados.

PATEL et al [20] investigaram a variação da arquitetura óssea de joelhos em relação a região e profundidade. Eles utilizaram 11 amostras de joelhos incluindo a patela, a região distal do fêmur e a tíbia de cadáveres entre 59 e 74 anos de idade. Oito amostras foram classificadas como normais e as outras com algum tipo de artrite. Foram analisados os parâmetros BV/TV, TbN, TbSp e TbTh e nos primeiros 6 mm de profundidade da amostra apresentaram um acréscimo significativo e após esta profundidade se estabilizaram, não havendo uma variação relevante. Ao comparar as regiões anatômicas, fêmur e tíbia, os parâmetros se mostraram maiores na região da tíbia, com exceção de TbSP que teve um comportamento inverso aos demais parâmetros. Os autores concluíram ainda que a micrtomografia demonstrou ser uma excelente ferramenta para análise quantitativa e qualitativa da microestrutura óssea.

BOYD et al [21] monitoraram a evolução de alterações da microestrutura óssea em ratas ovariectomizadas *in vivo*. Neste estudo os autores utilizaram 20 fêmeas com oito meses de idade. A região monitorada foi da tíbia direita e as microtomografias foram realizadas em intervalos de um mês durante seis meses. Os resultados mostraram que as ratas tiveram uma grande diminuição da fração de volume ósseo (BV/TV), sendo maior acentuado nos três primeiros meses (72%). O estudo mostrou a viabilidade da realização da análise histomorfométrica *in vivo* através da  $\mu\text{TC}$ , com a vantagem de que cada animal pode ser seu próprio controle.

## 2.2 Correções de Endurecimento de Feixe

Quando um feixe de raios X policromático atravessa um objeto, os fótons de baixa energia são mais removidos do feixe, devido ao fato do coeficiente de atenuação linear diminuir com o aumento da energia. Como resultado, o feixe se torna gradualmente mais “duro”, ou seja, há um aumento da sua energia média. Por conseguinte, a atenuação total, dado pelo logaritmo da razão do feixe de raios X incidente e atenuado, já não é uma função linear da espessura do absorvedor. Se este efeito não linear do endurecimento do feixe não é compensado, as imagens reconstruídas em microtomografia de raios X serão corrompidas por artefatos borda, estrias, e artefatos circulares [22]. Além disso, uma análise quantitativa dos dados de  $\mu$ TC não será possível. Assim, a correção para este artefato se torna um assunto de extrema importância para a obtenção de dados quantitativos.

Desde a criação do primeiro tomógrafo computadorizado (TC) em 1972 [23], uma enorme quantidade de propostas para correção de endurecimento de feixe tem sido encontrada na literatura, e CHO [24], McCULLOUGH *et al* [25], SHEPP e LOGAN [26] foram os primeiros a levantar o problema sobre os artefatos em imagem para diagnóstico devido à heterogeneidade dos feixes de raios X.

BROOKS e Di CHIRO [27] fizeram um estudo dos efeitos de endurecimento de feixe em reconstruções tomográficas. Para isto eles simularam três situações: primeiro eles estudaram os efeitos do endurecimento de feixe em tomografias de osso. Na segunda, eles estudaram os efeitos que apareceram nas imagens de um *CAT scanner* que não utilizavam bolsas de água. As bolsas de água foram introduzidas pela EMI Ltd [28] para diminuir a distorção das projeções. E por último, foram consideradas ambas as situações, e os resultados foram aplicados à cabeça humana na qual o número expressivo de estudos foi executado, e onde o endurecimento de feixe efetivo ficou aparente. Eles concluíram que em ambos os casos o endurecimento de feixe pode ser minimizado usando préfiltragem adicional ao feixe e/ou pela linearização do sinal no detector.

HERMAN [29] em 1979 investigou como se poderia relacionar a atenuação total,  $p$ , de um feixe de raios X polienergético com a atenuação total,  $m$ , de um feixe

monoenergético. Ele mostrou que para feixes com espectro de raios X típico para diagnóstico passando através do corpo humano era possível encontrar uma função simples  $f$ , tal que a  $f(p)$  era suficientemente próximo de  $m$ , e esta aproximação permitiram boas reconstruções. Todo o procedimento usado por HERMAN em seu trabalho pode ser visto no capítulo 3.

STONESTRON *et al* [30] revisaram as técnicas clássicas da época para correção de artefatos devido ao endurecimento de feixe de raios X. As técnicas de correções eram baseadas na linearização ou por pré filtração dos feixes de raios X. Os autores ressaltaram a dificuldade de se encontrar um absorvedor que possa filtra os raios X sem perder a intensidade dos fótons deste.

COLEMAN e SINCLAIR [31] propuseram em seu trabalho medidas usando duas energias, para obter dois raios somas poli energéticos  $p_1$  e  $p_2$ , e assim poder relacioná-los com o raio soma mono energético  $m$  através da seguinte equação:

$$m = a_{\infty} + \sum_{j=1}^{n_1} a_{1j} p_1^j + \sum_{j=1}^{n_2} a_{2j} p_2^j \quad (2.1)$$

Os valores de  $p_1$  e  $p_2$  foram obtidos pela calibração do sistema com água e alumínio de espessuras variáveis, de 0-2,5 cm e 5-25 cm respectivamente. Para os valores de  $p_2$  o espectro de raios X de 75 KeV foi filtrado com 2 mm de cobre e para os valores de  $p_1$  não foi utilizado nenhuma filtração. Foram feitos dois testes para avaliar o uso das correções propostas. No primeiro teste foi avaliada a correção para número de TC e no segundo testes para artefatos devido ao endurecimento de feixe. As correções aumentaram o valor médio do número de TC, mas reduziram a variação devido ao endurecimento de feixe. Para a implementação das correções de endurecimento de feixe nas imagens tomográficas obtidas do *scanner* EMI TC5005 através da equação 2.1 anteriormente foi desenvolvido um programa em *FORTRAN IV*.

GOODSITT [32] em 1985 fez uma simulação computacional para estudar os erros devido ao endurecimento de feixe, em tecidos adiposos e ósseos após o processamento de imagens, que utilizaram a técnica de duas energias em tomografia computadorizada. Para isto ele empregou um método de calibração no qual ele inseriu materiais padrão

dentro de um fantoma com tamanho semelhante a um paciente. O estudo indicou que para uma situação realística, os materiais padrões variavam e que a contribuição do endurecimento de feixe devido ao tecido adiposo e ósseo era pequena, e que estes erros poderiam ser minimizados se fosse feito uma calibração utilizando um fantoma com três tamanhos de corpos diferentes.

PAIVA *et al* [33] propuseram correções de endurecimento de feixe em um sistema de microtomografia de raios X para análise quantitativa de diferentes minerais, em amostras de rocha de reservatório de petróleo. Para isto eles levantaram os espectros de alvos de ouro (14 keV) e nióbio (10 keV), sem filtração e com filtros de grafite, cobre e nióbio. Eles concluíram que o uso de filtros, embora reduzindo os artefatos, não pôde eliminar o efeito de endurecimento de feixe sem a redução severa da intensidade dos raios X.

HSIEH *et al* [34] em 2000 apresentaram correções interativa de endurecimento de feixe para uma fonte raios X com feixe cônico. Foi desenvolvido um algoritmo que utilizou geometria de feixe paralelo inclinado e subseqüentemente foi empregado para estimar o erro de projeção e corrigir as projeções de feixe cônico. Uma análise teórica foi executada para investigar a precisão do método, e a análise indicou que a aproximação do feixe paralelo inclinado foi adequada para a aplicação. No trabalho foi mostrado que a vantagem desta aproximação foi a redução significativa na complexidade computacional de estimar o erro na reconstrução. Eles também apresentaram uma fórmula de reconstrução para a geometria de feixe paralelo.

JIAN e HONGNIAN [35] propuseram um método de correção envolvendo operações simples de sinograma das projeções originais de uma fonte raios X policromática. O princípio de correção foi deduzido através de dois teoremas matemáticos. Foram obtidos resultados de correções excelentes para dados simulados e dados experimentais de dois fantasmas. Segundo os autores o método possuía duas vantagens excelentes comparadas com o método convencional de ajuste polinomial, primeiro de que não eram necessárias imagens anteriores com operações complexas para criação de um modelo de correção, e segundo de que a validade não estava limitada pela composição e condições do objeto tomografado.

SOURBELLE *et al* [36] em 2005 apresentaram um algoritmo para corrigir o efeito de *cupping* devido ao endurecimento de feixe em imagens de TC médica. O método proposto foi empírico e não necessitou do conhecimento do espectro e dos coeficientes de atenuação. O método visa a linearização dos dados utilizando uma função polinomial de pré-correção. Os coeficientes do polinômio foram determinados a partir de um ajuste linear de algumas imagens de uma fonte de raios X policromática combinado com os dados de um modelo definido. O modelo foi obtido a partir das imagens reconstruídas de um fantoma de água. Segundo os autores o método se mostrou eficaz.

VEDULA E MUNSHI [37] em 2008 utilizaram um algoritmo, desenvolvido em seus trabalhos anteriores para simular imagens, e implementaram este algoritmo para dados experimentais obtidos a partir de um TC *scanner*. A projeção dos dados (obtidos experimentalmente) foi usada diretamente como passo inicial do algoritmo. Para correção foi considerado que o espectro da fonte de raios X seria como o espectro de HERMAN [29] e foi utilizada também uma função polinomial para corrigir as projeções. Além disso, uma análise de erro foi aplicada para a remoção de erro inerente.

### 2.3 Limiarização

A forma simples de segmentação de imagem é pela limiarização (ou *thresholding*) que é uma das mais importantes abordagens para a segmentação de imagens médicas. Na limiarização é analisada a similaridade dos níveis de cinza da imagem extraindo os objetos de interesse através da seleção de um nível que separa os agrupamentos de tons de cinza. A determinação do nível de TH para binarização de imagens é um dos maiores problemas na quantificação histomorfométrica de ossos através da microtomografia de raios X.

HARA *et al* [38] investigaram como os parâmetros morfológicos e as propriedades mecânicas podem ser afetados por pequenos erros no valor limite de TH. Para tal investigação foram microtomografados biópsias de vértebras de porco fêmea com 6, 23 e 230 semanas. Para cada amostra em forma de cubo, cinco limiares foram

determinados dentro do intervalo de limiares que um observador pode selecionar de forma realística, em passos de 0,5%. Uma variação de 0,5% no limiar resultou em uma diferença de 5% na fração de volume do osso (BV/TV) e uma diferença de 9% na rigidez máxima para cubos de osso com  $BV/TV < 0,15$ . Para  $BV/TV > 0,2$  essas diferenças foram apenas 2% e 3%, respectivamente. Para todas as amostras as diferenças de espessura trabecular e superfície óssea foram maiores que 3%. Os efeitos sobre a anisotropia e número trabecular foram insignificantes para as variações de limiar de 0,5%. Com os resultados os autores concluíram que a seleção de limiar foi importante para a determinação exata da fração de volume e propriedades mecânicas, principalmente para as frações de baixo volume de osso, e que a direção da arquitetura óssea foi menos sensível a alterações no limiar.

RÜEGSEGGER *et al* [39] também investigaram a microarquitetura óssea de biópsias. As amostras foram de crista ilíaca com  $8 \times 10 \text{ mm}^2$  e os autores afirmaram que os índices estruturais determinados pela  $\mu\text{TC}$  eram dependentes dos valores de TH utilizados na binarização das imagens, e por esta razão eles utilizaram um valor de TH fixo escolhido visualmente. Segundo os autores, as amostras possuíam uma relação de contraste osso/medula muito alto, o que permitiu que o processo de limiarização pela escolha visual do valor TH fosse rápido e eficiente.

MARTÍN-BADOSA *et al* [40] desenvolveram um método automático para a caracterização da arquitetura óssea em imagens microtomográficas 3D com fonte Síncrotron em um modelo de osteoporoses em ratos. A região para quantificação escolhida foi a metáfise distal de fêmur de cada rato. As amostras utilizadas foram de 16 ratos machos que foram sacrificados com 16 semanas de idade e divididos em dois grupos: 8 controles e 8 submetidos a um modelo de perda massa óssea por suspensão caudal. As imagens foram segmentadas com um valor de TH fixo igual a 100 de forma a separar o osso do *background*. Dentro de cada volume reconstruído e segmentado, uma ROI foi definida e osso trabecular e cortical foram automaticamente separados levando em conta considerações geométricas, como o osso cortical recobri toda região trabecular e é mais compacto. Os parâmetros morfológicos e topológicos foram quantificados nas duas regiões. Para a ROI trabecular foram quantificados as frações de volume ósseo BV/TV, superfície óssea BS/BV, espessura trabecular Tb.Th, número trabecular Tb.N, separação trabecular Tb.Sp, e adicionalmente a conectividade

trabecular pelo método de Euler (modelo dependente). Alguns dos parâmetros anteriores (BS/BV, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp) foram quantificados novamente usando um método de placas paralelas como modelo para a estrutura do osso trabecular, e foram comparados com os anteriores (modelo independente). Uma análise de porosidade também foi feita através da análise da estrutura e tamanho de poros na região cortical. Os resultados indicaram uma perda de massa óssea relacionada com um afinamento das trabéculas dos ratos submetidos a perda óssea por suspensão caudal em ambos modelos. No entanto, o modelo independente foi mais preciso que o modelo dependente, e em relação a conectividade não foi apresentada nenhuma mudança significativa para os dois grupos de animais.

LIMA *et al* [41] investigaram os efeitos de álcool na microarquitetura óssea em amostras de fêmur de ratos machos/fêmeas com idades diferentes. Os autores colocam a importância da limiarização para quantificação histomorfométrica, e que este ainda é um assunto crítico, pois não existe um padrão desenvolvido para o cálculo de TH. Eles mostram que a escolha de um limiar é muito importante, pois se o valor de TH for muito alto as trabéculas acabam ficando super espessas e se o valor for muito baixo as trabéculas ficam muito finas e no final obtendo-se um valor subestimado. Neste estudo, os autores selecionaram cuidadosamente a derivada parcial dos valores de volume de osso em relação ao valor de limiar.

OTSU [42] apresenta um novo método de cálculo automático de limiar para segmentação baseado na normalização do histograma das imagens como função de densidade de probabilidade discreta. Um ótimo limiar é selecionado pelo critério de discriminante, isto é, os níveis de cinzas são separados em duas classes que são o fundo e o objeto, considerando as variâncias entre as classes e a variância total. O método pode ser estendido para problemas com *multithreshold*.

ZHANG e HU [43] propuseram um método de limiarização de imagem baseado no método de OTSU com análises de histograma em 2D. O histograma foi adquirido das projeções das imagens 2D, e um algoritmo para encontrar os extremos do histogramas das imagens projetadas foi proposto com base na transformada *wavelet*. O algoritmo foi testado em imagens de biopsias de rins.

ZHANG *et al* [44] desenvolveram um algoritmo de preservação limite de conectividade, o Limiarização de Conectividade Estável (CST). O algoritmo foi baseado no acoplamento dos parâmetros topológicos e geométricos de conectividade e um modelo de índice de estrutura (SMI). O algoritmo foi testado em imagens microtomográficas de fêmur feminino com 66 anos de idade, e o resultado foi comparado com outros métodos de limiarização baseado na fração de volume e histograma. Os resultados mostraram que as mudanças em BV/TV, baseado no histograma, mostram um melhor resultado para o CST em relação aos outros métodos de limiarização, ou seja que o CST teve um melhor efeito de segmentação. Outra vantagem do método, segundo os autores, é que este pode ser aplicado diretamente em imagem 3D.

## 2.4 Densidade Mineral Óssea

Vários investigadores têm usado a Tomografia Computadorizada (TC) para medir a densidade mineral óssea (DMO) em vários locais do esqueleto humano. RUEGSEGGER *et al* [45] em 1974 foram os primeiros a descrever o uso da TC para estimar a densidade do osso e mostrou que a DMO em fêmures humanos poderia ser medido com uma precisão de 1%.

REICH *et al* [46] tomografaram amostras de tíbia e fibula de dez cadáveres e obtiveram uma correlação alta ( $r = 0,97$ ) entre o número de TC medido em um tomógrafo da *Ohio Delta Nuclear* e o conteúdo de cálcio do osso cortical, com uma dispersão de aproximadamente 6%.

ISHERWOOD *et al* [47] em 1976 modificaram um scanner de cabeça da EMI Ltd para quantificar a DMO no osso rádio e obtiveram uma reprodutibilidade de 0,2% *in vitro* e 1,5% *in vivo*.

POSNER e GRIFFITHS [48] informaram uma precisão de 3% a 4% quando compararam a DMO de ossos de cães determinadas *in vivo* em um TC, em relação a concentração de cálcio. Eles também acharam uma correlação alta com a absorciometria por fóton único (SPA).



REVAK [49] em 1980 encontrou um erro de 2,3% entre a medida de densidade por TC com um *Acta 0200 FS scanner* (tomógrafo de segunda geração) e a análise química de osso cortical de fêmur de cadáver. Estas investigações com os primeiros *scanners* comercialmente disponíveis apoiaram a tese que a TC poderia ser usada para medir DMO com precisão, ambos em osso cortical e osso trabecular.

ADAMS *et al* [50] mediram ossos trabeculares da região distal do fêmur com conteúdo mineral médio de  $79 \text{ mg/cm}^3$  (comparado com  $180 \text{ mg/cm}^3$  para vértebra normal) usando ambos TC com uma e duas energias. Para os dados de uma energia, a dispersão foi de 22 unidades sobre uma média de 515 unidades de TC; uma melhoria foi vista quando o número atômico efetivo foi comparado com a concentração de cálcio para duas energias, mas esta diferença não foi quantificada.

MERCER e ANDERSON [51] sugeriram um estudo piloto para investigar os efeitos de laser de dióxido de carbono no esmalte de dentes e para isto eles mediram as mudanças da densidade mineral nos dentes através dos níveis de cinza das imagens microtomográficas. Os resultados mostram a habilidade da microtomografia para exibir alta resolução das imagens bidimensional, e quantificar mudanças em densidade mineral dentro das amostras.

ANDERSON *et al* [52] utilizaram um microtomógrafo para calcular o conteúdo mineral de dentes humanos permanentes com uma resolução de 15-30  $\mu\text{m}$ . O conteúdo mineral médio foi calculado através dos coeficientes de atenuação lineares determinados nas imagens microtomográfica e os autores assumiram o componente inorgânico das amostras como hidroxiapatita. Os valores encontrados foram comparados com estudos semelhantes de esmalte coronal e dentina de pré-molares permanente superior. Os resultados sugeriram que o processo de mineralização da dentina difere da região coronal permanente.

POSTNOV *et al* [53] em 2003 desenvolveram um método para medir densidade do cálcio em amostras ósseas utilizando a técnica de  $\mu\text{TC}$ . As microradiografias foram adquiridas de fêmures de ratos. Os autores empregaram uma correção polinomial para endurecimento de feixe. Os níveis de cinzas foram calibrados com os valores da

densidade mineral do cálcio. O conteúdo de cálcio foi calculado diretamente do histograma das imagens e expresso como percentual da relação do volume e peso das amostras ósseas.

WONG *et al* [54] determinaram a distribuição da concentração mineral em cilindros de 2x2 mm de 11 dentes molares de leite através da microtomografia para estudo de cáries. A concentração mineral média para todos os dentes foi de 2,81 ( $\pm 0,065$ ) g cm<sup>-3</sup>. A diferença na concentração mineral entre o esmalte interno e externo variou de 1,5 a 8,7%. Os autores concluíram que devido a variação das concentrações minerais encontradas seria necessário ter uma base de dados para estudo de cáries em dentes de leite.

NAZARIAN *et al* [55] em 2008 levantaram a necessidade de se avaliar a variação dos parâmetros de imagens microtomográficas tais como tensão, corrente, tempo de integração, distância fonte-detector e número de projeções na relação entre densidade equivalente dos tecidos em estudo e seu coeficiente de atenuação linear. Para avaliar estes parâmetros os autores selecionaram dois fantomas; o primeiro foi confeccionado utilizando K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> líquido em resina e o segundo fantoma foi de hidroxiapatita produzido pela companhia *Scanco Medical AG*. Eles concluíram que a corrente, o tempo de integração e o número de projeções não interferiam na conversão entre densidade equivalente e coeficiente de atenuação para os dois fantomas ( $p > 0,05$  para todos os dados). Já para os parâmetros tensão, distância fonte-objeto e tamanho do *pixel* do detector afetaram significativamente a relação entre coeficiente de atenuação e densidade equivalente para os fantomas *Scanco* e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( $p < 0,05$ ). Os autores concluíram que o fantoma *Scanco* pode ser usado para avaliar densidade mineral de osso porém, ele não pode ser escaneado em campos de magnificação de imagem maiores do que usados nos equipamentos de microtomografia. Em relação ao K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pode ser utilizado para calibrar qualquer sistema de microtomografia para quantificação da densidade mineral e lembraram que como qualquer fantoma de calibração líquido com o passar do tempo eles seriam suscetíveis à degradação.

## 2.5 Microfluorescência de Raios X

O princípio da fluorescência de raios X (FRX) é conhecido desde 1913, quando Henry G. J. Moseley, verificou a relação entre o número atômico de um elemento ( $Z$ ) e seu comprimento de onda, ou da energia, dos raios X característicos emitidos. Até 1966 a FRX era realizada unicamente por espectrômetros por dispersão por comprimento de onda [56]. Com o desenvolvimento dos detectores semicondutores, foi surgindo a aplicação da fluorescência de raios X por dispersão em energia como uma técnica de análise multielementar em diversas áreas, como por exemplo, na biologia [57].

CRISS e BIRKS [58] utilizaram os princípios físicos da produção de raios X e desenvolveram o método dos parâmetros fundamentais. Este método se baseia na solução de equações que descrevem a dependência da intensidade da radiação fluorescente em relação os parâmetros físicos e instrumentais.

BRADLEY e FARQUHARSON [59] fizeram um estudo da composição do corpo humano em relação aos metais chumbo e ferro, *in vivo*. Segundo os autores para um tempo de contagem da irradiação de 1000 s, o chumbo e o ferro puderam ser detectados no nível de  $10 \mu\text{g (g pele)}^{-1}$ .

TODD et al [60] fizeram um estudo *in vivo* dos níveis de chumbo em amostras de tibia humanas. As amostras foram trituradas e as concentrações foram medidas com a FRX por dispersão em energia, e observaram uma concentração deste metal de 6 a 13  $\mu\text{g}$  por grama de osso.

Dentre as variantes das técnicas de FRX, a microfluorescência de raios X ( $\mu\text{FRX}$ ) é uma ferramenta moderna para examinar composição elementar de vários tipos de amostras, dentre elas o osso. Uma vantagem importante da técnica da  $\mu\text{FRX}$  é que o feixe primário pode ser focalizado até um tamanho muito pequeno, e assim permitir a análise de estruturas da ordem de  $10^{-6}$  m.

Os primeiros pesquisadores a aplicar a técnica de  $\mu\text{FRX}$  foram NICHOLS e RYON, em 1987, descrevendo a capacidade da instrumentação de linhas *scans* de ouro e platina [61]. Em 1997 BERNASCONI *et al* [62] realizaram um estudo sobre o sistema

de microfluorescência de raios X utilizando capilar de vidro, demonstrando algumas vantagens da fluorescência de raios X comparada com a excitação por prótons ou elétrons, como: baixa dissipação de energia, praticamente não ocasionando danos térmicos na amostra a ser analisada; as amostras podem ser analisadas no ar e assim elementos voláteis são observados; as amostras podem ser não condutoras; e por último, boa razão sinal-ruído resultando em menores limites de detecção.

GERHARDSSON *et al* [63] analisaram os níveis de chumbo em ossos corticais e esponjosos de trabalhadores expostos a este mineral. Os estudos mostraram que os trabalhadores possuíam uma maior concentração de chumbo nos ossos dos dedos, vértebras e crista ilíaca em relação ao grupo controle.

Os espectrômetros de  $\mu$ FRX podem ser divididos em dois grupos: os portáteis ou fixos em laboratórios, que utilizam tubos de raios X como fonte de excitação e capilares ópticos como condensadores do feixe incidente; e os que utilizam a radiação Síncrotron (RS) com detectores compactos, com boa resolução, ajustados para altas contagens [64, 65].

HUANG *et al* [66] estudaram amostras cancerígenas e não cancerígenas de fígado e osso utilizando a microfluorescência de raios X com radiação Síncrotron ( $\mu$ FRX-RS). Os autores puderam identificar diferenças nos elementos de traços presentes nas amostras cancerígenas em relação às amostras normais. Os resultados encontrados estavam de acordo com os resultados encontrados em outros métodos analíticos; como a análise por ativação neutrônica (NAA) e a técnica de emissão de raios X induzida por partículas carregadas (PIXE).

HOMMA *et al* [67] utilizaram a  $\mu$ FRX-RS para mapear bidimensionalmente amostras de rins humanos. Os resultados mostraram que os elementos Cu, Se e Zn se acumulavam mais no córtex renal do que na medula e as imagens da distribuição de Cu e Zn obtidas pela  $\mu$ FRX-RS foram consistentes com a distribuição adquirida pela técnica de absorção atômica.

LIMA *et al* [68] caracterizaram a estrutura óssea de amostras da cabeça femoral de ratos utilizando a  $\mu$ FRX-RS para obter mapas bidimensionais da distribuição dos

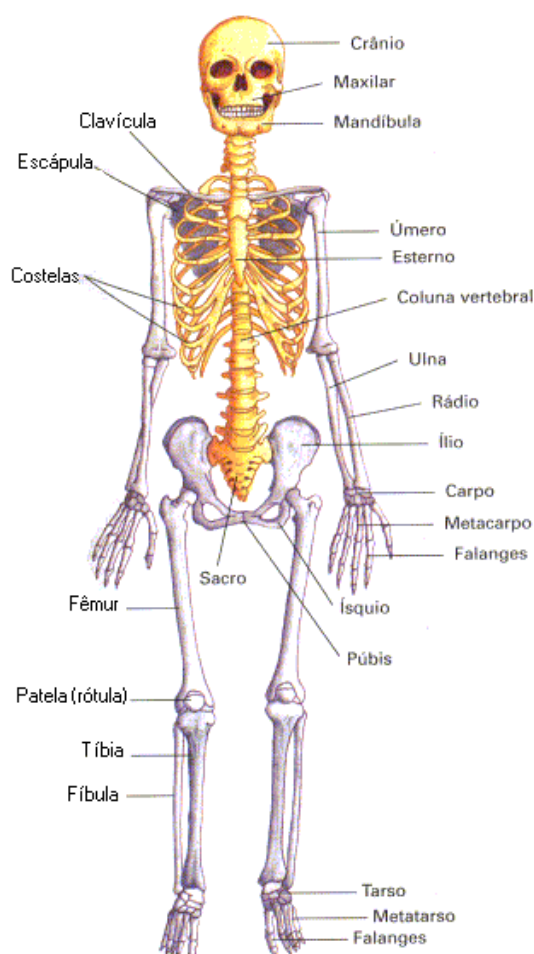
minerais nas regiões cortical e trabecular. Os pesquisadores concluíram que ambos a concentração e a distribuição dos minerais variaram significativamente entre os grupos, principalmente em relação ao elemento cálcio, dependendo da localização e da região óssea estudada.

FUKUMOTO *et al* [69] revisaram as aplicações da  $\mu$ FRX que utilizam fontes convencionais e fontes Síncrotrons e suas aplicações para amostras biológicas. Os autores utilizaram um capilar óptico na instrumentação e produziram mapas da distribuição elementar de amostras de plantas. Eles concluíram que a  $\mu$ FRX mostrou ser uma potente técnica não destrutiva para monitorar a distribuição elementar em tempo real.

### 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 3.1 O Tecido Ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado e caracteriza-se como o tecido mais duro, forte e resistente. Estas características é devido ao sal ósseo, uma substância basal que consiste de uma combinação de pirofosfato de cálcio e carbonato de cálcio, com quantidades menores de magnésio, sódio e cloro necessários para a manutenção da homeostasia mineral, combinado com o colágeno. Através da função estrutural, o osso é fundamental para locomoção, respiração e proteção dos órgãos internos. Através da função metabólica, atua como reservatório de cálcio e fósforo [70]. Na figura 3.1 pode ser visto um esquema do sistema esquelético humano.

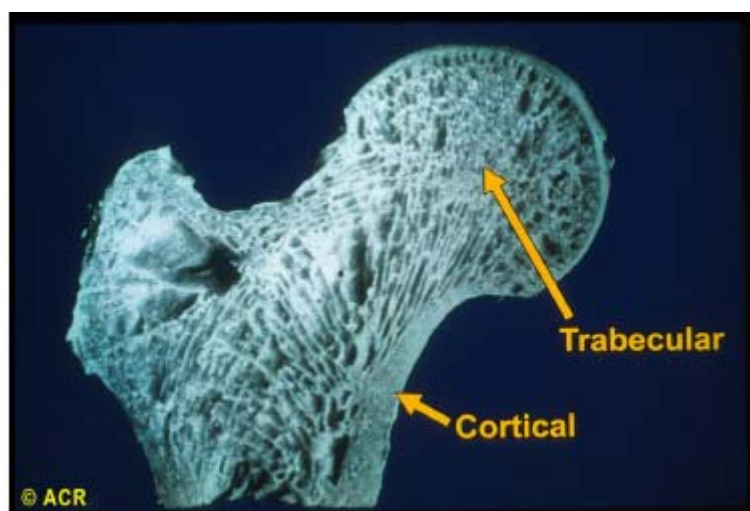


**Figura 3.1:** Sistema esquelético humano [71].

Do ponto de vista macroscópico, os ossos podem ser divididos em dois principais grupos: o esqueleto axial e o esqueleto apendicular. O esqueleto axial consiste de 80 ossos, englobando o crânio, a coluna vertebral e as costelas. O esqueleto apendicular adulto consiste de 126 ossos que configuram os membros superiores e inferiores. Os ossos variam, consideravelmente, de tamanho e formato, existindo quatro categorias gerais de formato: ossos longos, ossos curtos, ossos chatos e ossos irregulares. Alguns ossos podem pertencer a mais de uma categoria, como é o caso dos pequenos ossos do punho que são categorizados como curtos e irregulares.

A distribuição e organização do osso podem-se distinguir dois tipos de tecido ósseo: cortical e trabecular. Esta divisão é evidenciada na figura 3.2:

1. **Osso Cortical (ou compacto ou lamelar ou denso):** O osso cortical representa 70-80% da massa óssea total, sendo encontrado na superfície exterior de todos os ossos. A sua principal função é a de conferir rigidez ao osso, dependendo a sua proporção relativa, da função e solicitação mecânica do respectivo osso. Caracteriza-se por um valor de fração volumétrica (razão volume de massa óssea/volume total) próximo da unidade, o que justifica a denominação, por vezes utilizada, de osso compacto.
2. **Osso Esponjoso (ou trabecular ou cancellous):** O osso trabecular corresponde aos restantes 20-30% da massa óssea, estando localizado na porção interior do osso. Ele consiste numa estrutura reticular porosa, com densidade variável e relativamente baixa, que confere flexibilidade e resiliência à estrutura óssea global. Estas propriedades advêm da sua capacidade de absorção de energia proveniente de impactos. Caracteriza-se, ainda, por apresentar um valor relativamente baixo de fração volumétrica, compensando com uma área de superfície, aproximadamente, duas vezes superior à do osso compacto.



**Figura 3.2:** Tipos de osso: trabecular e cortical (adaptado de [72]).

### 3.1.1 Processo de Remodelação Óssea

Para a manutenção da homeostasia mineral, o esqueleto é continuamente destruído e reconstruído, em um processo denominado remodelação ou remanejamento ósseo. Sendo assim, o osso caracteriza-se como um tecido extremamente ativo. No esqueleto em desenvolvimento essa atividade contempla não apenas o crescimento, mas também a modelação óssea, processos pelo qual o osso atinge a respectiva forma e tamanho. No esqueleto adulto, o crescimento e a modelação óssea se reservam apenas para reparar fraturas e microfraturas. A atividade metabólica normal do esqueleto adulto envolve predominantemente a remodelação. O processo desenvolve-se em unidades de remodelação óssea e caracteriza-se pelo acoplamento das funções dos osteoblastos e dos osteoclastos, respeitando-se local e tempo [73].

Os osteoblastos são células uninucleadas de forma variável, com origem em células progenitoras mesenquimatosas do estroma da medula óssea. Entre as suas funções encontra-se a síntese de precursores metabólicos da matriz óssea, e regulação da sua mineralização, o que os torna responsáveis pela deposição de osso nos locais de reabsorção.

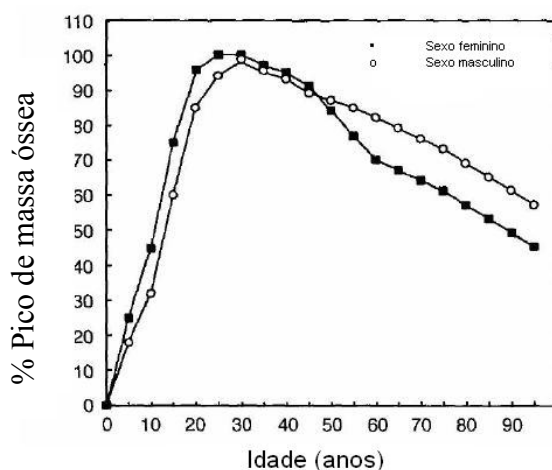
Os osteoclastos são células multinucleadas, derivadas de células hematopoiéticas da linhagem monócito-macrofágica, cuja síntese é controlada/regulada por moléculas



sintetizadas pelos osteoblastos. Apresentam uma atividade antagônica aos osteoblastos, no que diz respeito à remodelação óssea já que são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo.

O processo de remodelação óssea, que resulta da ação acoplada dos osteoblastos (deposição de osso) e dos osteoclastos (reabsorção de osso), é de importância extrema para o equilíbrio metabólico do cálcio e fósforo, e na reparação de microdanos ósseos, que se acumulam ao longo do tempo.

O balanço do ciclo de remodelação óssea vai determinar o ganho, a perda ou a manutenção da massa óssea atual. O paradigma atual da evolução da massa óssea aponta para um valor máximo de aumento de massa óssea durante o início da puberdade (fase de crescimento), e para um pico entre os 25 e os 35 anos [74]; a figura 3.3 ilustra esta evolução. O sexo masculino apresenta um pico de massa óssea com um valor mais elevado, o que se explica principalmente pela sua maior dimensão corporal [74]; por outro lado, o decréscimo de massa óssea no sexo feminino é muito mais acentuado, no início da menopausa (45-55 anos), devido à deficiência em estrogênios.



**Figura 3.3:** Evolução da massa óssea com a idade (adaptado de [75]).

O pico de massa óssea depende majoritariamente (75-80%) de fatores genéticos, mas também de fatores ambientais (20-25%). Entre estes, destacam-se o histórico clínico do qual podem fazer parte doenças que por si, ou pelas terapêuticas associadas, podem limitar o valor do pico de massa óssea alcançado; noutro espectro, temos fatores

como o estilo de vida (sedentarismo) e a nutrição (consumo de cálcio e vitamina D) [74].

### **3.1.2 Qualidade Óssea**

Há dez anos um novo parâmetro conceitual no estudo da estrutura óssea apresenta-se em intenso crescimento em atividades de pesquisa e destaca que o grande interesse dos estudiosos converge para a qualidade óssea.

O termo qualidade óssea tem sido utilizado amplamente para explicar um incontável número de observações clínicas que não podem ser explicadas de pronto pelas medidas da densidade óssea mineral (DMO). Sendo assim, tal conceito depende de uma definição a respeito da limitação de uma técnica clínica e, por esse motivo, tal conceituação se sujeita a mudança de acordo com novas técnicas de medidas que forem introduzidas [76, 77].

Existe consenso entre alguns pesquisadores em relação à definição de qualidade óssea, que pode ser definida como a “totalidade de aspectos e características que influenciem uma capacidade do osso para resistir a fraturas”. Artigos científicos [11, 76, 77] que refletem conhecimentos a respeito do assunto na década passada, entre pesquisadores, biólogos, médicos, engenheiros e clínicos, têm conduzido para uma nova compreensão deste conceito, sugerindo prevenção e mudanças. Com isso, observam-se os aspectos biológicos e a estrutura material que contribuem para determinar a resistência à falha estrutural: tamanho do osso; espessura da cortical óssea; números de trabéculas; conectividade; conteúdo do tecido mineral; sobrecarga da microdanificação; densidade dos osteócitos; porosidade e propriedades do colágeno dentro da ramificação das trabéculas [78].

### **3.1.3 Patogenia da Fragilidade Óssea**

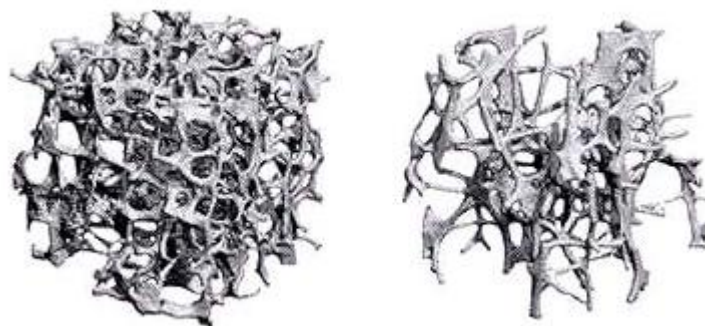
Não se atribui à fragilidade óssea um único elemento gerador; fatores genéticos e ambientais contribuem fundamentalmente no desenvolvimento de ossos pequenos,

frágeis ou de trabéculas e corticais ósseas finas, adelgadas, que resultam em baixo pico da densidade óssea. A resistência do material e da estrutura se mantém ao longo da vida pela remodelação óssea, que consiste na reposição ou na substituição local do osso velho pelo novo [78].

Normalmente até certa idade, ocorre a compensação da perda óssea na superfície externa do osso cortical (periósteo) e tal processo se prolonga mais em relação ao homem, se comparado à mulher. Mais mulheres que homens sofrem fraturas, porque o esqueleto da mulher é menor, mais sujeito, assim, à ampla danificação arquitetural e a menos adaptação efetiva pela formação óssea periosteal. Determina-se a base estrutural da fragilidade óssea antes do nascimento, e ganha expressão com a idade em ambos os sexos. Os ossos tornam-se frágeis porque são sujeitos a contínuo modelamento e remodelamento em decorrência de mecanismos celulares que constroem e reconstroem as falhas do esqueleto de acordo com a idade, movidos pela necessidade de se manterem as propriedades estruturais dos ossos e de se conferir maiores resistências às estruturas deficientes [78].

Osteoporose não se instala em consequência de causas simples; patogenia da estrutura deficiente, fragilidade óssea provavelmente seja denominada mais adequadamente que o termo osteoporose, cujo conceito deveria incluir, como desencadeadores, a epidemiologia, a patogenia, a prevenção e o tratamento da fragilidade óssea caso se aprofundassem ou se investigassem a fundo os problemas biomecânicos da estrutura deficiente, como se pode observar na figura 3.4.

Os efeitos da doença sobre a DMO e seu tratamento encontram-se documentados e pesquisadores concentram seu interesse no estudo da geometria óssea como fator determinante da resistência do osso. Algumas alterações na qualidade óssea podem conduzir a uma fragilidade, como, por exemplo, a osteomalácia, formada por uma mineralização reduzida do osso; raquitismo, em crianças, e a osteopetrose, que se caracteriza por hipermineralização óssea e aumento da massa óssea pela incapacidade própria dos osteoclastos para reabsorverem o osso. O osso apresenta-se rígido e quebradiço, dispõe de uma capacidade reduzida para absorver energia e freqüentemente se associa à fraturas.



**Figura 3.4:** Microtomografia da vértebra de um indivíduo normal na esquerda e na direita um indivíduo com osteoporose [79].

A osteoporose destaca-se como a mais freqüente doença óssea em razão de uma diminuição da massa óssea, sendo ela o resultado de várias causas. Em geral, a perda da massa óssea ganha importância pelo aumento de incidência de fraturas, particularmente no fêmur, coluna vertebral e osso distal do rádio (figura 3.5). Osteopenia é o termo utilizado para definir uma considerável perda de densidade óssea, porém mantendo a microarquitetura óssea normal, observada radiograficamente [80].



**Figura 3.5:** Radiografia e fotografia de um corte coronal de corpo vertebral de um paciente com osteoporose [81].

### 3.1.4 Métodos de Análises da DMO

A densitometria óssea é um método não-invasivo de avaliar a massa óssea, que se baseia na propriedade física do osso de absorver fótons. Vários métodos já foram desenvolvidos, incluindo: absorciometria por fóton único (SPA – *single photon absorptiometry*), emissão simples de raios X (SXA – *single X-ray absorptiometry*), dupla emissão de fótons (DPA – *dual photon absorptiometry*), emissão de raios X com duas energias (DEXA – *dual-energy X-ray absorptiometry*), tomografia computadorizada quantitativa (QCT – *quantitative computed tomography*), tomografia computadorizada quantitativa periférica (pQCT – *peripheral quantitative computed tomography*), ultra-sonografia quantitativa (QUS – *quantitative ultrasound*), ressonância magnética quantitativa (QMR – *quantitative magnetic resonance*) e raio X digital (DXR – *digital X-ray radiogrammetry*).

Com exceção da ultra-sonografia, que mede a velocidade de propagação e atenuação do ultra-som no osso, todos os métodos utilizam radiação ionizante. Uma fonte de radionuclídeos ou um tubo de raios X são usados para gerar um feixe de radiação que é absorvido parcialmente pelo tecido ósseo. Um sistema detector avalia a quantidade de radiação absorvida e os dados coletados são computadorizados e comparados a padrões internacionais obtidos de uma população com DMO normal [82].

O conteúdo mineral ósseo (CMO) é a quantidade de todos os minerais presentes na extensão de osso avaliada. Por convenção, usa-se o grama (g) como unidade para o CMO aferido pela DEXA. Para SPA, SXA e DPA, utiliza-se grama por centímetro (g/cm) [83].

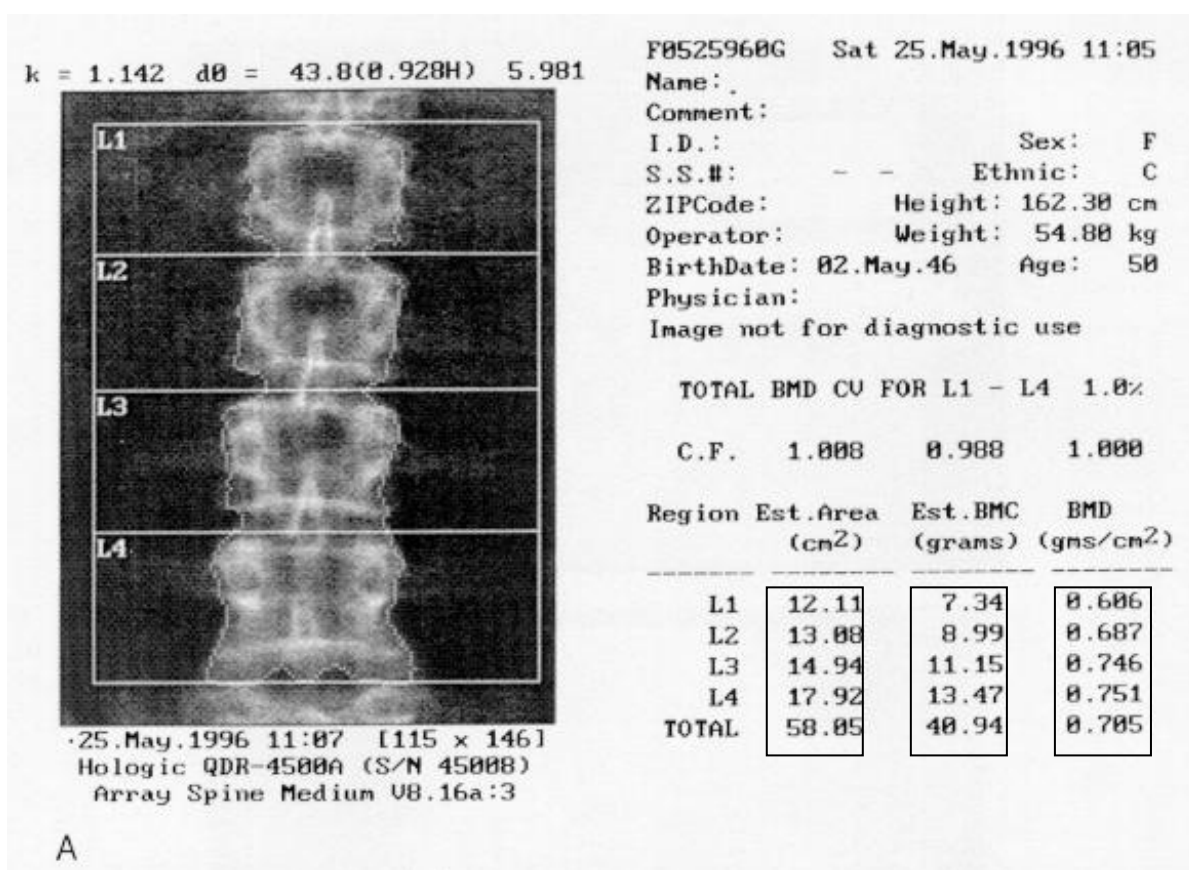
A densidade de um material é medida pela relação entre sua massa e seu volume, e sua unidade de medida é o grama por centímetro cúbico ( $\text{g/cm}^3$ ). No entanto, a DMO mensurada por DEXA, SPA, SXA ou DPA é a relação entre a quantidade todos os minerais ósseos (hidroxiapatita) presente em uma área projetada, ou seja, é a avaliação bidimensional de uma variável tridimensional, empregando grama por centímetro quadrado ( $\text{g/cm}^2$ ) como unidade. A QCT avalia a densidade com a verdadeira medida de volume em miligramas por centímetro cúbico ( $\text{mg/cm}^3$ ), mas não é freqüentemente

indicada em crianças e mulheres em idade fértil, pois emprega altas doses de radiação (maior que 1000 mRem) [83, 84, 85].

Entre as várias técnicas desenvolvidas, a DEXA é considerada a técnica padrão para medida da massa óssea. O método baseia-se na atenuação ou absorção da energia emitida por uma fonte de raios X pelo tecido ósseo na região estudada. São utilizados dois feixes de raios X, e o feixe de menor energia penetra nos tecidos moles, enquanto que o feixe de maior energia penetra tanto no tecido ósseo quanto nos tecidos moles circundantes. Um detector mede os raios que atravessam a região estudada, e um programa computacional segmenta a área para quantificação e subtrai os valores obtidos com os dois feixes de energia. No componente ósseo, determina o CMO numa determinada projeção do osso em gramas. Dividindo-se o CMO pela área, obtém-se a DMO em  $\text{g}/\text{cm}^2$ , ou seja uma densidade de área, não volumétrica. Os valores de atenuação são convertidos em medidas de massa mineral óssea através da comparação com as densidades de materiais usados para calibração do aparelho [83, 86].

A coluna lombar e o quadril são os locais comumente estudados, devido ao significado clínico da coluna e o fêmur como local de fratura osteoporótica. Embora a osteoporose seja uma doença sistêmica, o fator de correlação entre as DMOs de diferentes locais é de aproximadamente 0,7. Portanto a DMO de um local não pode prever o risco de fratura de um outro. A medida da densidade mineral óssea da coluna é de bastante interesse porque ali existe um rápido *turnover* do osso trabecular metabolicamente ativo, presente nos corpos vertebrais. Assim sendo, a coluna responde rapidamente aos efeitos de envelhecimento e doenças [87].

A seguir na figura 3.6 pode ser visto um resultado da medição da DMO das vértebras lombares (L1 a L4) de uma mulher com 50 anos, caucasiana com 162,30 cm de altura e 54,80 Kg. A medição foi feita com equipamento Hologic QDR 4500-A. Na figura pode ser visto ainda os valores estimados de área em  $\text{cm}^2$ , BMC em grama (ou em português CMO), e o resultado da BMD em  $\text{g}/\text{cm}^2$  (em português DMO) calculados pelo *software* do equipamento [87].



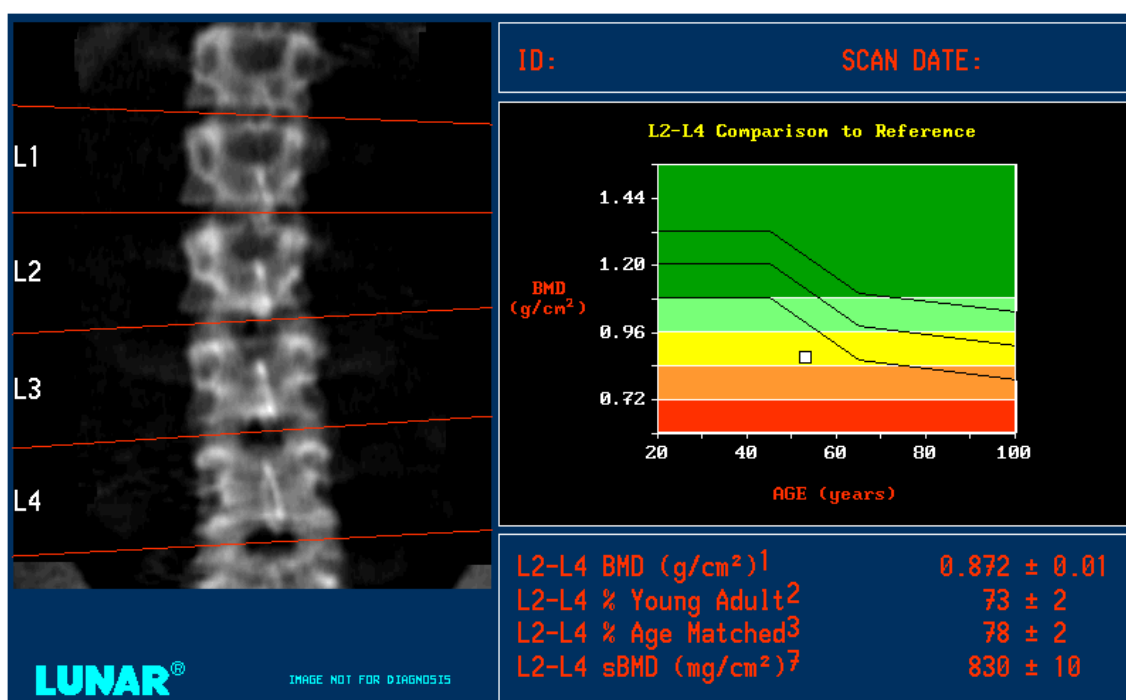
**Figura 3.6:** Resultado da medição da DMO das vértebras lombares (L1 a L4) de uma mulher de 50 anos de idade [87].

O diagnóstico de osteoporose nas mulheres pós-menopáusicas, de acordo com os critérios de um grupo de peritos da Organização Mundial de Saúde (OMS), é medida de um indivíduo e comparado com o valor médio da DMO de um conjunto de indivíduos jovens do mesmo sexo, com valores no pico de massa óssea [88, 89]. Desta relação obtém-se o *T score*, ou seja o número de desvios-padrão abaixo dos valores do grupo controle jovem. Considera-se que a mulher sofre de osteopenia se o seu *T score* está compreendido entre -1 e -2,5, de osteoporose se é inferior a -2,5 e a massa óssea é normal para valores de *T score* superiores a -1 (tabela 3.1). A diminuição da massa óssea medida desta forma, correlaciona-se diretamente com o risco de fratura, sendo que para cada diminuição da DMO em 1 desvio-padrão, duplica o risco de fratura [89].

**Tabela 3.1:** Classificação de Osteoporose em mulheres pós-menopáusicas baseada na medida de DMO por DEXA, segundo a OMS de 1994 [89].

T Score	Classificação
>-1	Normal
>-2,5 e <-1	Osteopenia
<-2,5	Osteoporose
<-2,5 + fratura	Osteoporose grave ou estabelecida

A figura 3.7 a seguir ilustra uma comparação entre o resultado de uma densitometria de vértebras lombares (L2 a L4) feita no equipamento Lunar DPX-L, com os valores de referências. O ponto branco na região amarela do gráfico dos valores de referencia indica o valor médio da DMO encontrado para as vértebras analisadas.



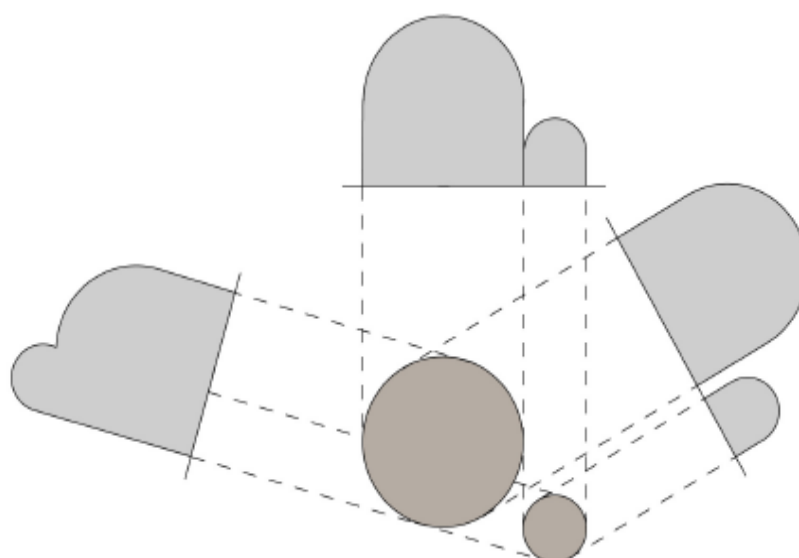
**Figura 3.7:** Ilustração da comparação do resultado da medição da DMO de vértebras lombares (L2 a L4) com os valores de referencia [87].



### 3.2 Microtomografia de Raios X

A microtomografia de raios X ( $\mu$ TC) é uma técnica de imagem que forma a informação em três dimensões de um objeto de estudo, possuindo o mesmo princípio da TC, e foi desenvolvida para inspeção de pequenas estruturas.

A idéia básica da tomografia computadorizada é de várias projeções medidas, retendo a informação geométrica total sobre um objeto. As projeções são inversamente projetadas de volta para o espaço objeto, e o resultado combinado é uma função de objeto pesquisado bidimensionalmente (em uma fatia). A figura 3.8 mostra a relação entre dois objetos e as projeções destes, vistos de três ângulos diferentes. Quanto mais projeções são coletadas e retroprojetadas, mais soluções exatas para a função objeto são obtidas. No caso da TC com feixes paralelos que atravessam o objeto, como na Figura 3.8, apenas projeções adquiridas ao longo de uma trajetória  $180^\circ$  são necessárias para reconstruir o objeto, uma vez que as projeções das direções opostas conterão informações iguais. No entanto, este não será o caso quando o feixe de raios X é divergente, uma vez que a magnificação das características das imagens dependerá da rotação, devido a variações da distância fonte-objeto. A solução exata é atingida então quando são coletadas projeções da trajetória circular completa.



**Figura 3.8:** A relação entre dois objetos e suas projeções, vista a partir de três ângulos diferentes [90].

Uma expressão para a intensidade dos raios X detectados após a propagação através de um objeto contendo  $n$  características foi dada na equação A.4 (Anexo A). Agora, se o objeto está confinado a uma fatia no plano  $xy$ , temos que reescrever a equação, como:

$$I = I_0 e^{-\int_L \mu(x,y) dl} \quad (3.1)$$

Onde  $\mu(x,y)$  é o coeficiente de atenuação linear no ponto  $(x,y)$  e  $dl$  é um incremento de comprimento, e a integração é realizada ao longo do caminho  $L$  da fonte ao detector. Da equação (3.1) podemos reescrever, em:

$$\int_L \mu(x,y) dl = -\ln \frac{I}{I_0} \quad (3.2)$$

Portanto, a intensidade medida pelo detector pode ser visto como valores da integração de linha dos coeficientes de atenuação. A integral de linha do lado esquerdo da equação (3.2) é chamada transformada de *Radon* da função  $\mu(x,y)$ . A projeção  $P$  é dada por:

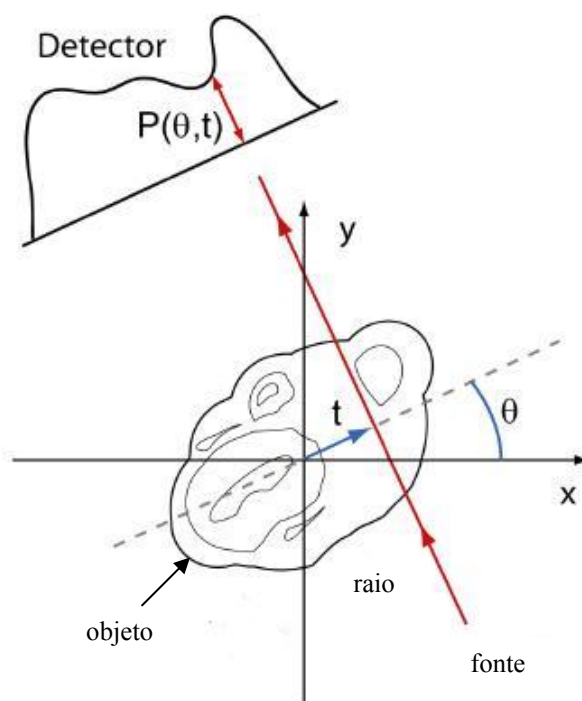
$$P(\theta, t) = \int_L \mu(x,y) dl \quad (3.3)$$

Na equação 3.3, os parâmetros  $\theta$  e  $t$  são: o ângulo de projeção e a posição radial dos raios; como mostra a figura 3.9. Estes são os parâmetros da integral de linha, acoplados as coordenadas espaciais  $x$  e  $y$  através da seguinte relação:

$$x \cos \theta + y \sin \theta = t \quad (3.4)$$

As expressões acima são, contudo, válidas apenas com a suposição de que todos os raios X utilizados para imagem são monocromáticos, isto é, têm o mesmo comprimento de onda. No entanto todas as fontes de raios X são mais policromáticas e,

consequentemente, os feixes de raios X têm certa largura de banda. A atenuação linear  $\mu(x,y)$  é, em geral, uma função da energia de fótons e idealmente a equação (3.2) deverá incluir também a integração ao longo do espectro energético de raios X.

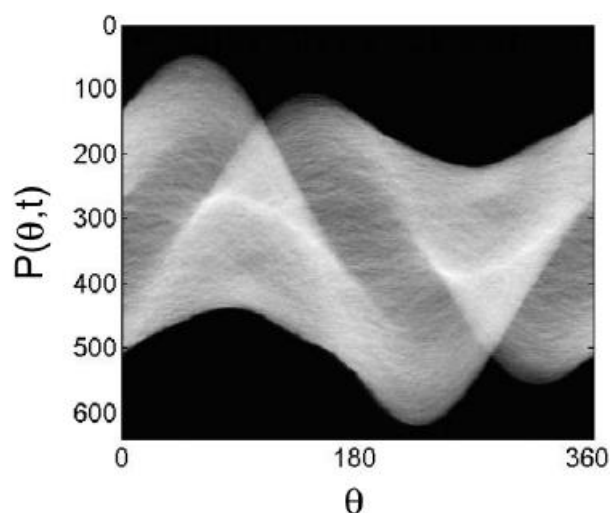


**Figura 3.9:** Um feixe de raios X se propagando através de uma seção transversal de um objeto (adaptado de [90]).

A fonte e o detector são girados em torno do objeto (eixo z) e para cada novo valor de ângulo de projeção  $\theta$  uma projeção 1D é adquirida. A rotação completa resulta nos dados de projeção de todos os valores de  $\theta$  e  $t$ .

Um importante fator que determina a qualidade da imagem reconstruída é o número de projeções coletadas de uma rotação de  $360^\circ$ . Um método para controlar os dados de projeção antes da reconstrução é a parcela do montante total de projeções 1D adquiridas lado a lado em uma seqüência angular. A distribuição obtida dos dados de projeções como uma função do ângulo de projeção é chamada sinograma, e pode ser visto na figura 3.10. Neste exemplo, 364 projeções foram capturadas durante uma rotação, de modo que o ângulo entre os dois passos subsequentes de projeção foi de aproximadamente  $1^\circ$ . Se poucas projeções são coletadas haverá passos discretos entre a

separação da projeção subsequente, e o bom aspecto será perdido. Ao estudar um sinograma, também é possível detectar se o objeto estudado se movimentou durante a varredura, o que induziria um movimento descontínuo das características do objeto, para um número limitado de ângulos. Este movimento indesejado resulta em artefatos (*unsharpness*) no *slice* reconstruído.



**Figura 3.10:** Exemplo de um sinograma [90].

### 3.2.1 Imagem com Feixe Cônico

A geometria de feixe cônico é a forma natural do feixe de um tubo de raios X. Um algoritmo de tomografia com feixe cônico é vantajoso para o uso, uma vez que permite a reconstrução de um espaço 3D diretamente dos dados de projeções 2D, ao invés de reconstruir *slice* por *slice*. Em outras palavras, não há necessidade de colimação do feixe e podendo, portanto, ser feito pleno uso da energia emitida.

Existem várias técnicas para a reconstrução com feixe cônico. A mais utilizada é baseada no trabalho pioneiro de FELDKAMP, DAVIS e KRESS [91]. É freqüentemente referida como algoritmo de Feldkamp.

- O algoritmo de *Feldkamp*.

Em analogia com a Equação (3.3), podemos agora escrever uma expressão para as duas dimensões através da projeção tridimensional do objeto  $f(x, y, z)$ .

$$P(\theta, a, b) = P(\theta, a(x, y, \theta), b(x, y, \theta)) = \int_L f(x, y, z) dl \quad (3.5)$$

Onde  $a$  e  $b$  são as coordenadas horizontais e verticais do detector, respectivamente. Como antes  $L$  é o comprimento geométrico que um raio se propaga através do objeto em seu caminho para o detector e  $\theta$  é o ângulo da projeção. As coordenadas do detector  $a$  e  $b$  estão relacionados à  $x$ ,  $y$ ,  $z$  e  $\theta$  através:

$$a(x, y, \theta) = R \frac{-x \operatorname{sen} \theta + \cos \theta}{R + x \cos \theta + y \operatorname{sen} \theta}, \quad (3.6)$$

$$b(x, y, z, \theta) = z \frac{R}{R + x \cos \theta + y \operatorname{sen} \theta}$$

Onde  $R$  é o raio da trajetória de fonte. A geometria de feixe cônico é mostrada na figura 3.11. Note que o sistema fonte-detector gira em torno do objeto ou sistema de coordenadas. No entanto, nas medições atuais o sistema fonte-detector permanece fixo, enquanto o objeto é que será rotacionado. O momento angular relativo é, no entanto o mesmo, que é o único parâmetro importante na reconstrução. Além disso, é possível observar que o sistema de coordenadas do detector aqui se desloca de modo que o eixo  $b$  coincide com a direção de  $z$ . Esta operação é puramente matemática e o detector

virtual está relacionado com o desenvolvimento físico do detector através de um simples fator de escala.

O procedimento de reconstrução é fundamentalmente o mesmo quando se utiliza feixes de raios X em paralelo. No entanto, o aumento da complexidade geométrica faz com que um número de fatores a ponderar seja necessário no algoritmo de reconstrução. O processo de filtração é dado por:

$$\tilde{P}(\theta, a, b) = \left( \frac{R}{\sqrt{R^2 + a^2 + b^2}} P(\theta, a, b) \right) * g(a) \quad (3.7)$$

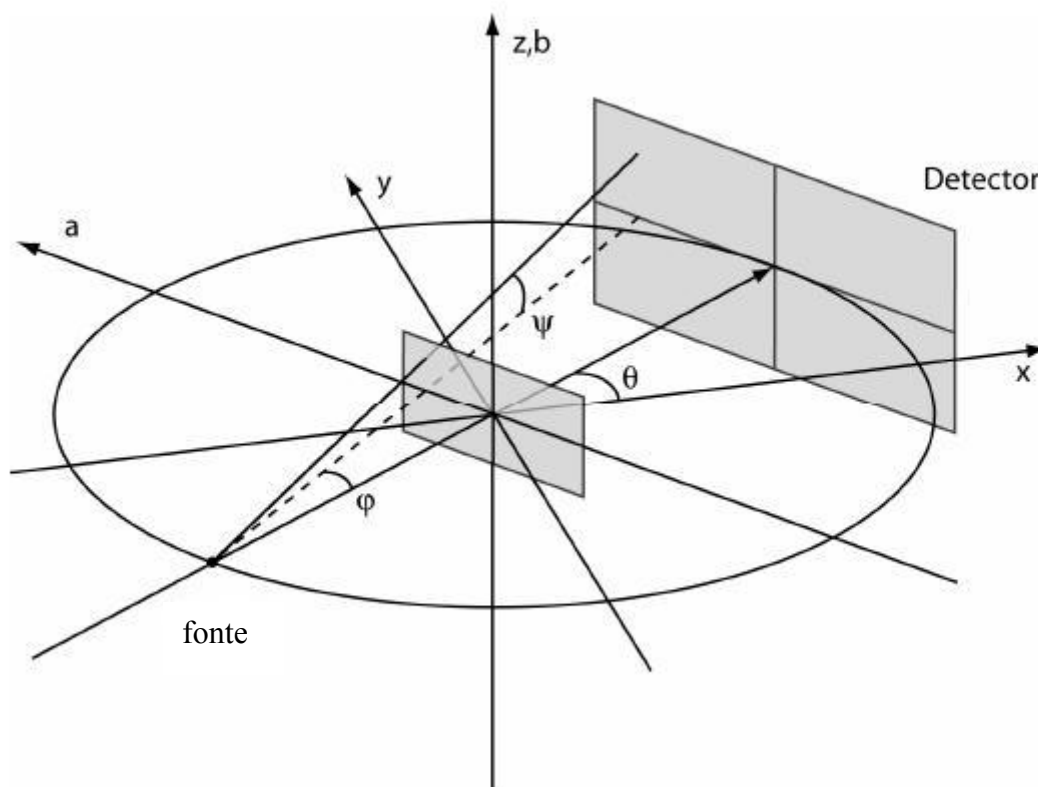
Onde \* denota convolução e  $g(a)$  é o filtro rampa.

O fator na frente da projeção é chamado de pré-fator de peso e pode ser relacionado com a geometria do feixe através da relação

$$\frac{R}{\sqrt{R^2 + a^2 + b^2}} = \cos \varphi \cos \Psi \quad (3.8)$$

Onde  $\varphi$  e  $\Psi$  são os ângulos leque e cônico, respectivamente, mostradas na Figura 3.11. O pré-fator de peso e projeção filtrada  $\tilde{P}(\theta, a, b)$  dada pela equação (3.7) são finalmente retroprojetadas no espaço tridimensional do objeto  $f(x, y, z)$ , e dado por:

$$f(x, y, z) \int_0^{2\pi} \frac{R^2}{(R + x \cos \theta + y \sin \theta)^2} \tilde{P}(\theta, a(x, y, \theta), b(x, y, z, \theta)) d\theta \quad (3.9)$$



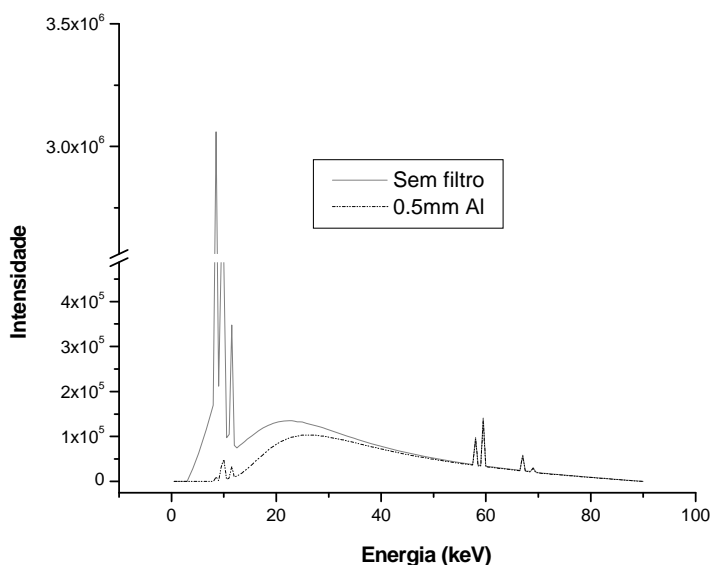
**Figura 3.11:** Geometria feixe cônico (adaptado de [90]).

### 3.2.2 Métodos de Correções para Endurecimento de Feixe

Neste tópico serão mostrados os diferentes métodos existentes para correção de endurecimento de feixe (*beam hardening*).

#### 3.2.2.1 Filtros

A filtragem é o método mais popular para reduzir o efeito de endurecimento de feixe [33,92]. Ao colocar um filtro entre a fonte e o objeto, como uma fina chapa de alumínio, a baixa energia de raios X são atenuadas, como uma consequência do efeito fotoelétrico. Desta forma, um difícil mais quase monocromático feixe é apresentado ao objeto. A figura 3.12 mostra o espectro de uma fonte de raios X com alvo de tungstênio, sem filtragem (linha completa) e com um filtro de 0,5 mm de alumínio (linha tracejada).



**Figura 3.12:** Espectro de raios X sem e com filtração de alumínio [93].

A principal desvantagem desta técnica é a diminuição da intensidade dos raios X, o que resulta em uma diminuição da relação sinal-ruído (SNR) da imagem, significando uma diminuição da qualidade da imagem. Para ter um SNR na imagem de TC comparáveis com os obtidos sem a utilização de filtros, o tempo de varredura ou a tensão do tubo tem de aumentar. Além disso, este método dá apenas uma redução do efeito do endurecimento de feixe.

### 3.2.2.2 Dupla Energia

A dupla energia é uma técnica essencialmente de obtenção de informação dependente da energia em um sistema de TC usando duas diferentes bandas de energias [31, 94]. O método começa com a representação do coeficiente atenuação em cada energia por um pequeno número de constantes, que são independentes da energia. Em outras palavras, o coeficiente de atenuação, como função da energia  $\mu(E)$ , pode ser representado por um pequeno número de constantes  $\{a_i; i = 1, 2, \dots, n\}$  por encontrar um conjunto de funções base  $\{f_i(E); i = 1, 2, \dots, n\}$  tal que  $(E)$  pode ser expresso como uma combinação linear destas funções [94]:



$$\mu(E) = a_1 f_1(E) + a_2 f_2(E) + \dots + a_n f_n(E) \quad (3.10)$$

Dentro da faixa de energia utilizada, o coeficiente de atenuação é determinado pelo efeito fotoelétrico e espalhamento *Compton*, como visto na equação A.7. Portanto, a combinação linear pode ser reescrita usando um conjunto de duas funções bases:

$$\mu(E) = a_p f_p(E) + a_c f_c(E) \quad (3.11)$$

Ou

$$\mu(E) = a_p \frac{1}{E^3} + a_c f_{KN}(E) \quad (3.12)$$

Onde  $a_p$  e  $a_c$  são constantes características do material, e  $f_p$  e  $f_c$  são funções dependentes da energia para a absorção fotoelétrica e espalhamento *Compton* respectivamente. A função  $\frac{1}{E^3}$  se aproxima a dependência de energia da interação fotoelétrica e  $f_{KN}(E)$ , que é a função de *Klein-Nishina*, dando a dependência de energia da seção transversal total para o espalhamento *Compton*. Esta função é mostrada na equação (3.13) com  $\gamma = E.(511kV)^{-1}$ .

$$f_{KN}(\gamma) = \frac{1+\gamma}{\gamma^2} \left[ \frac{2(1+\gamma)}{1+2\gamma} - \frac{1}{\gamma} \ln(1+2\gamma) \right] + \frac{1}{2\gamma} \ln(1+2\gamma) - \frac{(1+3\gamma)}{(1+2\gamma)^2} \quad (3.13)$$

Os parâmetros físicos  $a_p$  e  $a_c$  são dados por:

$$a_p \approx K_1 \frac{\rho}{A} Z^n \quad (3.14)$$

$$a_c \approx K_2 \frac{\rho}{A} Z \quad (3.15)$$

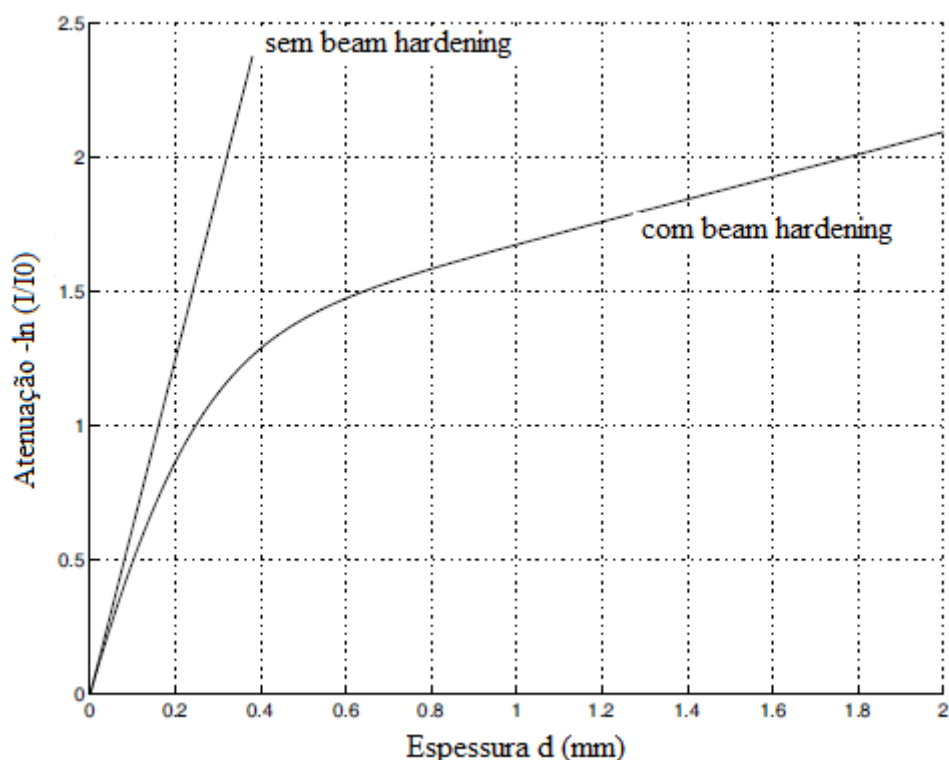
Onde  $K_1$  e  $K_2$  são as constantes,  $\rho$  densidade,  $A$  o peso atômico, e  $Z$  o número atômico.

### 3.2.2.3 Linearização

O terceiro método de correção é baseado em um procedimento de linearização [27, 29, 95]. Para um objeto homogêneo e para uma fonte monocromática, a lei de *Lambert-Beer* é dada pela equação 3.16:

$$-\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \mu d \quad (3.16)$$

Desta equação espera-se uma curva linear quando se *plota* a atenuação medida, que está ao lado esquerdo da equação 3.16, em função da espessura  $d$ . Contudo, devido aos raios X policromáticos, um desvio a esta tendência linear é notado. A figura 3.13 mostra o efeito do endurecimento de feixe na atenuação do alumínio com 80 kVp para diferentes espessuras.



**Figura 3.13:** Exemplo do efeito do endurecimento de feixe (beam hardening) causando uma relação não linear entre a espessura do alumínio e sua atenuação (Adaptado de [22]).

HERMAN [29] em seu trabalho desenvolveu um método para aproximar a atenuação policromática para monocromática, pela linearização dos coeficientes de atenuação. Ele descreveu que, para um dado par-fonte detector,  $m$  corresponde ao raio soma monoenergético dado pela equação 3.17.

$$m \cong \int_0^d \mu_e(x, y) dz, \quad (3.17)$$

onde a integral de 0 a  $d$  corresponde a espessura do objeto, e  $z$  é a distância do ponto  $(x, y)$  no caminho  $L$  entre a fonte e o detector. Para uma fonte policromática o raio soma  $p$  para um dado par-fonte detector é dado pela equação 3.18.

$$p \cong -\ln \int_0^E \tau_e \exp \left[ - \int_0^d (\mu_e(z) - \mu_e^a) dz \right] de. \quad (3.18)$$

Onde assumiu-se que a fonte emite fótons de raios X polienergéticos com fótons na faixa de energia entre 0 e  $E$ , onde  $\tau_e$  denota a razão de fótons em energia  $e$  que são detectados durante a medida, e  $d$  e  $z$  tem o mesmo significado para o caso monocromático. Tem se ainda que,  $\mu_e(z)$  é uma função de duas variáveis, a energia  $e$  e a distância do ponto  $z$  no caminho  $L$ , cujo o valor é o coeficiente de atenuação em energia  $e$  do ponto  $z$  no caminho  $L$  durante a medida. Por outro lado,  $\mu_e^a$  é uma função de uma única variável, a energia  $e$ , cujo valor é o coeficiente de atenuação somente do objeto  $a$  em energia  $e$ . Reescrevendo a equação 3.17 com mesmas considerações para o caso policromático, tem-se que:

$$m \cong \int_0^d (\mu_e(z) - \mu_e^a) dz. \quad (3.19)$$

A partir daí supõe-se que existam somente dois tipos de materiais a serem tomografados,  $a$  e  $b$ , nesse trabalho foram considerados os dois materiais sendo o osso e o ar, respectivamente. Considerando um par fonte-detector fixo, e assumindo que o comprimento total do caminho  $L$  que atravessa o material  $b$  é  $B$ . Das equações 3.18 e 3.19 temos que:

$$p \cong -\ln \int_0^E \tau_e \exp[-B(\mu_e^b - \mu_e^a)dz]de, \quad (3.20)$$

e

$$m \cong B(\mu_e^b - \mu_e^a)dz. \quad (3.21)$$

Combinando as equações 3.20 e 3.21 tem-se que:

$$p \cong -\ln \int_0^E \tau_e \exp\left(-\frac{\mu_e^b - \mu_e^a}{\mu_e^b - \mu_e^a} m\right)de. \quad (3.22)$$

A partir da equação 3.22 se especifica uma função  $f(p)$  dos raios soma polienergéticos, desde que se use  $f(p)$  como a estimativa do raios soma monoenergéticos  $m$ . Candidatos para tal função são as polinomiais, isto é, função da seguinte forma:

$$f(p) = a_n p^n + a_{n-1} p^{n-1} + \dots + a_2 p^2 + a_1 p + a_0, \quad (3.23)$$

onde  $n$  é a ordem polinomial e  $a_0, a_1, a_2, \dots, a_{n-1}, a_n$  são os coeficientes polinomiais que precisam ser determinados para que  $f(p)$  forneça uma estimativa aceitável de  $m$ . HERMAN [29] em seu trabalho usou as correções polinomiais para tomografia de tórax, onde considerou o meio com dois materiais, osso e tecido mole, usando as ordens polinomiais  $n=2$  e  $n=3$ . Os resultados mostraram que a correção polinomial  $n=2$  obteve resultado superior em relação a  $n=3$  [22, 29]. VAN de CASTEELLE [22] também faz a mesma recomendação para sistema com dois materiais e ressalta que para objetos muito heterogêneo, contendo mais de 3 materiais, ordem polinomial superior a  $n=2$  é necessária.

### 3.3 Quantificação da Morfologia Óssea por $\mu$ TC

A quantificação da morfologia óssea por microtomografia ( $\mu$ TC) é feita baseada na técnica de histomorfometria. Esta técnica desenvolveu-se a partir da década de 60, após a introdução, por Sacker e Nordim [96] e posteriormente por Bordier et al. [97], de métodos para obtenção de tecido ósseo, por meio de biópsias realizadas com trefinas especiais e sob anestesia local.

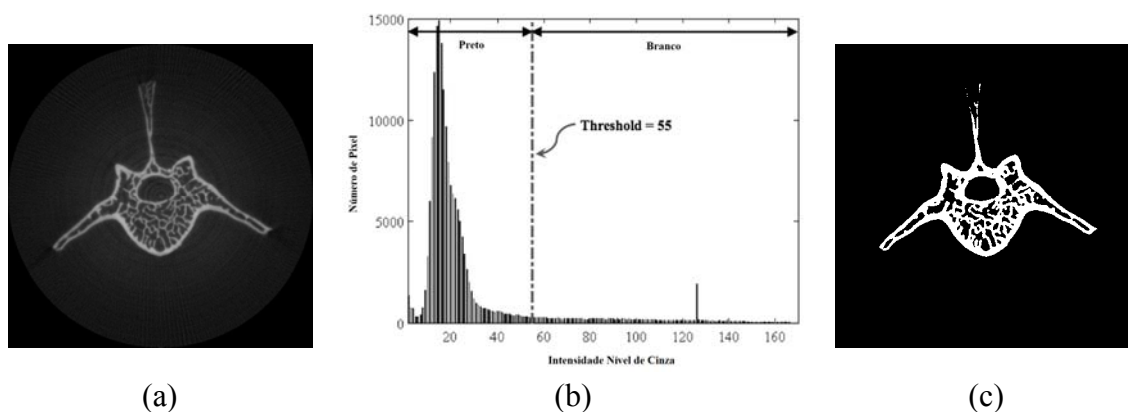
A histomorfometria convencional é baseada no princípio de estereologia, e este princípio é usado para investigar objetos tridimensionais através de suas informações bidimensionais. Existem basicamente três métodos convencionais para análise histomorfométrica [98-101].

1. Método manual: Retículos ósseos são visualizados na ocular de um microscópio, permitindo a medição de distâncias, espessuras, etc. Neste caso, as medidas de superfície são realizadas através da contagem de interseções entre as linhas e a estrutura óssea analisada. Já o volume ósseo é obtido pela técnica de contagem de pontos. Uma das grandes desvantagens deste método é o enorme tempo que se leva para a realização da análise de cada lâmina, podendo levar cerca de duas horas para um indivíduo treinado;
2. Método semi-automático: As imagens ósseas são adquiridas por um microscópio acoplado a um computador e uma câmara clara (ou uma câmara de vídeo tipo CCD). Neste caso, as imagens do osso são desenhadas com auxílio de um cursor sobre uma mesa digitalizadora. Feito todo o desenho histológico, o programa contido no computador faz toda a quantificação óssea. É uma técnica vantajosa em relação a anterior no que diz respeito ao tempo despendido e a eliminação de artefatos histológicos;
3. Método totalmente automático: Ambos, computador e câmara de vídeo, capturam as imagens histológicas. Aqui, a quantificação se dá através dos diferentes níveis de coloração das estruturas. Este método requer menos tempo de análise, porém é menos sensível no reconhecimento de estruturas celulares.

Através desta técnica pode-se analisar tanto parâmetros estruturais quanto mecânicos, topológicos e morfológicos analisando de maneira quantitativa os componentes da estrutura óssea, tais como o volume, a área e o perímetro. As medidas histomorfométricas podem expressar a quantidade de tecido ósseo e as taxas de formação e reabsorção, além de fornecerem dados acerca da sua microarquitetura e da conectividade trabecular.

FELDKAMP *et al* [16] desenvolveu um método para o levantamento dos dados histomorfométricos para imagens de  $\mu$ TC. Este método apresenta vantagem em relação ao método de histomorfometria convencional, pois na  $\mu$ TC, as seções (fatias) podem ser obtidas de forma não destrutiva e assim preservar as informações do tecido ósseo. Além disso, também é possível estimar em 3D os parâmetros histomorfométrico como, volume ósseo, superfície óssea, espessura trabecular, número de trabéculas e separação trabecular.

Para quantificar a morfologia óssea por  $\mu$ TC, usando os parâmetros histomorfométricos, primeiro é necessário escolher uma região de interesse (ROI) e binarizá-la. O processo de binarização é baseado na escolha de um valor limiar (TH) que será aplicado à imagem. Todos os *pixels* cujo valor for maior ou igual ao TH serão convertidos em um valor chamado de saturado. Em uma imagem digital com resolução de 8 *bits*, por exemplo, este valor saturado vale 255 (branco). De forma análoga, todos os *pixels* que tiverem valor inferior ao do limiar, serão convertidos em 0 (preto). O procedimento cria uma imagem binária, que separa (ou segmenta) o tecido ósseo do fundo. Na figura 3.14 pode ser visto um exemplo do processo de binarização de uma imagem óssea selecionando um valor de TH definido.



**Figura 3.14:** Processo de binarização onde (a) é um imagem  $\mu$ TC de 8-bit (nível de cinza 255), (b) é o histograma de (a) e a linha pontilhada marca o valor de TH selecionado em 55, e (c) é a imagem binária resultante.

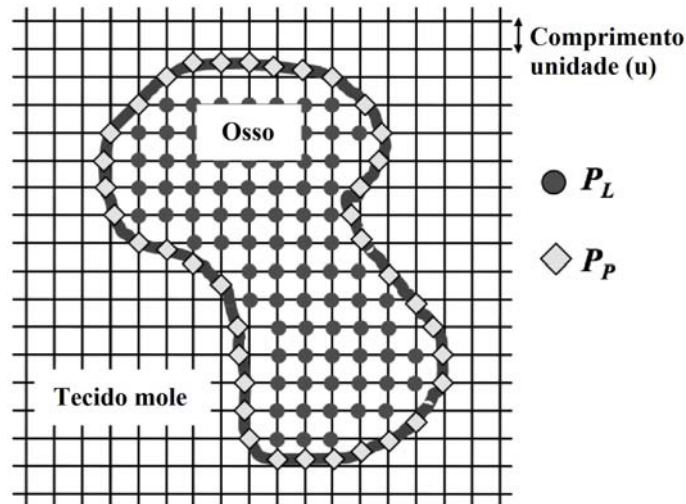
### 3.3.1 Parâmetros Histomorfométricos

Os índices histomorfométricos descritos nessa seção seguem a nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone and Mineral Research* [102]. Os parâmetros podem se divididos em duas categorias: primários e derivados. Os primários consistem de dois: razão do volume de tecido ósseo sobre volume total da amostra [BV/TV (%)] e o número de trabéculas ósseas, por milímetro de tecido, sendo também um índice que expressa a densidade trabecular [TbN (1/mm)], dados por [102]:

$$\frac{BV}{TV} = P_P, \quad (3.24)$$

$$Tb.N = P_L, \quad (3.25)$$

onde  $P_P$  é a fração de pontos que se encontram dentro do osso e  $P_L$  é o número de interseções de linhas de teste com a interface entre tecido "mole" e osso, dividido pelo comprimento total de linhas de teste [12]. Este conceito pode ser visualizado na figura 3.15 a seguir.



**Figura 3.15:** Representação de  $P_P$  e  $P_L$  na matriz superposta a imagem  $17 \times 17$ , onde  $P_P = 82$  and  $P_L = 38/(1 \text{ u} \times 289)$  (Adaptado de [12]).

A partir dos parâmetros primários são obtidos os derivados, que são: a razão da superfície do osso para o volume do mesmo [BS/BV (1/mm)], espessura trabecular [Tb.Th (mm)], e separação trabecular [Tb.Sp (mm)]. Eles podem ser calculados através das seguintes equações [103]:

$$\frac{BS}{BV} = \frac{2P_L}{P_P}, \quad (3.26)$$

$$Tb.Th = \frac{2}{BS/BV} = \frac{P_P}{P_L}, \quad (3.27)$$

$$Tb.Sp = \frac{1}{Tb.N} - Tb.Th = \frac{1 - P_P}{P_L}. \quad (3.28)$$

Na tabela 3.2 estão sumarizados os 5 parâmetros histomorfométricos aplicados para medir diferentes propriedades das trabéculas usando imagens  $\mu$ TC.



**Tabela 3.2:** Parâmetros histomorfométricos medidos em imagens  $\mu$ TC.

Parâmetros Histomorfométricos	Notação	Unidade
Volume ósseo: volume do osso trabecular.	BV/TV	%
Superfície óssea: razão entre superfície óssea e volume ósseo.	BS/BV	1/mm
Espessura trabecular: espessura das trabéculas.	Tb.Th	mm
Número trabecular: número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido.	Tb.N	1/mm
Separação trabecular: distancia entre os pontos médios das trabéculas ósseas.	Tb.Sp	mm

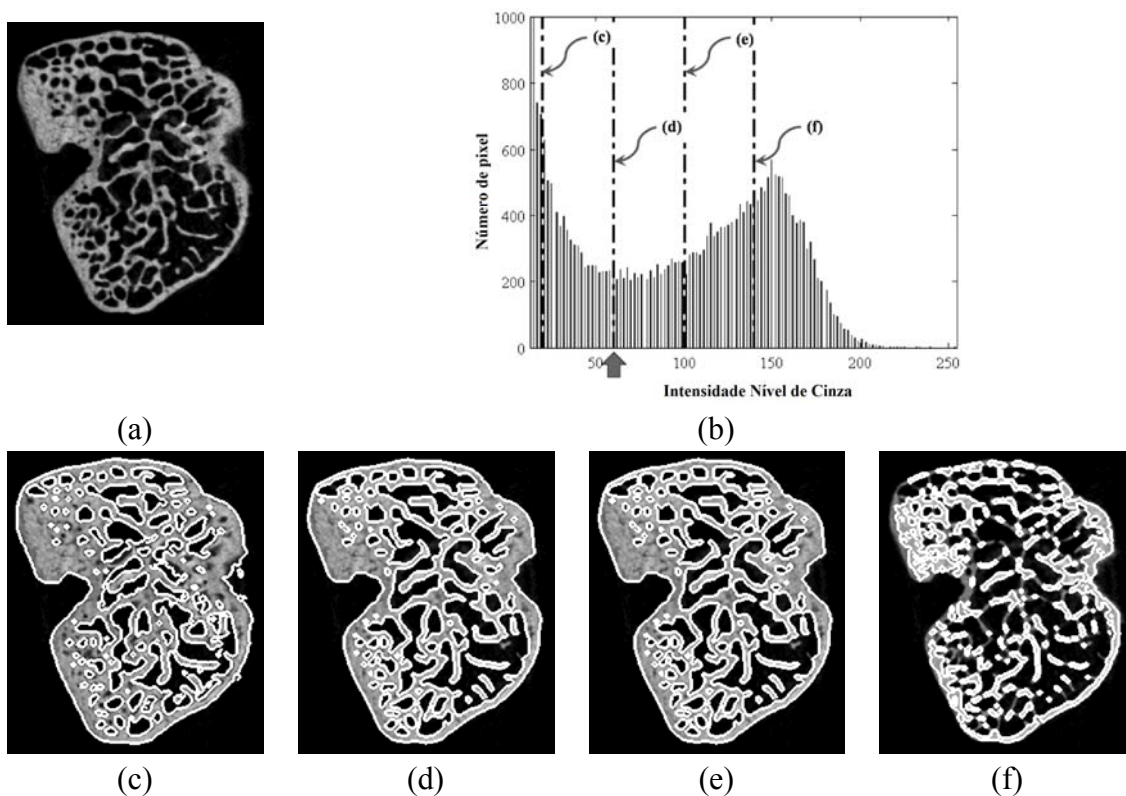
### 3.3.2 Métodos de Limiarização

Uma imagem de tamanho  $M \times N$  pode ser representada por uma função intensidade nível de cinza  $f(x,y)$ , com a faixa de 0 a  $L-1$ , onde  $L$  é o número máximo de níveis de cinza. Um método de limiarização cria uma imagem binária de  $f(x,y)$  por tornar todos os pixels abaixo de um valor de TH para zero e todos os pixels iguais ou maior que TH para 1.  $b(x,y)$  é uma versão binarizada de  $f(x,y)$  em algum TH global, definido como:

$$b(x,y) = \begin{cases} 1 & \text{se } f(x,y) \geq \text{TH} \\ 0 & \text{senão} \end{cases} \quad (3.29)$$

#### 3.3.2.1 Método de Limiarização Visual

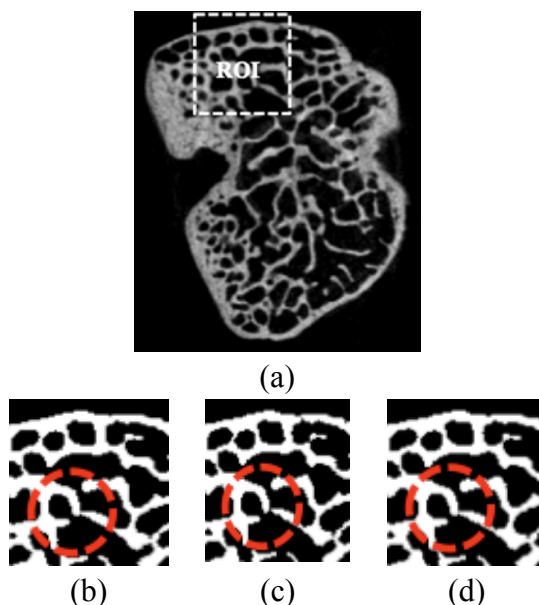
Vários pesquisadores têm procurado um método padrão para determinar o ótimo valor de TH (TH ótimo) para ser adotado na quantificação de imagens microtomográficas. O método mais comum é pela comparação visual entre a imagem original em escala de cinza e a imagem binarizada. Basicamente, o usuário varia o valor de TH até encontrar um resultado satisfatório (figura 3.16) [40, 104, 105]



**Figura 3.16:** Limiarização visual por comparação. (a) Imagem original em nível de cinza. (b) Histograma da imagem ilustrada em (a). As linhas pontilhadas correspondem aos diferentes valores de TH para produzir as imagens binárias: (c) TH = 20, (d) TH = 60, (e) TH = 100, e (f) TH = 140. A seta cinza indica o melhor valor de TH que apresenta visualmente a melhor limiarização da imagem em (a). Os contornos das imagens de (c) a (f) são delineadas com uma linha branca para facilitar a comparação visual.

No entanto, este método apresenta algumas desvantagens, uma vez que é possível obter valores de TH sub ou superestimados devido a subjetividade humana. A fim de reduzir esta variabilidade humana, o método pode ser melhorado pela escolha de um TH ótimo baseado no valor médio de dois ou mais TH selecionados. Primeiramente, máximo e mínimo nível de TH é encontrado pelo usuário, e aplicado na imagem original. Então, é comparada visualmente as diferenças entre as arestas das estruturas binarizadas e os limites da imagem original em nível de cinza. Se não houver qualquer

alteração substancial, o valor médio deste intervalo de TH é usado como o valor ótimo. Este procedimento define o método TH médio (MTH).

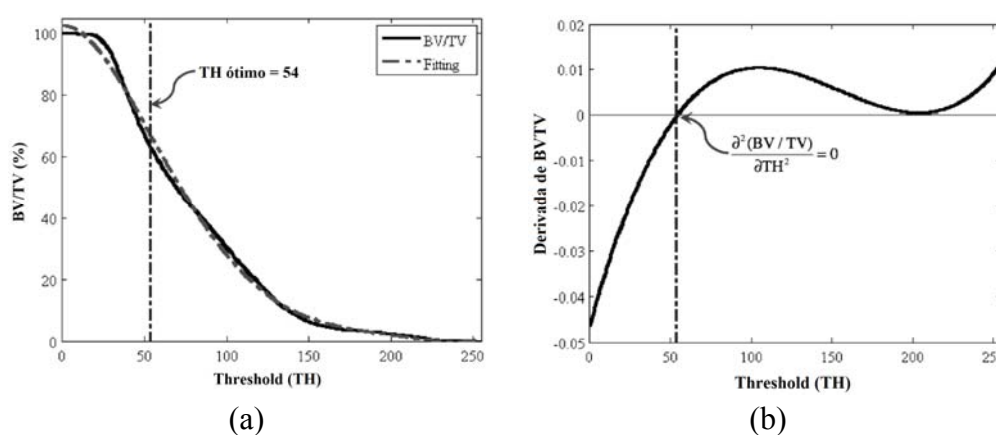


**Figura 3.17:** Seleção do ótimo TH empregando o método TH médio. (a) Imagem original contendo um ROI para exemplificar o procedimento. (b) ROI binarizada usando um mínimo  $TH_{\min} = 75$ . (c) ROI binarizada usando um máximo  $TH_{\max} = 85$ . (d) A media entre  $TH_{\min}$  e  $TH_{\max}$  define o  $TH_{\text{médio}} = 80$ . Os círculos tracejados na ROI marcam o efeito de diferentes TH sobre as estruturas finas.

A ROI na Figura 3.17 (b) e (c) foram binarizadas escolhendo dois valores de TH,  $TH_{\min} = 75$  e  $TH_{\max} = 85$ , respectivamente, da imagem original ilustrada na figura 3.17 (a). As imagens binarizadas não apresentam diferenças aparente nas bordas quando comparada visualmente com a ROI da imagem original. Assim, o TH ideal é o valor médio entre os níveis de cinza, ou seja,  $TH = 80$ , que é aplicado em todas as imagens no banco de dados. No entanto, o principal problema é decidir qual intervalo de TH deve ser escolhido, uma vez que depende da percepção humana. É importante acrescentar que o TH selecionado é determinado usando apenas uma imagem como referência para o banco de dados inteiro, o que torna a técnica limitada.

### 3.3.2.2 Método de Limiarização pela derivada igual a zero

O ponto de inflexão da curva que correlaciona o parâmetro BV/TV e as intensidades de nível de cinza pode ser usado para determinar o ótimo valor de TH em imagens  $\mu$ TC [106]. Esta técnica binariza a imagem em uma faixa de nível de cinza, e então, para cada imagem segmentada é calculado o parâmetro BV/TV. Este procedimento associa cada valor possível de TH com uma determinada percentagem do volume ósseo e o resultado é uma curva dos valores associados de [BV/TV (%)] *versus* valores de TH. Nesse trabalho foi usado um *fitting* polinomial de ordem 5, e da função polinomial encontrada é calculado a segunda derivada parcial [ $\partial^2(BV/TV)/\partial TH^2$ ]. Finalmente, o ponto onde  $\partial^2(BV/TV)/\partial TH^2 = 0$ , que representa o ponto de inflexão da curva, é escolhido como TH ótimo. A figura 3.16(a) mostra valores de TH na faixa de 0–85 e seus valores de BV/TV correspondentes, e a figura 3.18(b) ilustra a segunda derivada parcial encontrada como resultado do *fitting* da curva da figura 3.18(a)



**Figura 3.18:** Método pela derivada igual a zero. (a) A linha sólida representa a curva de BV/TV calculada para diferentes valores de TH. A linha tracejada subreposta é a curva fitting polinomial de ordem 5. A linha tracejada vertical indica o valor de TH ótimo. (b) Segunda derivada parcial da curva fitting de BV/TV avaliado em toda faixa dos níveis de TH. O valor da derivada parcial igual a zero é selecionado como TH ótimo (linha vertical tracejada).

O método derivada igual a zero (DTH) apresenta duas desvantagens. Primeiro, a ordem da *fitting* polinomial é selecionada visualmente pelo operador, comparando a curva *fitting* com a curva de BV/TV. Segundo, como o método depende de um polinômio de ordem  $n$ , a segunda derivada parcial terá  $n-2$  ordem. Portanto, quando a derivada parcial é avaliada dentro de toda a gama de nível de cinza para calcular o melhor TH, haverá  $n-2$  resultados, ou seja  $n-2$  valores de TH. Neste ponto, o usuário deve selecionar um deles, comparando a imagem binarizada com a original.

### 3.3.2.3 Método de Limiarização OTSU

O método de OTSU [42] seleciona automaticamente o melhor valor de TH, baseado na normalização do histograma da  $f(x,y)$  como uma função de probabilidade discreta, definida como:

$$p_r(r_q) = \frac{n_q}{n}, \quad q = 0, 1, 2, \dots, L-1, \quad (3.30)$$

onde  $n$  é o número total de pixels na imagem e  $n_q$  é o número de pixels com intensidade  $r_q$ .

O algoritmo de OTSU assume que a imagem em escala de cinza,  $f(x,y)$ , contém duas classes de pixels,  $C_0$  e  $C_1$ , correspondendo ao objeto e o fundo, respectivamente. Então, é selecionado automaticamente um valor de TH para separar ambas as classes,  $C_0 = [0, 1, \dots, t]$  e  $C_1 = [t+1, \dots, L-1]$ , e suas distribuições de probabilidade são definidas como:

$$C_0 : \frac{p_1}{\omega_0(t)}, \frac{p_2}{\omega_0(t)}, \dots, \frac{p_t}{\omega_0(t)}, \quad (3.31)$$

$$C_1 : \frac{p_{t+1}}{\omega_1(t)}, \frac{p_{t+2}}{\omega_1(t)}, \dots, \frac{p_L}{\omega_1(t)}, \quad (3.32)$$

onde

$$\omega_0(t) = \sum_{q=1}^t p_q, \quad (3.33)$$

$$\omega_1(t) = \sum_{q=t+1}^L p_q. \quad (3.34)$$

Além disso, os valores médios de para as classes  $C_0$  e  $C_1$  são expressas como:

$$\mu_0 = \sum_{q=1}^t \frac{q \cdot p_q}{\omega_0(t)}, \quad (3.35)$$

$$\mu_1 = \sum_{q=t+1}^L \frac{q \cdot p_q}{\omega_1(t)}, \quad (3.36)$$

e o valor médio total é definido como:

$$\mu_T = \omega_0 \mu_0 + \omega_1 \mu_1. \quad (3.37)$$

Em seguida, usando discriminante linear é calculado a variância inter classes  $\sigma_B^2$ , expressa como:

$$\sigma_B^2 = \omega_0 (\mu_0 - \mu_T)^2 + \omega_1 (\mu_1 - \mu_T)^2. \quad (3.38)$$

Finalmente, o TH ótimo é encontrado pela maximização de  $\sigma_B^2$  como:

$$\text{TH} = \max_t [\sigma_B^2(t)]. \quad (3.39)$$

O algoritmo de OTSU [42] é calculado como se segue:

1. Calcular o histograma da imagem e as probabilidades de cada nível de cinza.
2. *Set up* inicial  $\omega_0(0)$ ,  $\omega_1(0)$ ,  $\mu_0(0)$  e  $\mu_1(0)$  em  $t = 0$  com as equações (3.33)-(3.36).
3. Passo por todos os níveis de cinza  $t = 0$  para  $L-1$ 
  - i) Atualiza  $\omega_0(t)$ ,  $\omega_1(t)$ ,  $\mu_0(t)$  e  $\mu_1(t)$  com as equações (3.33)-(3.36).
  - ii) Calcula a variância inter-classes  $\sigma_B^2$  com a equação 3.38.
4. Determina o melhor valor de TH com a equação 3.39.

O método de OTSU se caracteriza por sua natureza não paramétrica e não supervisionada de seleção de limiar e tem as seguintes vantagens desejáveis: (1) o processo como um todo é muito simples; (2) são utilizados somente os momentos cumulativos zero e de primeira ordem do histograma de níveis de cinza; e (3) viabiliza a análise de outros aspectos importantes, tais como estimativa dos níveis médios das classes e, separação das classes.

### 3.3.3 Operadores Morfológicos

A Morfologia Matemática (MM) é um ramo de processamento de imagem dedicado à análise de formas. Os Operadores Morfológicos (OP) podem simplificar os dados da imagem, preservando as suas características fundamentais e eliminando os irrelevantes. Para conseguir isso, a imagem geralmente é sondada com uma forma menor conhecido chamado elemento estruturante, ou, em inglês, *structuring element* (SE). A forma do SE é escolhido de acordo com algum conhecimento sobre as características geométricas das estruturas de imagem relevantes e irrelevantes [107].

### A. Filtros morfológicos básicos

Os filtros morfológicos básicos são o morfológico de abertura,  $\gamma$ , e o morfológico de fechamento,  $\varphi$ , com um SE  $B$ , e eles são definidos como [107]:

$$\gamma_B(f) = \delta_{\hat{B}}(\varepsilon_B(f)), \quad (3.40)$$

$$\varphi_B(f) = \varepsilon_{\hat{B}}(\delta_B(f)), \quad (3.41)$$

onde  $\hat{B}$  é a transposta de SE, e  $\varepsilon$  e  $\delta$  são as operações morfológicas de erosão e dilatação, respectivamente.

Outra classe de filtros é composta por abertura e fechamento por reconstrução. Quando filtros por reconstrução são construídos, as transformações de base geodésica (dilatação e erosão geodésica) são iteradas até a que idempotência é encontrada durante  $n$  interações. A dilatação e erosão geodésica são dadas por  $\delta_f(g) = f \wedge \delta(g)$  com  $g \leq f$  e  $\varepsilon_f(g) = f \vee \varepsilon(g)$  com  $g \geq f$ , respectivamente. Quando a função  $g$  é igual a erosão ou dilatação da função original, é obtido a abertura ou fechamento por reconstrução [107]:

$$\hat{\gamma}_B(f) = \lim_{n \rightarrow \infty} \delta_f^n(\varepsilon_B(f)), \quad (3.42)$$

$$\hat{\varphi}_B(f) = \lim_{n \rightarrow \infty} \varepsilon_f^n(\delta_B(f)). \quad (3.43)$$

Portanto, a abertura por reconstrução,  $\hat{\gamma}$ , de uma imagem  $f$  com um SE  $= B$  é definido como a erosão de  $f$  com  $B$ , seguido por dilatação geodésica iterada até que estabilidade seja atingida, onde  $\wedge$  é mínimo pontual. O efeito de  $\hat{\gamma}$  em uma imagem é remover todas as estruturas que são ambas menores que SE e mais brilhante que seu entorno.

Por outro lado, o fechamento por reconstrução,  $\hat{\varphi}$ , de uma imagem  $f$ , com SE  $= B$



é definido como a dilatação de  $f$  com  $B$ , seguido pela erosão geodésica iterada até a idempotência é encontrada, onde  $\vee$  é o máximo pontual. O resultado de  $\hat{\varphi}$  é a remoção de todas estruturas que são ambas menores que SE e mais escuras que seu entorno.

### B. Transformação *top-hat*

A transformação *top-hat* é uma operação que extrai pequenos elementos e detalhes das imagens. Em imagens em escala de cinza, esta abordagem pode ser útil em encontrar pequenos pixels aglomerados que estão escuros e rodeados por um fundo relativamente leve, ou vice-versa. Também pode ser usado para localizar bordas em imagens com baixo ruído [108].

Existem dois tipos de transformações *top-hat*: a *white top-hat* (WTH), e o *black top-hat* (BTH). A primeira é definida como a diferença entre a imagem de entrada  $f$  e sua abertura,  $\gamma$ , enquanto a segunda é calculada como a diferença entre fechamento,  $\varphi$ , e a imagem de entrada  $f$ . Os operadores WTH e BTH são definidos como [107]:

$$\text{WTH}(f) = f - \gamma_B(f), \quad (3.44)$$

$$\text{BTH}(f) = \varphi_B(f) - f. \quad (3.45)$$

As transformações *top-hat* são comumente usadas em tarefas de processamento de imagens, como correção da iluminação irregular ou melhoramento de imagem

### 3.4 Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raios X (FRX) é uma técnica multielementar bem estabelecida e desenvolvida, capaz de fornecer informações quantitativas e qualitativas precisas sobre a composição elementar de uma variedade de materiais de forma não destrutiva. A técnica de FRX tem uma ampla faixa dinâmica, alta precisão e um requisito mínimo para a preparação das amostras. A FRX é normalmente empregada para análises de rotinas e não rotinas ambientais, geológicas, biológicas, industriais e outros tipos de amostras [109-112].

A técnica de FRX requer que as espécies sejam irradiadas com fótons muito energéticos. A energia da fonte para irradiar as espécies na maioria dos equipamentos comerciais é um feixe policromático primário emitido por tubos de raios X acoplados aos geradores de alta tensão altamente estabilizados.

Se uma espécie é irradiada com um feixe de fótons de energia  $E_o$ , onde  $E_o$  excede à energia crítica de excitação em um dado átomo, alguns elétrons são ejetados do átomo, diz-se que o átomo está num estado excitado ou ionizado. Átomos em um estado ionizado são instáveis e quase instantaneamente um processo de transição eletrônica começa a fim de preencher as vacâncias deixadas pelos elétrons ejetados.

A energia dos raios X característicos emitidos pelos elementos pode ser calculada de modo aproximado, pela equação 3.46 [113]:

$$E = 13,65(Z - b)^2 \left( \frac{1}{n_f^2} - \frac{1}{n_i^2} \right) \quad (3.46)$$

Onde:

$E$  = energia dos raios X (medida em eV);

$n_i, n_f$  = número quântico principal do nível inicial e final do salto quântico;

$Z$  = número atômico do elemento emissor dos raios X; e

$b$  = constante de Moseley, com valores iguais a 1 e 7,4, para as camadas K e L, respectivamente.

Pela equação 3.46 tem-se que a energia dos raios X emitida é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico  $Z$  do elemento excitado.

A FRX basicamente divide-se em duas variantes analíticas distintas: a baseada na dispersão por comprimento de onda (WD-FRX), existente em mais de 15.000 laboratórios no mundo, e a dispersão por energia (ED-FRX), em 3.000 laboratórios [114]. A WD-FRX desenvolveu-se nos meados da década de 60, enquanto que a ED-FRX dez anos após, com o surgimento dos detectores semicondutores de silício e germânio.

As subvariantes da técnica FRX por dispersão por energia, além da convencional, são: (1) a fluorescência de raios X por reflexão total, possuindo vantagens como quantidades diminutas das amostras (da ordem de 5  $\mu\text{l}$ ) e menores valores de limites de detecção em relação à FRX convencional; (2) a microfluorescência de raios X ( $\mu\text{-XRF}$ ), sendo a única a fornecer informações sobre a distribuição elementar na amostra. Nestas técnicas e variantes, normalmente se utiliza raios X de elementos alvo (Mo, Rh, etc) de um tubo de raios X, e mais recentemente raios X da luz Síncrotron.

É possível resumir a análise por fluorescência de raios X em três fases:

### ***1. Excitação dos elementos***

Quando um átomo de uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons dos níveis interiores dos átomos e, como consequência disto, elétrons dos níveis mais externos realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma redução de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raios X, de energia característica bem definida para cada elemento.

### ***2. Dispersão dos raios X***

No método de fluorescência de raios X com dispersão por comprimento de onda, os raios X característicos são selecionados por um cristal difrator, de acordo com seus comprimentos de onda, obedecendo à lei de Bragg da difração.

Embora seja um método preciso, a fluorescência de raios X com dispersão por comprimento de onda tem como desvantagens o alto custo de aquisição do equipamento e o inconveniente movimento síncrono entre o cristal difrator e o detector.

Na técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia, os raios X interagem com os detectores e produzem pulsos eletrônicos proporcionais às energias dos raios X. Os detectores proporcionais à gás, os cintiladores sólidos de NaI(Tl) e os semicondutores de Si(Li) e Ge hiperpuro são os mais usados [113].

### ***3. Detecção e medida dos raios X***

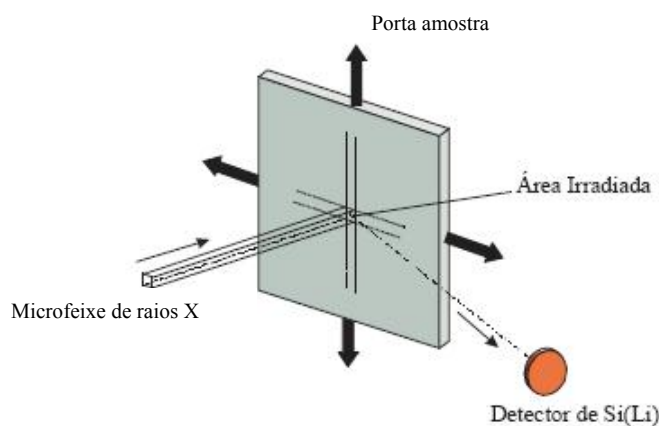
No sistema de fluorescência de raios X de dispersão por comprimento de onda, normalmente são empregados os detectores proporcionais e o cristal cintilador sólido NaI(Tl) na detecção dos raios X característicos, pois a separação ou seleção dos raios X é feita através do cristal de difração, não havendo necessidade de um detector que discrimine as energias ou os comprimentos de onda dos vários raios X emitidos pela amostra.

O detector proporcional tem resolução intermediária, os detectores de Si(Li), e Ge hiperpuro, por distinguirem linhas espectrais de energias próximas, como  $K_{\alpha}$  e  $K_{\beta}$ , são os mais indicados para a técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia.

A escolha entre os detectores semicondutores de Si(Li) e Ge hiperpuro deve ser feita em função da faixa de energia de interesse, sendo, normalmente, o primeiro utilizado na faixa de 1 a 50 keV, e o segundo acima de 30 keV, por apresentar uma maior eficiência de detecção [113].

### 3.4.1 Microfluorescência de Raios X.

A microfluorescência de raios X ( $\mu$ FRX), uma importante variante da fluorescência de raios X por dispersão em energia, surgiu em meados da década de 1980, baseada na excitação localizada e análise microscópica de uma pequena área na superfície de uma amostra maior, fornecendo informações sobre a distribuição de elementos majoritários, minoritários e de traço, presentes no material em estudo. Um esquema da montagem experimental de medidas por  $\mu$ FRX pode ser visto na figura 3.19.



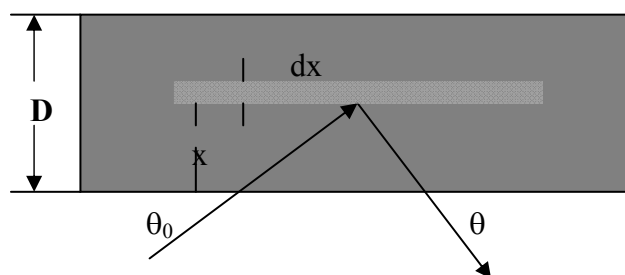
**Figura 3.19:** Desenho esquemático da montagem experimental para medições por  $\mu$ FRX [115].

Basicamente, um feixe primário de raios X com uma pequena seção transversal (microscopicamente) irradia uma amostra e induz a emissão de fluorescência de raios X de um microlocal. Um adequado sistema detector coleta a radiação fluorescente que transporta informações sobre a composição local da amostra. Quando a amostra é movida manualmente ou controlada por computador, no caminho do feixe de raios X, é possível fazer uma análise pontual, em uma linha ou em uma área (imagem). A dificuldade na exploração deste método refere-se à produção de feixes de raios X suficientemente intensos para permitir sensíveis microanálises. Os meios para atingir estes objetivos recentemente começaram a aparecer com o desenvolvimento de fontes de radiação Síncrotron e os recentes progressos no domínio da óptica de raios X.

### 3.4.2 Análise Quantitativa por $\mu$ FRX

A análise por fluorescência de raios X constitui-se por duas etapas, a primeira consiste apenas na identificação elementar dos componentes presentes em uma amostra. A segunda etapa consiste em uma análise elementar mais profunda da amostra, baseada na determinação das proporções em que tais elementos se apresentam em um dado objeto de estudo [13].

Para se determinar a relação entre a intensidade da radiação fluorescente e a concentração  $W_i$  de um elemento  $i$  em uma amostra, deve-se assumir uma amostra homogênea com espessura uniforme  $D$ . A intensidade da linha  $K\alpha$  de um elemento, produzida numa camada  $dx$  a uma profundidade  $x$  (figura 3.20) é produto de três probabilidades [56]:



**Figura 3.20:** Geometria para a análise quantitativa da fluorescência de raios X (Adaptado de [56]).

A *probabilidade P1*: é a probabilidade da radiação de excitação atingir a camada  $dx$  a uma profundidade  $x$ :

$$P_1 = e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \sin \theta_0} \quad (3.47)$$

onde  $\mu_0$  é o coeficiente de absorção de massa da matriz ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) na energia dos fótons incidentes,  $\rho_0$  é a densidade da matriz ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) e  $\theta_0$  é o ângulo de incidência entre a direção do feixe incidente e a superfície da amostra. O valor de  $\mu_0$  pode ser calculado

como o somatório dos produtos do coeficiente de absorção de massa pela fração em massa de todos os elementos presentes na amostra.

A *probabilidade P<sub>2</sub>*: é a probabilidade da radiação de excitação produzir uma vacância nos átomos de um elemento de interesse contidos na camada dx, resultando na produção de raios X característicos:

$$P_2 = \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho \cdot dx, \quad (3.48)$$

onde  $\tau$  é o coeficiente de absorção de massa para efeito fotoelétrico do elemento de interesse ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) na energia de excitação,  $w$  é o rendimento de fluorescência da camada K,  $j$  é a razão de salto da camada K  $\rightarrow$  camada L,  $f$  é a fração de fótons K emitidos como raios K $\alpha$  característicos e  $\rho$  é a densidade ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ).

O coeficiente de absorção para o efeito fotoelétrico exatamente na energia do corte de absorção tem dois valores: um superior, que representa a probabilidade de retirar elétrons de todas as camadas K, L, M, etc., e um inferior, que representa a probabilidade de retirar elétrons de todas as camadas, com exceção da camada K. Assim defini-se razão de salto (*jump ratio*) como a razão entre os valores, superior e inferior. Portanto pode-se definir essa razão como a probabilidade de retirar elétrons de todas as camadas em relação à probabilidade das camadas L, M, etc.

O segundo termo da equação,  $(1-1/j)$ , indica a probabilidade de ionização da camada K em relação a todas as camadas K, L, M, etc., e então o termo  $\tau \cdot (1-1/j)$  representa o número de ionizações ocorridas na camada K.

Os parâmetros fundamentais  $\tau$ ,  $w$ ,  $j$  e  $f$  para um determinado elemento dependem apenas da energia de excitação e podem ser agrupado em um único termo, denominado constante dos parâmetros fundamentais (K) e então, a equação pode ser reescrita como:

$$P_2 = K \cdot \rho \cdot dx, \quad (3.49)$$

onde

$$K = \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \quad (3.50)$$

*Probabilidade P3:* é a probabilidade do raio X  $K\alpha$  produzido na camada  $dx$  não ser absorvido na espessura  $x$  e, conseqüentemente atingir o detector, produzindo um pulso eletrônico:

$$P_3 = e^{-\mu \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen} \theta} \cdot \varepsilon, \quad (3.51)$$

onde  $\mu$  é o coeficiente de absorção de massa da matriz ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ),  $\varepsilon$  é a eficiência do detector na energia dos fótons característicos e  $\theta$  é o ângulo de emergência (entre a superfície da amostra e a direção do feixe emergente).

A eficiência do detector pode ser calculada teoricamente mediante as dimensões dos componentes do detector (camadas ativa e morta de Si, camada de ouro, janela de Be, etc.) especificados pelo fabricante, distância entre a amostra e o detector, e condições de excitação (sob ar, vácuo ou hélio).

A intensidade da radiação fluorescente  $dI$  produzida pelo elemento  $i$  contido na camada  $dx$  é o produto das três probabilidades P1, P2 e P3 e do fator de geometria G, que pode ser escrita como:

$$dI = G \cdot \underbrace{e^{-\mu_0 \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen} \theta_0}}_{P1} \cdot \underbrace{\tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho \cdot dx}_{P2} \cdot \underbrace{e^{-\mu \cdot \rho_0 \cdot x / \text{sen} \theta} \cdot \varepsilon}_{P3} \quad (3.52)$$



Onde:  $G = I_0 \cdot \Omega_1 \cdot \Omega_2$ .

A variável  $G$ , denominada fator de geometria, é uma constante de proporcionalidade e depende apenas da geometria do sistema de excitação-deteção, da intensidade da fonte de excitação, e não da concentração elementar.

A equação 3.52 pode ser rescrita como:

$$dI = G \cdot e^{-(\mu_0 / \text{sen}\theta + \mu / \text{sen}\theta_0) \cdot \rho_0 \cdot x} \cdot \tau \cdot w \cdot \left(1 - \frac{1}{j}\right) \cdot f \cdot \rho_0 \cdot \varepsilon \cdot dx \quad (3.53)$$

Os coeficientes de absorção de massa para as energias dos feixes incidente  $E_0$  e emergente  $E_i$  podem ser agrupados da seguinte forma:

$$\chi_i(E_0, E_i) = \frac{\mu_M(E_0)}{\text{sen}\theta_1} + \frac{\mu_M(E_i)}{\text{sen}\theta_2}, \quad (3.54)$$

onde  $\chi_i(E_0, E_i)$  pode ser interpretado como um coeficiente de absorção de massa total. A equação 3.54 pode ser reescrita, fazendo as devidas substituições em seus termos, através dos definidos pelas equações 3.51, 3.52 e 3.53, obtendo:

$$dI = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot x} \cdot \rho \cdot dx \quad (3.55)$$

A equação 3.55 ao ser integrada em toda a espessura da amostra, fornece a intensidade da radiação fluorescente  $I$  (fótons.s<sup>-1</sup>) emitida por um elemento  $i$ , com concentração  $W_i$ , na amostra.

$$I_i = G \cdot K_i \cdot \varepsilon_i(E_i) \cdot \rho_i \cdot \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi_i \cdot \rho_0}, \quad (3.56)$$

onde,  $\rho_0 \cdot D$  é a densidade superficial de massa da amostra, medida em g /cm<sup>2</sup>,  $\frac{\rho_i}{\rho_0} = W_i$  é a concentração do elemento  $i$  na amostra, medida em µg/g ou em g/kg, ou seja, a concentração fracionada do elemento em base de massa. Sendo assim:

$$I = G \cdot \varepsilon \cdot K \cdot W \cdot \frac{1 - e^{-\chi \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi} \quad (3.57)$$

O produto que envolve os parâmetros fundamentais  $K_i$ , a geometria do arranjo experimental  $G$  e a eficiência da detecção  $\varepsilon_i(E_i)$  representam a sensibilidade do espectrômetro de raios X para o elemento  $i$  na amostra, sendo representado por  $S_i$ .

$$S_i = G \cdot K_i \cdot \varepsilon_i(E_i) \quad (3.58)$$

A partir desse novo termo, apresentado na equação 3.58, a equação 3.57 pode ser reescrita como:

$$I_i = S_i \cdot W_i \cdot \frac{1 - e^{-\chi_i \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi_i} \quad (3.59)$$

A razão apresentada na equação é denominada fator de absorção  $A$  para o elemento  $i$  na amostra:

$$A = \frac{1 - e^{-\chi_i \cdot \rho_0 \cdot D}}{\chi_i} \quad (3.60)$$

### 3.4.3 Limite de Detecção

O limite de detecção representa a menor quantidade (volume, massa, concentração, etc) que pode ser discriminada estaticamente em relação à radiação de fundo (BG) de uma medida. O limite de detecção  $LD_i$  para cada elemento de uma amostra está diretamente relacionado com a intensidade do  $BG_i$  sob o pico desse elemento de acordo com a equação [116]:

$$LD_i = \frac{3C}{I} \frac{\sqrt{BG}}{\sqrt{t}} \quad (3.61)$$

Este limite pode ser expresso como uma concentração elementar que resulta em uma intensidade líquida igual a 3 vezes a intensidade do  $BG_i$ .

Onde C é a concentração elementar do padrão e t é o tempo de medida.

### 3.5 A Radiação Síncrotron

A radiação Síncrotron (RS) é uma radiação eletromagnética emitida por elétrons relativísticos (elétrons com energia  $E \gg mc^2$ ) viajando em uma trajetória curva. Elétrons relativísticos são gerados em aceleradores circulares com energia da ordem de giga elétron volts (GeV). As aplicações da RS são inúmeras, destacando-se seu uso na biologia, catálise em química, física de superfícies, física do estado sólido, microestrutura e raios-X [117].

As características mais importantes da radiação Síncrotron estão centradas no fato de que seu espectro estende-se continuamente em comprimentos de onda na região do infravermelho até raios X duros, e a radiação é linearmente polarizada no plano da órbita do elétron e elipticamente polarizada acima e abaixo deste plano. Além destes fatores a radiação Síncrotron é altamente colimada, originando um feixe de elétrons com brilho excepcional [118]. Adicionalmente, a radiação é cerca de 10<sup>6</sup> vezes mais

potente que a produzida por um tubo de raios-X convencional [119]. Estas características são empregadas, principalmente, em medidas de fluorescência [117].

O surgimento e a difusão de laboratórios de radiação Síncrotron deram-se na década de 60 [117, 120], e nesta seção apenas os componentes principais para gerar radiação Síncrotron serão citados. O componente de maior importância é o anel de armazenamento da radiação Síncrotron. Este dispositivo é formado por estruturas magnéticas (comumente chamadas de *bend*) que curvam os elétrons em um círculo e produz radiação Síncrotron. Outros componentes de destaque são denominados de *wiggler's*, que são usados para produzir ou aumentar radiação e as bombas de vácuo empregadas para evacuar o anel de armazenamento.

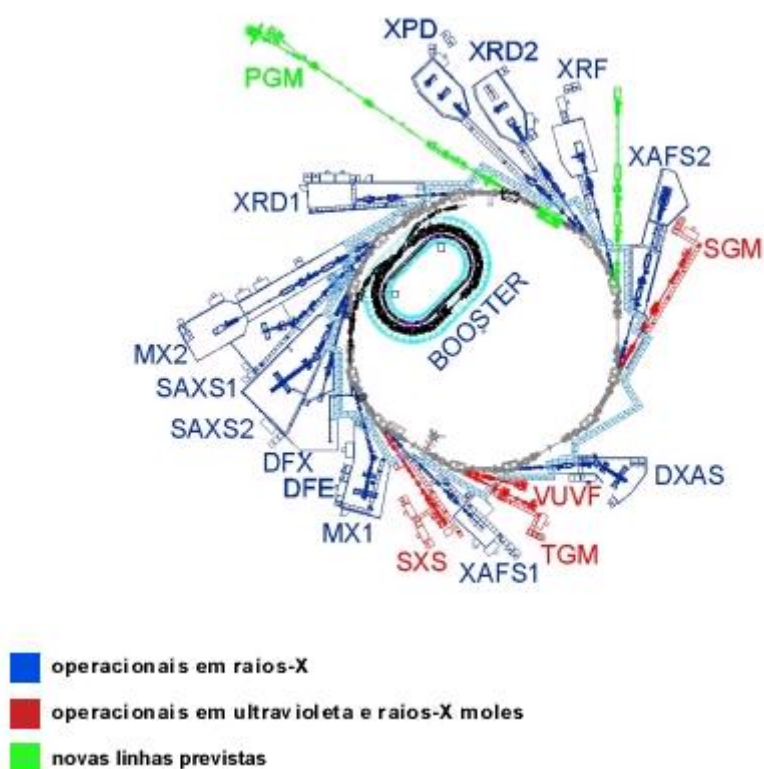
A construção do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS teve início em 1987, na cidade de Campinas, sob o gerenciamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e do Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT. O LNLS é um dos maiores projetos científicos já realizados no Brasil, e, em 1997, foi celebrado o término da sua construção. Os objetivos da construção do LNLS estão voltados em dotar o país de um laboratório capaz de gerenciar e conduzir pesquisas científicas. Estas pesquisas devem ter, preferencialmente, uma grande variedade de aplicações tecnológicas, nível elevado e relevância internacional. Outro objetivo importante está em atender a comunidade científica nacional e internacional no desenvolvimento de experimentos [121].

As principais características operacionais do LNLS são mostradas na tabela 3.3. No acelerador linear, os elétrons são acelerados em duas fases: na primeira, eles ganham energia até 80 KeV ao atravessarem um campo eletrostático em um componente chamado canhão de elétrons; na segunda, estes elétrons entram em 4 guias de onda, chamadas estruturas aceleradoras, onde ondas de rádio-frequência lhes fornecem energia de até 100 MeV.

**Tabela 3.3:** Principais características operacionais do LNLS [121].

Parâmetro	Valor/Característica
Energia de operação	1,37 GeV
Injetor	Acelerador linear
Energia injetada	120 MeV
Corrente elétrica nominal	100 mA
Circunferência	93,21 m
Diâmetro médio	30 m
Tempo de vida do elétron	10 horas

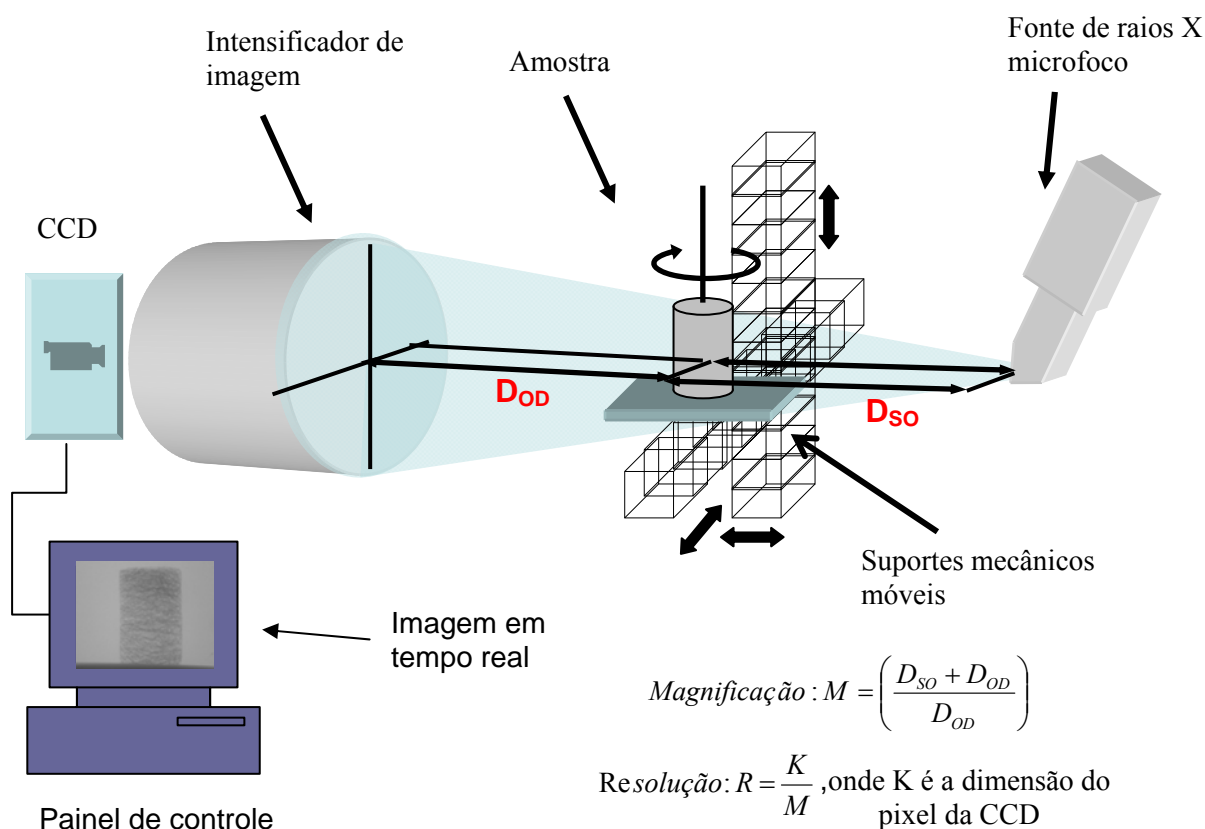
O anel de armazenamento de elétrons existente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) tem capacidade para 24 linhas de luz. Atualmente, os pesquisadores têm à disposição doze linhas de luz e três em projeto. No anel de armazenamento um dos parâmetros mais importantes é o tempo de vida dos elétrons que estão armazenados. Normalmente este tempo deve ser da ordem de 10 horas ou mais, de modo que os experimentos possam ser efetuados durante todo um dia de trabalho. A Figura 3.21 mostra o posicionamento de cada linha de luz do LNLS.

**Figura 3.21:** Linhas de Luz do LNLS, Campinas [122].

## 4. CORREÇÃO DE ENDURECIMENTO DE FEIXE E CALIBRAÇÃO DO SISTEMA DE MICROTOMOGRAFIA

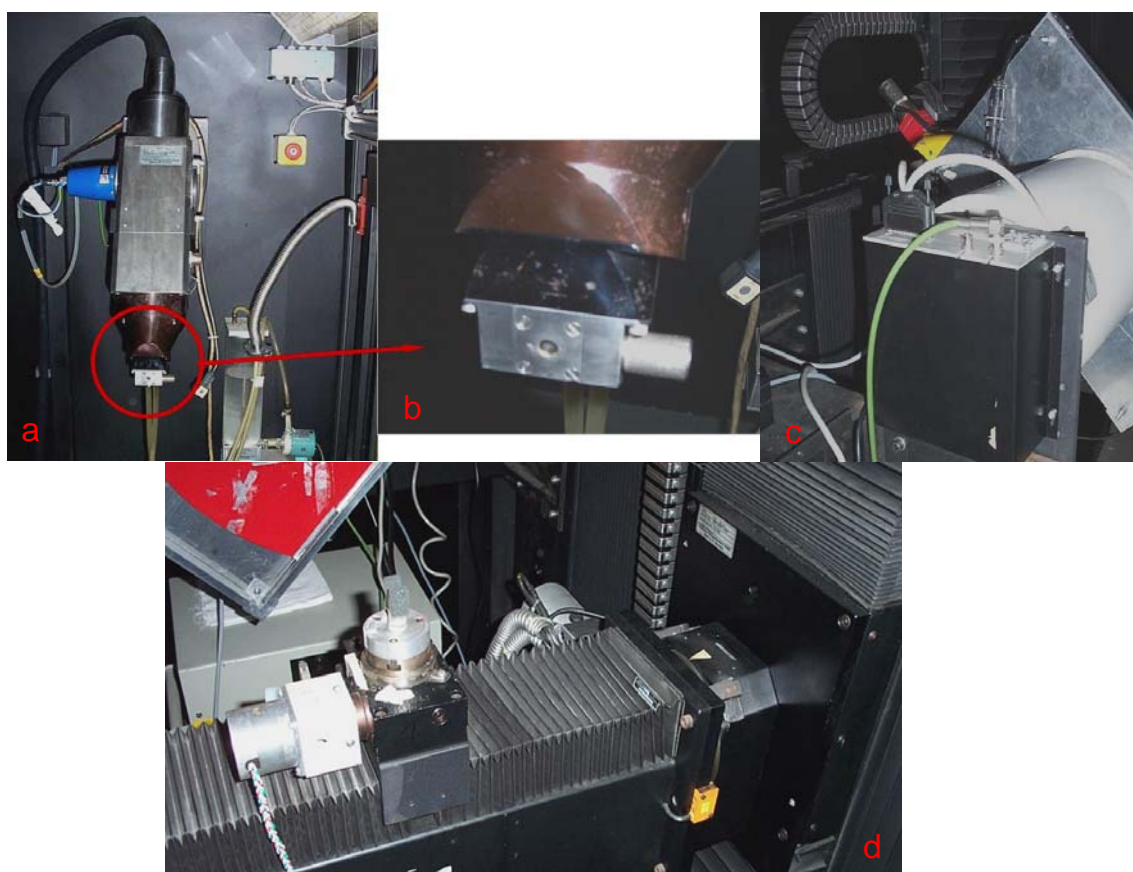
### 4.1 Equipamento para Microtomografia de Raios X

Para obtenção das microtomografias foi utilizado o sistema de raios X Fein Focus, modelo FXS 160-50 do Laboratório de Instrumentação Nuclear da COPPE/UFRJ [123]. O sistema experimental consiste em um tubo de raios X microfocado com feixe cônico, que opera dentro de um intervalo de tensão de 0 a 160 kV e de corrente de 0 a 1mA. O sistema de detecção é composto por um tubo intensificador de imagem de 22,5 cm de diâmetro acoplado a uma câmera de vídeo tipo CCD. O sinal eletrônico que vem do intensificador é capturado pela CCD e enviado a um monitor de televisão que está no console do sistema, onde é possível visualizar a imagem radiográfica em tempo real.



**Figura 4.1:** Desenho esquemático do sistema de raios X Fein Focus.

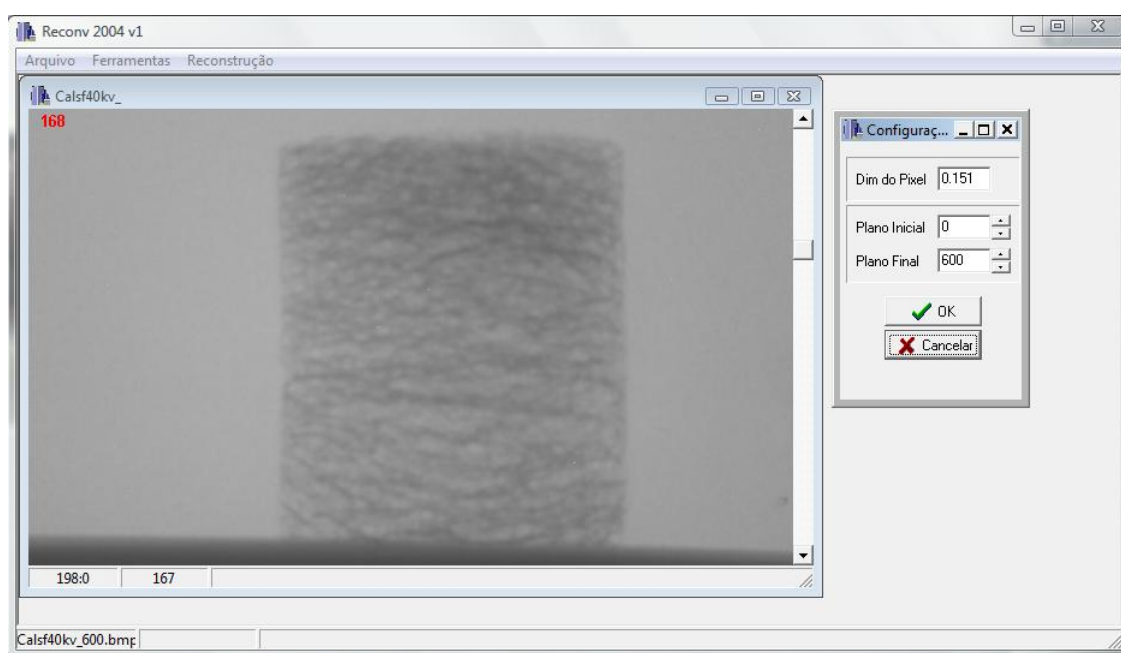
Este sistema também possui suporte mecânico móvel que possibilitam vários graus de liberdade com relação à movimentação e posicionamento do corpo de prova, o que viabiliza o ajuste do fator de magnificação da imagem a ser capturada. A magnificação está relacionada às distâncias da fonte-amostra ( $D_{SO}$ ) e amostra-detector ( $D_{OD}$ ). O sinal eletrônico, enviado pela CCD ao monitor de vídeo, é transformado em digital, por uma interface Analógica-Digital de 8 bits. Este sinal é processado em tempo real por um microcomputador Pentium-233MHz com 64MB de memória RAM e apresentado em um monitor de vídeo do tipo super VGA, sendo armazenado sob a forma de arquivo bitmap. A figura 4.2 mostra detalhes do sistema de raios X Fein Focus.



**Figura 4.2:** Detalhes do sistema de raios X Fein Focus. Em (a) o tubo de raios X microfoco, (b) detalhes do alvo e da janela de saída, (c) posicionamento da CCD acoplada ao intensificador de imagem e em (d) braço mecânico para posicionamento de amostras [14].

As imagens digitalizadas são adquiridas entre 30-60 minutos, dependendo do número de projeções. A reconstrução das imagens tomográficas é feita com algoritmo de retroprojeção filtrada pelo programa Reconv desenvolvido por OLIVEIRA [14]. A figura 4.3 mostra a interface do programa de reconstrução; e os dados de entrada para a execução da reconstrução são os seguintes:

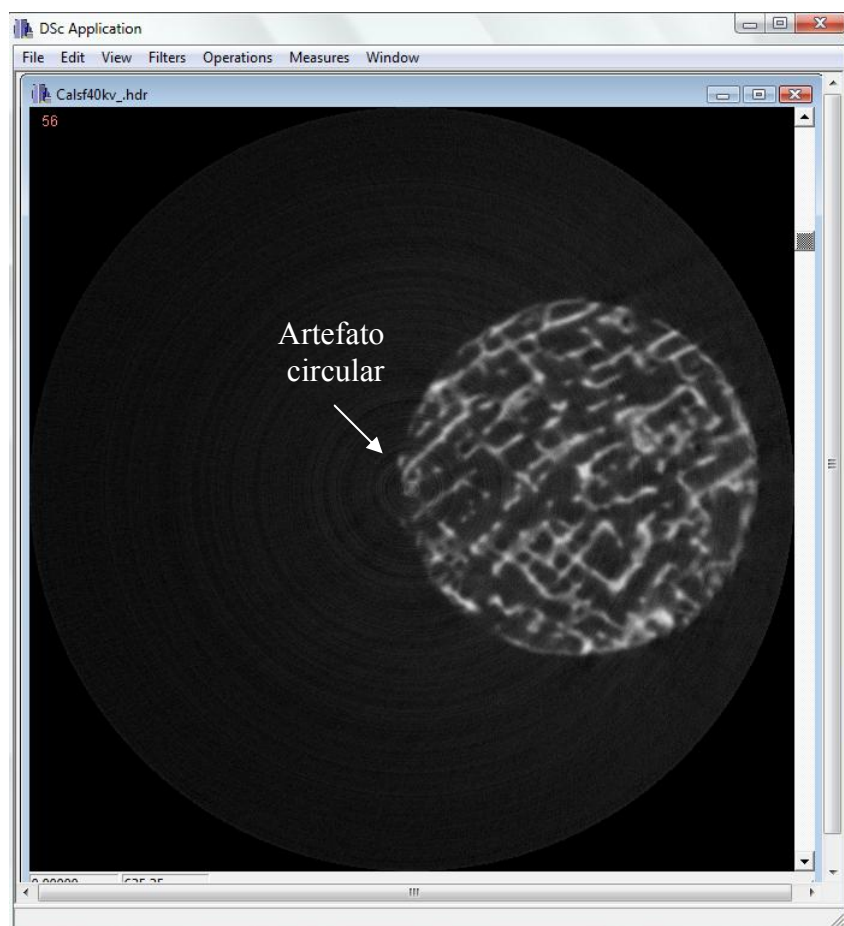
- a. As imagens radiográficas (com extensão bitmap);
- b. Dimensão do *pixel* da CCD;
- c. Escolha do plano inicial e final de reconstrução.



**Figura 4.3:** Interface do programa de reconstrução Reconv [14].

As imagens reconstruídas são armazenadas em um arquivo *\*.raw*, onde é possível visualizar todos os planos (*slices*) da amostra inspecionada, e um outro arquivo *\*.hdr* onde são armazenados os coeficientes de atenuação da amostra inspecionada como 0-Maxdensi . Na figura 4.4 pode ser visto um *slice* 2D após a reconstrução





**Figura 4.4:** Imagem 2D da amostra após reconstrução.

É possível perceber na figura 4.4 a presença de artefatos circulares. Este tipo de artefato provém da não linearidade dos fotoelementos do detector em resposta a uma mesma excitação luminosa [14]. O fato destas não linearidades ocorrerem sempre nos mesmos lugares, faz com que as projeções (unidimensional ou bidimensional) apresentem um perfil de ganho comum. Este perfil de ganho gera no sinograma da imagem uma série de listas verticais, que indicam as posições do detector onde a variação da eficiência dos fotoelementos é mais “agressiva” [14]. Uma forma de se eliminar os anéis da reconstrução é eliminar as listras verticais no sinograma. E isso pode ser feito de duas maneiras: corrigindo-se o perfil de ganho diretamente do detector antes do processo de aquisição ou utilizando filtros morfológicos após a etapa de reconstrução da imagem [14].

## 4.2 Correções de Endurecimento de Feixe

O método adotado para correção de endurecimento de feixe foi o de linearização das projeções usado por HERMAN [29]. Em seu trabalho HERMAN desenvolveu um método para aproximar a atenuação policromática para monocromática, pela linearização dos coeficientes de atenuação, como visto na seção 3.2.2.3 do capítulo anterior. O autor usou um espectro de raios X discretizado em energia para encontrar a calibração entre os coeficientes de atenuação de projeções usando uma fonte monoenergética e outra polienergética. HERMAN calculou os raios soma polienergéticos  $p$  assumindo uma probabilidade fóton contagem,  $\tau_E$ , de 25% para 40 KeV, 50 % para 70 KeV e 25% para 100 KeV, enquanto que os raios soma monoenergéticos  $m$  foram calculados para energia de 70 KeV. Neste trabalho, a relação entre  $m$  e  $p$  foi feita considerando apenas osso, além de ar. A tabela 4.1 mostra os valores dos coeficientes de atenuação do osso (ICRU - 44,  $\rho = 1,92 \text{ g/cm}^3$  [124]) usados na curva de calibração entre as projeções mono e polienergéticas, dado pela equação 3.22.

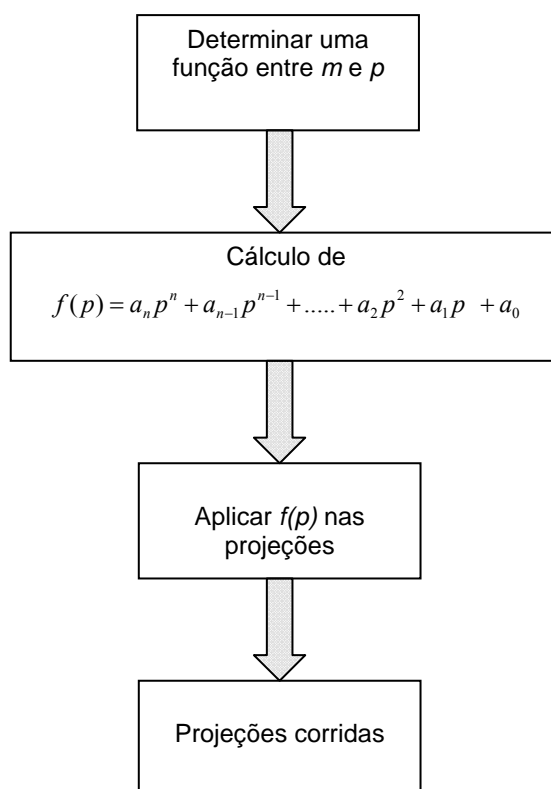
**Tabela 4.1:** Coeficiente de atenuação linear para o osso assumido nos cálculos dos dados de projeções monoenergéticos e polienergéticos (Fonte: NIST [124]).

$\tau_E$ (%)	$\mu_{\text{osso}, E} (\text{cm}^{-1})$	Energia (KeV)
25	$3,46 \times 10^{-1}$	40
50	$1,33 \times 10^{-1}$	70
25	$0,96 \times 10^{-1}$	100

A relação não linear entre  $m$  e  $p$  foi ajustada com polinômios usando a equação 3.22 do capítulo 3, ou seja, cada projeção das imagens microtomográficas foi corrigida com uma função polinomial  $f(p)$  para tendências lineares que se espera no caso monocromático.

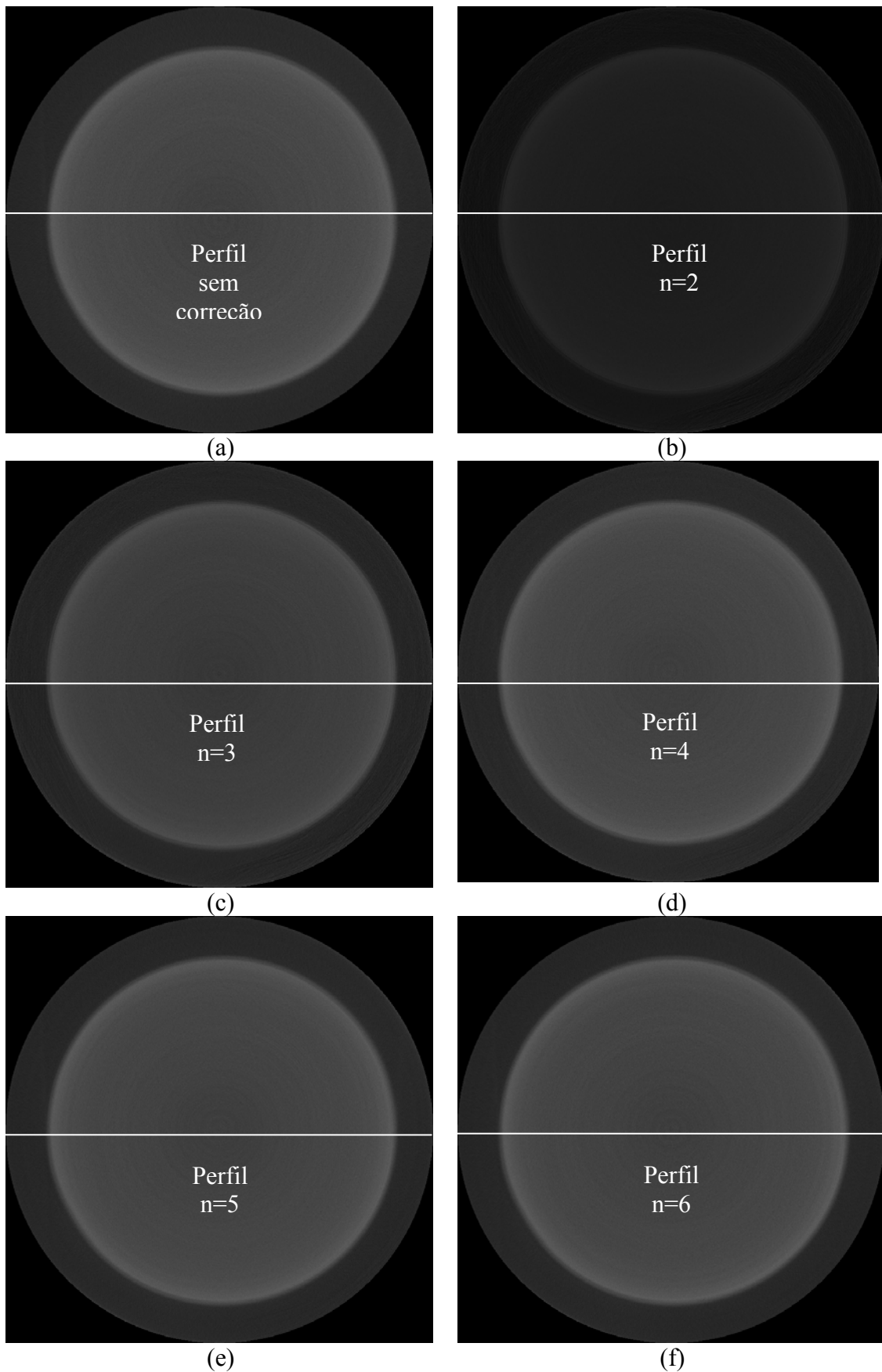
Foram testados ordens polinomiais para escolher o melhor ajuste, e o  $n$  foi variado de 2 a 6. Para valores maiores que 6 os coeficientes polinomiais tendiam a zero. O teste para escolher o melhor ajuste foi feito com dados de projeções das imagens

microtomográficas de uma amostra cerâmica de hidroxiapatita pura HAp-H1 (tabela 4.2, seção 4.3). Os cálculos de  $f(p)$  e as correções das projeções foram feitos utilizando o programa MATLAB® 2007<sup>a</sup> [125]. A seguir um esquema dos passos feitos pelo programa.

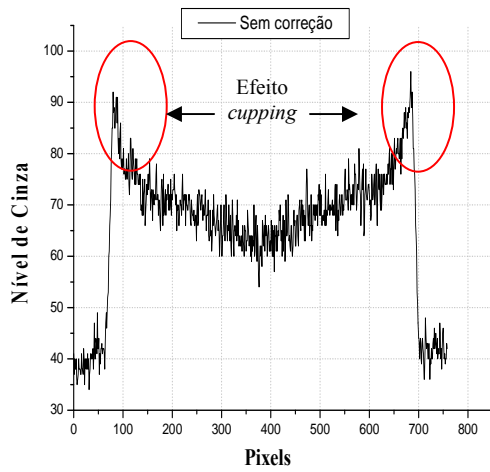


**Figura 4.5:** Esquema da metodologia utilizando o programa MATLAB para corrigir os dados de projeção das imagens microtomográficas.

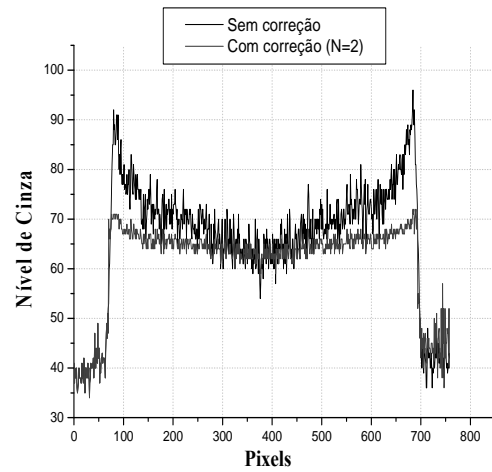
Na figura 4.6 pode ser visto as imagens obtidas da cerâmica de HAp-H1. Em (a) sem correção, (b) com correção polinomial  $n=2$ , (c)  $n=3$ , (d)  $n=4$ , (e)  $n=5$  e (f)  $n=6$  e na figura 4.7 seus respectivos perfis.



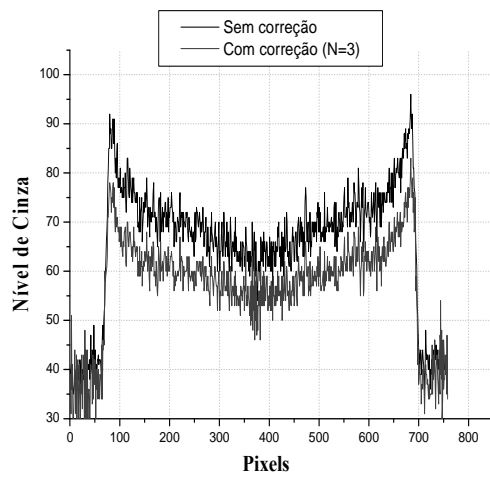
**Figura 4.6:** Imagens obtidas da cerâmica de HAp-H1. Em (a) sem correção, (b) com correção  $n=2$ , (c)  $n=3$ , (d)  $n=4$ , (e)  $n=5$  e (f)  $n=6$ .



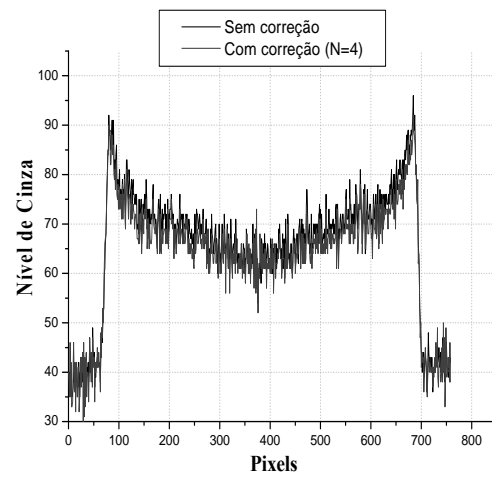
(a)



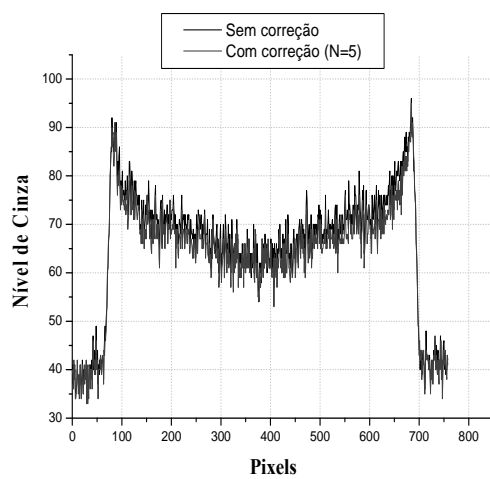
(b)



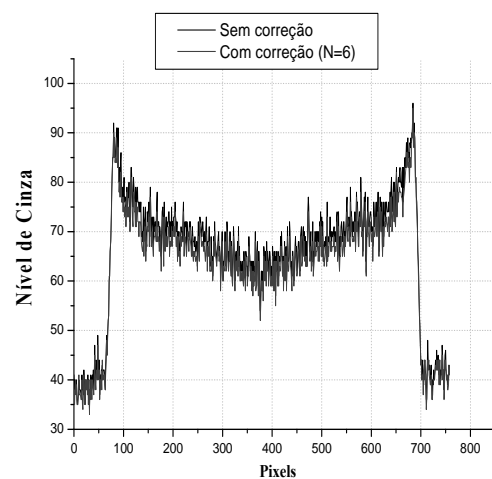
(c)



(d)



(e)



(f)

**Figura 4.7:** Perfis das imagens da cerâmica de HAp-H1. Em (a) sem correção, (b) com correção  $n=2$ , (c)  $n=3$ , (d)  $n=4$ , (e)  $n=5$  e (f)  $n=6$ .

Na figura 4.6b, que foi reconstruída após correção do endurecimento de feixe usando polinômio de ordem 2, é possível perceber uma homogeneidade no nível de cinza da imagem e suavização de artefato circular em relação a imagem sem correção (figura 4.6a). As demais imagens 4.6c a 4.6f não apresentaram suavização deste artefato.

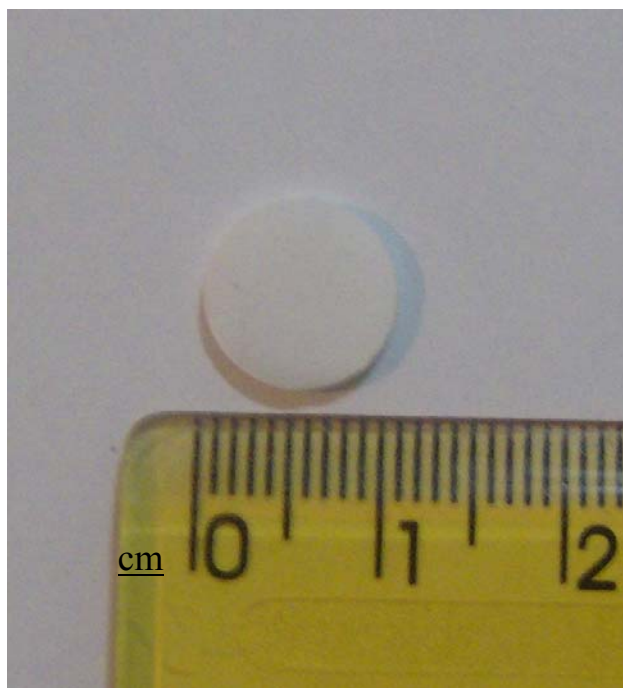
Ao comparar os perfis de cada imagem após correção de endurecimento de feixe (figuras 4.7b a 4.7f) é possível perceber que a correção usando polinômio de grau 2 mostrou uma melhor linearização dos dados do que a usando polinômios de grau 3 a 6. A linearização por  $n=2$  também diminuiu o efeito *cupping* (circulo vermelho na figura 4.7a). O efeito *cupping* é um efeito causado pelo endurecimento de feixe, onde os valores de intensidade na borda de um objeto têm seus valores aumentados.

### 4.3 Calibração do Sistema de Microtomografia

Para representar os níveis de cinza das imagens microtomográficas em densidade mineral óssea (DMO) é necessário levantar uma curva de calibração Densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) *versus* Coeficiente de Atenuação ( $\text{cm}^{-1}$ ) para o equipamento de microtomografia. O primeiro critério a ser utilizado é a escolha de um material de referência cujos coeficientes de atenuação refletem a absorção dos minerais ósseos; e o segundo, que este material também seja homogêneo em resolução espacial. Segundo a literatura, os principais componentes do tecido ósseo são cálcio e fósforo, estes abundantemente na forma de hidroxiapatita, e ambos os critérios citados anteriormente podem ser encontrados em amostras sólidas de hidroxiapatita [126, 127]. Comercialmente, já se encontra fantoma para calibração de sistema de microtomografia feitos com hidroxiapatita com densidades variáveis embebidos em resina epóxi [55].

O Laboratório de Materiais Biocerâmicos do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) produz fosfatos de cálcio, e desenvolve pesquisa fundamental e aplicações tecnológicas utilizando biocerâmicas [128]. Dentre as biocerâmicas produzidas, destacam-se a hidroxiapatita pura (HAp) que são empregadas como implantes para reconstrução óssea [129].

Foram doados por este laboratório, 8 amostras cerâmicas de HAp preparadas com densidades diferentes para o levantamento da curva de calibração do sistema de microtomografia. Todas as amostras foram preparadas utilizando a técnica de pressão uniaxial. Para tanto, o material em forma de pó foi pesado e colocado em um molde cilíndrico, onde foi lubrificado com ácido oléico e prensado em 6 toneladas por 15 minutos cada amostra. Após a prensagem as amostras foram tratadas termicamente a 1100 °C em fornos de câmara. Na figura 4.8 pode ser visto uma amostra cerâmica após o processo de sinterização. Na tabela 4.2 podem-se observar as especificações físicas de cada amostra cerâmica usada na curva de calibração.



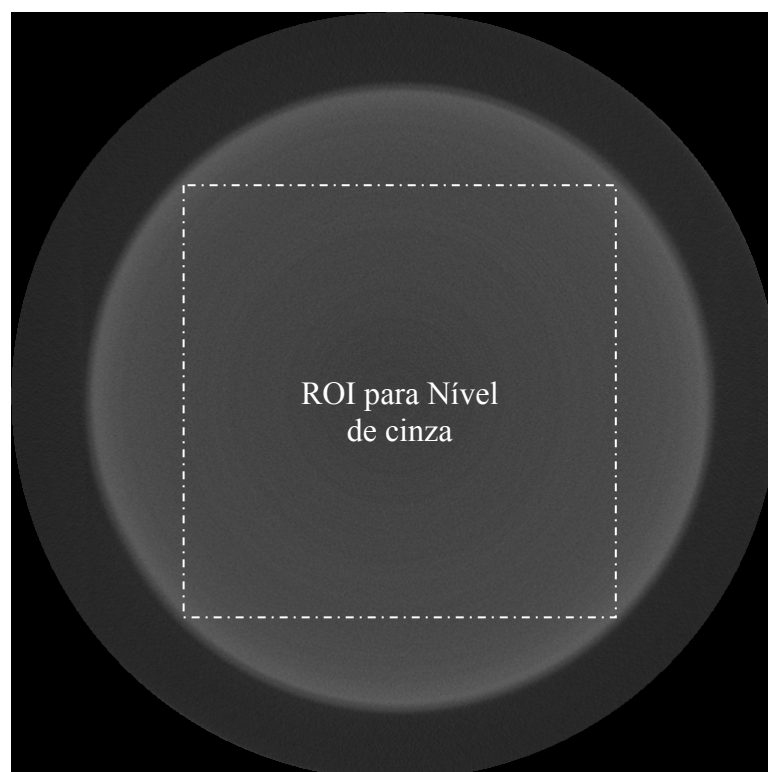
**Figura 4.8:** Amostra cerâmica de hidroxiapatita pura (HAp).

**Tabela 4.2:** Valores de massa, espessura, diâmetro e densidade das amostras cerâmicas de hidroxiapatita pura (HAp).

Amostras HAp	Massa (g)	Espessura (cm)	Diâmetro (cm)	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
H1	0,21	0,11	1,00	2,49
H2	0,36	0,13	1,13	2,79
H3	0,26	0,11	1,04	2,82
H4	0,27	0,10	1,06	3,02
H5	0,25	0,10	0,97	3,41
H6	0,27	0,10	1,00	3,44
H7	0,27	0,10	0,98	3,52
H8	0,28	0,10	1,00	3,57

Os coeficientes de atenuação de cada amostra de HAp foram medidos no sistema de microtomografia (figura 4.1). Cada amostra de HAp foi posicionada na mesa porta amostra deste sistema à uma distância 110 mm da fonte e 1100 mm do detector, tendo as imagens um fator de magnificação igual a 11 e resolução de 13,55  $\mu\text{m}$ . As amostras foram tomografadas com tensão de 40 kV ( $\sim 26,67$  KeV), corrente de 0,10 mA, 32 quadros e 600 projeções. O coeficiente de atenuação de cada amostra, após a reconstrução das imagens pelo programa Reconv [14], foram armazenados em arquivo de texto \*.hdr, onde os valores de Maxdensi equivale ao coeficiente de atenuação máximo dividido pelos tons de cinza (255) da imagem e multiplicado pela resolução da mesma. Para obter o coeficiente de atenuação da amostra em  $\text{cm}^{-1}$  basta fazer o caminho inverso, ou seja, multiplica-se o valor de Maxdensi pelo nível de cinza da imagem e dividi-lo pela resolução. Na figura 4.9 pode ser visto um *slice* 2D da amostra H1 de HAp onde se tem em destaque no centro da amostra uma região de interesse (ROI) para o nível de cinza da imagem.



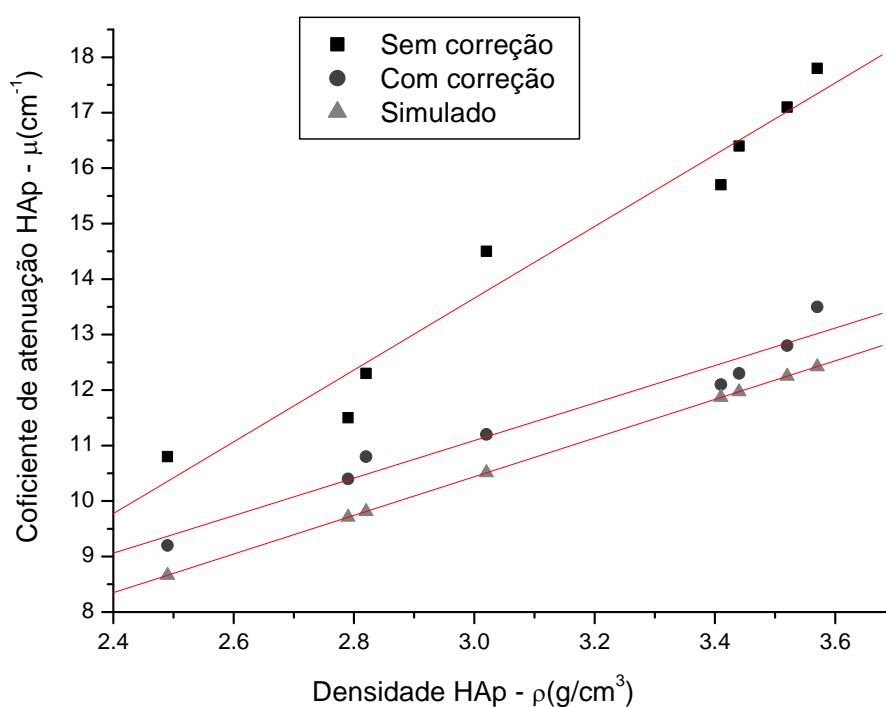


**Figura 4.9:** Imagem 2D da amostra H1 de HAp após reconstrução e em destaque a ROI para nível de cinza.

Para avaliar o método de calibração os valores dos coeficientes de atenuação para cada amostra de HAp foram simulados no programa XCOM do NIST [124] e posteriormente comparados com os valores experimentais encontrados sem correção e com correção de endurecimento de feixe. A tabela 4.3 traz os valores dos coeficientes de atenuação de cada amostra de HAp medido no sistema de microtomografia sem correção e com correção de endurecimento de feixe e os valores simulados. Na figura 4.10 pode-se observar a curva de calibração do sistema.

**Tabela 4.3:** Valores dos coeficientes de atenuação ( $\text{cm}^{-1}$ ) das cerâmicas de hidroxiapatita pura (HAp) medidos no sistema de microtomografia sem correção e com correção de endurecimento de feixe, e simulados no XCOM.

Amostras HAp	Coefficiente de Atenuação ( $\text{cm}^{-1}$ ) sem correção	Coefficiente de Atenuação ( $\text{cm}^{-1}$ ) com correção	Coefficiente de Atenuação ( $\text{cm}^{-1}$ ) simulado	Erro Relativo sem correção (%)	Erro Relativo com correção (%)
H1	10,80	9,20	8,66	19,81	5,87
H2	11,50	10,40	9,71	15,57	6,63
H3	12,30	10,80	9,81	20,24	9,17
H4	14,50	11,20	10,51	27,52	6,16
H5	15,70	12,10	11,87	24,39	1,90
H6	16,40	12,30	11,97	27,01	2,68
H7	17,10	12,80	12,25	28,36	4,30
H8	17,80	13,50	12,42	30,22	8,00



**Figura 4.10:** Curva de calibração Densidade HAp -  $\rho(\text{g}/\text{cm}^3)$  e Coeficiente de Atenuação HAp -  $\mu(\text{cm}^{-1})$ .

Através dos resultados apresentados na tabela 4.3 observa-se que os erros percentuais encontrados, ao comparar os coeficientes de atenuação simulados com os medidos experimentalmente e corrigidos para endurecimento de feixe, foram menores que 10%. A curva de calibração para as imagens em densidade obteve um bom ajuste com  $R^2=0,963$  e  $p<0,0001$ , que é dada pela equação a seguir:

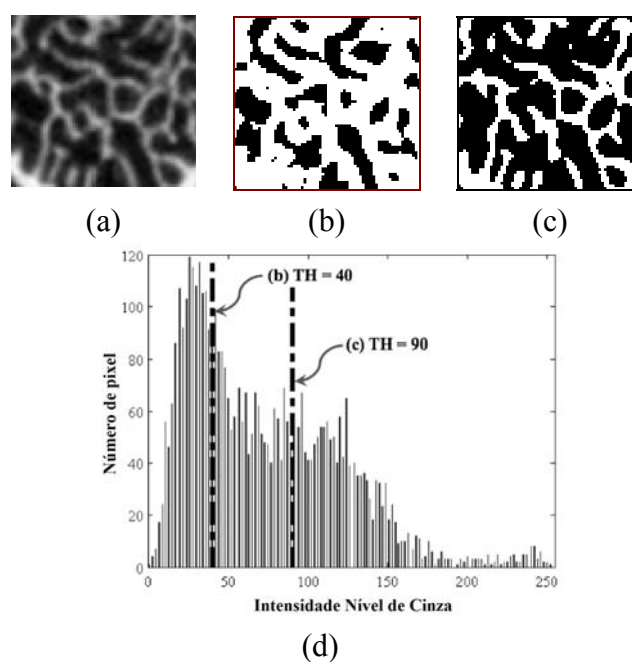
$$\rho = 0,952 + 3.379\mu \quad (4.1)$$

$$R^2 = 0.963$$

$$p < 0.0001$$

## 5. LIMIAZIZAÇÃO AUTOMÁTICA PARA SEGMENTAÇÃO DE IMAGEM MICROTOMOGRÁFICA

O principal problema do processo de binarização de imagens ósseas é definir o melhor nível de limiarização (TH) como já mencionado no capítulo 3. Dependendo da seleção do nível de TH, é possível obter valores sub ou superestimados dos parâmetros histomorfométricos. Baixos valores de TH podem levar a superestimação do volume ósseo, uma vez que a quantidade de pixels relacionados ao tecido ósseo será maior do que realmente é. Por outro lado, altos valores de TH darão uma menor quantidade de osso relacionado aos *pixels*, e conseqüentemente, subestimação do volume ósseo. A figura 5.1 traz um exemplo do efeito da escolha de diferentes valores de TH em uma imagem  $\mu$ TC de amostra óssea.



**Figura 5.1:** Demonstração do efeito da escolha de diferentes valores de TH. (a) Imagem original correspondendo a uma ROI de uma amostra óssea. (b) Imagem superestimada (baixo TH) e (c) imagem subestimada (alto TH). (d) O histograma dos níveis de cinza da imagem em (a), e os valores de TH selecionados para obter (b) com TH = 40 e (c) com TH = 90.

Neste trabalho é apresentado um algoritmo de limiarização totalmente automático, desenvolvido por FLORES [130]. Esta foi uma parceria entre o Laboratório de Instrumentação Nuclear – PEN/COPPE/UFRJ e o Laboratório de Ultra-som em Medicina (LUS) – PEB/COOPE/UFRJ. O algoritmo desenvolvido se diferencia de outros métodos de limiarização, por não necessitar de intervenção humana para selecionar o TH ótimo nas imagens de  $\mu\text{TC}$ . Este algoritmo foi dividido em duas partes: pré-processamento das imagens, realizado por operadores morfológicos (seção 3.3.3), e a seleção do nível de TH utilizando o método de OTSU (seção 3.3.2.3).

A seguir será mostrado cada passo do algoritmo desenvolvido para limiarização das imagens de  $\mu\text{TC}$ .

### 5.1 Algoritmo de Limiarização Automático

Antes de aplicar o procedimento de limiarização nas imagens  $\mu\text{CT}$ , pelo método de OTSU [42], é necessário aumentar o contraste entre o objeto (osso) e o fundo preto (não osso). O objetivo é separar claramente a distribuição dos pixels de ambas as classes para melhorar o funcionamento do algoritmo.

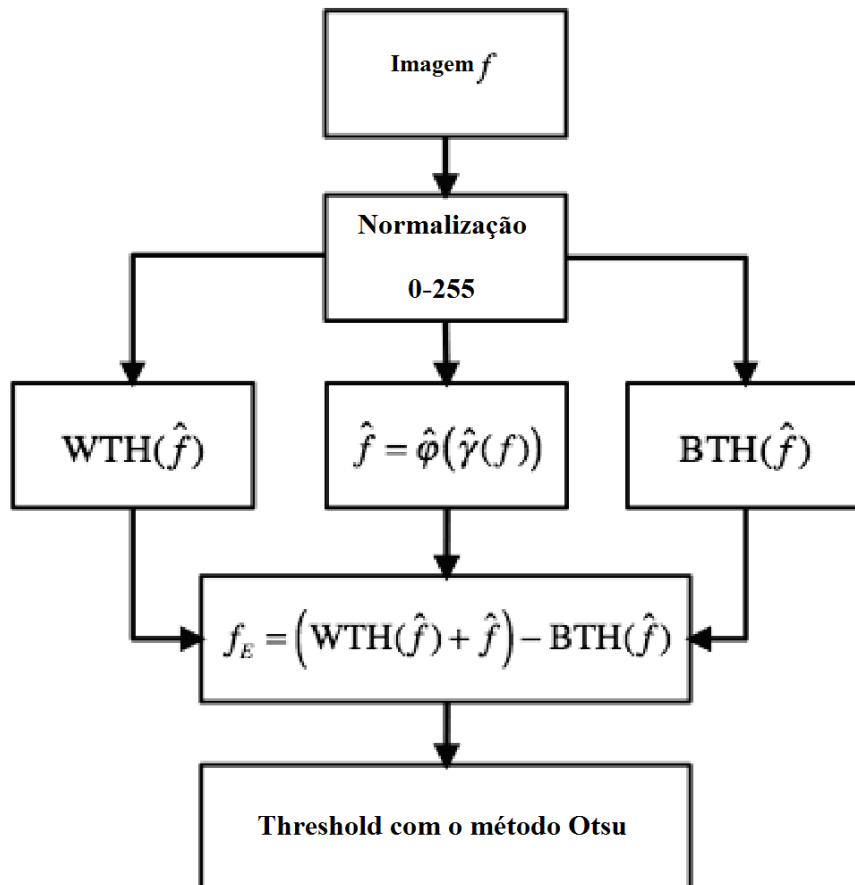
Como primeiro passo, o algoritmo faz uma normalização na faixa de 0 a 255 na imagem  $f$ . Após, é aplicada na imagem normalizada  $f$  uma filtragem morfológica definida como  $\hat{f} = \hat{\phi}(\hat{\gamma}(f))$ , usando um elemento estruturante (SE) quadrado de tamanho  $3 \times 3$  *pixels*. Este procedimento permite remover ruídos menores que SE preservando as informações importantes da imagem.

A forma e o tamanho do SE para a transformação *top-hat* depende da estrutura morfológica a ser extraída. Nesta aplicação, procurou-se detectar o contraste de estruturas tubulares, para aplicação posteriormente nas estruturas trabeculares ósseas em imagens  $\mu\text{CT}$ . Em seguida, um SE disco de tamanho maior do que a largura das trabéculas foi utilizado. Portanto, ambas as transformações *top-hat*, *white top-hat* (WTH) e *black top-hat* (BTH), são aplicados separadamente na imagem filtrada  $\hat{f}$

usando um SE disco com um raio de 15-píxel. Em seguida, para realçar o contraste da imagem, uma operação aritmética é realizada por meio das imagens, como segue:

$$f_E = \left( \text{WTH}(\hat{f}) + \hat{f} \right) - \text{BTH}(\hat{f}). \quad (5.1)$$

A imagem realçada resultante  $f_E$  está agora pronta para ser processada pelo algoritmo de OTSU, assim pode-se obter a imagem segmentada  $f_{bw}$ , de acordo com o TH selecionado automaticamente. Na figura 5.2 é ilustrado o fluxograma do algoritmo de limiarização automática usando operadores morfológicos e o método OTH. Todos os passos do algoritmo foram desenvolvidos em MATLAB.



**Figura 5.2:** Fluxograma do algoritmo de limiarização automática com operadores morfológicos e método OTSU.

## 5.2 Simulação de Fantoma para Teste de Limiarização em Imagem $\mu$ TC

A fim de verificar a eficiência do algoritmo de limiarização automático em relação a outros métodos de limiarização foi simulado um fantoma para testes de limiarização em imagens  $\mu$ TC. Este fantoma foi simulado por FLORES [130], e trata-se de um meio poroso cúbico de 1,815 mm de aresta, com resolução de pixel de 15  $\mu$ m e fator de magnificação igual a 10. O fantoma foi simulado em MATLAB usando uma combinação de funções senoidais. A seguir será mostrado cada passo da simulação do fantoma.

Primeiro, foi criada uma função 3D de um meio poroso com tamanho de 1,815 mm por cada lado do cubo, onde cada pixel da imagem corresponde a 15  $\mu$ m. A função usada foi:

$$S_i(x, y, z) = -\left(|\sin(x) + \sin(y) + \sin(z)| + 1\right)^{0.1}, \quad (5.2)$$

onde  $|\cdot|$  é o valor absoluto.

Segundo, extrair cada *slice* 2D da função  $S_i$  para cada vista da função 3D:

$$S_{xy}^n(i, j) = S_i^n(x, y), \quad S_{xz}^n(i, j) = S_i^n(x, z), \quad S_{yz}^n(i, j) = S_i^n(y, z), \quad (5.3)$$

onde  $n$  é um *slice* 2D para uma vista específica  $(x, y)$ ,  $(x, z)$  ou  $(y, z)$ , neste trabalho a vista escolhida foi  $(x, y)$ .

Depois, normalização em 8 bits (0 a 255 níveis de cinza) para cada *slice* 2D com a expressão:

$$Y(i, j) = 255 \cdot \frac{X(i, j) - \min(X(i, j))}{\max(X(i, j)) - \min(X(i, j))} \quad (5.4),$$

onde  $X(i, j)$  representa cada *slice* 2D:  $S_{xy}^n(i, j)$ ,  $S_{xz}^n(i, j)$ ,  $S_{yz}^n(i, j)$ .

Após a normalização foi adicionado um ruído Gaussiano com o método Box-Muller [131] a cada *slice*, onde o ruído está representado pela expressão:

$$N(i, j) = \left| \sqrt{-2 \cdot \log(u_1(i, j)) \cdot \cos(2\pi \cdot u_2(i, j))} \right|, \quad (5.5)$$

onde  $u_1(i, j)$  e  $u_2(i, j)$  são matrizes 2D de números aleatórios entre 0 e 1 do mesmo tamanho do *slice*  $Y(i, j)$ . Então, o ruído  $N(i, j)$  foi adicionado a cada *slice* normalizado como pela Eq. (5.5):

$$Y_N(i, j) = Y(i, j) + N(i, j) \cdot \sqrt{Y(i, j)}, \quad (5.6)$$

onde  $Y(i, j)$  é o *slice* sem ruído original e  $Y_N(i, j)$  é o *slice* ruidoso.

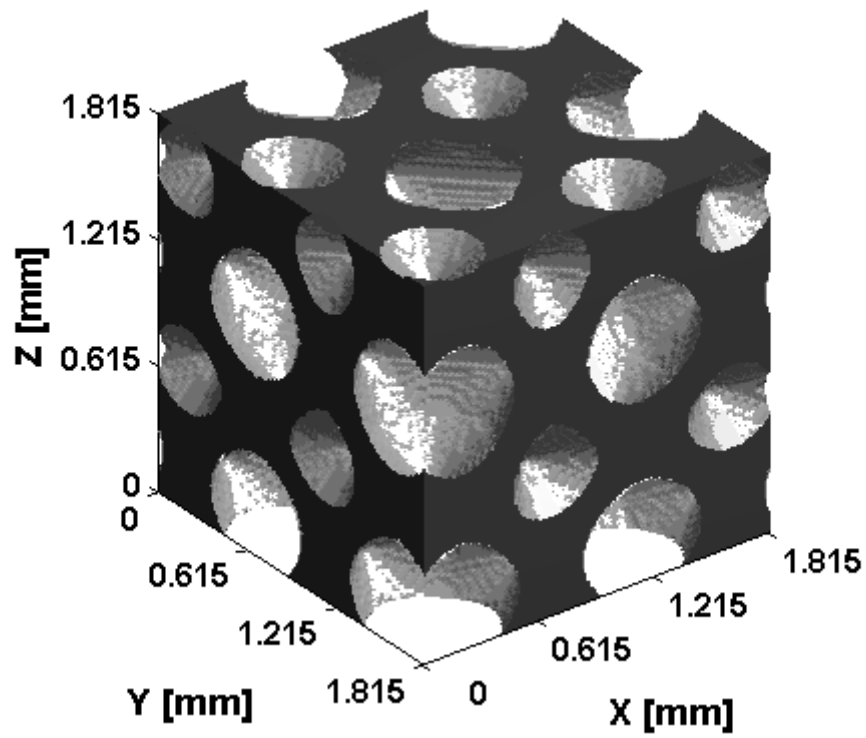
Depois cada *slice* ruidoso  $Y_N(i, j)$  é escalado dentro de uma faixa de tons de cinza, por exemplo entre 0 e 180, com a expressão:

$$Z(i, j) = \left( Y_N(i, j) \cdot \frac{G_{\max} - G_{\min}}{255} \right) + G_{\min}, \quad (5.7)$$

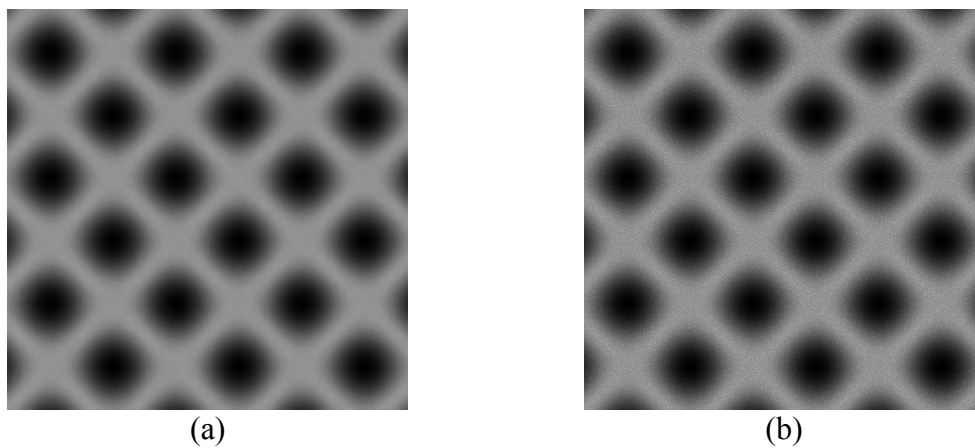
onde  $G_{\max}$  e  $G_{\min}$  são os níveis de cinza máximo e mínimo.

Por último, cada *slice* 2D foi salvo em formato bitmap na vista de interesse,  $Z_{xy}^n(i, j)$ . Foram gerados 121 *slices* e essas imagens foram usadas para testar os métodos de limiarização.





**Figura 5.3** Fantoma simulado como meio poroso para testar os métodos de limiarização em imagens microtomográficas.



**Figura 5.4** Slices gerados do fantoma simulado como meio poroso. Em (a) sem ruído e em (b) com ruído Gaussiano.

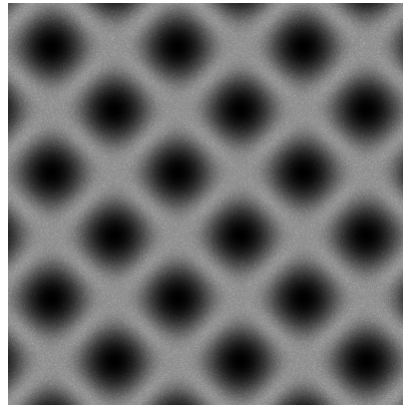
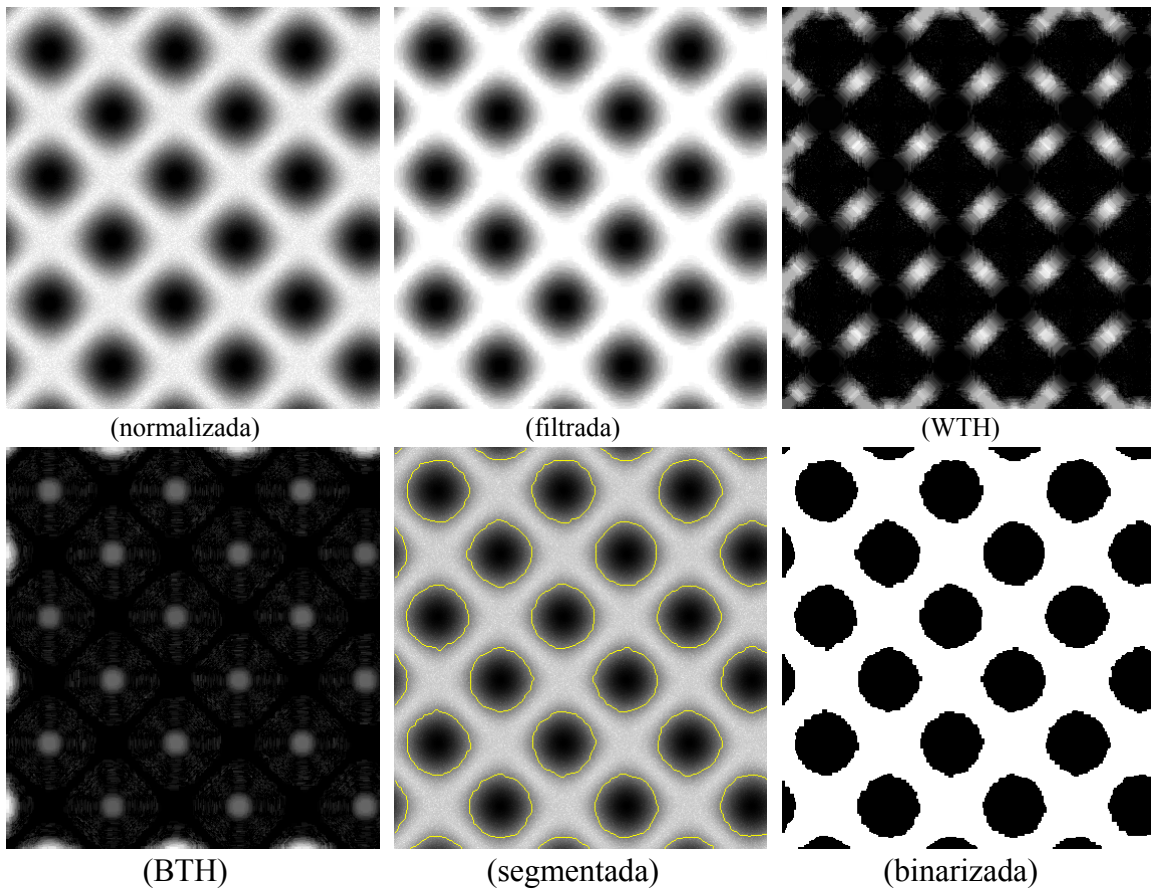
### 5.3 Comparação entre Métodos de Limiarização

Para avaliar o desempenho do método de limiarização automático, em relação aos métodos não automáticos, foram utilizados os 121 *slices* gerados na simulação do fantoma descrito na seção anterior.

Os *slices* foram limiarizados e binarizados por três métodos de TH, que foram eles: os não automáticos TH médio (MTH) e TH pela derivada zero (DTH) (descritos no capítulo 3), e pelo método automático desenvolvido por FLORES, que foi chamado neste trabalho de OTH. Após a binarização foram quantificados os parâmetros histomorfométricos primários,  $P_P$  (BV/TV) e  $P_L$  (Tb.N), estes foram obtidos em todos os 121 *slices* pelo programa DSc. [100]. O programa DSc. faz o cálculo do parâmetro  $P_P$  pelo quociente entre o número de pixels branco que corresponde a fase de interesse e o número total de pixels da imagem. Já Por outro lado,  $P_L$  é calculado pelo quociente entre a quantidade de pixels nas bordas da imagem e o número total de pixels da imagem. Finalmente, utilizando  $P_P$  e  $P_L$ , os outros parâmetros histomorfométricos BS/BV, Tb.Th e Tb.Sp, descritos na seção 3.3.1, foram também obtidos [107].

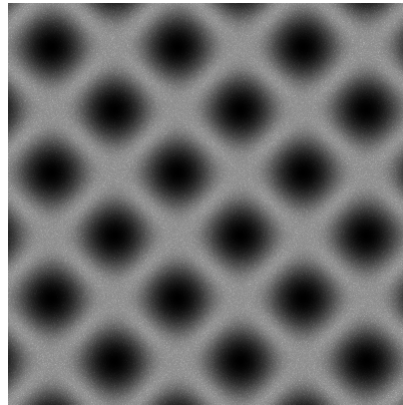
A quantificação histomorfométrica 3D é uma extensão do método de quantificação 2D, onde a contagem dos pixels brancos contidos na microestrutura e nas suas bordas, são aplicados a todos os *slices*, isto é, ao invés de se avaliar somente os pixels de uma imagem, avalia-se a soma total de todos os pixels brancos contidos no volume de dados, tanto para o cálculo de  $P_P$  quanto para o de  $P_L$ . A soma de todos os pixels brancos contidos na microestrutura equivale ao volume da fase interesse; a soma de todos os pixels contidos nas bordas de cada imagem forma o total de pontos presentes na superfície da fase de interesse. Dividindo ambas as somas pelo total de pixels presente no volume de dados, têm-se os valores de  $P_P$  e  $P_L$ . A partir destes dois valores, calculam-se os demais parâmetros histomorfométricos usando as equações descritas na seção 3.3.1.

As figuras 5.4 e 5.5 mostram um *slice* do fantoma simulado binarizado pelos métodos OTH, MTH e DTH.

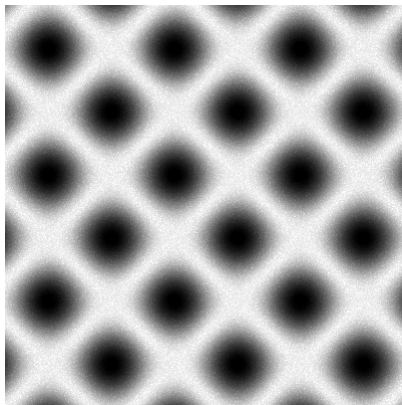
**Original****Método OTH**

**Figura 5.4** *Slice* 2D do fantoma simulado como meio poroso limiarizado pelo método automático OTH.

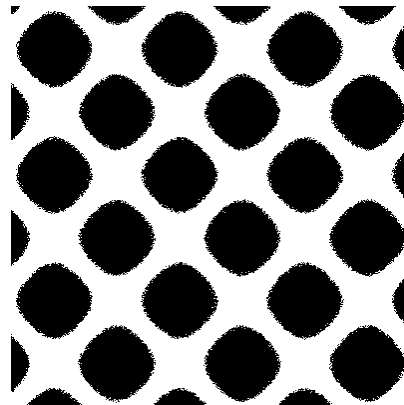
**Original**



**Método MTH**

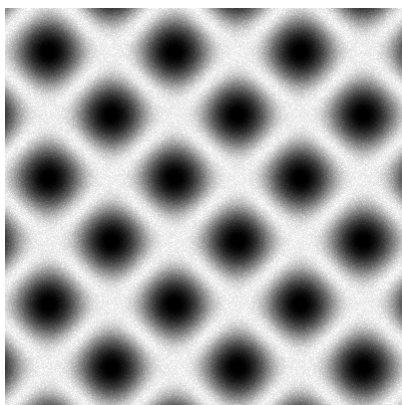


**(normalizada)**

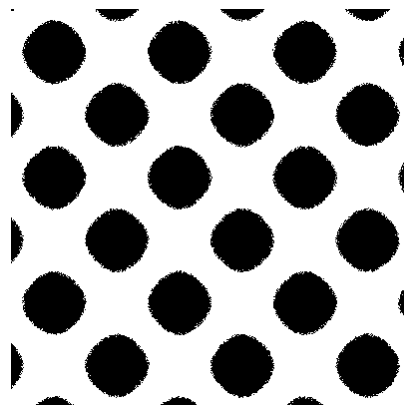


**(binarizada)**

**Método DTH**



**(normalizada)**



**(binarizada)**

**Figura 5.5** *Slice* 2D do fantoma simulado como meio poroso limiarizado pelos métodos MTH e DTH.

A seguir, serão apresentados nas tabelas 5.1 e 5.2 os valores dos parâmetros histomorfométricos 2D e 3D conhecidos do fantoma simulado, e os valores encontrados pelos três métodos de limiarização OTH, MTH e DTH.

**Tabela 5.1** Parâmetros histomorfométricos 2D do fantoma simulado, e os valores encontrados pelos três métodos de limiarização DTH, MTH e OTH.

Parâmetros	Fantoma	OTH	MTH	DTH
BV/TV (%)	85,55	84,77	78,26	82,46
BS/BV ( $\text{mm}^{-1}$ )	7,48	7,31	6,39	7,03
Tb.Th (mm)	0,267	0,273	0,313	0,284
Tb.N ( $\text{mm}^{-1}$ )	3,20	3,10	2,50	2,90
Tb.Sp (mm)	0,045	0,050	0,087	0,060

**Tabela 5.2** Parâmetros histomorfométricos 3D do fantoma simulado, e os valores encontrados pelos três métodos de limiarização DTH, MTH e OTH.

Parâmetros	Fantoma	OTH	MTH	DTH
BV/TV (%)	84,64	83,15	77,83	81,55
BS/BV ( $\text{mm}^{-1}$ )	7,02	7,10	6,76	6,87
Tb.Th (mm)	0,285	0,282	0,296	0,291
Tb.N ( $\text{mm}^{-1}$ )	2,97	2,95	2,63	2,80
Tb.Sp (mm)	0,052	0,057	0,084	0,066

Os resultados apresentados na tabela 5.1 mostram que o método de limiarização automático OTH obteve valores bem próximos aos parâmetros histomorfométricos do fantoma simulado, tendo erro percentual encontrado para o parâmetro BV/TV de 1%, BS/BV de 2%, Tb.Th de 2%, Tb.N de 3% e Tb.Sp de 9%. Já o método MTH obteve os maiores erros percentuais para os parâmetros histomorfométricos, BV/TV de 9%, BS/BV de 15%, Tb.Th de 17%, Tb.N de 22% e Tb.Sp de 93%. Em relação aos valores encontrados pelo método DTH estes também foram próximos aos parâmetros

histomorfométricos do fantoma e o erro percentual para BV/TV foi de 4%, BS/BV de 6%, Tb.Th de 6%, Tb.N de 9% e Tb.Sp de 34%.

Também foram calculados os erros percentuais em relação aos resultados mostrados na tabela 5.2 para os dados 3D. O método OTH obteve bons resultados mostrando que BV/TV obteve um erro de 2%, BS/BV de 1%, Tb.Th de 1%, Tb.N de 1% e Tb.Sp de 10%. O método DTH também obteve resultados próximos aos parâmetros histomorfométricos do fantoma e o erro percentual para BV/TV foi de 4%, BS/BV e Tb.Th de 2%, Tb.N de 6% e Tb.Sp de 27%. Em relação ao método MTH este obteve os maiores erros percentuais para os parâmetros histomorfométricos: BV/TV de 8%, BS/BV de 4%, Tb.Th de 4%, Tb.N de 11% e Tb.Sp de 63%. Lembrando que todos os erros percentuais foram calculados em relação aos parâmetros histomorfométricos do fantoma simulado.

Com os resultados das tabelas 5.1 e 5.2 pode-se concluir que o método OTH obteve um melhor rendimento em relação aos outros dois métodos MTH e DTH, apresentando um erro percentual menor ou igual a 10%. Este resultado é muito importante na hora de escolher um método de limiarização de imagens ósseas, onde os resultados podem elucidar, ou não, anomalias nas amostras estudadas.

## 6. DENSIDADE MINERAL E MORFOLOGIA DE AMOSTRAS ÓSSEAS POR MICROTOMOGRÁFIA

Este capítulo apresenta os resultados obtidos da quantificação da densidade mineral e a quantificação da morfologia de amostras ósseas procedentes de estudos em ratos da linhagem *Wistars*. As imagens microtomográficas foram corrigidas para o efeito de endurecimento de feixe e calibradas em densidade ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) usando a metodologia descrita no capítulo 4. A quantificação morfológica foi feita usando o algoritmo de limiarização automático OTH descrito no capítulo 5.

### 6.1 Amostras Ósseas

As amostras ósseas quantificadas pelas técnicas de microtomografia de raios X e de microfluorescência de raios X foram de ratos machos da linhagem *Wistar* com 4 meses e 1 ano de idade, doadas pelo Laboratório de Fisiologia Endócrina do Instituto de Biofísica da UFRJ. Estes animais foram provenientes de dois protocolos diferentes e são apresentados a seguir.

#### *Protocolo 1: Estudo de hipertiroidismo e hipotiroidismo*

O protocolo de estudo de hipertiroidismo e hipotiroidismo [132] foi feito em animais de 4 meses. Durante o tempo do protocolo os animais foram mantidos em temperatura controlada (22-25°C) com ciclos de 12 h luz e 12 h de escuro. Para induzir hipertiroidismo um grupo de 3 animais com massa corporal entre 200-250g tomaram injeções subcutâneas do suprafisiológico hormônio T4 em solução salina (10  $\mu\text{g}/100$  g bw, sc), durante 10 dias. Um grupo controle com 3 ratos receberam somente solução de NaCl a 0,9%, sc, durante o mesmo período.

*Protocolo 2: Estudo de envelhecimento*

O protocolo de estudo de envelhecimento foi feito com os animais de 4 meses e 1 ano com massa corporal entre 200-1000 g. Estes animais também foram mantidos em temperatura controlada (22-25°C) com ciclos de 12h luz e 12h de escuro. Não foi administrado nenhum tipo medicamento nos animais durante o tempo do protocolo. Estes animais foram divididos em dois grupos: jovens (5 animais de 4 meses) e adultos (8 animais de 1 ano).

Ambos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do IBCCF e em concordância com o Conselho das Organizações Internacionais de Ciências Médicas (Genebra, Suíça) e da Sociedade Americana de Fisiologia [132].

*Sacrifício dos animais*

Com o término do período dos protocolos, os animais foram sacrificados e o sítio anatômico escolhido para a quantificação foi à região da vértebra lombar (L3 e L4), por ser o segundo sítio anatômico de avaliação para osteoporose [86-88, 133]. Após sacrifícios os animais foram dessecados com lâmina de bisturi e colocados em larvas de besouros [134] para remoção de todo tecido mole, ficando apenas o material ósseo. Este procedimento é muito importante para preservação do material ósseo, tanto para análise da densidade mineral óssea (DMO) por microtomografia, quanto para o conteúdo mineral ósseo (CMO) por microfluorescência. Na figura 6.1a pode ser visto o esqueleto de um rato *Wistars* após o processo de limpeza pelas larvas de besouro. Nas figuras 6.1b e 6.1 c podem ser visualizados as amostras usadas nos ensaios de microtomografia e de microfluorescência de raios X.





(a)



(b)



(c)

**Figura 6.1:** Amostra óssea de rato *Wistars*. Em (a) esqueleto ósseo após o processo de limpeza por larvas de besouro, (b) amostra usada no ensaio de microtomografia e (c) corte transversal da amostra (b) usado no ensaio de microfluorescência de raios X.

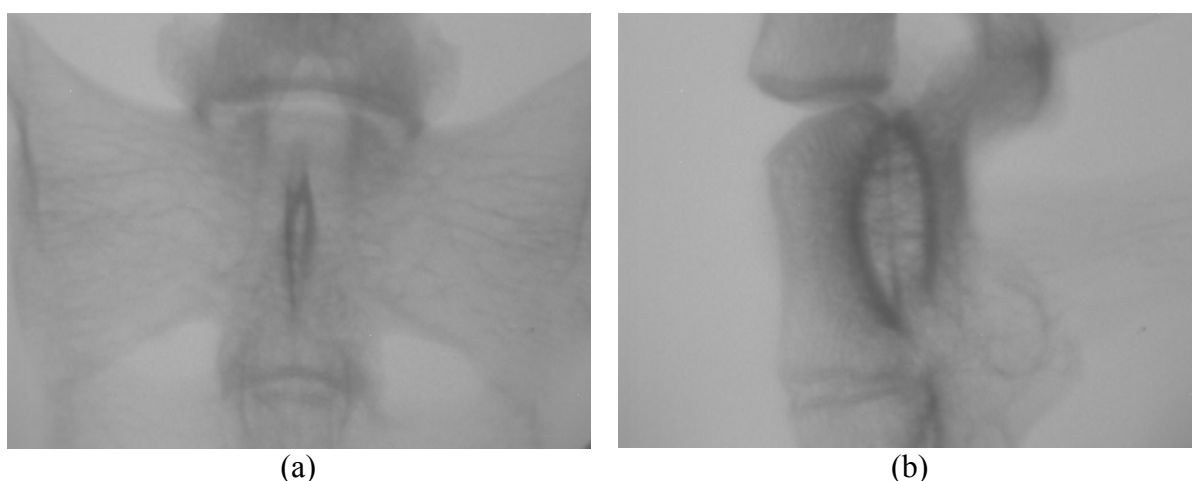
## 6.2 Resultados por $\mu$ TC

O ensaio microtomográfico das amostras ósseas foi feito no sistema de raios X Fein Focus, modelo FXS 160-50, descrito no capítulo 4, seção 4.1 deste trabalho. Os parâmetros de aquisição das imagens estão descritos na tabela 6.1.

**Tabela 6.1** Parâmetros de aquisição do ensaio microtomográfico das amostras ósseas de vértebras lombares (L3 e L4) de ratos *Wistars*.

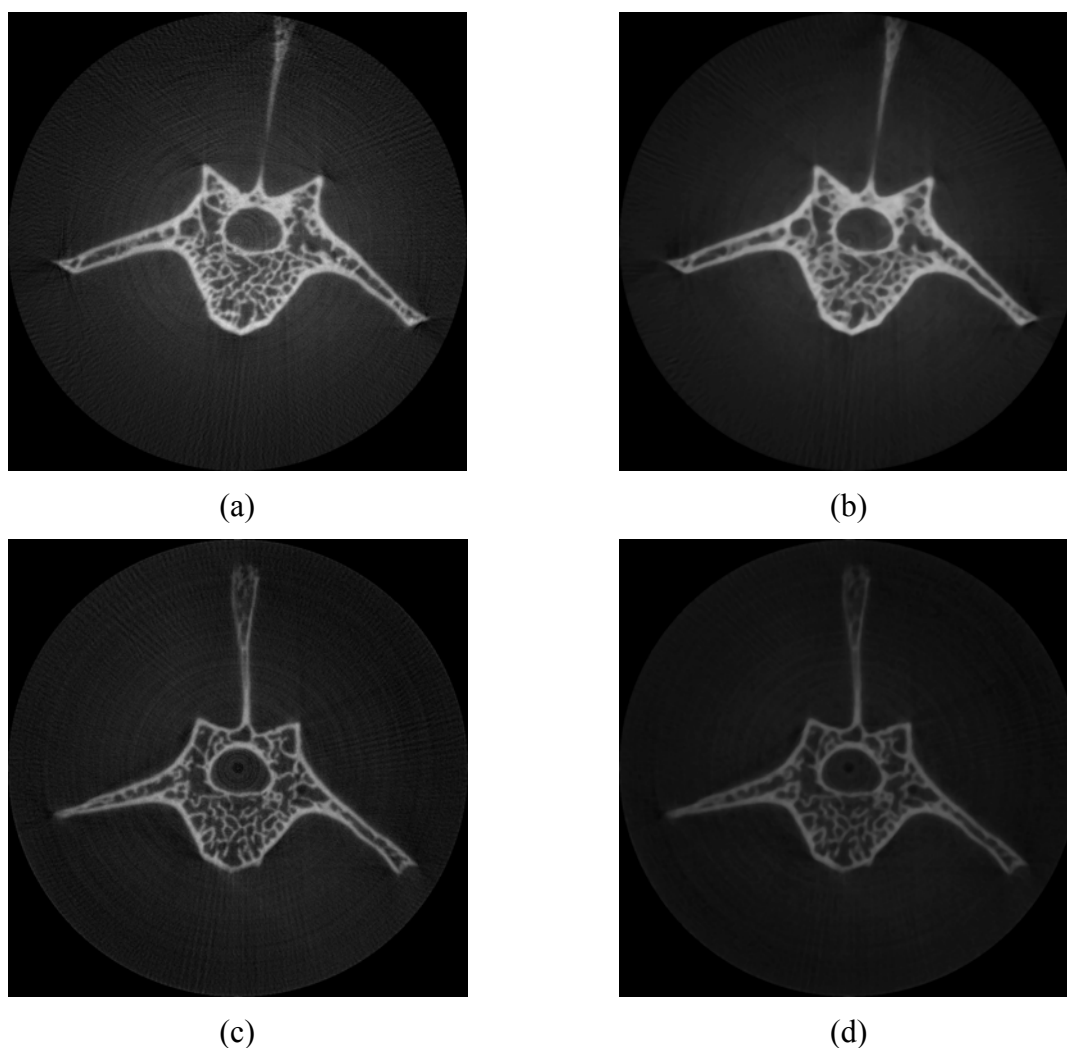
Tensão	40-42 kV
Corrente	0,10-0,12 mA
Fator de magnificação	7,50-11,84
Dimensão do pixel na CCD	0,151 mm
Número de projeções	300
Número de quadros	32
Área quantificada	1,20 mm <sup>2</sup>
Resolução das imagens reconstruídas	0,010-0,020 mm

A figura 6.2 mostra duas radiografias de aquisição do ensaio microtomográfico da amostra de vértebra lombar L3 do grupo jovem com vista frontal e lateral. Após aquisição de todas as radiografias estas foram reconstruídas bidimensionalmente usando o programa Reconv [14].



**Figura 6.2:** Radiografia de aquisição da vértebra lombar L3 do grupo jovem. Em (a) vista frontal e (b) vista lateral.

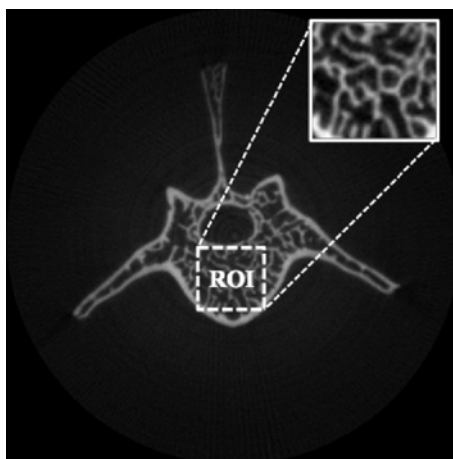
Com as imagens reconstruídas estas foram corrigidas para o efeito de endurecimento de feixe utilizando o método de linearização com polinômios de ordem 2 (seção 4.1, capítulo 4). A seguir pode ser observado na figura 6.3 microtomografias de uma amostra L3 e L4 do grupo jovem antes e após a correção de endurecimento de feixe.



**Figura 6.3:** Microtomografias das vértebras lombares L3 e L4 do grupo jovem. Em (a) L3 sem correção e em (b) com correção de endurecimento de feixe. Em (c) L4 sem correção e em (d) com correção de endurecimento de feixe.

É possível perceber nas figuras 6.3b e 6.3d que a correção do efeito de endurecimento de feixe suavizou os artefatos circulares e homogeneizou o nível de cinza, ao comparar estas imagens com as imagens sem correção (figuras 6.3a e 6.3c).

O próximo passo foi escolher a região de interesse (ROI) para a quantificação da morfologia e da densidade mineral. A ROI escolhida foi o corpo vertebral, pois esta região contém o maior volume trabecular. O método de limiarização usado foi o do algoritmo de limiarização automático OTH. Na figura 6.4 é possível ver um exemplo de escolha da ROI de uma imagem reconstruída.



**Figura 6.4:** Imagem microtomográfica em nível de cinza e escolha da ROI na região do corpo vertebral.

A área da ROI quantificada tanto na morfologia, quanto para densidade mineral, foi de  $1,20 \text{ mm}^2$  com 100 *slices*. As tabelas 6.2 e 6.3, a seguir, mostram os resultados da quantificação morfológica usando a histomorfometria 2D, nas regiões lombares L3 e L4 das amostras dos protocolos 1 e 2.

**Tabela 6.2:** Resultado da quantificação morfológica 2D das amostras de vértebras lombares L3 e L4 do protocolo 1.

Parâmetros Histomorfométricos	Protocolo 1			
	Grupo Controle (n=3)		Grupo Hipertiroidismo (n=3)	
	L3	L4	L3	L4
BV/TV (%)	34,1±5,5 <sup>a</sup>	44,0±3,2 <sup>a</sup>	37,7±12,6	36,6±10,5
BS/BV (1/mm)	35,7±3,4	29,0±3,0	33,0±7,5	32,8±7,4
Tb.Th (mm)	0,06±0,01	0,07±0,01	0,06±0,02	0,06±0,02
Tb.N (1/mm)	5,7±0,7	6,3±1,1	6,3±0,4	6,1±0,2
Tb.Sp (mm)	0,12±0,02	0,09±0,02	0,10±0,03	0,10±0,02

*Valores representados como: média ± desvio padrão.*

<sup>a</sup>*Estatisticamente significativo ao sítio anatômico para o mesmo grupo,  $\alpha=0,05$ .*

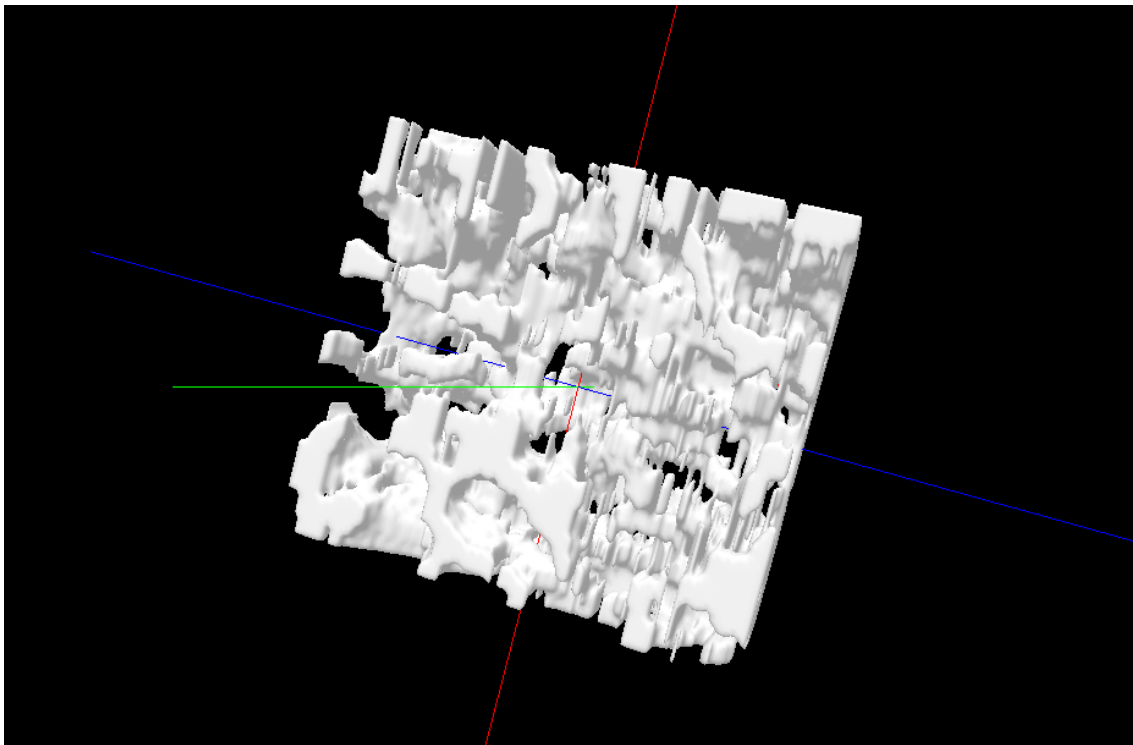
**Tabela 6.3:** Resultado da quantificação morfológica 2D das amostras de vértebras lombares L3 e L4 do protocolo 2.

Parâmetros Histomorfométricos	Protocolo 2			
	Grupo Jovem (n=5)		Grupo Adulto (n=8)	
	L3	L4	L3	L4
BV/TV (%)	45,7±1,5 <sup>b</sup>	41,7±4,3 <sup>b</sup>	24,7±3,1 <sup>b</sup>	25,1±2,5 <sup>b</sup>
BS/BV (1/mm)	34,1±0,7	33,2±0,1	39,0±2,3	35,2±2,1
Tb.Th (mm)	0,06±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,06±0,01
Tb.N (1/mm)	7,6±0,3 <sup>b</sup>	6,9±0,7 <sup>b</sup>	4,9±0,5 <sup>b</sup>	4,2±0,4 <sup>b</sup>
Tb.Sp (mm)	0,07±0,01 <sup>b</sup>	0,08±0,02 <sup>b</sup>	0,15±0,01 <sup>b</sup>	0,18±0,04 <sup>b</sup>

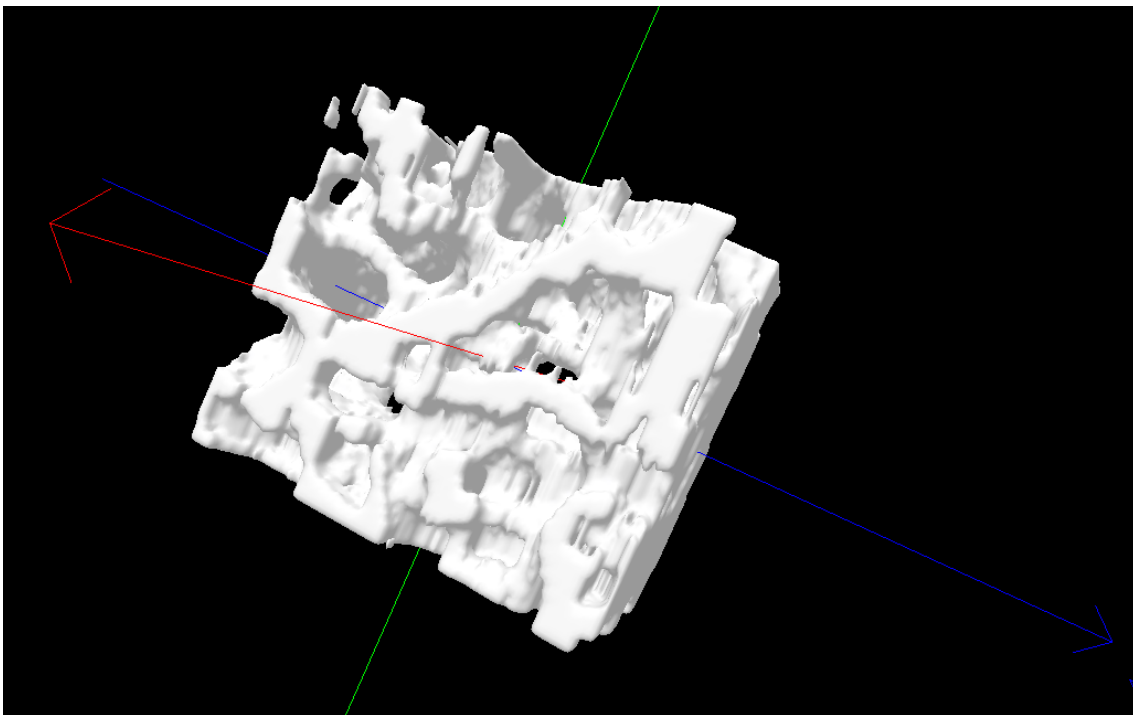
*Valores representados como: média ± desvio padrão.*

<sup>b</sup>*Estatisticamente significativo ao protocolo,  $\alpha=0,05$ .*

A seguir serão mostrados nas figuras 6.3 a 6.6 as imagens microtomográficas reconstruídas tridimensionalmente das áreas quantificadas tanto na morfologia quanto para densidade mineral óssea dos protocolos 1 e 2.

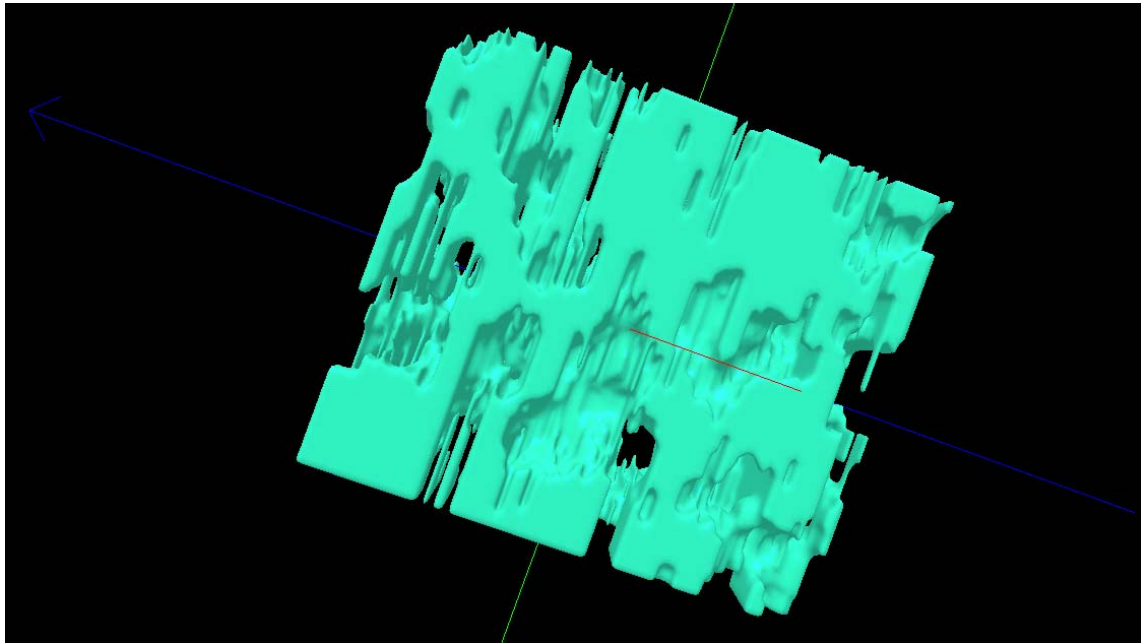


(a)

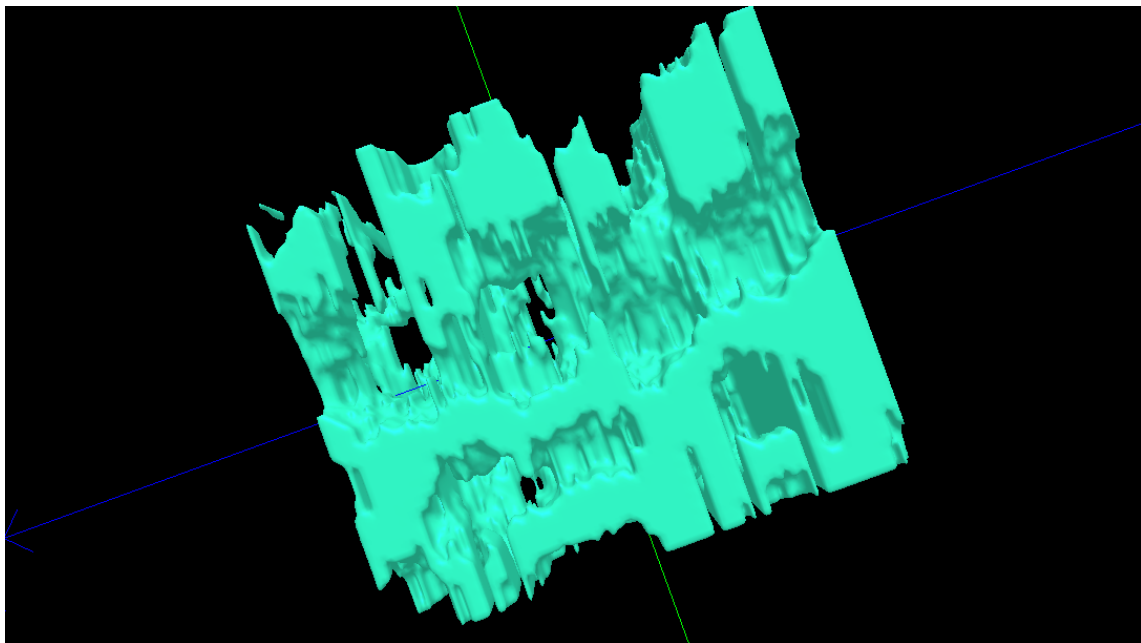


(b)

**Figura 6.3:** Imagens 3D das áreas quantificadas do grupo controle (protocolo 1). Em (a) L3 e em (b) L4.

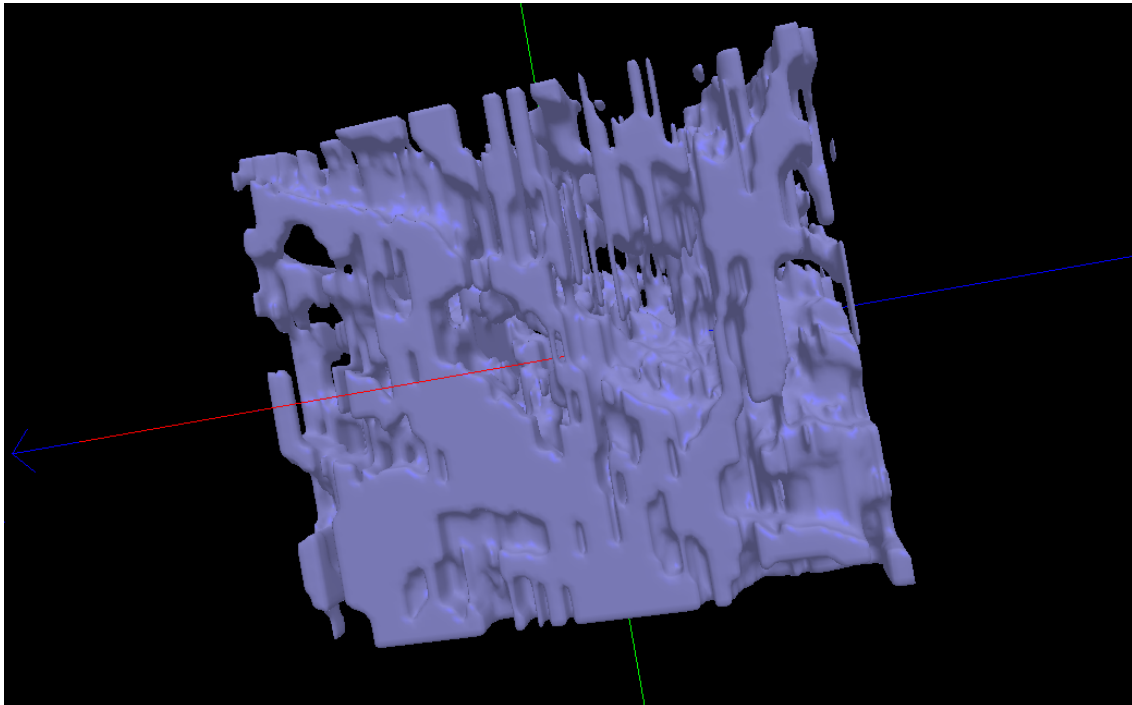


(a)

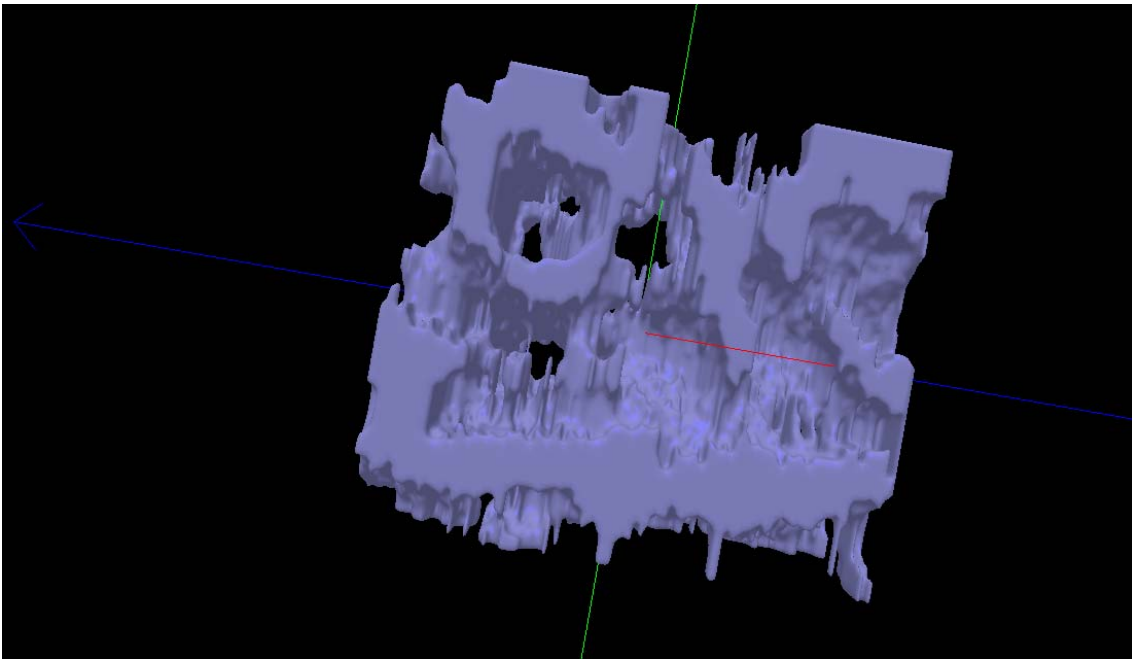


(b)

**Figura 6.4:** Imagens 3D das áreas quantificadas do grupo hipertiroidismo (protocolo 1). Em (a) L3 e em (b) L4.



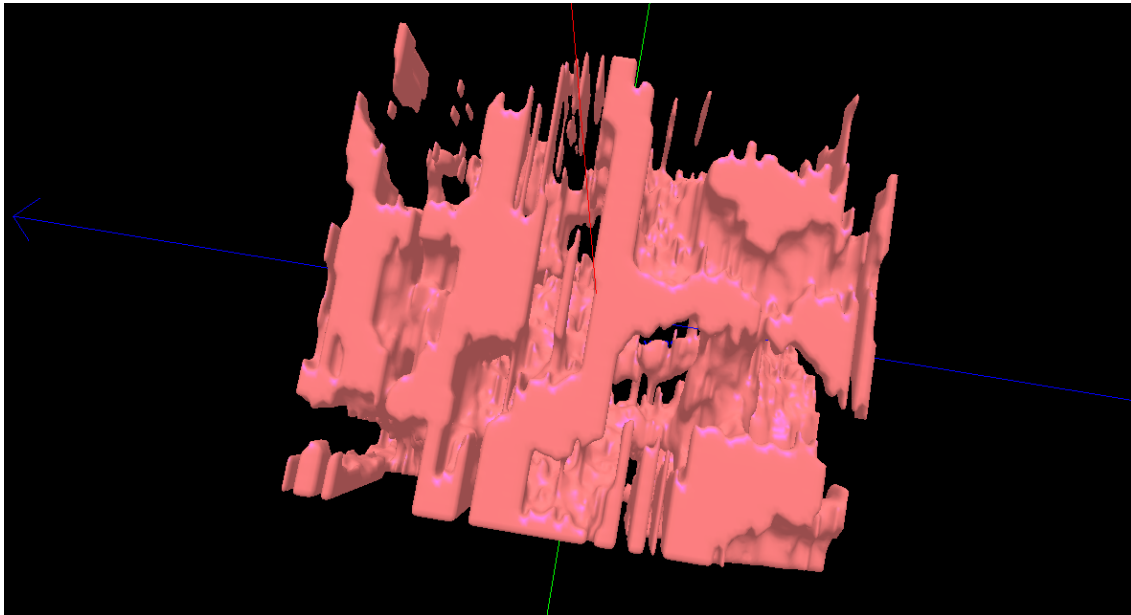
(a)



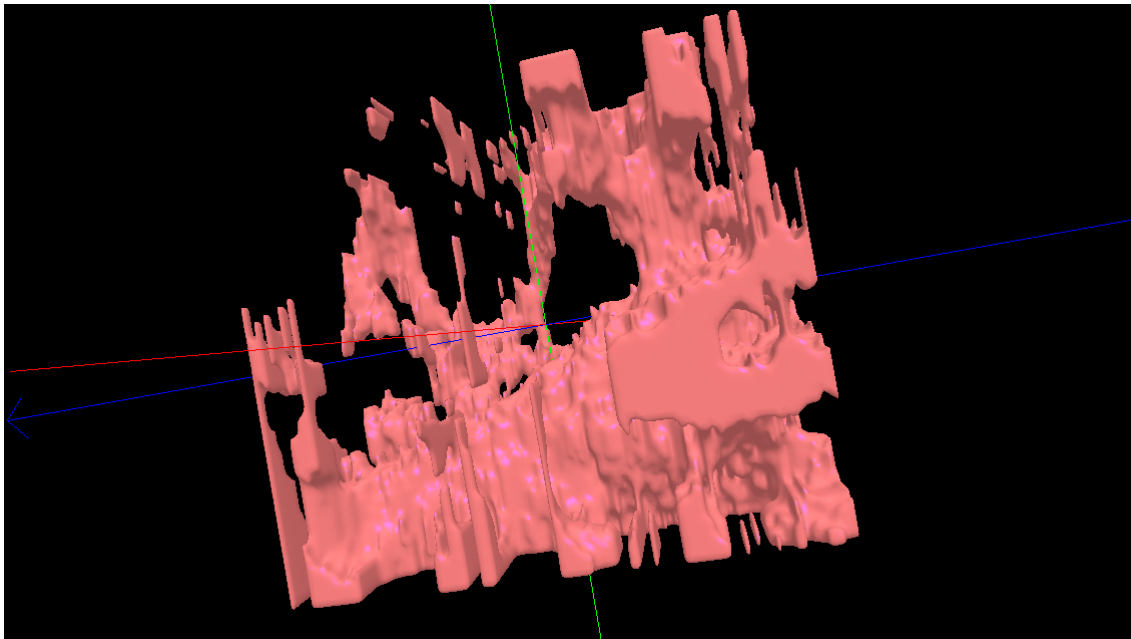
(b)

**Figura 6.5:** Imagens 3D das áreas quantificadas do grupo jovem (protocolo 2). Em (a) L3 e em (b) L4.





(a)



(b)

**Figura 6.6:** Imagens 3D das áreas quantificadas do grupo adulto (protocolo 2). Em (a) L3 e em (b) L4.

As tabelas 6.4 e 6.5 mostram os resultados das quantificações morfológicas 3D das amostras dos protocolos 1 e 2.

**Tabela 6.4:** Resultado da quantificação morfológica 3D das amostras de vértebras lombares L3 e L4 do protocolo 1.

Parâmetros Histomorfométricos	Protocolo 1			
	Grupo Controle (n=3)		Grupo Hipertiroidismo (n=3)	
	L3	L4	L3	L4
BV/TV (%)	35,1±2,9 <sup>a</sup>	44,3±2,4 <sup>a</sup>	32,1±3,3	33,8±3,2
BS/BV (1/mm)	28,8±4,7	21,4±3,8	37,6±4,2	30,3±2,3
Tb.Th (mm)	0,07±0,01	0,10±0,02	0,05±0,01	0,07±0,01
Tb.N (1/mm)	5,0±0,7	4,2±0,6	6,4±0,3	4,8±0,4
Tb.Sp (mm)	0,13±0,02	0,14±0,01	0,11±0,02	0,14±0,02

Valores representados como: média ± desvio padrão.

<sup>a</sup>Estatisticamente significativo ao sítio anatômico para o mesmo grupo,  $\alpha=0,05$ .

**Tabela 6.5:** Resultado da quantificação morfológica 3D das amostras de vértebras lombares L3 e L4 do protocolo 2.

Parâmetros Histomorfométricos	Protocolo 2			
	Grupo Jovem (n=5)		Grupo Adulto (n=8)	
	L3	L4	L3	L4
BV/TV (%)	37,1±1,3 <sup>b</sup>	34,0±3,3 <sup>b</sup>	29,1±3,4 <sup>b</sup>	20,1±2,3 <sup>b</sup>
BS/BV (1/mm)	35,7±1,8	33,4±0,2	36,8±3,7	35,8±4,7
Tb.Th (mm)	0,06±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,06±0,01
Tb.N (1/mm)	6,6±0,4 <sup>b</sup>	5,7±0,8 <sup>b</sup>	3,8±0,7 <sup>b</sup>	3,4±0,4 <sup>b</sup>
Tb.Sp (mm)	0,10±0,01 <sup>b</sup>	0,12±0,02 <sup>b</sup>	0,22±0,02 <sup>b</sup>	0,23±0,03 <sup>b</sup>

Valores representados como: média ± desvio padrão.

<sup>b</sup>Estatisticamente significativo ao protocolo,  $\alpha=0,05$ .

Os resultados das quantificações morfológicas 2D e 3D do protocolo 1 (tabelas 6.2 e 6.4) mostraram que: foram significativas as variações estatísticas entre os sítios L3 e L4 do grupo controle para o parâmetro histomorfométrico volume ósseo (BV/TV), ou seja, a região L4 apresentou maior percentual de osso em relação a região L3 tanto na

análise 2D como para 3D. É possível perceber esta diferença ao comparar as imagens 3D (figura 6.3) onde a imagem de uma amostra L3 mostra ser mais porosa do que a imagem de uma amostra L4. Ainda para o protocolo 1, mas em relação a análise do grupo hipertiroidismo, não foram encontradas para esse grupo diferenças significativas ao comparar os sítios anatômicos. As análises estatísticas foram feitas com o teste estatístico *t-Student* num intervalo de confiança de 95%.

Fazendo a comparação entre as amostras do grupo hipertiroidismo e o grupo controle, ainda em relação ao protocolo 1, as amostras do grupo hipertiroidismo não sofreram alterações significativas segundo o teste estatístico *t-Student* num intervalo de confiança de 95%. Podendo assim concluir que o hormônio T4 administrado por 10 dias nos animais para induzir o hipertiroidismo, não acarretou em nenhum tipo de desordem na morfologia das amostras analisadas. Porém este resultado pode ser mudado se o tempo de administração do protocolo for aumentado, assim como o número de amostras, melhorando assim a estatística dos dados. Este último comentário pode ser levado em consideração, pois segundo a literatura [135, 136], mulheres em tratamento para hipertiroidismo apresentaram o que os médicos chamam de osteoporose secundária.

Os resultados das quantificações histomorfométricas 2D e 3D do protocolo 2 (tabelas 6.3 e 6.4) mostraram que: em relação aos sítios anatômicos L3 e L4 não foram encontrados diferenças significativas dentro do mesmo grupo (jovem ou adulto). Já ao comparar os resultados em relação ao protocolo de envelhecimento, foi possível perceber uma diminuição do percentual do volume ósseo (BV/TV), isto é, um aumento da porosidade das matrizes ósseas do grupo adulto quando comparado ao grupo jovem. É possível perceber esta diminuição ao comparar as imagens 3D das L3 e L4 do grupo adulto (figura 6.6), onde estas apresentam maior fragmentação óssea em relação às imagens 3D do grupo jovem (figura 6.5). Outros parâmetros histomorfométricos do grupo adulto, que também sofreram alterações significativas foram o número de trabéculas (Tb.N), que pode-se perceber uma diminuição e um aumento do espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp). Estas alterações foram significativa, segundo o teste *t-Student*, com  $\alpha=0,05$ . Estes resultados mostraram que a morfologia óssea do grupo adulto apresentou deterioração da microarquitetura, tendo como consequência a diminuição da quantidade óssea, tornando-os frágeis e suscetíveis á fraturas. Este tipo

de alteração também ocorre em humanos, e pode levar um indivíduo a desenvolver ao que os médicos chamam de osteoporose tipo II, ou senil [74-77, 82, 86, 88].

A forma de avaliação da osteoporose em humanos é pela medida da densidade mineral óssea pela técnica de densitometria, onde se tem a quantidade de todos os minerais presentes na área projetada que é dada em  $\text{g/cm}^2$ . Neste trabalho a microtomografia mostra um diferencial em relação à técnica de densitometria, pois a análise foi feita em relação ao volume da amostra, isto é, a densidade mineral óssea foi quantificada em relação ao volume de dados da ROI selecionada.

As imagens microtomográficas foram calibradas em  $\text{g/cm}^3$  usando a curva de calibração da seção 4.2, capítulo 4. A transformação das imagens das ROIs de nível de cinza para densidade foi feita usando o programa MATLAB aonde foi escolhido um limiar de nível de cinza entre a região de osso e a região de não osso.

A seguir serão mostrados nas figuras 6.7 e 6.8 *slices* das ROIs microtomográficas calibradas em  $\text{g/cm}^3$  dos protocolos 1 e 2.

As tabelas 6.6 e 6.7 mostram os resultados obtidos da densidade mineral das amostras ósseas dos protocolos 1 e 2. Os valores foram colocados nas tabelas como máximo, mínimo e médio dos valores de densidade em relação ao volume das ROIs microtomográficas.

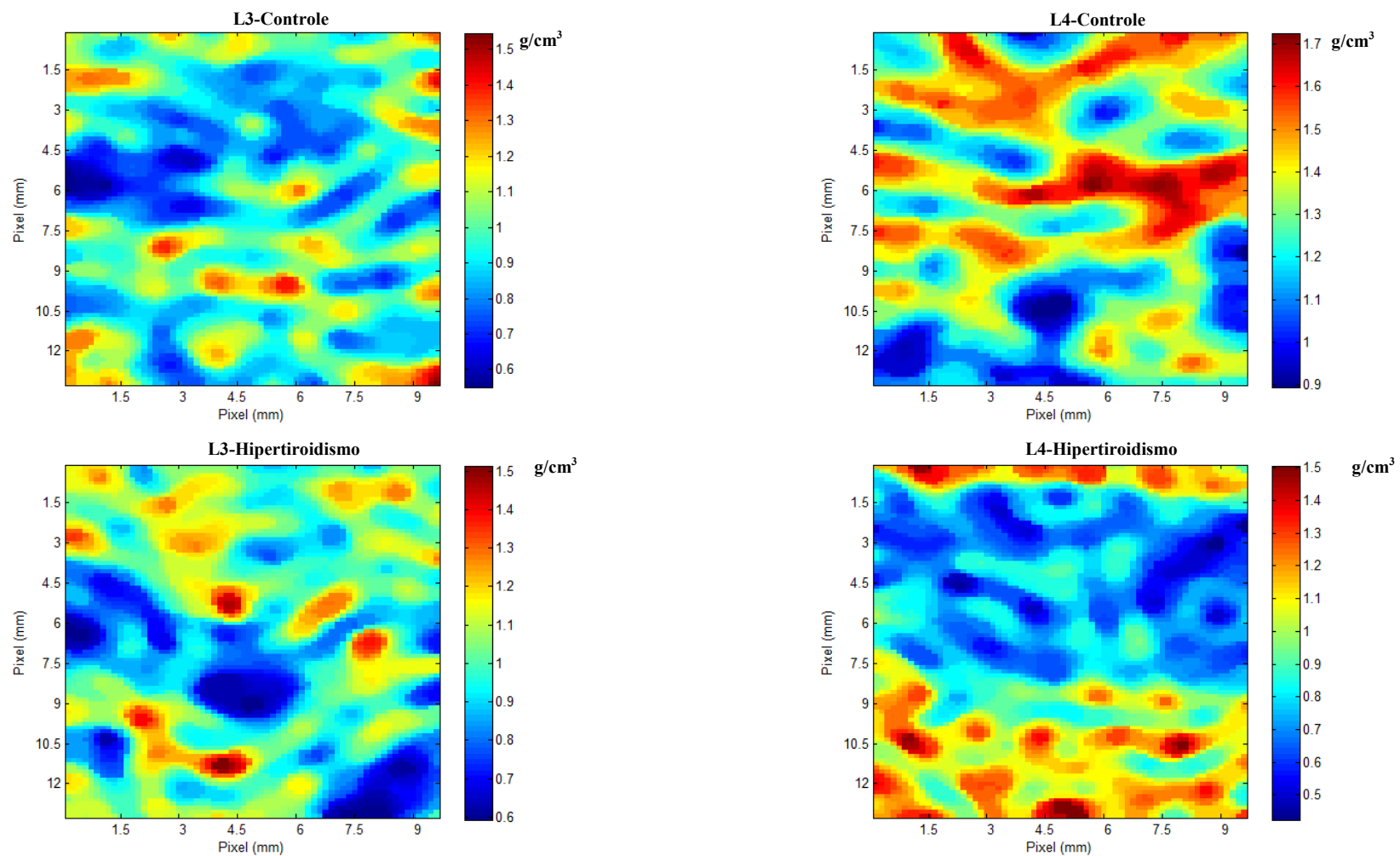
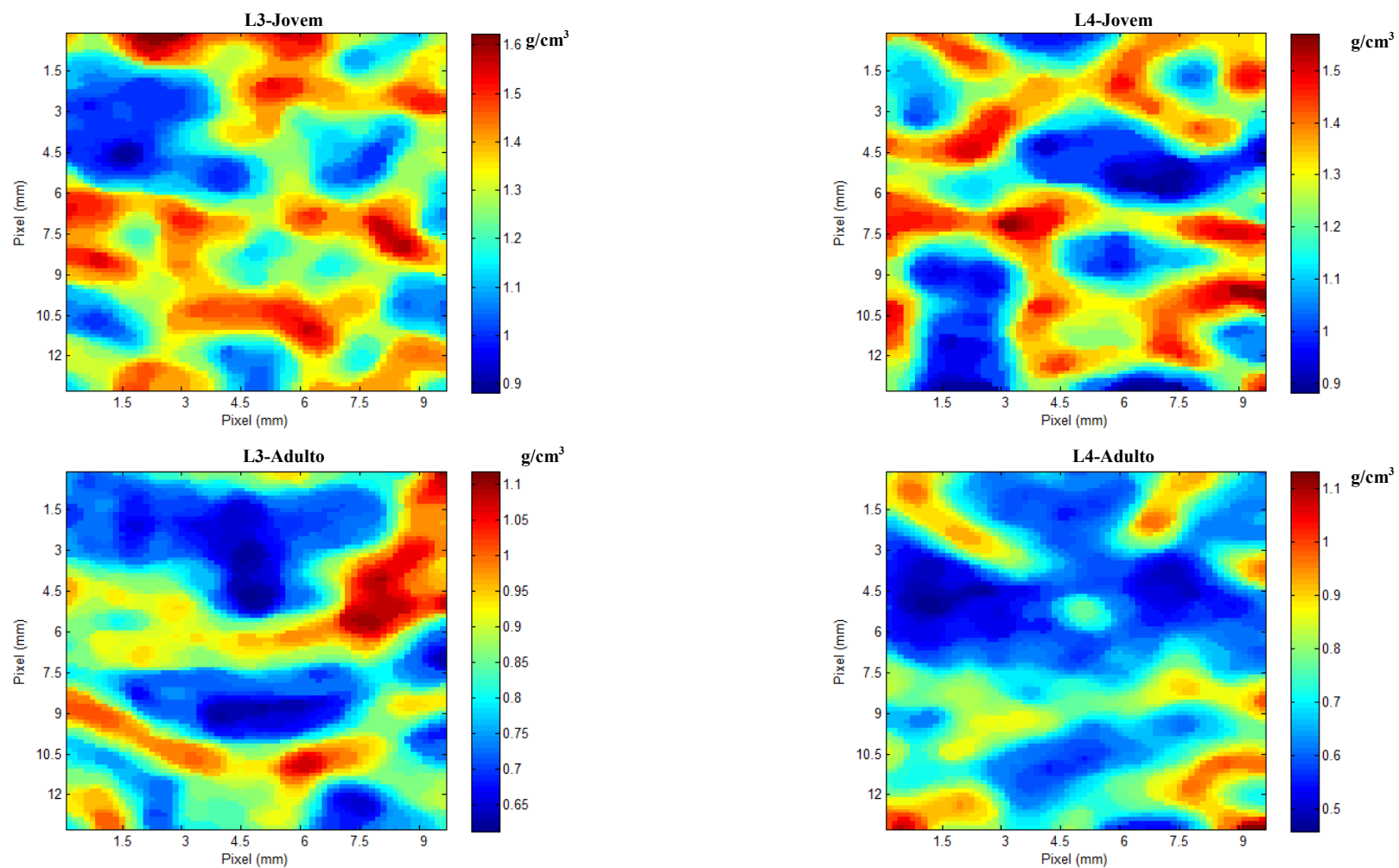


Figura 6.7: Slices das ROIs microtomográficas de L3 e L4 calibradas em  $\text{g/cm}^3$  do protocolo 1.



**Figura 6.8:** Slices das ROIs microtomográficas de L3 e L4 calibradas em g/cm<sup>3</sup> do protocolo 2.

**Tabela 6.6:** Resultado da quantificação da densidade mineral das ROIs das amostras de vértebras lombares L3 e L4 do protocolo 1.

Valores de Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Protocolo 1			
	Grupo Controle (n=3)		Grupo Hipertiroidismo (n=3)	
	L3	L4	L3	L4
Máximo	1,5±0,1 <sup>a</sup>	1,7±0,1 <sup>a</sup>	1,5±0,03	1,5±0,05
Médio	0,8±0,02	0,9±0,03	0,8±0,03	0,8±0,03

Valores representados como: média ± desvio padrão.

<sup>a</sup>Estatisticamente significativo ao sítio anatômico para o mesmo grupo,  $\alpha=0,05$ .

**Tabela 6.7:** Resultado da quantificação da densidade mineral das ROIs das amostras de vértebras lombares L3 e L4 do protocolo 2.

Valores de Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Protocolo 2			
	Grupo Jovem (n=5)		Grupo Adulto (n=8)	
	L3	L4	L3	L4
Máximo	1,6±0,04 <sup>b</sup>	1,6±0,05 <sup>b</sup>	1,1±0,02 <sup>b</sup>	1,1±0,03 <sup>b</sup>
Médio	0,8±0,02	0,8±0,03	0,8±0,01	0,7±0,02

Valores representados como: média ± desvio padrão.

<sup>b</sup>Estatisticamente significativo ao protocolo,  $\alpha=0,05$ .

Em todos os resultados mostrados nas tabelas 6.6 e 6.7 foram aplicados o teste estatístico *t-Student* para o sítio anatômico de um mesmo grupo e também em relação ao protocolo com intervalo de confiança de 95%.

Os resultados da quantificação da densidade mineral óssea do protocolo 1 (tabela 6.6) mostram que: os valores de densidade da amostra L4 do grupo controle apresentou um valor máximo de densidade maior do que a amostra L3 do mesmo grupo. Este resultado corrobora com o resultado da histomorfometria onde este sítio anatômico apresentou maior percentual de volume ósseo, que também foi estatisticamente

significativo. Apesar da amostra L4 do grupo controle apresentar um valor maior de densidade, não é possível concluir se o sítio L4 se diferencia do sítio L3, pois este comportamento não ocorre em relação aos demais grupos de ambos os protocolos. Para uma melhor análise é necessário investigar um número maior de amostras, e assim ter um teste estatístico mais conclusivo. O resultado encontrado em relação ao protocolo mostrou que os valores de máximo e médio de densidade também não apresentaram diferenças significativas, o que corrobora com os resultados da histomorfometria.

Já em relação aos resultados das amostras do grupo jovem e adulto do protocolo 2 (tabela 6.7), os resultados mostraram que em relação aos sítio anatômico para um mesmo grupo estes não apresentaram diferenças significativas entre os valores de máximo e médio de densidade. Ao aplicar o teste estatístico em relação ao protocolo o primeiro resultado encontrado foi que os valores de máximo de densidade do grupo adulto sofreram diminuição significativa, mostrando que este grupo apresentou uma menor massa óssea em relação ao grupo jovem. Já os resultados dos valores médios de densidade não apresentaram diferenças significativas.

Ao analisar o comportamento das estruturas ósseas do protocolo 2, onde notou-se uma redução significativa do parâmetros histomorfométrico BV/TV e valores máximo de densidade mineral óssea, pode se dizer que este resultado corrobora com estudos associados ao envelhecimento ósseo. Este resultado se deve ao ciclo da remodelação óssea, isto é, durante a vida de um indivíduo o tecido ósseo passa constantemente por um processo de absorção e formação [72]. Com o decorrer do tempo, o balanço entre a reabsorção e formação óssea se torna negativo, o que resulta numa diminuição do volume do osso, tornando-os menos densos e mais frágeis, e assim mais suscetíveis a quebra [74].

O próximo passo deste trabalho foi avaliar o conteúdo mineral ósseo das amostras, e no próximo capítulo serão apresentados os resultados da análise da distribuição elementar dos minerais das amostras dos dois protocolos pela técnica de microfluorescência de raios X.



## 7. CONTEÚDO MINERAL DAS AMOSTRAS ÓSSEAS DE RATOS POR MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

O ensaio de microfluorescência de raios X foi realizado na linha de luz D09B - XRF Fluorescência de Raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, SP, Brasil. Esta linha destina-se a análise da composição química multielementar ( $Z \geq 13$ ) em aplicações científicas de determinação de elementos químicos de traços em ciências ambientais, biológicas e materiais, perfil de profundidade química de filmes finos e mapeamento químico. A linha opera com feixe de 4 a 23 keV, e na tabela abaixo pode ser visto as outras características da linha.

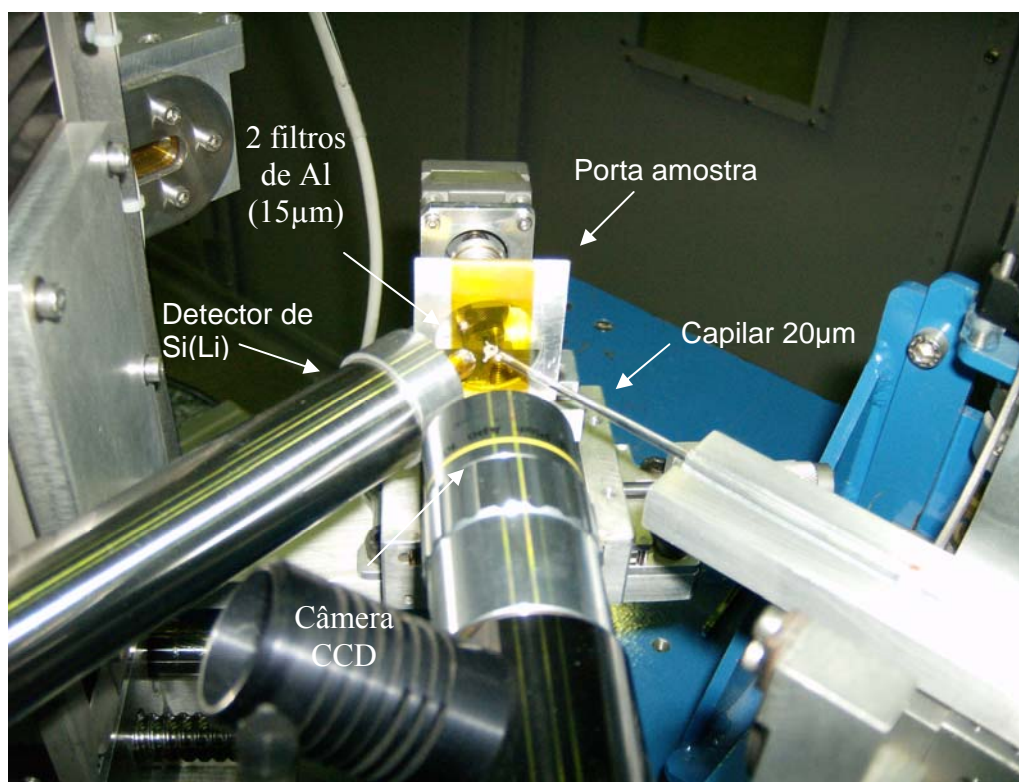
**Tabela 7.1:** Características Gerais da linha D09B do LNLS [122].

Fonte	Imã defletor D09B ( $15^{\circ}$ ); fluxo na amostra: $4 \times 10^9$ fótons/s a 8 keV; feixe de luz branca.
Monocromador	Monocromador <i>chanel-cut</i> .
Cristais	Cristais Si (111) ( $2d = 6,217 \text{ \AA}$ ): 4 - 14 keV ( $E/\Delta E = 2800$ ); e Si (220) ( $2d = 6,217 \text{ \AA}$ ): 5 - 23 keV ( $E/\Delta E = 2800$ ).
Óptica	Capilar óptico de $20 \mu\text{m}$ de resolução espacial.
Detector	Detectores Si(Li) (resolução de 165 eV); fotodiodos e câmeras de ionização. Câmara de vácuo com geometria de excitação convencional ( $45^{\circ}$ - $45^{\circ}$ ).
Amostra	Estações para experiências a incidência rasante e mapeamento 2D, ambas com controle total de posicionamento de amostras.

Para a detecção dos fótons de raios X, foi utilizado um detector semiconductor de Si(Li) acoplado a um módulo amplificador e placa analisadora multicanal, inserida em um microcomputador.

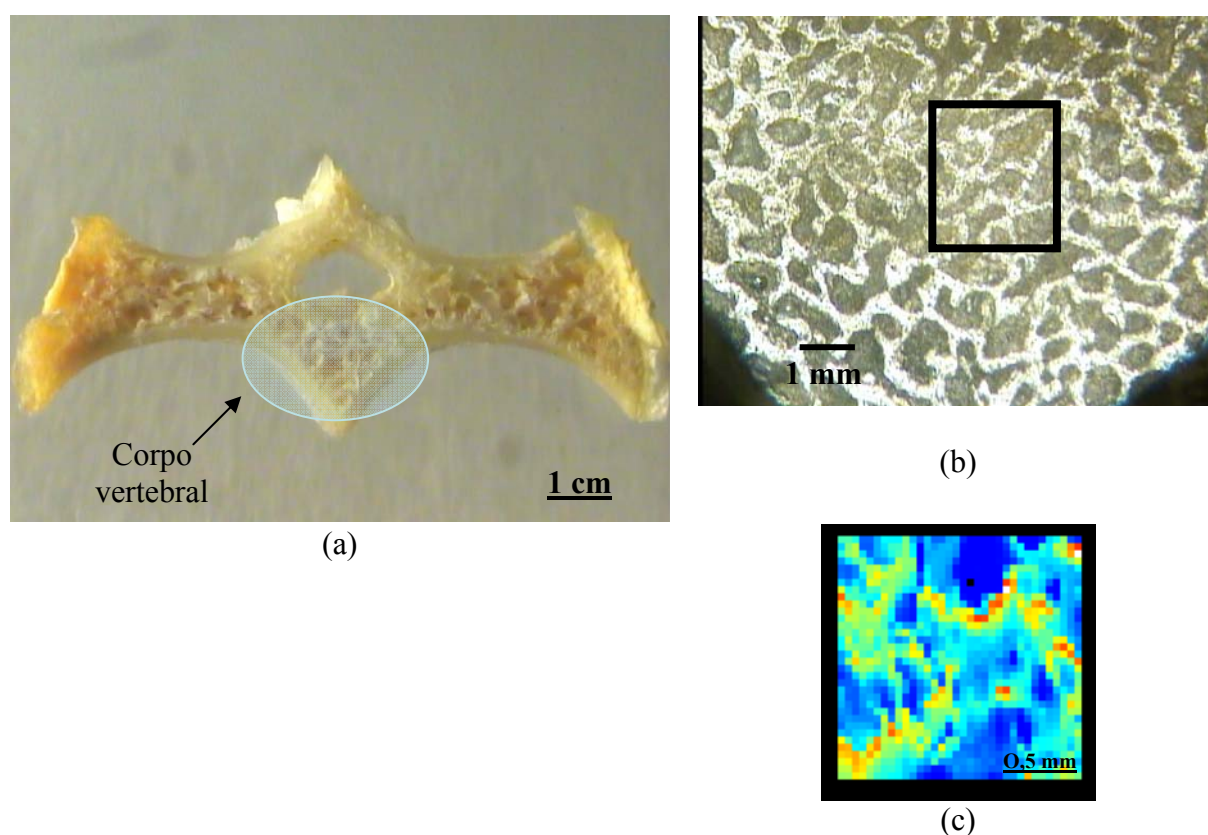
Para a análise de amostras pela técnica de microfluorescência de raios X ( $\mu$ FRX), a linha de fluorescência conta com uma mesa para o alinhamento do capilar, desenhada para ter reprodutibilidade e alta resolução angular, assim como para a translação completa.

O microfeixe é gerado com um fino capilar cônico de 23,5 cm de comprimento com 75  $\mu$ m de diâmetro na entrada e 13  $\mu$ m de diâmetro na saída. A estação de  $\mu$ -FRX inclui além do detector dispersivo, um microscópio ótico com zoom motorizado e um conjunto de estágios X,Y,Z, $\theta$ z para o posicionamento da amostra. Todos estes estágios são executados por controle remoto (Figura 7.1).



**Figura 7.1:** Arranjo experimental da linha D09B-XRF do LNLS.

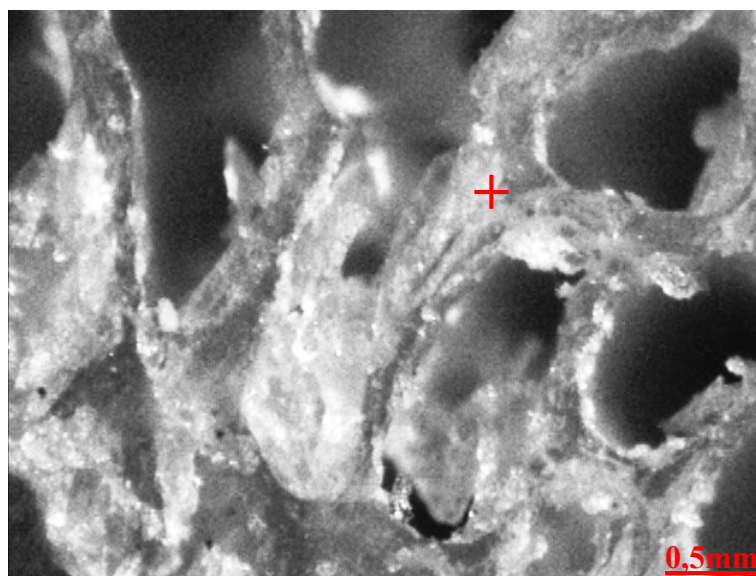
Para executar o experimento, as amostras de vértebras foram resinadas em *polymethylmethacrylato* (PMMA) e estas foram cortadas com lâmina de diamante por uma máquina de corte de precisão automática Isomet Buehler®. As amostras não tiveram nenhuma outra preparação e estas variaram em massa por área de 0.025-0.060 g/cm<sup>2</sup>. Com o auxílio do microscópio óptico foi escolhida a região do corpo vertebral para o mapeamento das amostras. A seguir a figura 7.2 mostra a seqüência para escolha da região a ser analisada por  $\mu$ FRX.



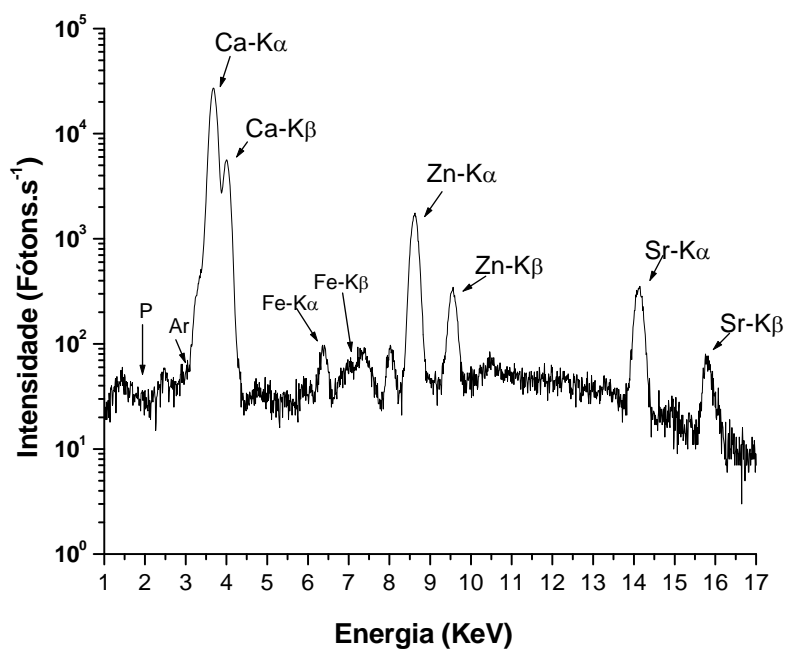
**Figura 7.2:** Sequência para escolha da região de quantificação. Em (a) imagem de uma amostra de vértebras cortada com lâmina de diamante, (b) região do corpo vertebral vista por microscópio óptico (100x), e (c) uma representação de uma imagem por  $\mu$ FRX.

Para o ajuste dos espectros dos raios X característicos em intensidades fluorescentes dos elementos presentes nas amostras ósseas e para os cálculos de concentração dos mesmos, foi utilizado o programa *Quantitative X-Ray Analysis Software* (QXAS) fornecido pela *International Atomic Energy Agency* (IAEA) [137].

A figura 7.3b apresenta um exemplo de um espectro obtido com a técnica de  $\mu$ FRX da região trabecular (Figura 7.3a) de uma amostra de vértebra lombar controle. É possível observar os elementos químicos presentes na amostra, com exceção do elemento Argônio (Ar) que é proveniente do ar.



(a)



(b)

**Figura 7.3:** Em (a) pode ser visto uma microfotografia da região trabecular de uma amostra de vértebra, e em (b) tem-se o espectro do ponto indicado pela cruz vermelha obtido por  $\mu$ FRX.

### 7.1 Curva de Sensibilidade do Sistema de $\mu$ FRX

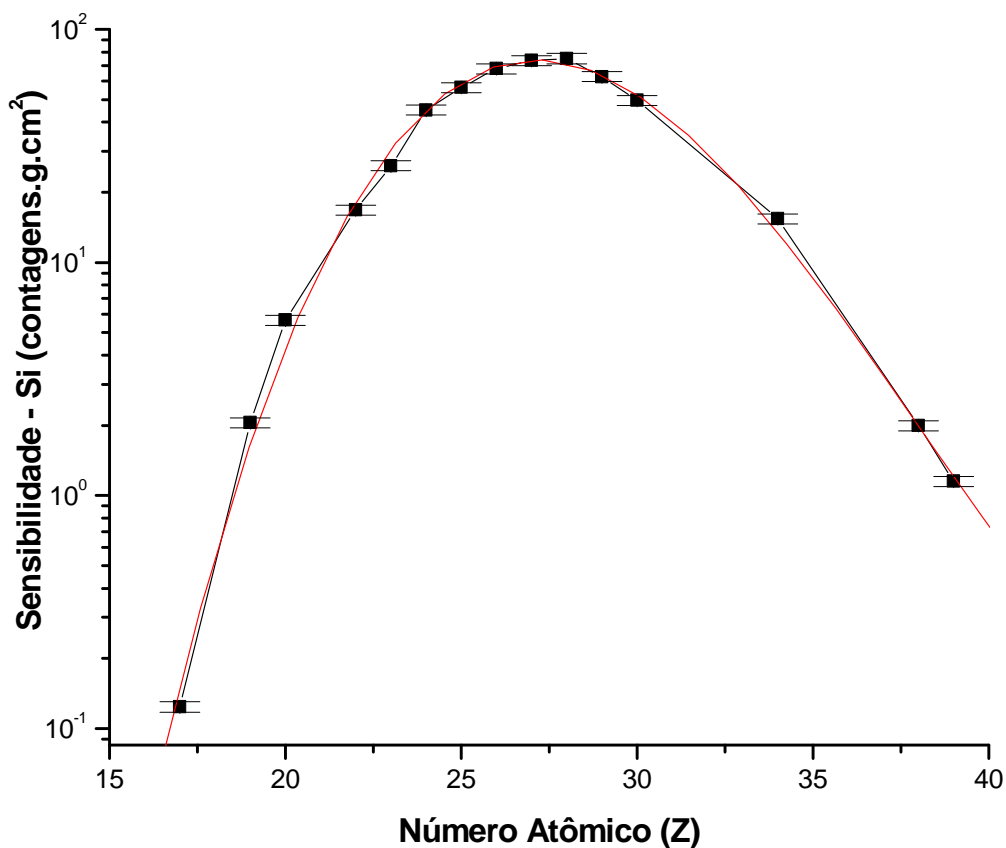
Foram usados padrões monoelementares, depositados em um filme fino de *mylar* fornecidos pela MicroMatter, no levantamento da curva da sensibilidade relativas para os elementos das series K. A tabela 7.2 traz as informações sobre os padrões utilizados no cálculo da sensibilidade do sistema de  $\mu$ FRX.

Cada padrão foi posicionado no suporte porta amostra da mesa do *sistema* experimental e foram feitas as radiações de 3 a 200 segundos, dependendo do elemento. Com as intensidades relativas de cada elemento dos padrões e suas densidades superficiais em função de suas energias, a curva da sensibilidade do sistema foi levantada.

**Tabela 7.2:** Padrões utilizados para cálculo da curva de sensibilidade do sistema  $\mu$ FRX-RS.

Elemento/óxido	Densidade superficial ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$E_K$ (keV)	Tempo de medida (s)
SiO	29,1	1,74	200
KCl	24,6	2,62	20
CaF <sub>2</sub>	24,5	3,69	8
Ti	39,4	4,51	5
V	42,2	4,95	5
Cr	42,6	5,41	3
Mn	47,7	5,90	3
Fe	46,1	6,40	3
Co	50,7	6,93	3
Ni	43,1	7,48	3
Cu	46,5	8,05	3
ZnTe	15,6	8,64	5
Se	42,5	11,22	10
SrF <sub>2</sub>	31,2	14,16	20
YF <sub>3</sub>	31,0	14,96	200
NbO <sub>3</sub>	36,4	16,61	20

A curva da sensibilidade relativa ( $S_i$ ) em função do número atômico ( $Z$ ) para série K está representada na figura 7.3



**Figura 7.3:** Curva de sensibilidade relativa para linha K do sistema de  $\mu$ FRX-RS.

A equação ajustada que relaciona a sensibilidade relativa ( $S_i$ ) e o número atômico ( $Z$ ) do elemento, para a série K, é dada por:

$$\text{Log}_{10}(S_i(Z)) = -24,991 + 2,428 Z - 0,069 Z^2 + 6,095E-4 Z^3 \quad (5.1)$$

$$R^2 = 0,997$$

Através da equação 5.1 é possível obter qualquer valor de sensibilidade para linha K em função do número atômico.

## 7.2 Limite de Detecção das Amostras

O limite de detecção (LD) do sistema foi calculado empregando-se amostra certificada para osso do NIST, o SRM 1486 – *Bone Meal*. O material certificado foi preparado em forma de pastilhas compactadas com densidade superficial de 91,14 mg/cm<sup>2</sup> (medida de massa por área). Os espectros foram levantados nas mesmas condições que as amostras ósseas, apenas com um tempo maior de aquisição de 100 s. O cálculo do limite de detecção foi feito pela equação 3.62 e os valores encontrados podem ser visto na tabela 7.3.

**Tabela 7.3:** Limite de detecção (LD) para amostra certificada do NIST SRM 1486 - *Bone Meal*.

Elemento	Limite de Detecção
P (%)	Não detectável
Ca (%)	0,010±0,002
Fe (µg g <sup>-1</sup> )	3,7±0,80
Zn (µg g <sup>-1</sup> )	3,8±0,40
Sr (µg g <sup>-1</sup> )	20±2,10

*Valores representados como: média ± desvio padrão.*

Os valores apresentados na tabela 7.3 representam a menor concentração dos elementos Cálcio (Ca), Ferro (Fe), Zinco (Zn) e Estrôncio (Sr) da qual podemos estar confiantes de sua medição pelo o sistema de µFRX-RS. O elemento fósforo (P) não pode ser detectável com a instrumentação usada no ensaio de microfluorescência, pois este elemento possui uma energia de fluorescência muito baixa, entorno de 2,19 keV, e os fótons com esta energia acabam sendo absorvidos pelas duas folhas de alumínio

(15µm cada) colocadas no detector para diminuir a contribuição da radiação de fundo (*background*).

A seguir, nas tabelas 7.4 e 7.5 serão apresentados os valores de limite de detecção das amostras dos protocolos 1 e 2.

**Tabela 7.4:** Limite de detecção (LD) para as amostras do protocolo 1.

Elemento	Protocolo 1	
	Limite de Detecção	
	Grupo Controle (n=3)	Grupo Hipertireoidismo (n=3)
P (%)	Não detectável	Não detectável
Ca (%)	0,025±0,004	0,025±0,004
Fe (µg g <sup>-1</sup> )	10,33±0,07	9,13±0,06
Zn (µg g <sup>-1</sup> )	7,30±0,10	6,87±0,10
Sr (µg g <sup>-1</sup> )	62,94±1,30	69,51±3,30

*Valores representados como: média ± desvio padrão.*

**Tabela 7.5:** Limite de detecção (LD) para as amostras do protocolo 2.

Elemento	Protocolo 2	
	Limite de Detecção	
	Grupo Jovem (n=5)	Grupo Adulto (n=8)
P (%)	Não detectável	Não detectável
Ca (%)	0,022±0,001	0,020±0,001
Fe (µg g <sup>-1</sup> )	12,59±0,09	6,77±0,05
Zn (µg g <sup>-1</sup> )	7,97±0,11	6,16±0,09
Sr (µg g <sup>-1</sup> )	47,19±0,98	42,47±0,88

*Valores representados como: média ± desvio padrão.*



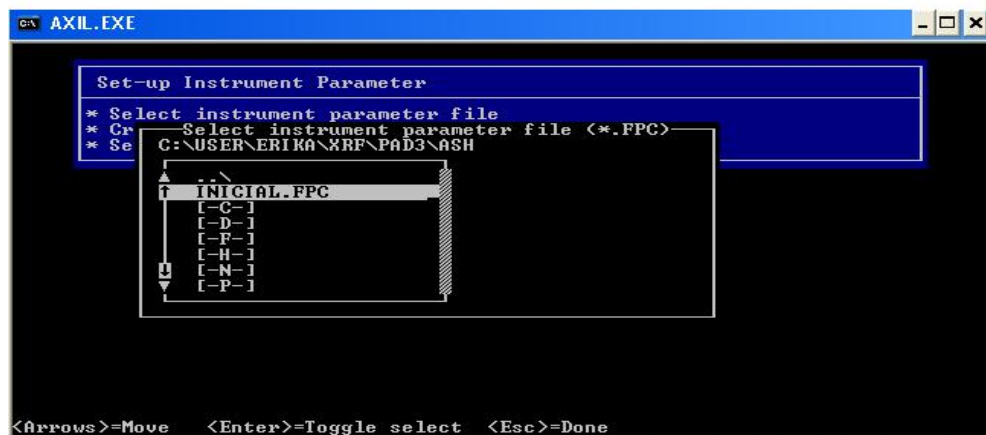
### 7.3 Absorção e Cálculo das Concentrações Elementares

O fator de absorção, assim como as concentrações elementares e o fator de reforço foram calculados com o *Software QXAS*, que usa método dos parâmetros fundamentais, (seção 3.4.2, capítulo 3). São inseridos no programa: a distribuição do espectro do sistema de microfluorescência, o tipo de detector, a geometria, e as distâncias fonte-amostra-detector (tabela 7.6). Todos esses dados são salvos em um arquivo *\*.FPC* que é rodado pelo programa. Além do arquivo *\*.FPC*, o arquivo *\*.ASR* que contém as intensidades elementares medida pontualmente em cada amostra, também é selecionado. Após a seleção destes arquivos, uma janela do programa é aberta onde se coloca os valores de corrente usada durante a medida, seleciona o tipo de amostra (neste trabalho as amostras foram consideradas intermediárias) e a densidade superficial (massa por área da amostra). As concentrações, assim como os fator de absorção e reforço, são gerados pelo programa QXAS, e salvos em arquivos texto *\*.ARP* para cada ponto medido na amostra.

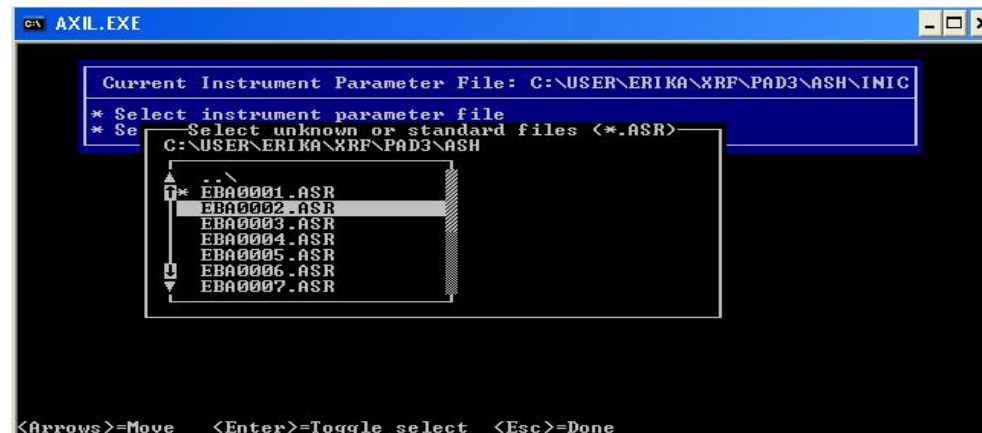
**Tabela 7.6:** Condições experimentais das medidas de microfluorescência de raios X.

Feixe:	Branco
Detector:	Si(Li) SL 30165, resolução de 165 eV em 5,9 keV
Geometria:	45°/ 45°
Distância fonte-amostra:	20 mm
Distância amostra-detector:	604 mm
Absorvedor:	15 µm de Al cada (2 folhas no detector)

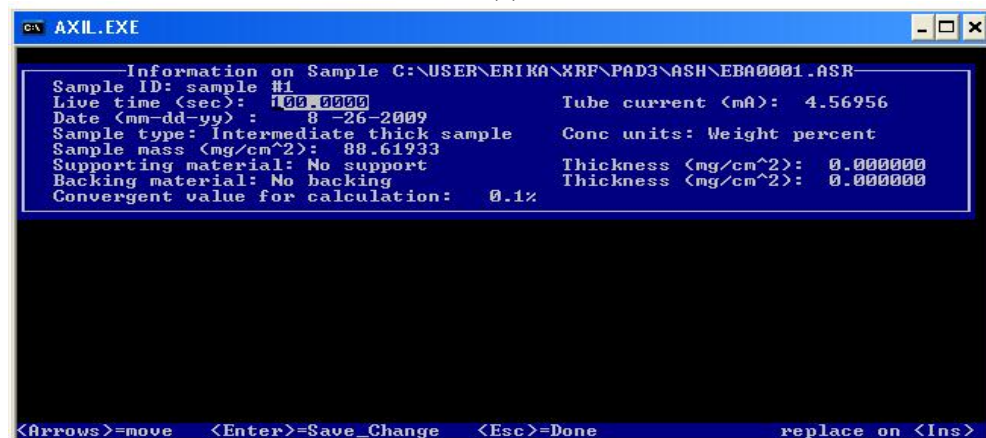
A seguir, na figura 7.4 são ilustrados os passos usados no programa QXAS, e na figura 7.5 pode ser visto o resultado da quantificação de um espectro de uma amostra certificada do NIST, o SRM 1486 – *Bone Meal*.



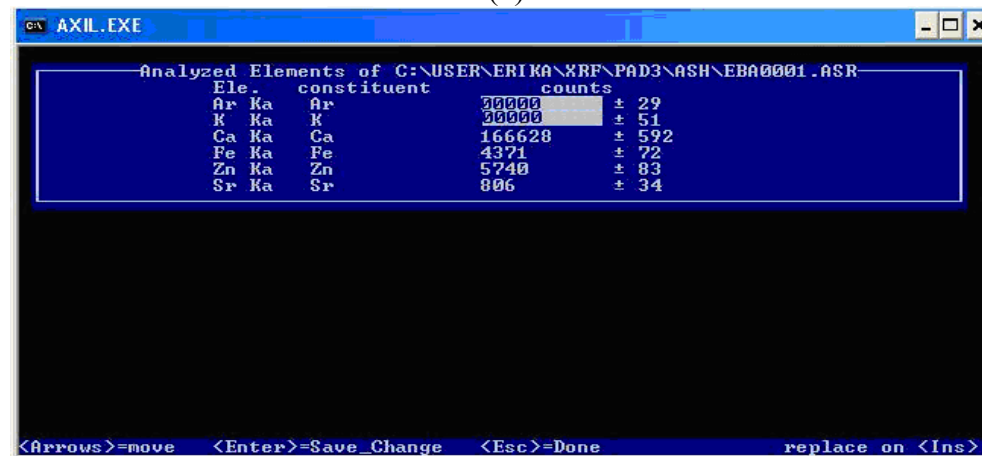
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 7.4:** Cálculo da concentração elementar pelo programa QXAS. Em (a) seleção do arquivo \*.FPC, (b) seleção dos arquivos \*.ASR de cada amostra, (c) interface para introdução das informações de cada amostra e (d) elementos presentes nas amostras em intensidades.

```

EBM0005 - Bloco de notas
Arquivo  Editar  Formatar  Exibir  Ajuda

Eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee»
o  FUND4                      12-15-2009      21:31:10
Eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee¼
Eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee»
o  Sample identity: sample #5
o  Spectrum fitting data: C:\USER\ERIKA\PAD2\EBMEAL\EBM0005.ASR
o  Instrument parameter data: C:\USER\ERIKA\PAD2\EBMEAL\BONE2.FPC
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA¶
o  Instrumental identity: No Filter
o  Average instrumental constant: 8.3500E+04
o  Measuring time: 100. sec.      Collimator: No Collimator
o  Filter used: No Filter        Atmosphere: Air
Eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee'
o  Report of Calculated Concentrations
o
o  Sample thickness: 9.1140E-02 g/cm2
o  Iterations for concentration: 3
o  Pre-set convergence: .10 % Last convergence: .056 %
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA¶
o  Ele.-line Constituent  Concen.(elem.)  Absorption Enhancement
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA¶
o  K -Ka      K      0000      0 0000      ppm      0000      0000
o  Ca-Ka      Ca      28.23ñ     .102      %      2.0377E-02  1.0025
o  Fe-Ka      Fe      94.53ñ     1.607     ppm     3.0110E-02  1.0062
o  Zn-Ka      Zn      153.57ñ    2.334     ppm     6.8818E-02  1.0174
o  Sr-Ka      Sr      259.63ñ    9.812     ppm     3.2225E-01  1.0000
o  Known concentrations:
o  Mg          4660.00      ppm
o  P           12.30        %
o  Pb          1.33        ppm
o  Na          5000.00      ppm
o  C           18.60        %
o  Total percent of fluorescent elements: 28.30 %
Eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee¼
y

```

**Figura 7.5:** Arquivo gerado pelo programa QXAS. Em destaque os valores de concentração elementar, fator de absorção e reforço por elemento de uma amostra certificada do NIST o SRM 1486 – *Bone Meal*.

#### 7.4 Análise de Amostra Certificada

Para avaliar a metodologia utilizada no mapeamento bidimensional das amostras ósseas de vértebras, primeiro foi analisada uma amostra de referência do NIST, o SRM 1486 – *Bone Meal*. O material certificado foi compactado em forma de pastilha, com densidade superficial de 91,14 mg/cm<sup>2</sup> (massa por área), e mapeado com uma matriz de 5x5 pontos<sup>2</sup> num tempo de aquisição de 50 s para cada ponto, com passos de 0,20 mm, tamanho do feixe de 20 µm, tendo num total 25 espectros. Os valores de concentração elementar medido para cada ponto da matriz inspecionada foram calculados com o programa QXAS, como descrito na seção anterior. Na tabela 7.7 são mostrados os valores de concentrações certificadas, os medidos por µFRX e o erro relativo entre os dois valores.

**Tabela 7.7:** Comparação entre os valores medidos e certificados do NIST SRM 1486 - *Bone Meal*.

Elemento	Concentração certificado	Concentração medida por µFRX (n=25)	Erro relativo
Ca (%)	26,58±24	27,1±1,1	0,02
Fe (µg g <sup>-1</sup> )	99±28	101,9±7,6	0,03
Zn (µg g <sup>-1</sup> )	147±16	142,2±6,2	0,03
Sr (µg g <sup>-1</sup> )	264±7	257,7±9,7	0,02

\* Todos os valores estão como: *média±desvio padrão*.

Os valores medidos pela µFRX apresentaram erros relativos inferiores a 5%, confirmando um bom ajuste dos dados medidos com a metodologia apresentada neste trabalho.

### 7.5 Resultados de $\mu$ FRX para as amostras ósseas

A distribuição elementar quantificada pela  $\mu$ FRX nas amostras de vértebras lombares L4 dos protocolos 1 e 2 foi medida de duas maneiras.

- 1) Informação pontual do espectro: A análise pontual foi medida na região trabecular, ou seja, os espectros foram medidos em cima das trabéculas ósseas, sem pegar a região de não osso entre estas. Foram medidos 5 espectros individuais, escolhidos aleatoriamente, dentro da região para o mapeamento elementar. Cada espectro foi medido num tempo de 50 s, para uma melhor estatística de contagem dos dados. O cálculo das concentrações elementares foi feito pelo programa QXAS, e os resultados das concentrações dos espectros individuais são mostrados nas tabelas 7.8 e 7.9.
- 2) Mapas elementares: É uma série de pontos espectrais em uma combinação de múltiplas linhas que permite analisar a heterogeneidade de uma amostra. Os mapas são convertidos em cores que indicam a presença em maior ou menor escala, ou ainda a ausência de um elemento na amostra inspecionada. O mapa da região de interesse (ROI) das amostras ósseas da vértebra lombar L4 foram medidas na região do corpo vertebral, ou seja, na região trabecular. As áreas medidas foram de  $0,70 \text{ mm}^2$  para o protocolo 1, e  $0,80 \text{ mm}^2$  para o protocolo 2, ambas com passos de  $0,02 \text{ mm}$ , num tempo de medida de 10 s por ponto, totalizando 1296 espectros por amostra para o protocolo 1 e 1681 espectros para o protocolo 2. O cálculo das concentrações elementares foi feito pelo programa QXAS e as imagens foram plotadas usando o programa MATLAB.

A seguir, os resultados das concentrações elementares das amostras dos protocolos 1 e 2, calculadas dos espectros individuais. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados obtidos foram comparados em relação ao protocolo, utilizando o teste estatístico *t-Student* com nível de significância de 5%.

*Concentração elementar do Protocolo 1.*

Sabe-se que o hormônio T4 (tiroxina), assim como outros hormônios como a calcitonina, é produzido pela glândula tireóide que é uma das maiores glândulas endócrina do corpo [132,135,136]. Qualquer alteração nesta glândula pode levar ao aumento da produção de T4 (hipertiroidismo), o que acaba diminuindo os níveis de calcitonina na corrente sanguínea. A calcitonina é responsável por levar o cálcio do plasma para a matriz óssea, conseqüentemente, uma diminuição deste hormônio pelo aumento de T4 acarreta em uma menor deposição de cálcio no osso.

O cálcio (Ca) é o principal elemento da matriz óssea, mas além deste, outros elementos presentes na matriz tais como ferro (Fe), zinco (Zn) e estrôncio (Sr) tiveram suas concentrações calculadas e os resultados são mostrados na tabela 7.8 abaixo.

**Tabela 7.8:** Resultado das concentrações elementares das amostras de vértebras lombares L4 dos protocolos 1.

Parâmetros	Protocolo 1	
	Grupo Controle (n=3)	Grupo Hipertiroidismo (n=3)
	L4	L4
Ca (%)	22,4±0,02	22,4±0,03
Fe (µg g <sup>-1</sup> )	91,5±0,5 <sup>b</sup>	103,6±1,9 <sup>b</sup>
Zn (µg g <sup>-1</sup> )	455,6±1,4	484,3±2,6
Sr (µg g <sup>-1</sup> )	350,1±5,2 <sup>b</sup>	396,5±5,7 <sup>b</sup>

*Valores representados como: média ± desvio padrão.*

<sup>b</sup> *Estatisticamente significativo ao protocolo, α=0,05.*

O estudo da distribuição elementar nas amostras do grupo hipertiroidismo revelou que o elemento cálcio não sofreu alterações significativas na região analisada comparando com o grupo controle, demonstrando que 10 dias de administração do hormônio T4, não alterou a distribuição deste elemento na região trabecular. Já os elementos ferro e estrôncio tiveram um aumento significativo nas amostras do grupo

hipertiroidismo. O ferro é transportado no plasma até a medula óssea e sua deficiência pode reduzir o crescimento ósseo [138]. Sabe-se que o estrôncio é um elemento de muita afinidade com o osso e estudos têm mostrado que este mineral estimula a formação óssea [139]. Em relação ao zinco, este não apresentou alteração significativa nas amostras do grupo hipertiroidismo. Osso e músculo esquelético respondem por mais de 80 % do zinco (Zn) e as manifestações clínicas severas de deficiência de Zn em humanos são retardamento do crescimento, demora em maturação sexual e do esqueleto [137].

As figuras 7.6 e 7.7 apresentam os mapas bidimensionais da concentração elementar da região trabecular de uma amostra do grupo controle e hipertiroidismo, respectivamente.

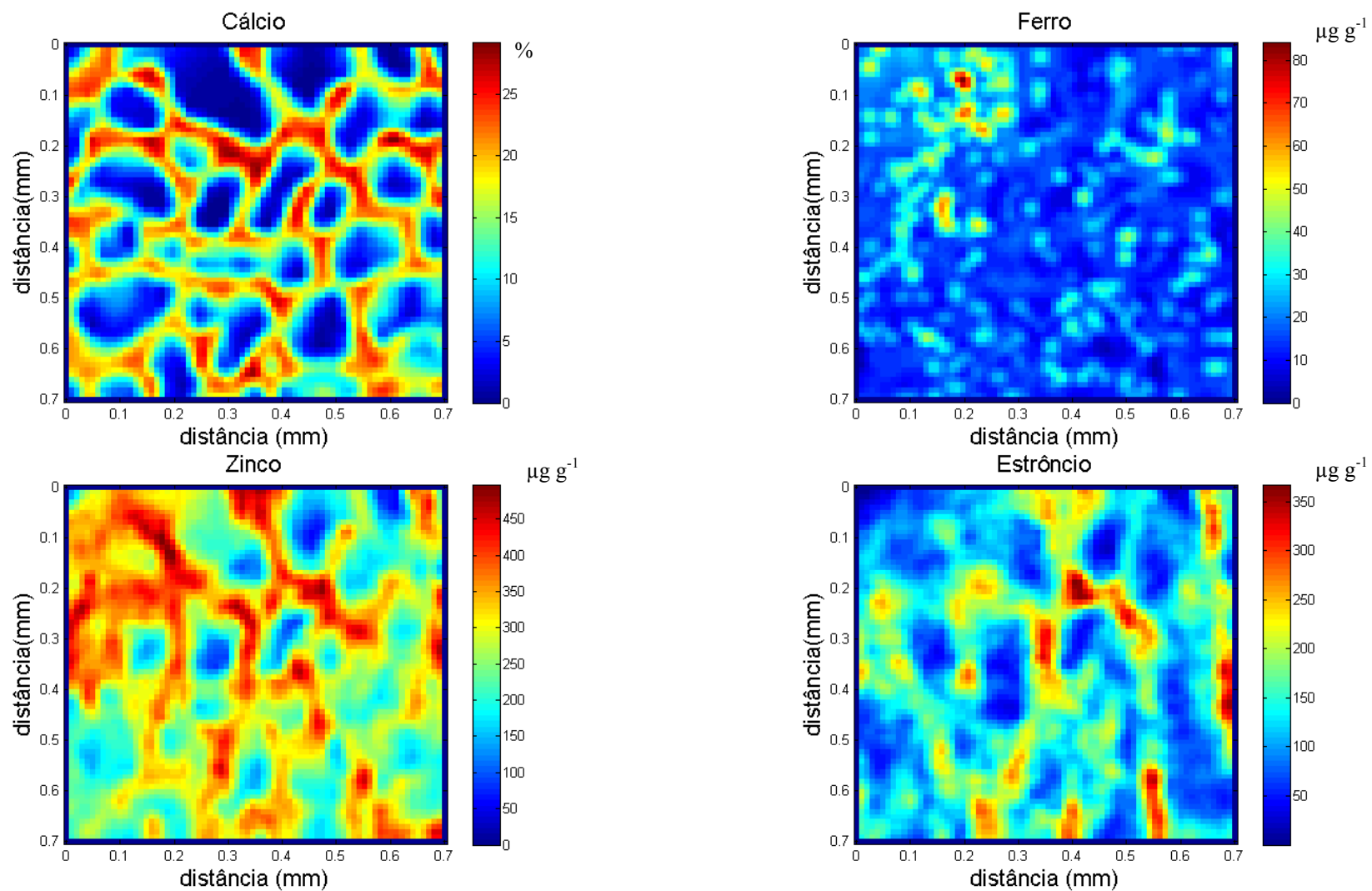


Figura 7.6: Imagens do mapeamento bidimensional da concentração do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio de uma amostra L4 do grupo controle.



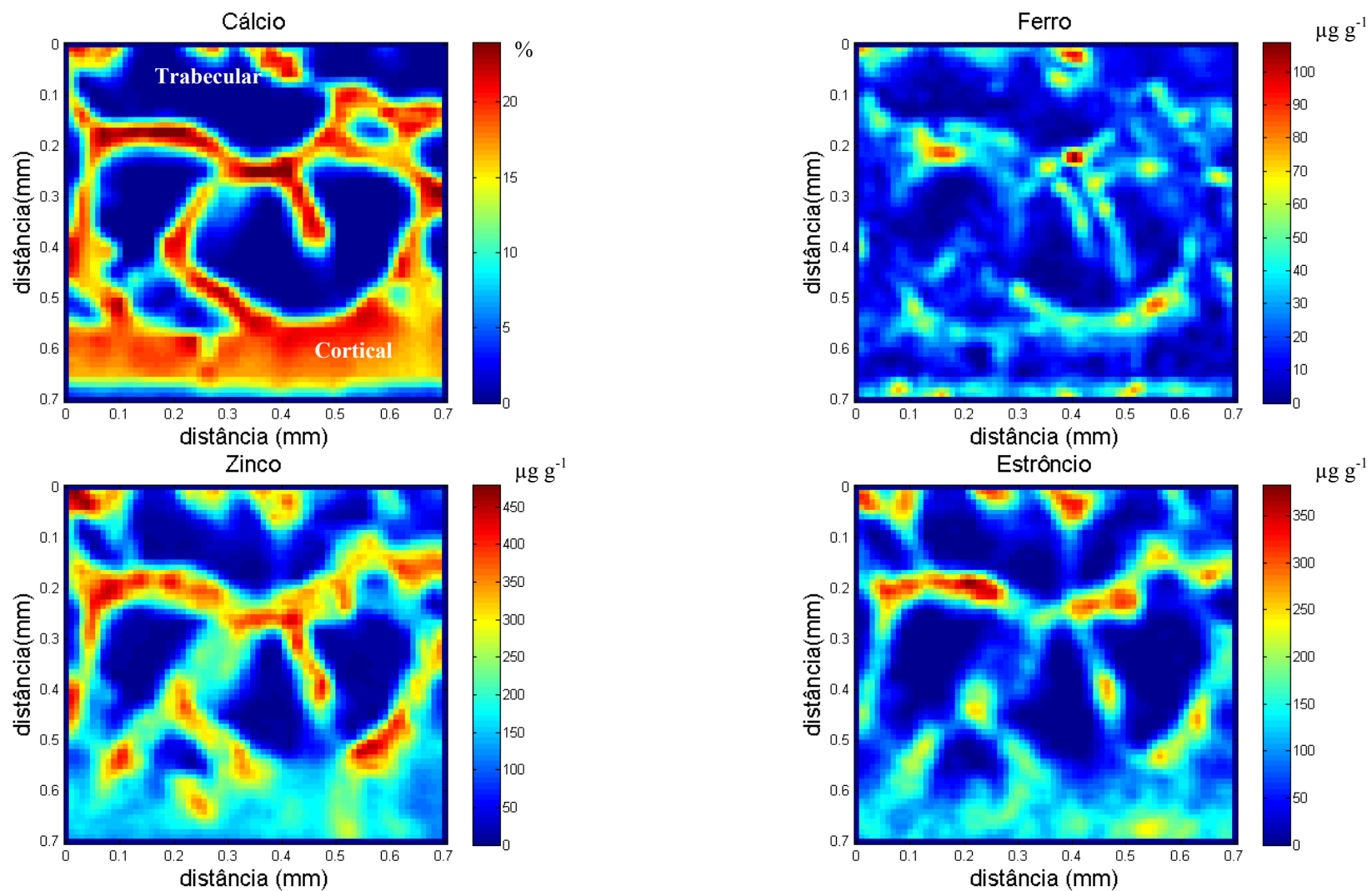


Figura 7.7: Imagens do mapeamento bidimensional do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio de uma amostra L4 do grupo hipertiroidismo.

Os mapas elementares das amostras do grupo controle mostraram uma distribuição homogênea do cálcio, e segundo o ICRU-44 este elemento representa 22,5% de uma matriz óssea, corroborando com os resultados encontrados. Os elementos minoritários ferro, zinco e estrôncio apresentaram uma distribuição heterogênea, destacando os elementos zinco e estrôncio que se distribuem mais na região trabecular do que na região cortical, como pode ser visualizado na figura 7.6 do grupo hipertireoidismo.

A seguir serão apresentados os resultados das amostras do estudo de envelhecimento do protocolo 2.

#### *Concentração elementar do Protocolo 2.*

A tabela 7.9 mostra os valores das concentrações do cálcio (Ca), ferro (Fe), zinco (Zn) e estrôncio (Sr) calculados dos espectros individuais da região trabecular das amostras L4 protocolo 2.

**Tabela 7.9:** Resultado das concentrações elementares das amostras de vértebras lombares L4 do protocolo 2.

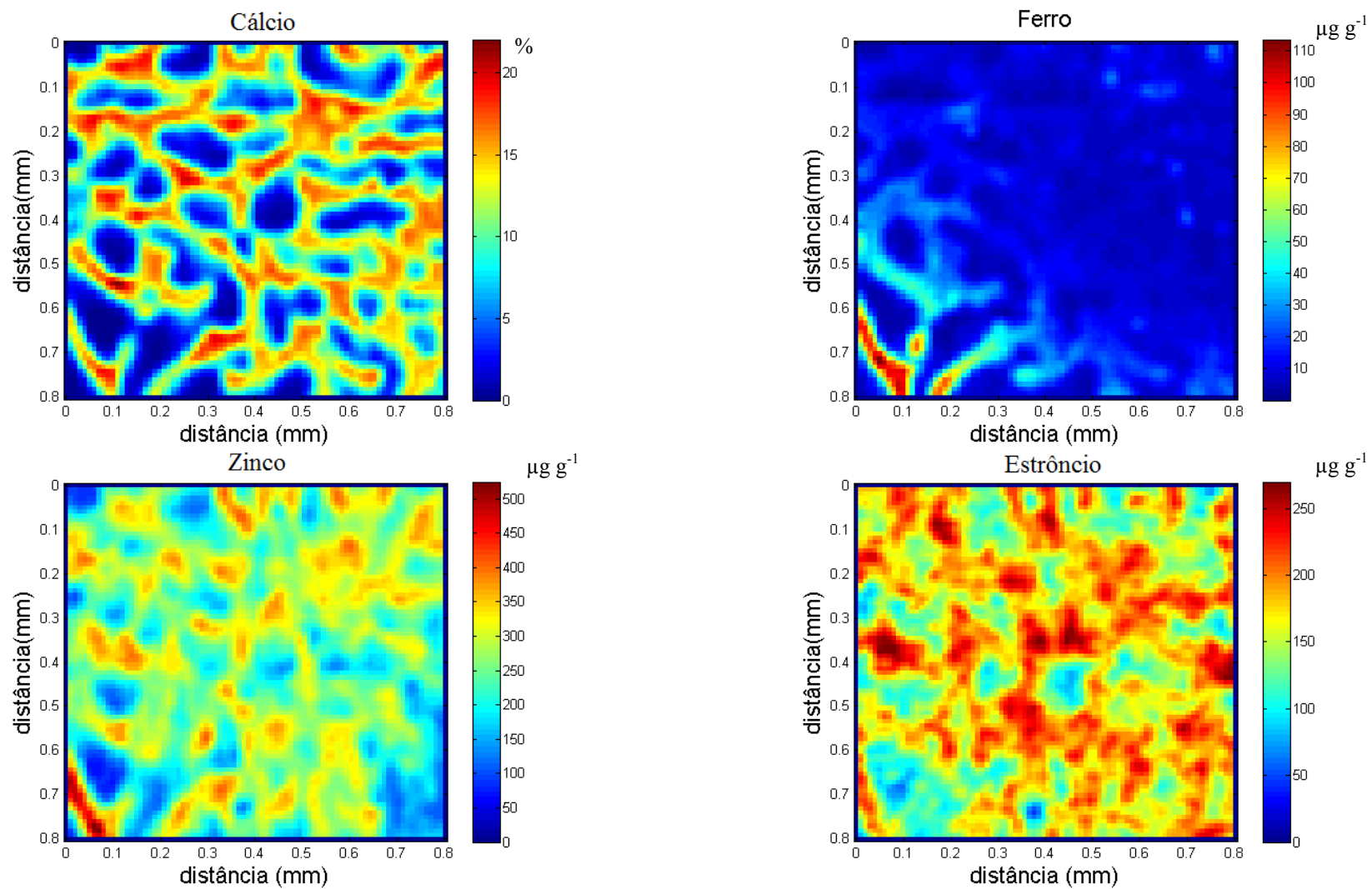
Parâmetros	Protocolo 2	
	Grupo Jovem (n=5)	Grupo Adulto (n=5)
	L4	L4
Ca (%)	22,4±0,1	20,4±0,1
Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	126,2±3,1 <sup>b</sup>	48,0±2,0 <sup>b</sup>
Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	528,7±6,0 <sup>b</sup>	288,9±3,9 <sup>b</sup>
Sr ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	262,5±14,9 <sup>b</sup>	167,0±7,7 <sup>b</sup>

*Valores representados como: média ± desvio padrão.*

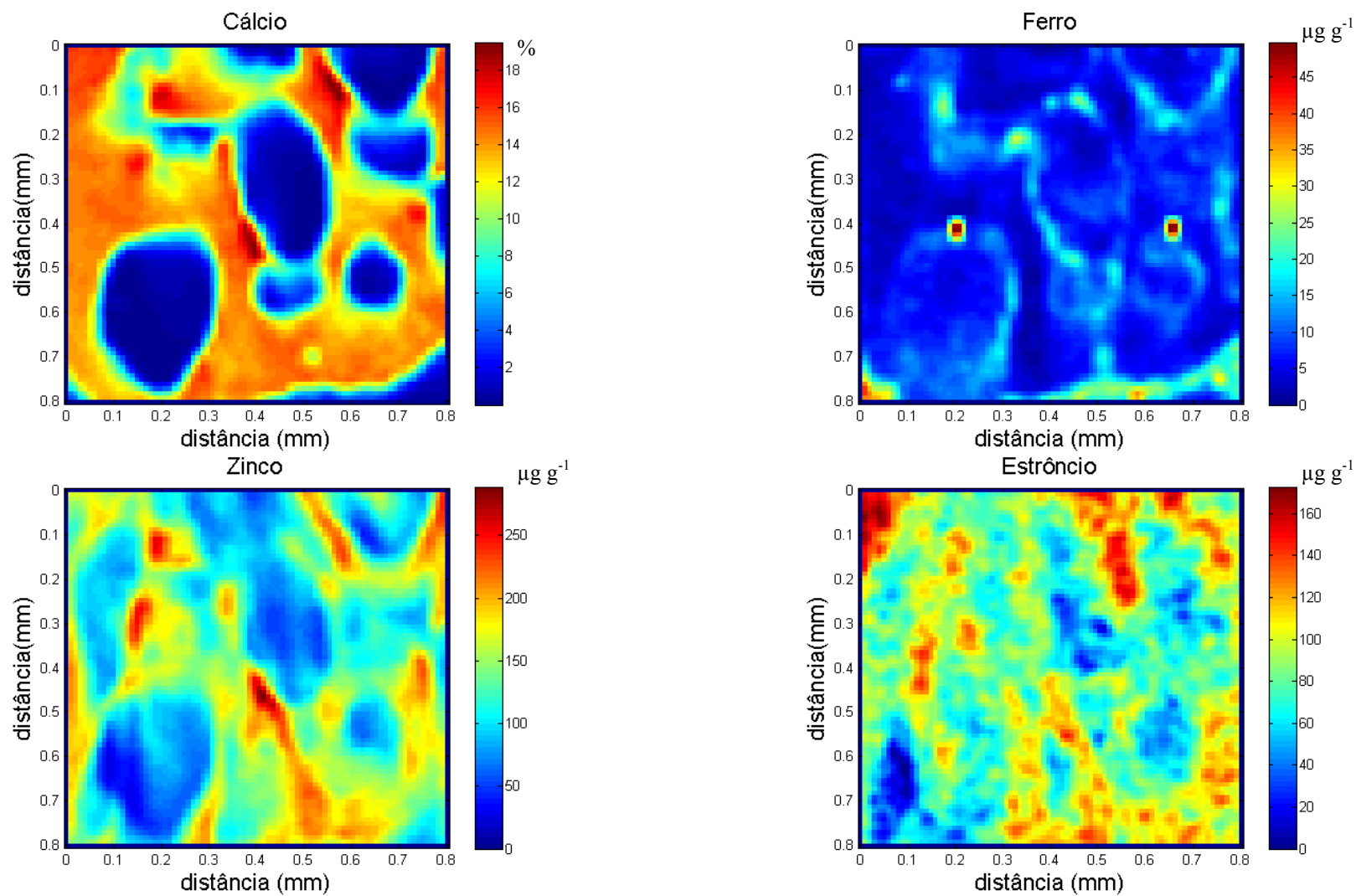
<sup>b</sup> *Estatisticamente significativo ao protocolo,  $\alpha=0,05$ .*

O elemento cálcio apresentou uma diminuição no grupo adulto em relação ao grupo jovem, mas essa diferença não foi significativa. Já os elementos ferro, zinco e estrôncio apresentaram menores concentrações no grupo adulto em relação ao grupo jovem. Lembrando que estes elementos estão diretamente ligados ao crescimento e manutenção da massa óssea, e suas deficiências podem acarretar em fragilidade da região trabecular [138, 139]. Ossos que apresentam a região trabecular frágil são mais suscetíveis a fraturas.

As figuras 7.8 e 7.9 apresentam os mapas bidimensionais da concentração elementar da região trabecular de uma amostra do grupo jovem e adulto, respectivamente.



**Figura 7.8:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio de uma amostra L4 do grupo jovem.



**Figura 7.9:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio de uma amostra L4 do grupo adulto.

Os mapas elementares das amostras dos grupos jovem e adultos mostraram uma distribuição homogênea do cálcio, e seus valores ficaram próximos ao da ICRU-44 de 22,5% de uma matriz óssea, corroborando com os resultados encontrados. Já os elementos minoritários ferro, zinco e estrôncio apresentaram uma distribuição heterogênea, e suas concentrações foram menores para o grupo adulto comparado ao grupo jovem, num intervalo de 95% de confiança.

## 8. CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou um estudo da qualidade óssea em amostras de vértebras de ratos provenientes de dois protocolos: hipertiroidismo e envelhecimento. As quantificações foram feitas através das técnicas de microtomografia e microfluorescência de raios X, onde foram avaliados a densidade mineral, a morfologia e o conteúdo mineral das amostras.

Para alcançar o objetivo principal, o trabalho foi dividido em três metas, e a primeira foi alcançada com a correção do efeito de endurecimento de feixe e calibração do sistema de microtomografia para quantificação da densidade mineral óssea. Na correção do endurecimento de feixe foi usando o método de linearização por polinômios, descrito por HERMAN [29]. O fator polinomial variou de  $2 \leq n \leq 6$ , obtendo-se um melhor resultado para  $n=2$ , onde foi possível perceber uma redução do efeito *cupping* e homogeneidade do nível de cinza. A calibração do sistema foi feita com hidroxiaptita pura, e a curva obtida teve um bom ajuste com  $R^2 = 0,98$  e  $p < 0,0001$ .

Para alcançar a segunda meta, foram testados três métodos de limiarização de imagem, um método visual baseado no valor médio de TH (MTH), um método pelo cálculo da segunda derivada igual a zero (DTH), e um método automático baseado na limiarização de OTSU (OTH). O desempenho dos métodos foi avaliado pelos parâmetros histomorfométricos 2D e 3 D de 121 *slices* gerados de um fantoma simulado em MATLAB usando uma combinação de funções senoidas. O método OTH obteve um melhor rendimento em relação aos outros dois métodos MTH e DTH, apresentando um erro percentual menor ou igual a 10%. Este resultado foi muito importante na escolha do método de limiarização das imagens microtomográficas para a quantificação das amostras ósseas.

Com o alcance das duas metas foi possível quantificar a morfologia e a densidade mineral das amostras ósseas dos protocolos de hipertiroidismo e envelhecimento.

Os resultados das quantificações morfológicas 2D e 3D do protocolo de hipertiroidismo mostraram que: a região anatômica L4 do grupo controle apresentou maior percentual ósseo em relação região L3. Foi possível perceber esta diferença ao comparar as imagens 3D destes sítios anatômicos onde a região L3 mostrou ser mais poroso do que a L4. Ainda para o protocolo 1, mas em relação a análise do grupo hipertiroidismo, não foram encontradas para esse grupo diferenças significativas ao comparar os sítios anatômicos. As análises estatísticas foram feitas com o teste estatístico *t-Student* num intervalo de confiança de 95%.

Fazendo a comparação entre as amostras do grupo hipertiroidismo e o grupo controle, ainda em relação ao primeiro protocolo, as amostras do grupo hipertiroidismo não sofreram alterações significativas segundo o teste estatístico aplicado. Podendo assim concluir que o hormônio T4 administrado por 10 dias nos animais para induzir o hipertiroidismo, não acarretou em nenhum tipo de desordem na morfologia das amostras analisadas. A sugestão aqui é de que seja retomado o estudo com um tempo maior de administração do hormônio T4, assim como um número maior de animais, podendo assim melhor a estatística dos dados. Esta sugestão é baseada nos resultados encontrados na literatura [135, 136], onde mulheres em tratamento para hipertiroidismo apresentaram o que os médicos chamam de osteoporose secundária.

Os resultados das quantificações morfológicas 2D e 3D do protocolo de envelhecimento mostraram que: em relação aos sítios anatômicos L3 e L4 não foram encontrados diferenças significativas dentro do mesmo grupo (jovem ou adulto). Já ao comparar os resultados em relação ao protocolo de envelhecimento, foi possível perceber uma diminuição do percentual do volume ósseo (BV/TV), isto é, um aumento da porosidade das matrizes ósseas do grupo adulto quando comparado ao grupo jovem. Este resultado foi observado nas imagens 3D das L3 e L4 do grupo adulto, onde estas apresentam maior fragmentação óssea, em relação às imagens 3D do grupo jovem. Outros parâmetros histomorfométricos, que também sofreram alterações significativas foram o número de trabéculas (Tb.N) onde ocorreu uma diminuição, e um aumento do espaçamento entre estas (Tb.Sp). Os resultados mostraram que a morfologia óssea do grupo adulto apresentou deterioração da microarquitetura, tendo como consequência a diminuição da quantidade óssea, tornando-os frágeis e suscetíveis á fraturas.



O diferencial deste trabalho foi apresentado na quantificação da densidade mineral óssea pela microtomografia de raios X. Onde foi possível quantificar a região de interesse ROI selecionada na análise morfológica em relação a sua densidade, nos dando uma avaliação mais completa em relação aos efeitos do hormônio T4, usado nos animais do grupo hipertiroidismo, e do fator idade nos animais do protocolo de envelhecimento.

Os resultados da quantificação da densidade mineral óssea do protocolo 1 mostram que: os valores de densidade da amostra L4 do grupo controle apresentou um valor máximo de densidade maior do que a amostra L3 do mesmo grupo. Este resultado corrobora com o resultado da histomorfometria onde este sítio anatômico apresentou maior percentual de volume ósseo, que também foi estatisticamente significativo. Apesar da amostra L4 do grupo controle apresentar um valor maior de densidade, não é possível concluir se o sítio L4 se diferencia do sítio L3, pois este comportamento não ocorre em relação aos demais grupos de ambos os protocolos. Para uma melhor análise é necessário investigar um número maior de amostras, e assim ter um teste estatístico mais conclusivo. O resultado encontrado em relação ao protocolo mostrou que os valores de máximo e médio de densidade também não apresentaram diferenças significativas, o que corrobora com os resultados da histomorfometria.

Já em relação aos resultados das amostras do grupo jovem e adulto do protocolo 2, os resultados mostraram que em relação aos sítio anatômico para um mesmo grupo estes não apresentaram diferenças significativas entre os valores de máximo e médio de densidade. Ao aplicar o teste estatístico em relação ao protocolo o primeiro resultado encontrado foi que os valores de máximo de densidade do grupo adulto sofreram diminuição significativa, mostrando que este grupo apresentou uma menor massa óssea em relação ao grupo jovem. Este resultado se deve ao ciclo da remodelação óssea, isto é, durante a vida de um indivíduo o tecido ósseo passa constantemente por um processo de absorção e formação. Com o decorrer do tempo, o balanço entre a reabsorção e formação óssea se torna negativo, o que resulta numa diminuição do volume do osso, tornando-os menos densos e mais frágeis, e assim mais suscetíveis a fratura.

Para concluir o estudo da qualidade óssea nas amostras dos protocolos 1 e 2, a terceira meta foi alcançada com o mapeamento das concentrações elementares pela técnica de microfluorescência de raios X. Este estudo revelou que: o cálcio, que é o principal mineral da matriz óssea, não apresentou variação significativa nas amostras dos dois protocolos, e seu mapeamento mostrou-se homogêneo em todas as amostras. Os mapas bidimensionais dos minerais, ferro, zinco e estrôncio mostraram uma distribuição heterogênea destes minerais na região trabecular. Para o mineral ferro que é responsável pelo crescimento ósseo, às amostras do primeiro protocolo, mostraram um aumento de concentração deste mineral no grupo hipertiroidismo, já em relação as matrizes ósseas das amostras do grupo adulto do protocolo 2, mostraram uma menor concentração deste mineral comparando com o grupo jovem, e esta diminuição foi significativa em intervalo de confiança de 95 %. Para o mineral zinco às amostras do segundo protocolo mostrou uma redução significativamente, o que já não ocorreu nas amostras do primeiro protocolo, lembrando que deficiência deste mineral em humanos retarda o crescimento do esqueleto ósseo. Para o mineral estrôncio os níveis encontrados nas matrizes do primeiro protocolo sofreram alterações significativas comparando grupo controle e hipertiroidismo, o que também ocorreu nas amostras do grupo adulto.

Outro aspecto importante na avaliação da qualidade óssea se refere às características do osso que conferem a capacidade de resistência à fratura. Novos medicamentos têm surgido no mercado para tratamento da osteoporose. Sugestão para trabalhos futuros seria uma análise do grau de competência biomecânica de amostras de fêmures e vértebras, provenientes de protocolos em estudo animal para novos medicamentos para osteoporose pelas técnicas de microtomografia e microfluorescência de raio X.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PACCINI, M. K., GLANER, M. F., “Densidade Mineral Óssea e Absorptometria de raios X de Dupla Energia”, *Revista Brasileira de Cineantropometria Desempenho Humano*. v. 10, n.1, pp. 92-99, 2008.
- [2] BRAILLON, P. M, SALLE, B. L., BRUNET J., GLORIEUX, et al., “Dual Energy X-ray Absorptiometry Measurement of Bone Mineral Content in Newborns: Validation of the Technique”, *Pediatric Research*. v. 32, pp. 77–80, 1992.
- [3] PANATTONI, G. L., SCIOLLA, A., ISAIA, G. C., “Densitometric study of developing vertebral bodies”, *Calcified Tissue International*, v. 57, pp. 74–77, 1995.
- [4] PANATTONI, G. L., D'AMELIO, P., Di STEFANO, M., et al., “Densitometric Study of Developing Femur”, *Calcified Tissue International*, v. 64, pp. 133–136, 1999.
- [5] SALLE, B. L., BRAILLON, P., GLORIEUX, F. H., et al., “Lumbar Bone Mineral Content Measured by Dual Energy X-ray Absorptiometry in Newborns and Infants”, *Acta Paediatrica*, v. 81, pp. 953–958, 1992.
- [6] BRAILLON, P. M., LAPILLONNE, A., HO, P. S., et al., “Assessment of the Bone Mineral Density in the Lumbar Vertebrae of Newborns by Quantitative Computed Tomography”, *Skeletal Radiology*, v. 25, pp. 711–5, 1996.
- [7] ROSCHGER, P., GRABNER, B. M., RINNERTHALER, S., et al., “Structural Development of the Mineralized Tissue in the Human L4 Vertebral Body”, *Journal of Structural Biology*, v. 136, pp. 126–136, 2001.

- [8] SKEDROS, J. G., BLOEBAUM, R. D., BACHUS, K. N., et al, “Influence of Mineral Content and Composition on Graylevels in Backscattered Electron Images of Bone”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 27, pp. 57–64, 1993.
- [9] SKEDROS, J. G., BLOEBAUM, R. D., BACHUS, K. N., et al., “The Meaning of Graylevels in Backscattered Electron Images of Bone”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 27, pp. 47–56, 1993.
- [10] ITO M., “Assessment of Bone Quality using Micro-Computed Tomography (micro-CT) and Synchrotron Micro-CT, *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, v. 23, pp. 115–21, 2005.
- [11] COMPSTON, J., “Bone Quality: What is It and How is It Measured?”, *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 50, n. 4, pp. 579-585, 2006.
- [12] LIMA, I. C. B., *Caracterização de Estruturas Internas Ósseas através das Técnicas de Microtomografia Computadorizada Tridimensional e Fluorescência de Raios X*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2006.
- [13] SERPA, R. F. B., *Análise Multielementar de Tecidos Cerebrais através da Microfluorescência de Raios X e Fluorescência de Raios X por reflexão Total*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2007.
- [14] OLIVEIRA, L. F. *Tomografia Computadorizada Tridimensional usando Raios-X na Análise de Objetos Volumétricos*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002.
- [15] LIMA, I. C. B., *Quantificação Histomorfométrica 2D a partir de Tomografia Computadorizada 3D*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002.

- [16] FELDKAMP, L. A., GOLDSTEIN, S. A., PARFITT, A. M., et al., “The Direct Examination of Three-Dimensional Bone Architecture in Vitro by Computed Tomography”, *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 4, n. 1, pp. 3-11, 1989.
- [17] MÜLLER, R., Van CAMPENHOUT, H., Van DAMME, B., et al., “Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies: A Quantitative Structural Comparison of Histological Sections and Micro-Computed Tomography”, *Bone*, v. 23, issue 1, pp. 59-66, 1998.
- [18] De ASSIS, J. T., *Microtomografia utilizando Tubo de Raios X*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1992.
- [19] YANG, J., PHAM, S. M., CRABBE, D. L., “High-resolution Micro-CT Evaluation of Mid-to-long Term Effects of Estrogen Deficiency on Rat Trabecular Bone”, *Academic Radiology*, v 10, issue 10, pp. 1153-1158, 2003.
- [20] PATEL, V., SEMMA ISSEVER, A., BURGHARDT, et al., “MicroCT Evaluation of Normal and Osteoarthritic Bone Structure in Human Knee Specimens”, *Journal of Orthopaedic Research*, v. 21, n. 1, pp. 6-13, 2003.
- [21] BOYD, S. K., DAVISON, P., MÜLLER, R., et al., “Monitoring Individual Morphological Changes Over Time in Ovariectomized Rats by in Vivo Micro-Computed Tomography”, *Bone*, v. 39, pp. 854-62, 2006.
- [22] VAN de CASTEELE, E., *Model-based approach for Beam Hardening Correction and Resolution Measurements in Microtomography*. PhD thesis, Antwerpen University, Antwerpen, Belgium, 2004.
- [23] HOUNSFIELD, G. N., “Computerized Transverse Axial. Scanning (Tomography): Part 1. Description of System”, *British Journal Radiology*, v.46, pp. 1016-1022, 1973.

- [24] CHO, Z. H., “General Views on 3-D Image Reconstruction and Computerized Transverse Axial Tomography”, *IEEE Transactions on Nuclear Science*, v. NS-21(3), pp. 44-71, 1974.
- [25] MCCULLOUGH, E. C., BAKER, H. L., OW Houser, J. R., et al., “An Evaluation of the Quantitative and Radiation Features of a Scanning X-ray Transverse Axial Tomography: the EMI scanner”, *Radiology*, v. 111, pp. 709-715, 1974.
- [26] SHEPP, L. A., LOGAN, B. F., “The Fourier reconstruction of a head section”, *IEEE Transactions on Nuclear Science*, v. NS-21, pp. 21-43, 1974.
- [27] BROOKS, R. A., DI CHIRO, G., “Beam Hardening in X-ray Reconstructive Tomography”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 21, n. 3, pp. 390-398, 1976.
- [28] HOUNSFIELD, G. N., *British Patent No. 1283915* (British Patent Office, London), 1972.
- [29] HERMAN, G.T., “Correction for Beam Hardening in Computed Tomography”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 24, n. 1, pp. 81-106, 1979.
- [30] STONESTRORN, J. P., ALVAREZ, R. E., MACOVSKI, A. *IEEE Transactions Biomedical Engineering*, v. BME-28, pp. 128, 1981.
- [31] COLEMAN, A. J., E SINCLAIR, M., “A Beam-Hardening Correction Using Dual-Energy Computed tomography”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 30, n.11, pp. 1251-1256, 1985.
- [32] GOODSITT, M. M., “Beam hardening errors in post-processing dual energy quantitative computed Tomography”, *Medical Physics*, v. 22, issue 7, pp. 1039-1047, 1995.

- [33] DE PAIVA, R. F., LYNCH, J., ROSENBERG, E., et al., “A beam hardening correction for X-ray microtomography”, *NDT&E International*, v. 31, n. 1, pp. 17-22, 1998.
- [34] HSIEH, J., MOLTHEN, R. C., DAWSON, C. A., et al., “An iterative approach to the beam hardening correction in cone beam CT”, *Medical Physics*, v. 27 n.1, 2000.
- [35] JIAN, F., HONGNIAN, L., “ Beam-hardening correction method based on original sonogram for X-CT”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 556, n.1, pp. 379–385, 2006.
- [36] SOURBELLE, K., KACHELRIEß, M., KALENDER, W. A., “Empirical Water Precorrection for Cone-Beam Computed Tomography”, *Nuclear Science Symposium Conference Record, IEEE*, v. 4, pp. 1871-1875, 2005.
- [37] VEDULA, V. S. V. M., MUNSHI, P., “An improved algorithm for beam hardening corrections in experimental X-ray tomography” *NDT&E International*, v. 41, pp. 25–31, 2008.
- [38] HARA, T., TANCK, E., HOMMINGA, J., et al., “The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties”, *Bone*, v. 31 , issue 1 , pp. 107.
- [39] RÜEGSEGGER, P., KOLLER, B., MÜLLER, R., “A microtomographic system for the non-destructive evaluation of bone architecture”, *Classified Tissue International*, v. 58, pp. 24–29, 1996.
- [40] MARTÍN-BADOSA, E., ELMOUTAOUAKKIL, A., NUZZO, S., et al., “ A method for the automatic characterization of bone architecture in 3D mice microtomographic images”, *Computerized Medical Imaging and Graphics*, v. 27, issue 6, pp. 447-458, 2003.

- [41] LIMA, I., ROCHA, M. S., LOPES, R. T., “Ethanol bone evaluation using 3D microtomography”, *Micron*, v.39, issue 5, pp. 617-622, 2008.
- [42] OTSU, N., “A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms”, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, v. 9, n. 1, pp. 62-66, 1979.
- [43] ZHANG, J., HU, J., “Image Segmentation based on 2D Otsu method with Histogram Analysis”. *IEEE International Conference on Computer Science and Software Engineering*, doi: 10.1109/CSSE.2008.206, 2008.
- [44] ZHANG, J., HE, Z., FAN, S., HE, et al., “Automatic Thresholding of Micro-CT Trabecular bone Images”, *IEEE International Conference on BioMedical Engineering and Informatics*, doi: 10.1109/BMEI.2008.13, 2008.
- [45] RUEGSEGGER, P., NIEDERER, P., ANLIKER, M., “An extension of classical bone mineral measurements”, *Annals of Biomedical Engineering*, v. 2, pp. 194-205, 1974.
- [46] REICH, N. E., SEIDELMANN, F. E., TUBBS, R. R., “Determination of bone mineral content using CT scanning”, *American Journal Roentgenology*, v. 127, pp. 593-594, 1976.
- [47] ISHERWOOD, I., RUTHERFORD, R. A., PULLAN, B. R., et al., “Bone mineral estimation by computer assisted transverse axial tomography”, *The Lancet*, v. 308, Issue 7988, pp. 712-715, 1976.
- [48] POSNER, I., GRIFFITHS, H. J., “Comparison of CT scanning with photon absorptiometric measurement of bone mineral content in the appendicular skeleton”, *Investigative Radiology*, v. 12, pp. 544, 1977.
- [49] REVAK, C. S., “Mineral content of cortical bone measured by computed tomography”, *Journal of Computed Assisted Tomography*, v. 4, pp. 342-350, 1980.



- [50] ADAMS, J. E., CHEN, S. Z., ADAMS, P. H., et al., “Measurement of trabecular bone mineral by dual energy computed tomography”, *Journal of Computed Assisted Tomography*, v. 6, pp. 601-607, 1982.
- [51] MERCER, C. E., ANDERSON, P., “X-ray microtomography: a novel technique for the quantification of effects in enamel following CO2 laser application”, *British Dental Journal*, v. 180, pp. 451-455, 1996.
- [52] ANDERSON, P., ELLIOTT, J. C., BOSE, U., et al., “A Comparison of the Mineral Content of Enamel and Dentine in Human Premolars and Enamel Pearls Measured by X-Ray Microtomography”, *Archives oral Biology*, v. 41, n. 3, pp. 281-290, 1996.
- [53] POSTNOV, A. A., VINOGRADOV, A. V., VAN DYCK, D., et al., “Quantitative analysis of bone mineral content by x-ray microtomography”, *Physiological Measurement*, v. 24, pp. 165-178, 2003.
- [54] WONG, F. S. L., ANDERSON, P., FAN, H., et al., “X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel”, *Archives of Oral Biology*, v. 49, pp. 937—944, 2004.
- [55] NAZARIAN, A., SNYDER, B. D., ZURAKOWSKI, D., et al., “Quantitative micro-computed tomography: A non-invasive method to assess equivalent bone mineral density”, *Bone*, v. 43, pp. 302–311, 2008.
- [56] NASCIMENTO FILHO, V. F., *Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão e energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF)*, Dept<sup>o</sup> de Ciências Exatas - ESALQ/USP e Laboratório de Instrumentação Nuclear - CENA/USP, apostila, julho/1999, 33 p.
- [57] KATSANOS, A. A., *X-Ray Methods*. In: IAEA, ed. *Elemental Analysis of Biological Materials*. Viena, IAEA, *Technical Reports*, series n. 197, pp. 231, 1980.

- [58] CRISS, J. W., BIRKS, L. S., “Calculation Methods for Fluorescent X-Ray Spectrometry. Empirical Coefficients vs. Fundamental Parameters”. *Analytical Chemistry*, v. 40, pp. 1080, 1968.
- [59] BRADLEY, D. A., FARQUHARSON, M. J., “XRF and the in vivo evaluation of toxicological metals”, *X-ray spectrometry*, v. 28, n. 4, pp. 270-274, 1999.
- [60] TODD, A. C., CARROL, S., GODBOLD, J. H., et al., “Variability in XRF measured tibia lead levels”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 45, pp. 3737–3748, 2000.
- [61] HAVRILLA, G. J., “Applications of X-ray microfluorescence to materials analysis”, *X-ray spectrometry*, v. 26, n.6, pp. 364-373, 1997.
- [62] BERNASCONI, G., TAJANI, A., DARGIE, M., et al., *Study of the elemental lateral distribution in fiber optic conductors*. Vienna: IAEA, 1997. (Agency’s Laboratories, A-2444).
- [63] GERHARDSSON, L., AKANTIS, A., LUNDSTRÖM, N. G., et al., “Lead concentrations in cortical and trabecular bones in deceased smelter workers”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.19, issues 2-3, n. 2, pp. 209-215, 2005.
- [64] KANNGIEßER, B., “Quantification procedures in micro X-ray fluorescence analysis”, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 58, issue 4, pp. 609-614, 2003.
- [65] INJUK, J., VAN GRIEKEN, R., “Literature trends in x-ray emission spectrometry in the period 1990-2000: a reviews”, *X-ray spectrometry*, v. 23, n. 1, pp. 35-39, 2003.

- [66] HUANG, Y. Y., LU, J. X., HE, R. G., et al., “Study of human bone tumor slice by SRFRX microprobe”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, v 21, pp. 1301-1304, 2001.
- [67] HOMMA, S., NAKAI, I., MISAWA, S., et al., “Site-specific distribution of copper, selenium, and zinc in human kidney by synchrotron radiation induced X-ray fluorescence”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, v. 103, p. 229-232, 2005.
- [68] LIMA, I., ANJOS, M. J., FLEIUSS, M. L. F., et al., “Characterization of osteoporotic bone structures by bidimensional images through x-ray microfluorescence with synchrotron radiation”, *X-Ray Spectrometry*, v. 37, issue 3, pp. 249-254, 2007.
- [69] FUKUMOTO, N., KOBAYASHI, Y., KURAHASHI, M., et al., “X-ray fluorescent spectroscopy with a focused X-ray beam collimated by a glass capillary guide tube and element mapping of biological samples”, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, v. 54, issue 1, pp. 91-98, 1999.
- [70] WATKINS, J. *Estrutura e Função do Sistema Musculoesquelético*. Porto Alegre: ArtMed, 2001.
- [71] Disponível em: <<http://www.afh.bio.br/sustenta/img/esqueleto1.gif>>  
(pesquisa realizada em 10/01/2009).
- [72] CANHÃO, H., FONSECA, J.E., QUEIROZ, M.V., “Epidemiologia da osteoporose, mecanismos de remodelação óssea e factores protectores do osso”, *Acta Reumatológica Portuguesa*, v.30, pp 225-240, 2005.
- [73] LÉPORI, R. L. *Atlas de Osteoporose*. São Paulo, Santos: Ed. Soriak Comércio e Promoções S.A, março, 2004.

- [74] RALSTON, S.H. “What determines peak bone mass and bone loss?” *Baillière's Clinical Rheumatology*; v. 11, pp. 479-494, 1997.
- [75] LIPS, P., “Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications”, *Endocrine Reviews*, v. 22, pp.477-501, 2001.
- [76] BOUXSEIN, L. M., “Bone quality: where do we go from here?” *Osteoporosis International*, n.14, part V, p. 118- 127, 2003.
- [77] SEEMAN, E. “Bone quality”, *Osteoporosis International*, n. 14, suppl., part V, p. 57, 2003.
- [78] WHITE, C.S. “Oral radiographic predictors of osteoporosis”, *Dentomaxillofacial Radiology*, v. 31, n. 2, p. 84-92, 2002.
- [79] KANIS, J., BORGSTROM, F., ZETHRAEUS, N., et al., “Intervention threshold for osteoporosis in the UK”. *Bone*, v. 36, p. 22-32, 2005.
- [80] RESNICK, D., *Osteoporosis*. In: RESNICK, D. 3<sup>a</sup> ed., Diagnosis of bone and joint disorders, Saunders Company, Philadelphia, v. 4, cap. 51, p. 1783-1853, 1995.
- [81] GOWIN, W., FELSEMBERG, D., *Methods in osteodensitometry*. In: SCHÖNAU, E. Paediatric Osteology. Amsterdam: Elsevier, pp. 73-81, 1996.
- [82] KREIPE, R. E., “Bones of today, bones of tomorrow”, *American Journal of Diseases of Children*, v. 146, n. 1, pp. 22-25, 1992.
- [83] CHAN, Y. Y., BISHOP, N. J., “Clinical management of childhood osteoporosis”, *International Journal of Clinical Practice*, v. 56, n. 4, pp. 280-286, 2002.
- [84] SLOSMAN, D. O., RIZZOLI, R., BONJOUR, J. P., “Bone absorptiometry: a critical appraisal of various methods”, *Acta Paediatrica Supplement*, v. 411, pp. 9-11, 1995.

- [85] Consensus Development Conference: “Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis”, *American Journal of Medicine*, v. 94, pp. 646-50, 1993.
- [86] KANIS, J. A., et al, “The diagnosis of osteoporosis”, *Journal of Bone Mineral Research*, v. 9, pp. 1137-41, 1994.
- [87] OLIVEIRA, J. B., Aplicação da Densitometria Óssea na Osteoporose. Disponível em <<http://www.docstoc.com>>(Pesquisa realizada em 05/01/2010)
- [88] KANIS, J. A., “Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk”, *Lancet*, v. 359, pp. 1929-36, 2002.
- [89] *World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis*. WHO Technical report series 843. Geneva, WHO, 1994.
- [90] FORSBERG, F., *X-ray Microtomography and Digital Volume Correlation for Internal Deformation and Strain Analysis*. Doctoral thesis. Luleå University of Technology Department of Applied Physics and Mechanical Engineering Division of Experimental Mechanics, 2008.
- [91] FELDKAMP, L. A., DAVIS, L. C., KRESS, J. W., “Practical Cone-beam Algorithm”, *Journal of the Optical of Society American*, v. 1, pp. 612-619, 1984.
- [92] JENNINGS, R. J., “A method for comparing beam hardening filter materials for diagnostic radiology”, *Medical Physics*, v. 15, pp. 588-599, 1988.
- [93] CRANLEY, K., et al., *Catalogue of diagnostic X-ray spectra and other data*. The Institute of Physics and Engineering in Medicine. Report 78, 1997.

- [94] ALVAREZ, R.E. MACOVSKI, A., “Energy-selective reconstructions in X-ray computerized tomography”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 21, pp. 733-744, 1976.
- [95] HAMMERSBERG, P., MANGARD, M., “Correction for beam hardening artifacts in computerized tomography”, *Journal of X-ray Science and Technology*, v. 8, pp. 75-93, 1998.
- [96] SACKER, L. S., NORDIM, B. E. C., “A simple bone biopsy needle”, *Lancet* pp.1:347, 1954.
- [97] BORDIER, P., MATRAJT, H., MIRAVET, L., et al., “Mesure histologique de la masse et de la résorption des traveés osseuses”, *Pathologie Biology*, v. 12, PP. 1238-1243, 1964.
- [98] MERZ, W. A., SCHENK, R. K., “Quantitative structural analysis of human cancellous bone”, *Acta Anatomica*, v. 75, pp. 54-66, 1970.
- [99] GARRAHAN, N. J., MELLISH, R. W., COMPSTON, J. E., “A new method for the two-dimensional analysis of bone structure in human iliac crest biopsies”, *Journal of Microscopy*, v. 142, pp. 341-349, 1986.
- [100] MEUNIER P. J., Bone histomorphometry. In: *Osteoporosis: etiology, diagnosis and management*, 2nd ed., pp. 299-318, (Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999).
- [101] MEUNIER, P. J., COUPRON, P., Iliac trabecular bone volume in 236 controls. Representativeness of iliac sample. In *Proceedings of the First Workshop on Bone Morphometry*, pp. 100-105, 1973.
- [102] PARFITT, A. M., DREZNER, M. K., GLORIEUX, F. H., et al., “Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature symbols, and units”, *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 2, pp. 595-610, 1987.

- [103] UNDERWOOD, E. E., *Quantitative Stereology*, (Addison-Wesley, MA, USA, 1970).
- [104] HANSON, N. A., BAGI, C., “Alternative approach to assessment of bone quality using micro-computed tomography,” *Bone*, v. 35, pp.326-333 (2004).
- [105] DING, M., HVID, I., “Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone,” *Bone*, 26(3), 291-295 (2000).
- [106] BARBIER, A., MARTEL, C., DE VERNEJOU, M. C., et al., “The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional x-ray microcomputed tomography,” *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 17, 37-44 (1999).
- [107] SOILLE, P., *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*, 2nd ed. (Springer-Verlag, Berlin, 2004).
- [108] DOUGHERTY, E. R., LOTUFO, R. A. *Hands-on Morphological Image Processing*, (SPIE Press, Washington, 2003).
- [109] ANJOS, M. J., CALZA, C. F., BUENO, M. I. M. S., et al., “EDFRX analysis of Marajoara pubic covers”, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research. Section B. Beam Interactions with Materials and Atoms*, v. 263, p. 245-248, 2007.
- [110] COSTA, A. C. M., CASTRO, C. R. F., ANJOS, M. J., et al., “Multielement determination in river-water of Sepetiba Bay tributaries (Brazil) by total reflection X-ray fluorescence using synchrotron radiation”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 269, p. 703-706, 2006.

- [111] CALZA, C. F., ANJOS, M. J., SOUZA, S. M. F. M., et al., “X-ray Microfluorescence with Synchrotron Radiation applied in the analysis of pigments from ancient Egypt”, *Applied Physics. A, Materials Science & Processing*, v. 90, p. 75-79, 2008.
- [112] SERPA, R. F. B., JESUS, E. F. O., ANJOS, M. J., et al., “Elemental concentration in the cortex and hippocampus of Wistar rats by X-ray total reflection fluorescence with synchrotron radiation”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 269, p. 647-652, 2006.
- [113] SIMABUCO, S. M., *Emprego da fluorescência de raios X por Dispersão de energia no estudo da dinâmica da vinhaça no solo*. Tese de D. Sc., IPEN/CNEN, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
- [114] IAEA, INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Industrial and environmental applications of nuclear analytical techniques. Vienna: IAEA, (TECDOC, 1121), 1999.
- [115] PÉRES, C. A., *Análisis por Microfluorescencia de Rayos-X con Radiación Síncrotrón Utilizando Óptica Capilar: Principios, Desarrollos y Aplicaciones*. Tese de D.Sc., Universidad Nacional de Córdoba, 2004.
- [116] BERTIN, E.P., Principles and practice of X-ray spectrometric analysis. London: Plenum Press, pp. 1079, 1975.
- [117] WINICK, H., BIENENSTOCK, A., Annual Review of Nuclear and Particle Science, v. 28, pp. 33-113, 1978.
- [118] EBERHARDT, W., *Applications of Synchrotron Radiation: high-resolution studies of molecules and molecular adsorbates on surfaces*, Heidelberg: Springer-Verlag, 1995.
- [119] ADAMS, F., JANSSENS, K., SNIGIREV, A., “Microscopic X-ray fluorescence analysis and related methods with laboratory and synchrotron radiation sources”, *Journal Analytical Atomic Spectrometry*, v. 13, pp. 319- 331, 1998.



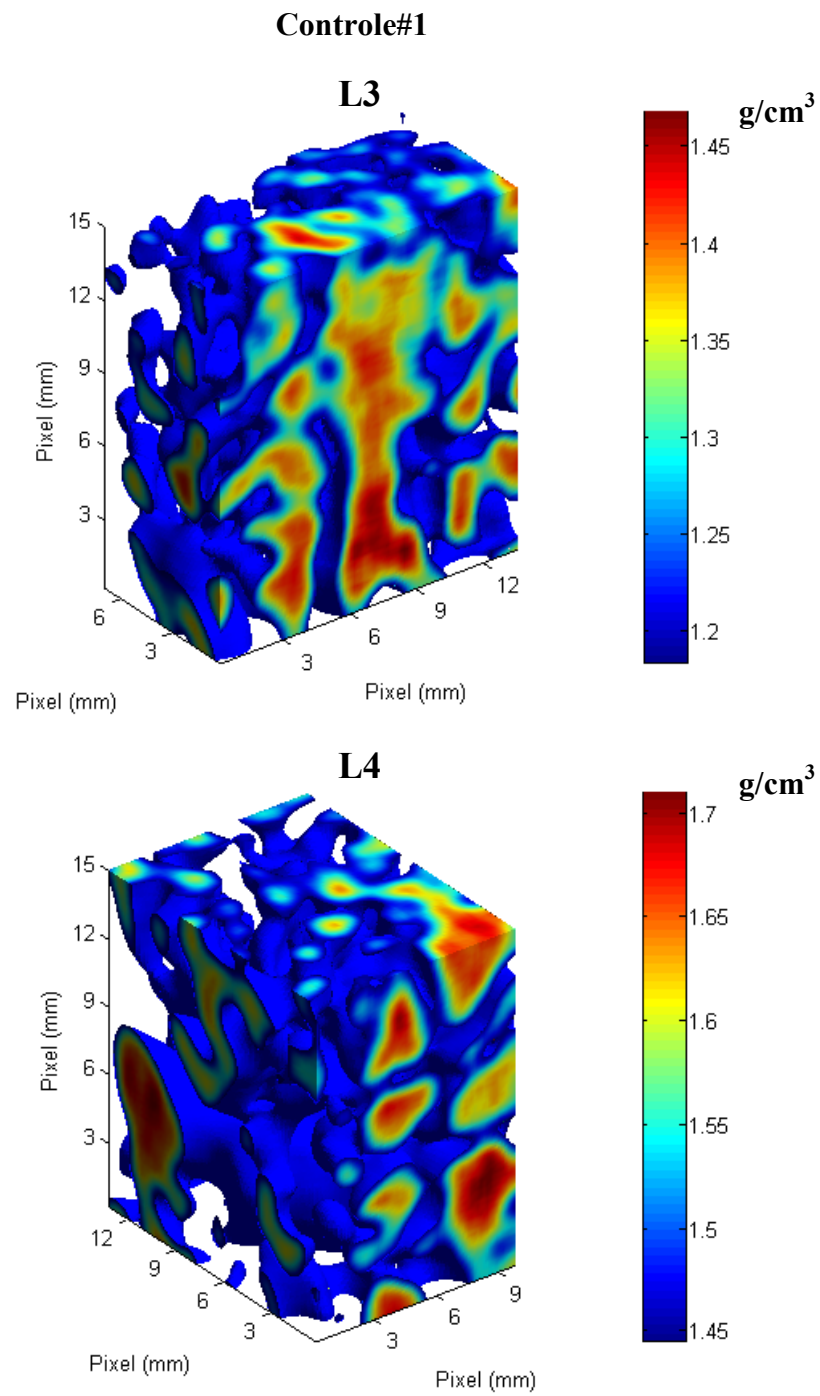
- [120] RINDBY, A., “Progress in X-ray microbeam spectroscopy”, *X-ray Spectrometry*, v. 22, issue 4, pp. 187-191, 1993.
- [121] CRAIEVICH, A. F., RODRIGUES, A. R., “The Brazilian synchrotron light source”, *Hyperfine Interaction*, v. 113, pp. 465-475, 1998.
- [122] Disponível em: < [www.lnls.br](http://www.lnls.br) > (pesquisa realizada no dia 06/05/2008).
- [123] LOPES, R. T., RODRIGUES, J. L., DE ASSIS, J. T., “Evaluation of a Microtomography System with an X-ray Microfocus Tube”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 48, n. 10-12, pp. 1437-1442, 1997.
- [124] Disponível em: <<http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/cover.html>> (Pesquisa realizada no dia 06/05/2008).
- [125] Software MATLAB - The Language Of Technical Computing. 2007a.
- [126] SCHWEIZER, S., HATTENDORF, B., SCHNEIDER, P., et al., “Preparation and Characterization of Calibration Standards for Bone Density Determination by Micro-Computed Tomography”, *Analyst*, v. 132, pp. 1040-1045, 2007.
- [127] KOLLER, B., LAIB, A., “Calibration of Micro-CT data for Quantifying Bone Mineral and Biomaterial Density and Microarchitecture”,
- [128] SANTOS, S. R. S, ROSSI, A. M., ANDRADE, L. R., et al., “In vitro Evaluation of Porous Biphasic Scaffolds”, *Engineering Materials*, v. 330-332, pp. 935-937, 2007.
- [129] SANTOS, S. R. S, ROSSI, A. M., PRADO DA SILVA, M. H., “Hydroxyapatite Precursor Phases Identification by X-ray Diffraction Using Synchrotron Radiation”, *Engineering Materials*, v. 330-332, pp. 115-118, 2007.

- [130] FLORES, W. G. *Desarrollo de una Metodología Computacional para la Clasificación de Lesiones de Mama en Imágenes Ultrasonicas*. Tese de D.Sc., Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Ingeniería Eléctrica Sección de Bioelectrónica, 2009.
- [131] CORRÊA, S. C. A. *Otimização da Dose e da Imagem Radiográfica Digital de Tórax Usando Modelagem Computacional*. Tese de DSc. COPPE/UFRJ, 2009.
- [132] LEAL, A. L. R. C., PANTALEÃO, T. U., MOREIRA, D.G., et al., “Hypothyroidism and hyperthyroidism modulates ras MAPK intracellular pathway in rat thyroids”, *Endocrine Journal (Basingstoke)*, v.31, pp. 174-178, 2008.
- [133] LEWIN, S, GOUVEIA, C. H. DE A, MARONE, M. M. S, et al., “Densidade mineral óssea vertebral e femoral de 724 mulheres brancas brasileiras: influência da idade e do peso corporal”, *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43(2), pp. 127-36, 1992.
- [134] E. HEFTI, U. TRECHSEL, H. RÜFENACHT, “Use of dermestid beetles for cleaning bones” *Calcified Tissue International*, ., 31, pp.45-47, (1980).
- [135] FEITOSA D. S., BEZERRA, B., AMBROSANO, G. M., et al., “Thyroid Hormones May Influence Cortical Bone Healing Around Titanium Implants: A Histometric Study in Rats”, *Journal of Periodontology*, v. 79, n. 5, pp. 881-887, 2008 (doi:10.1902/jop.2008.070466).
- [136] LITTLE J. W. “Thyroid disorders. Part I: hyperthyroidism”, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. V. 101, pp. 276-84, 2006.
- [137] BERNASCONI, G.A. “Axil: Analysis of x-ray spectra by iterative least squares fitting”. *IAEA Laboratories Seibesdof*, Austin, 1995.

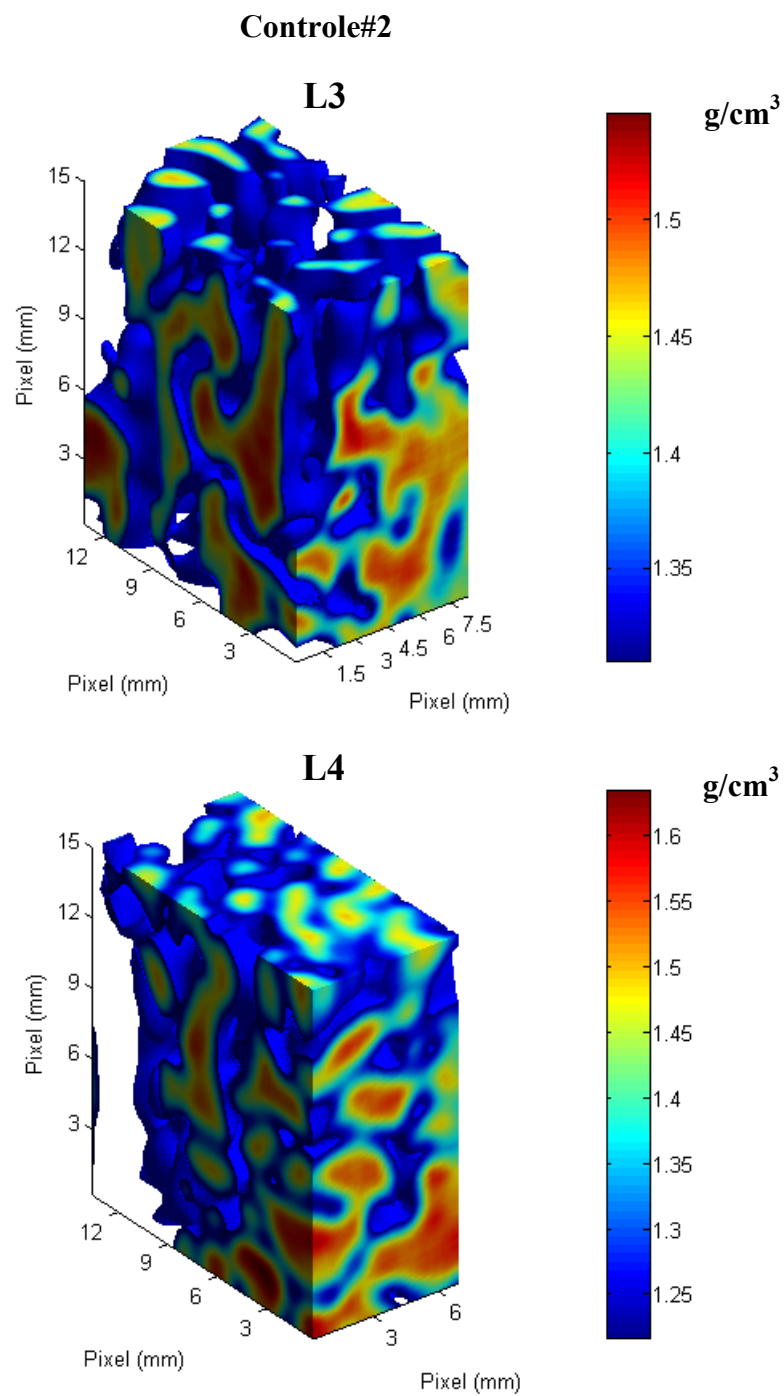
[138] ILICH, J. Z., KERSTETTER, J. E., “Nutrition in Bone Health Revisited: A Story Beyond Calcium” *Journal of the American College of Nutrition*, v. 19, n. 6, pp. 715–737, 2000.

[139] FOGELMAN, I., BLAKE, G. M., “Strontium ranelate for the treatment of osteoporosis” *BMJ*, v. 330, pp. 1400-1401, 2005.

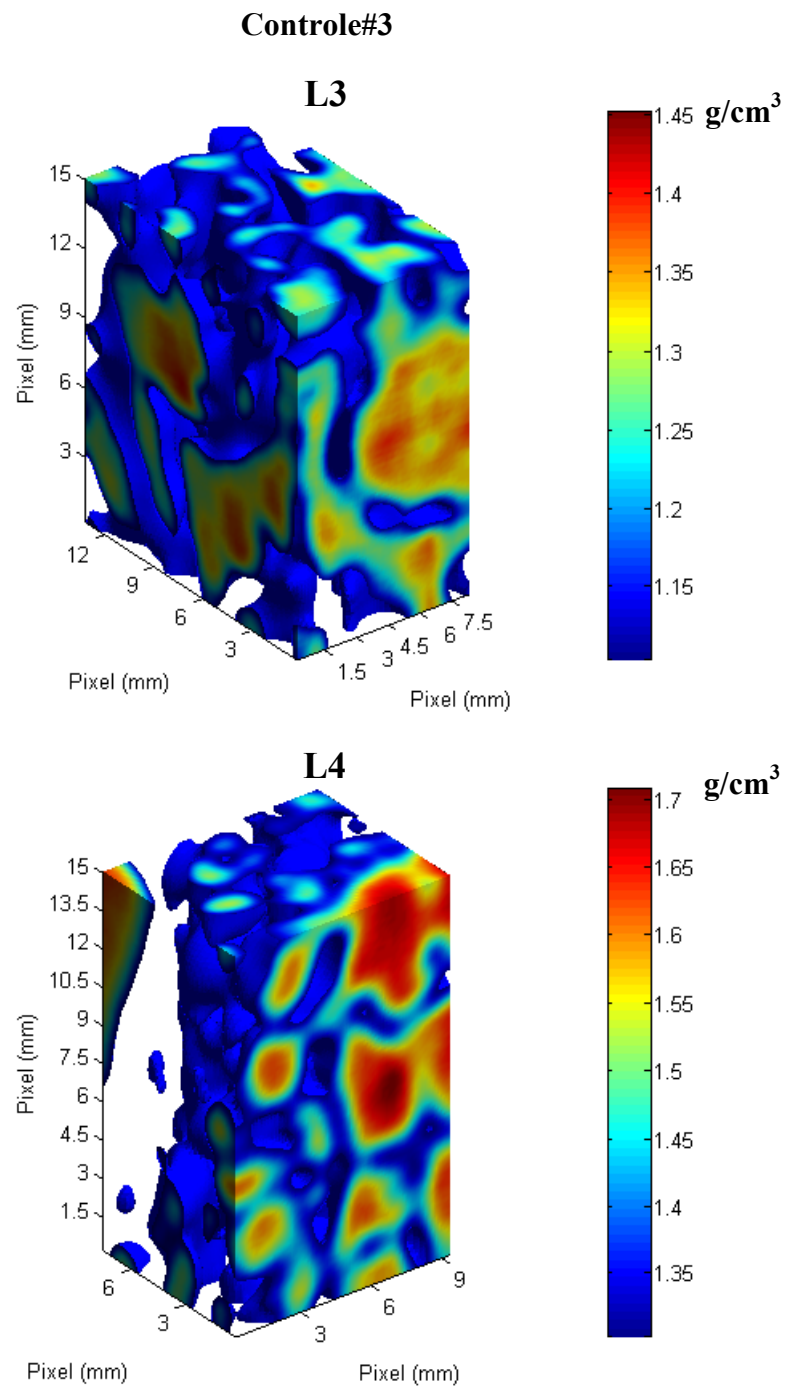
**ANEXO A**  
**IMAGENS 3D DAS ROIS MICROTOMOGRÁFICAS EM**  
**DENSIDADE**



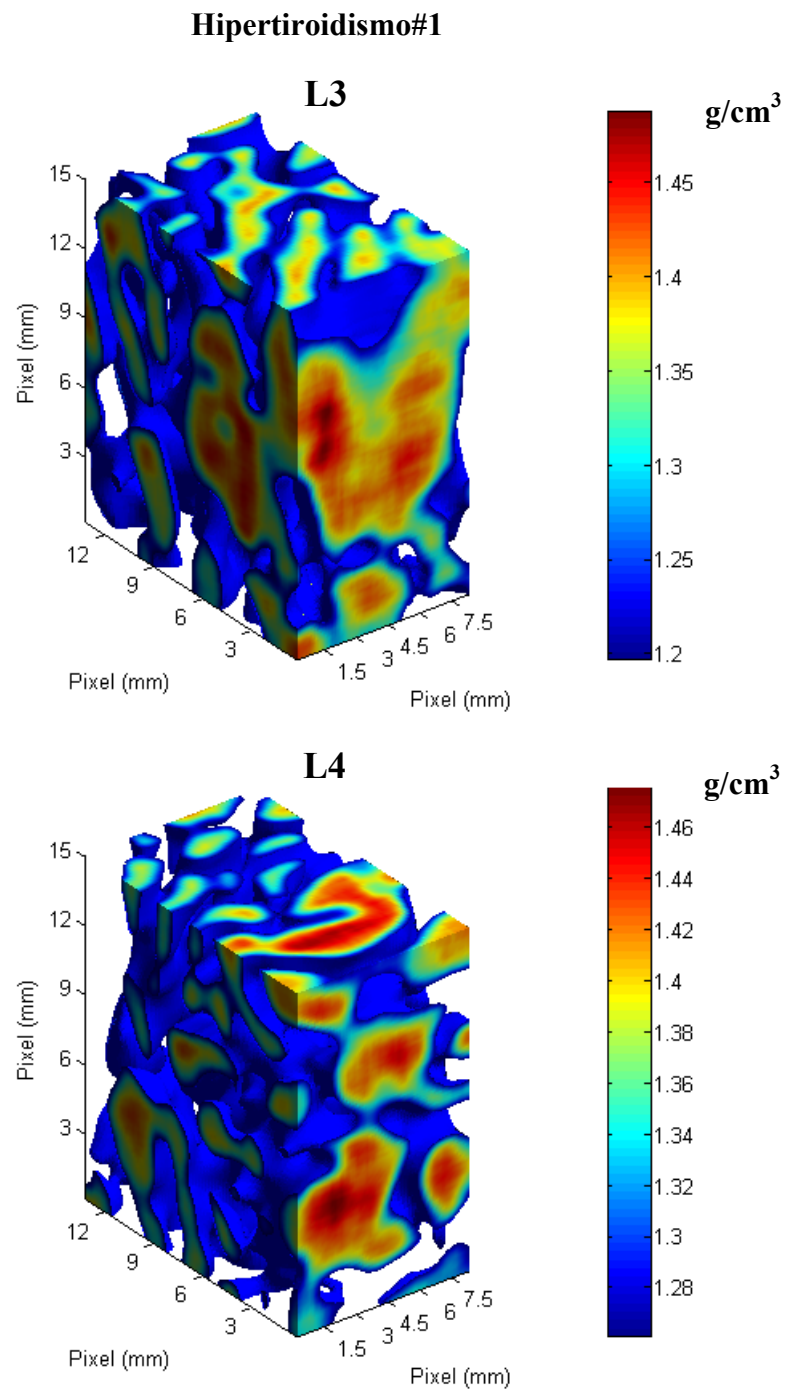
**Figura A.1:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo controle (amostra #1).



**Figura A.2:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo controle (amostra #2).

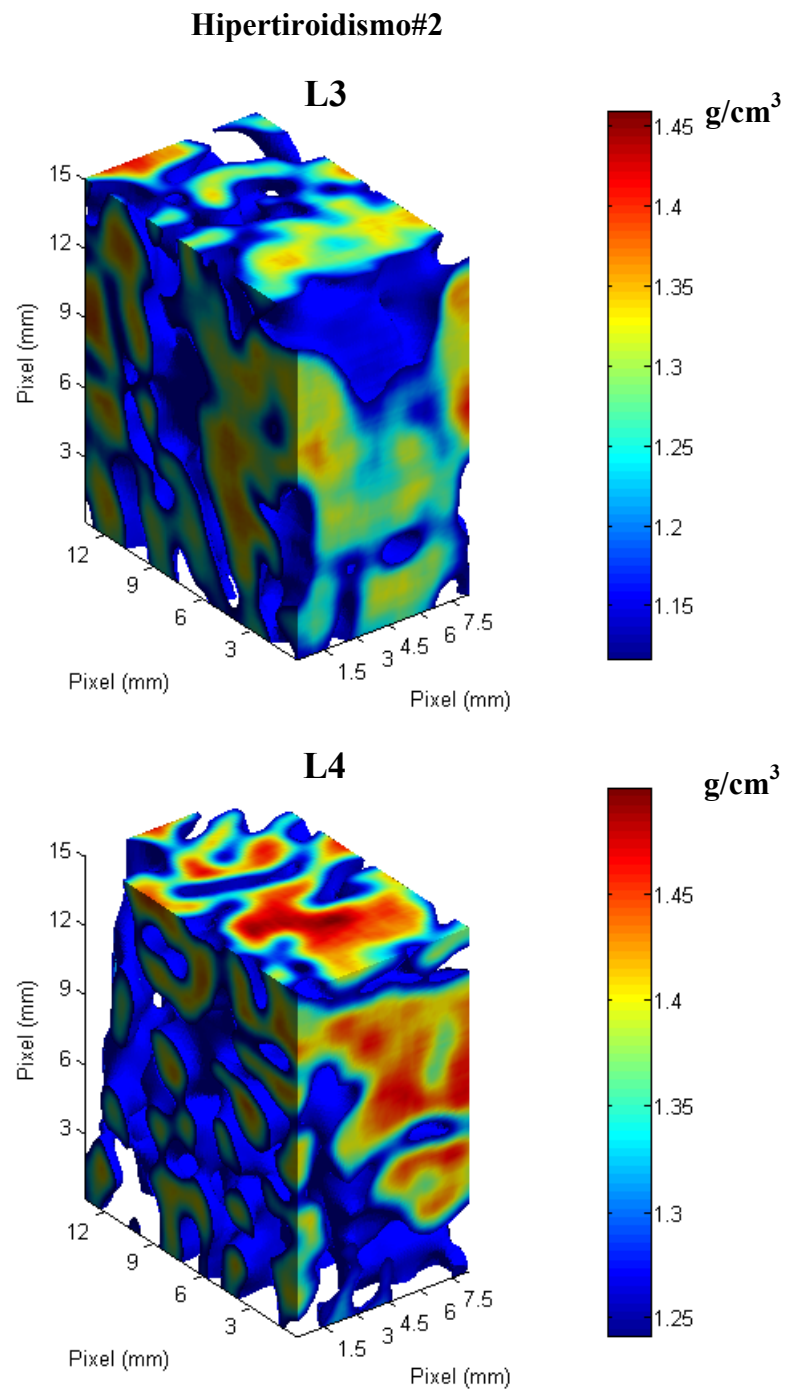


**Figura A.3:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo controle (amostra #3).

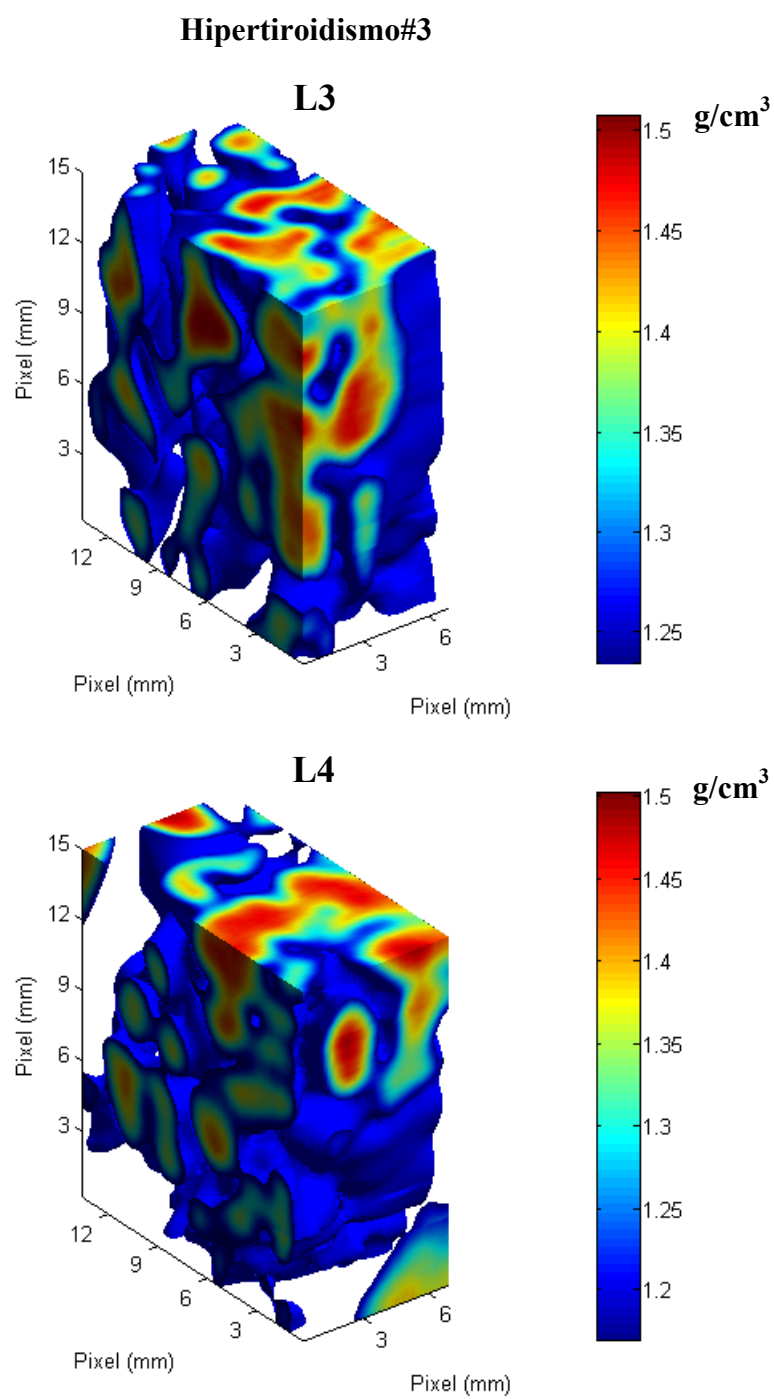


**Figura A.4:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo hipertiroidismo (amostra #1).

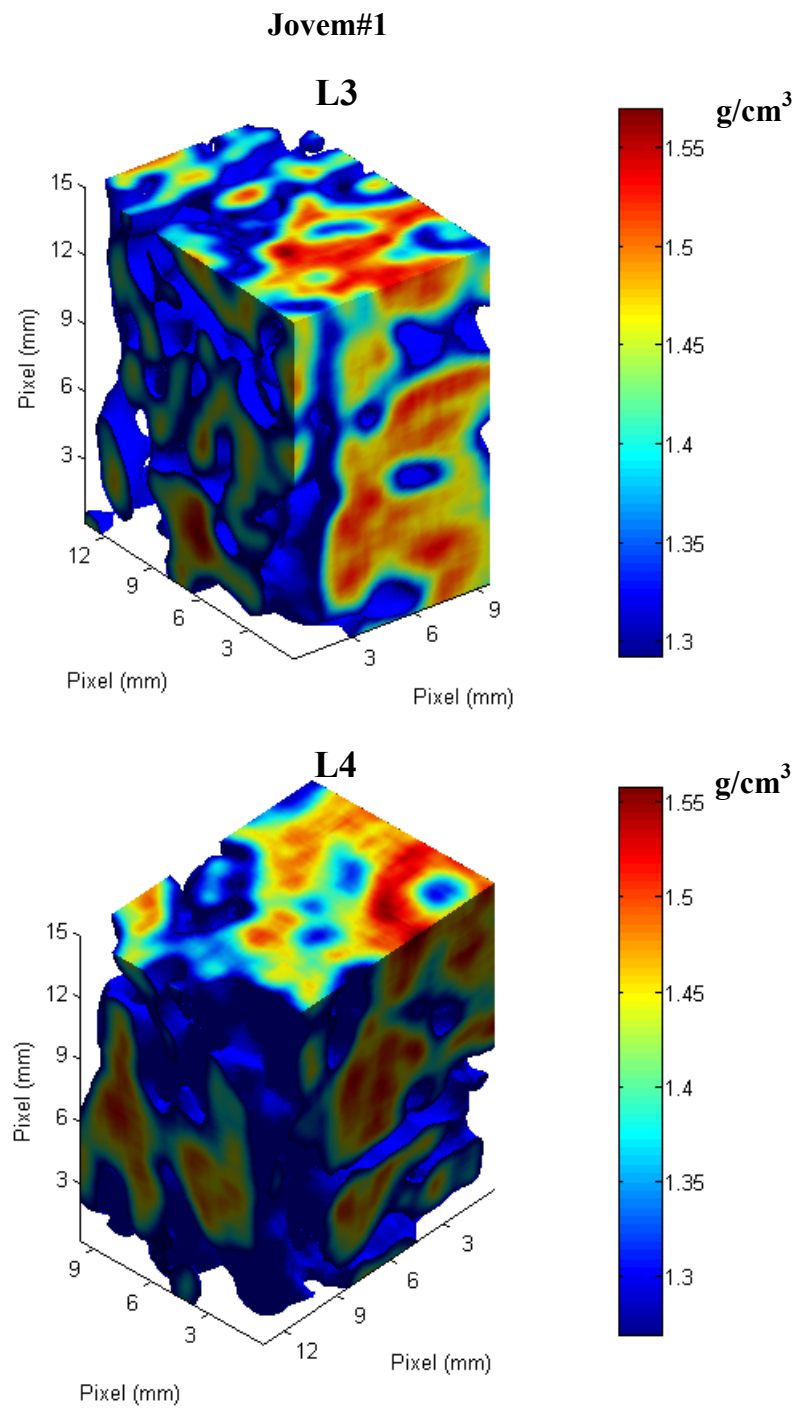




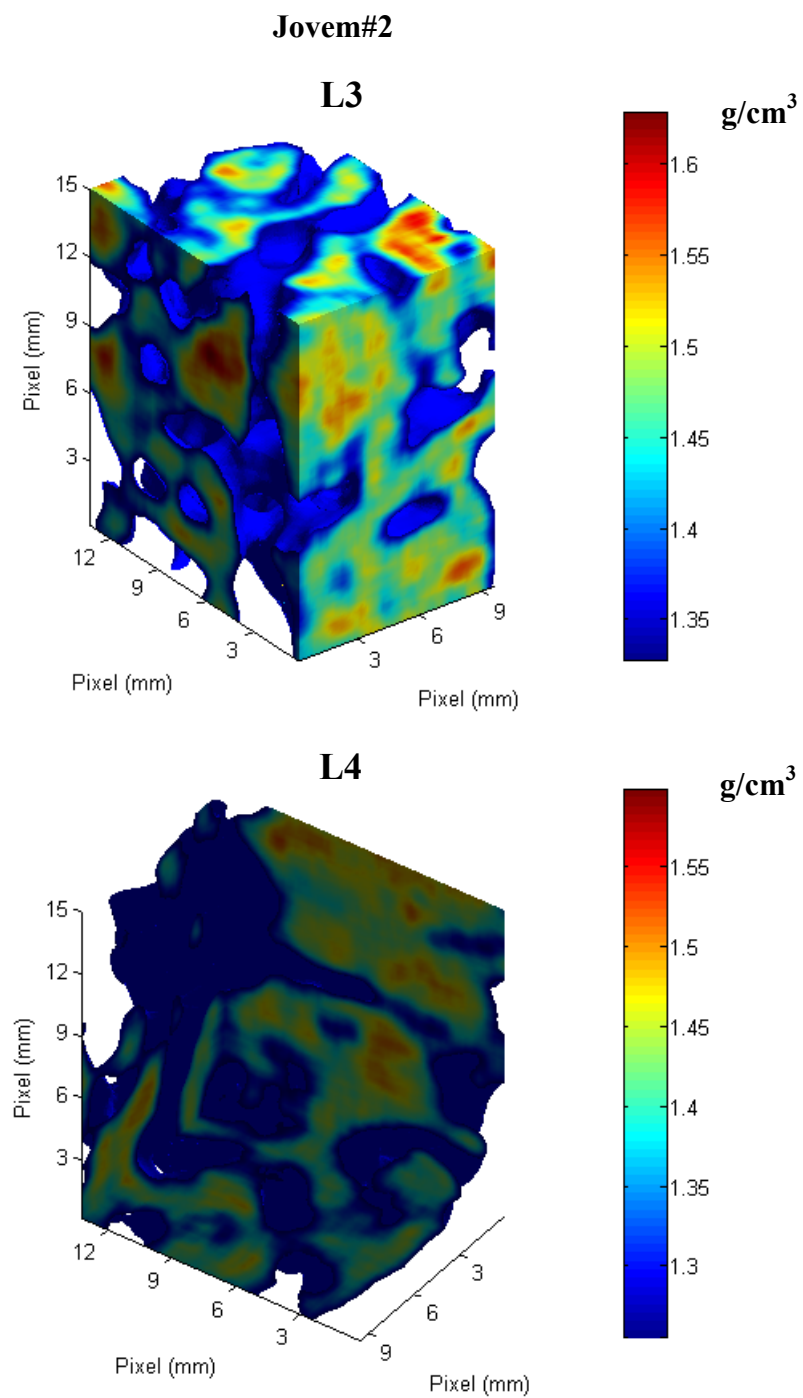
**Figura A.5:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo hipertiroidismo (amostra #2).



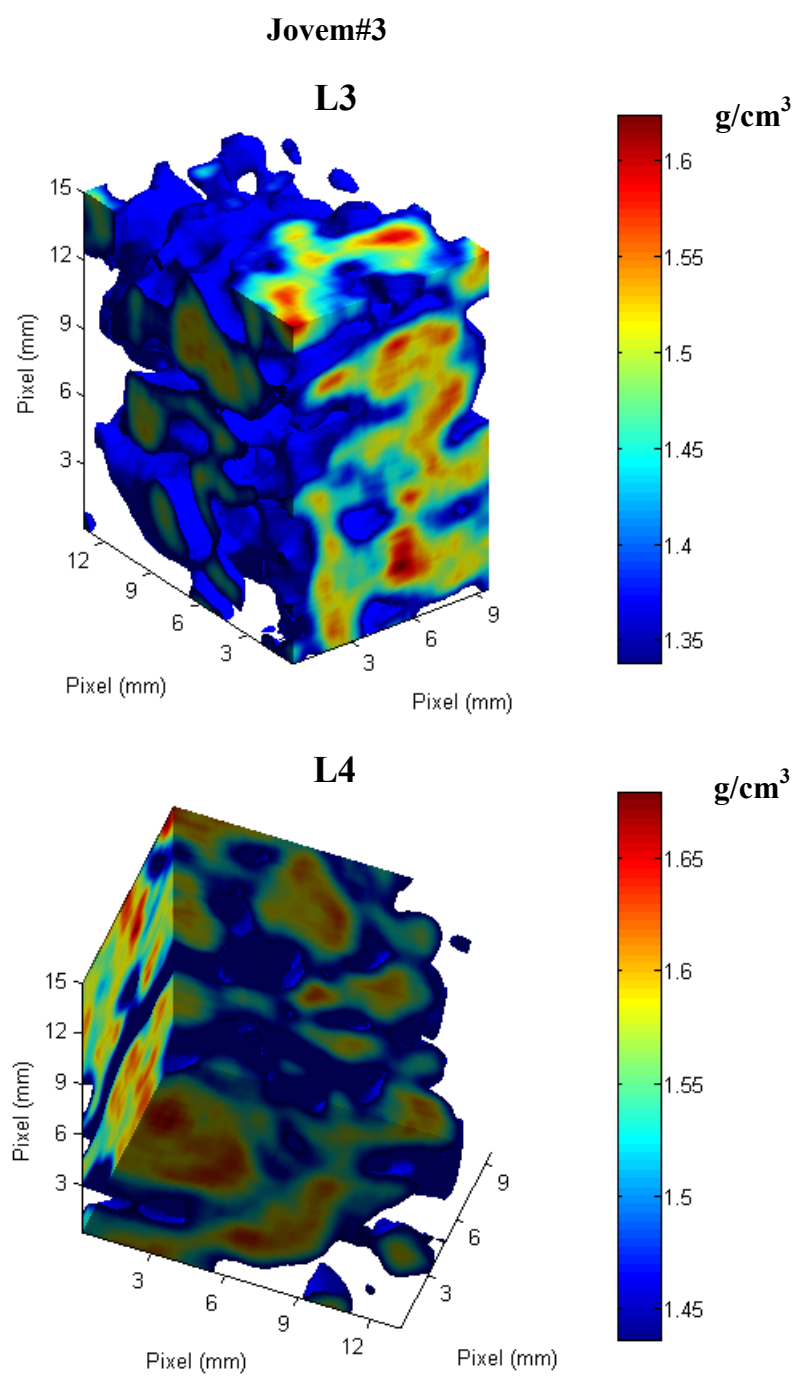
**Figura A.6:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo hipertiroidismo (amostra #3).



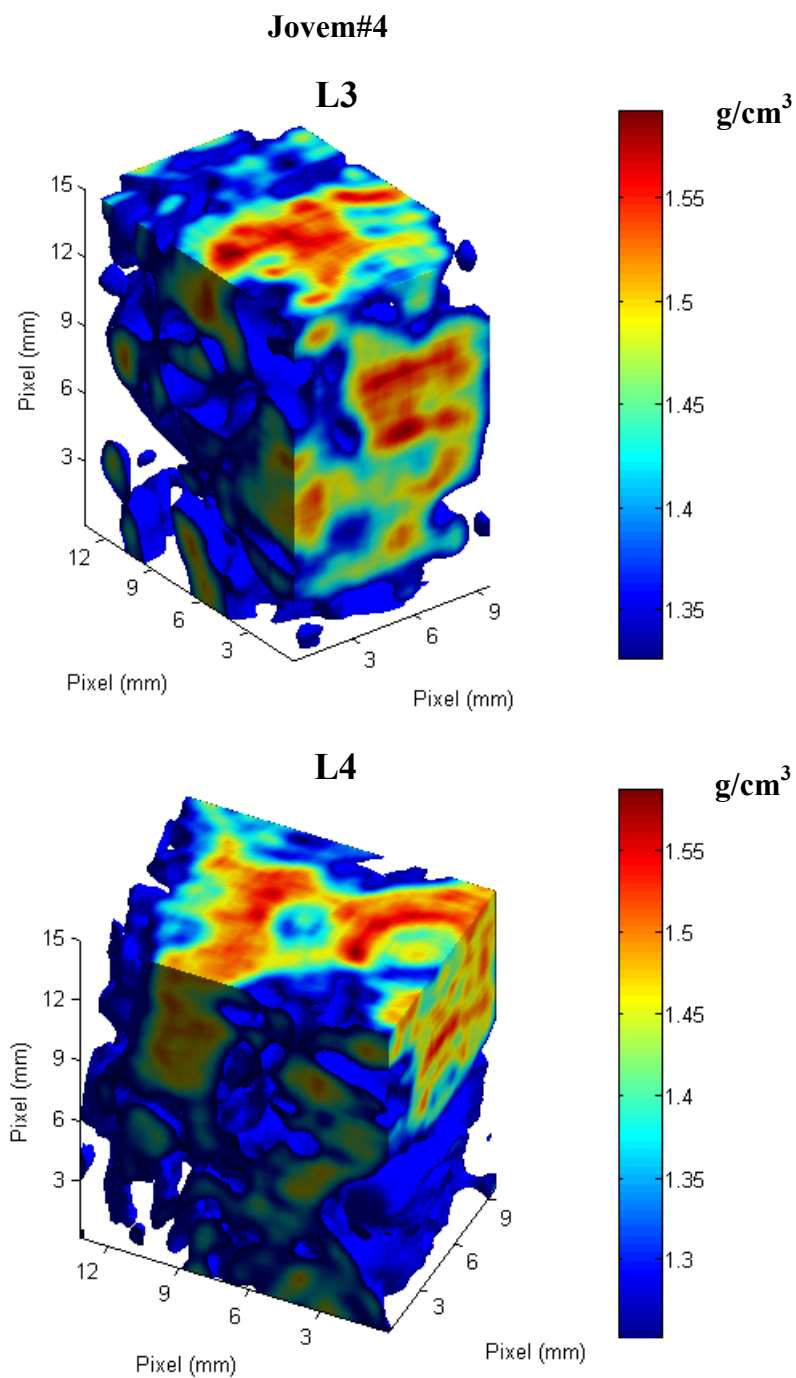
**Figura A.7:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo jovem (amostra #1).



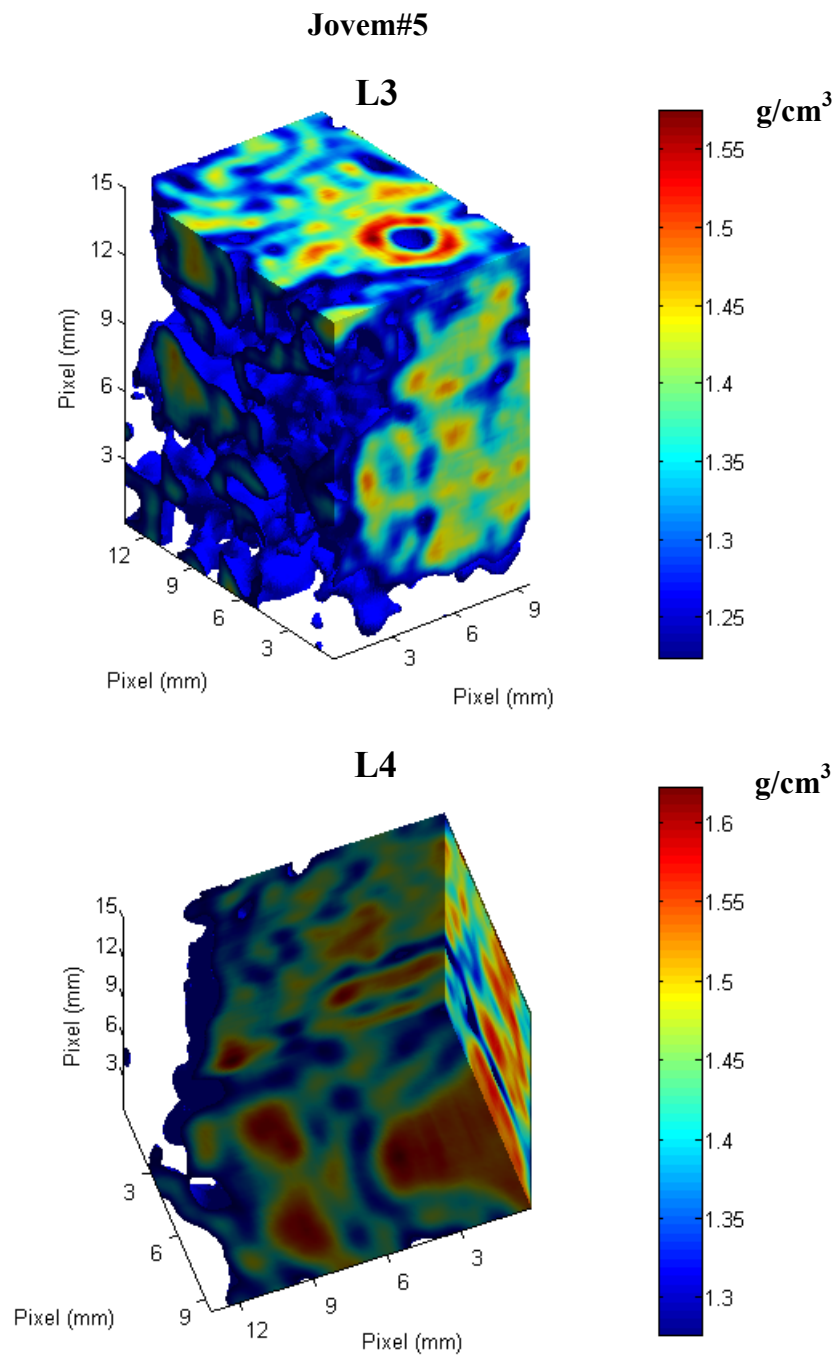
**Figura A.8:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo jovem (amostra #2).



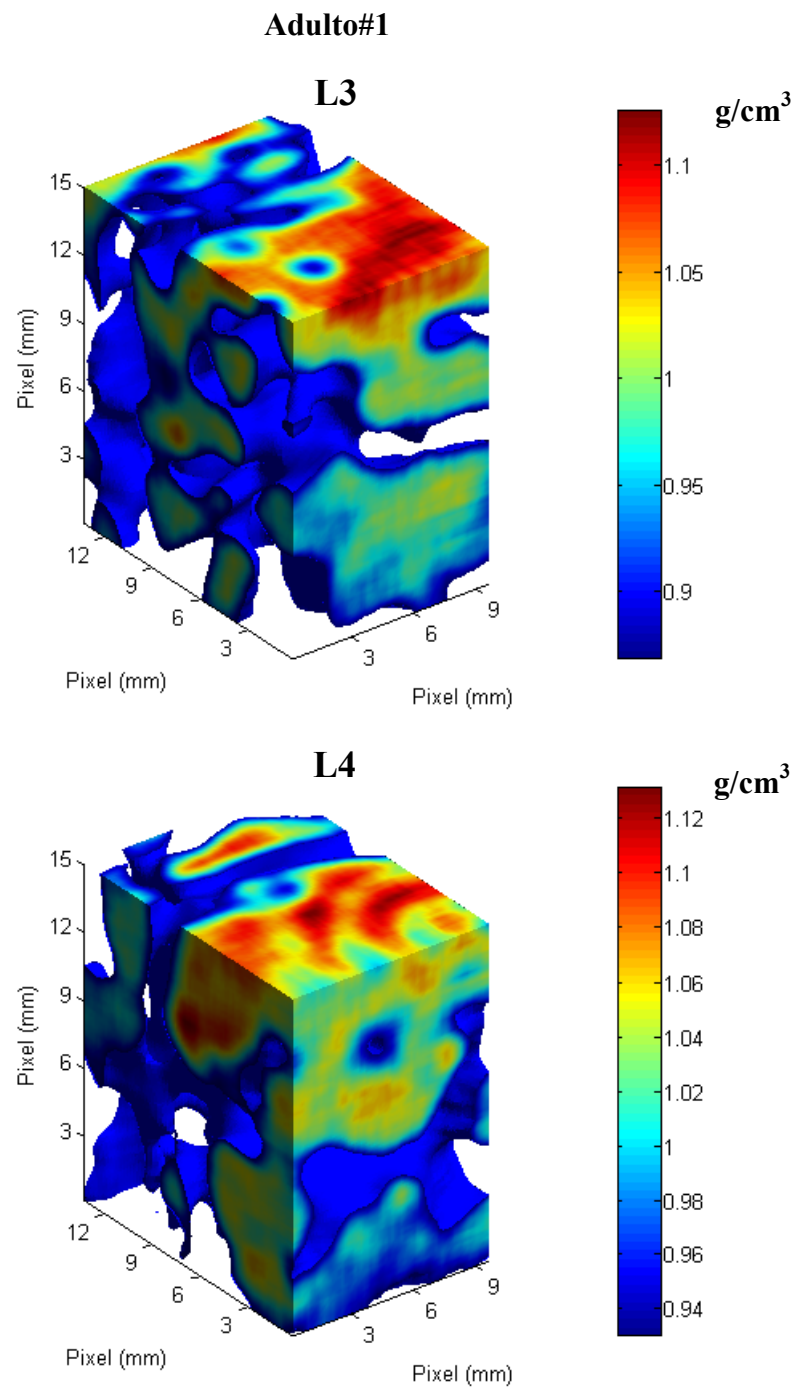
**Figura A.9:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo jovem (amostra #3).



**Figura A.10:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo jovem (amostra #4).

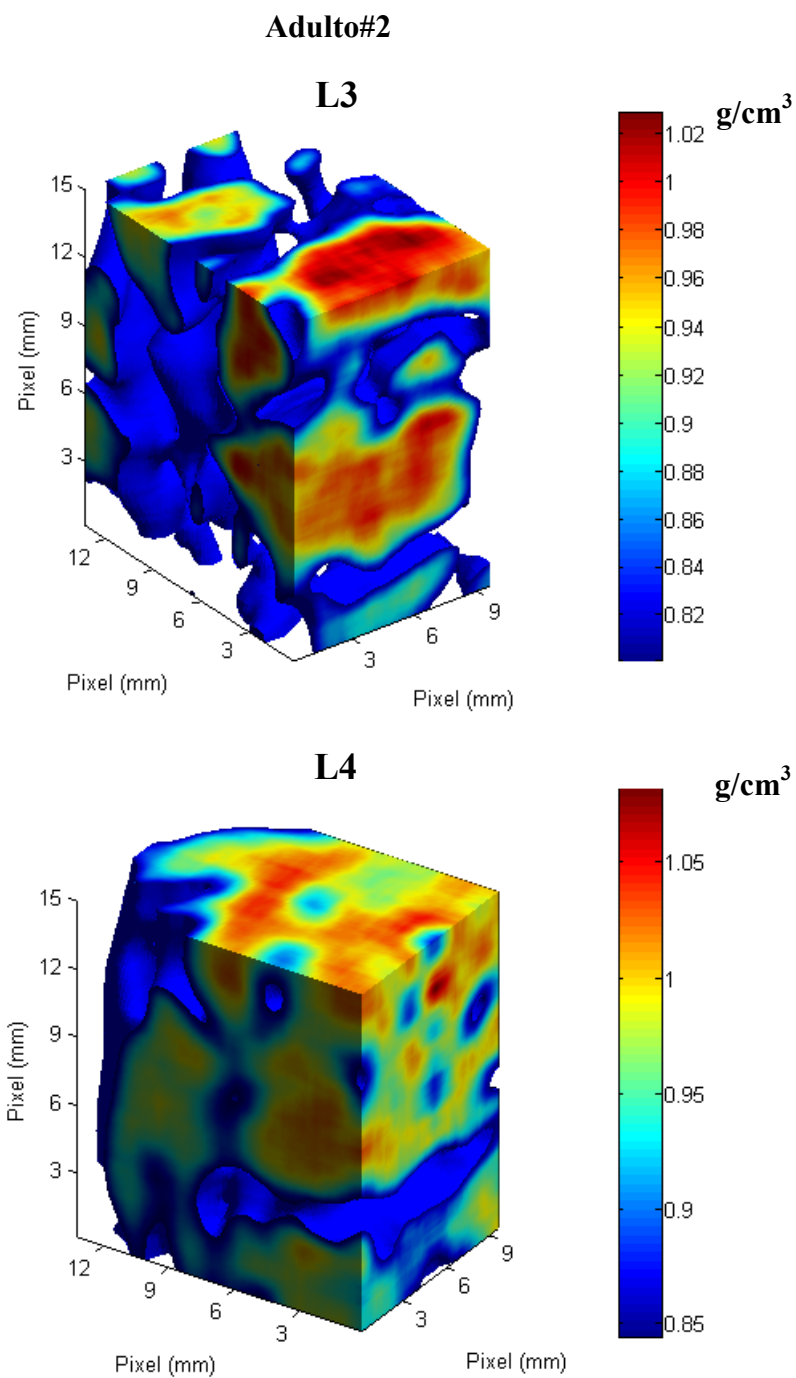


**Figura A.11:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo jovem (amostra #5).

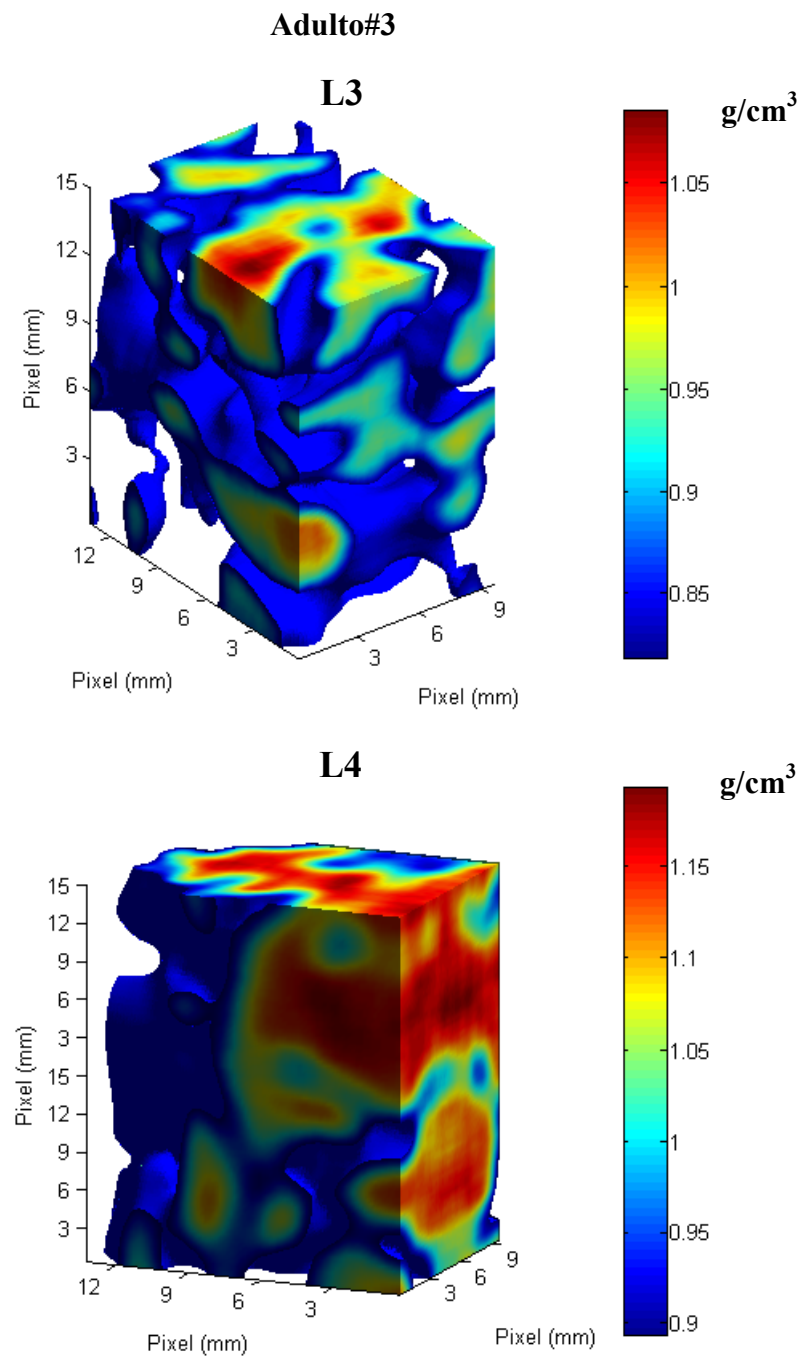


**Figura A.12:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo adulto (amostra #1).

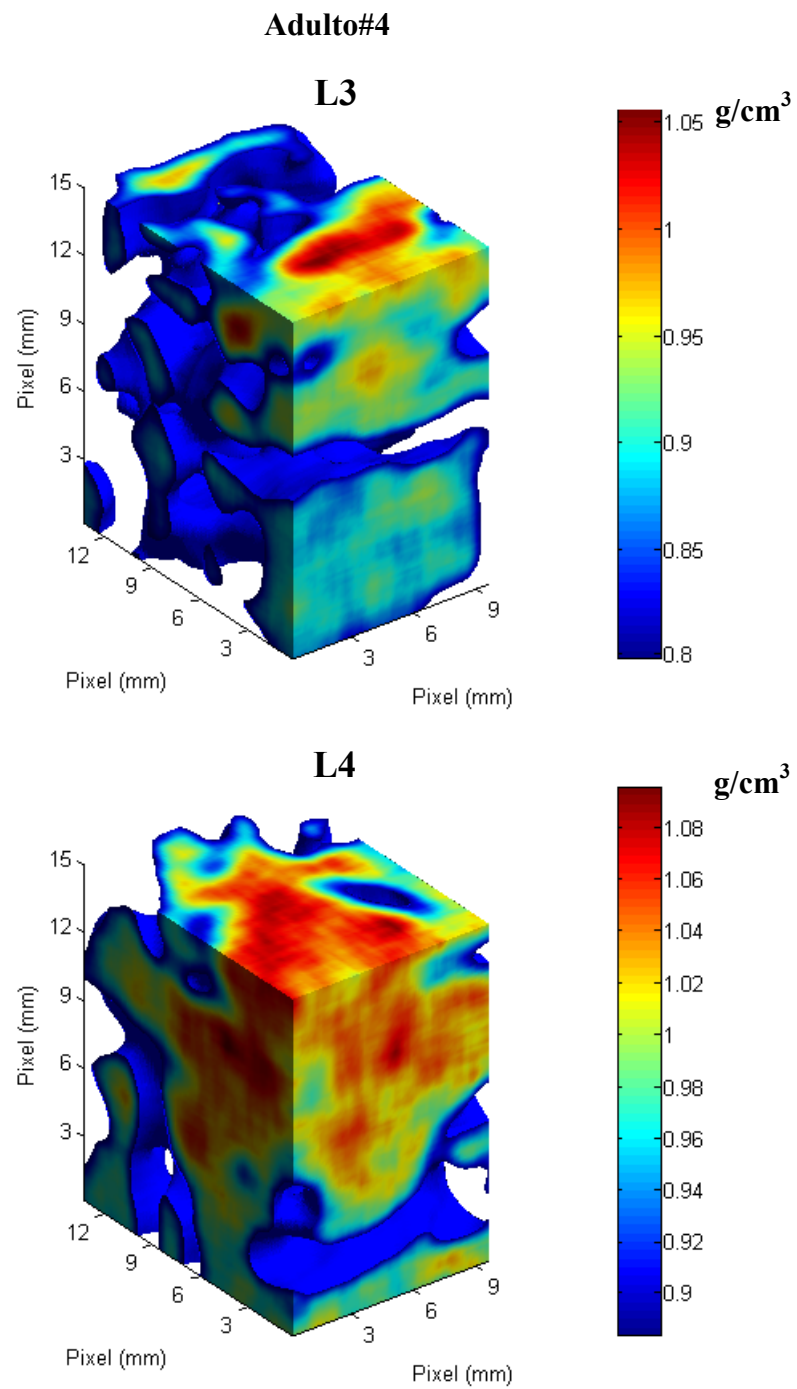




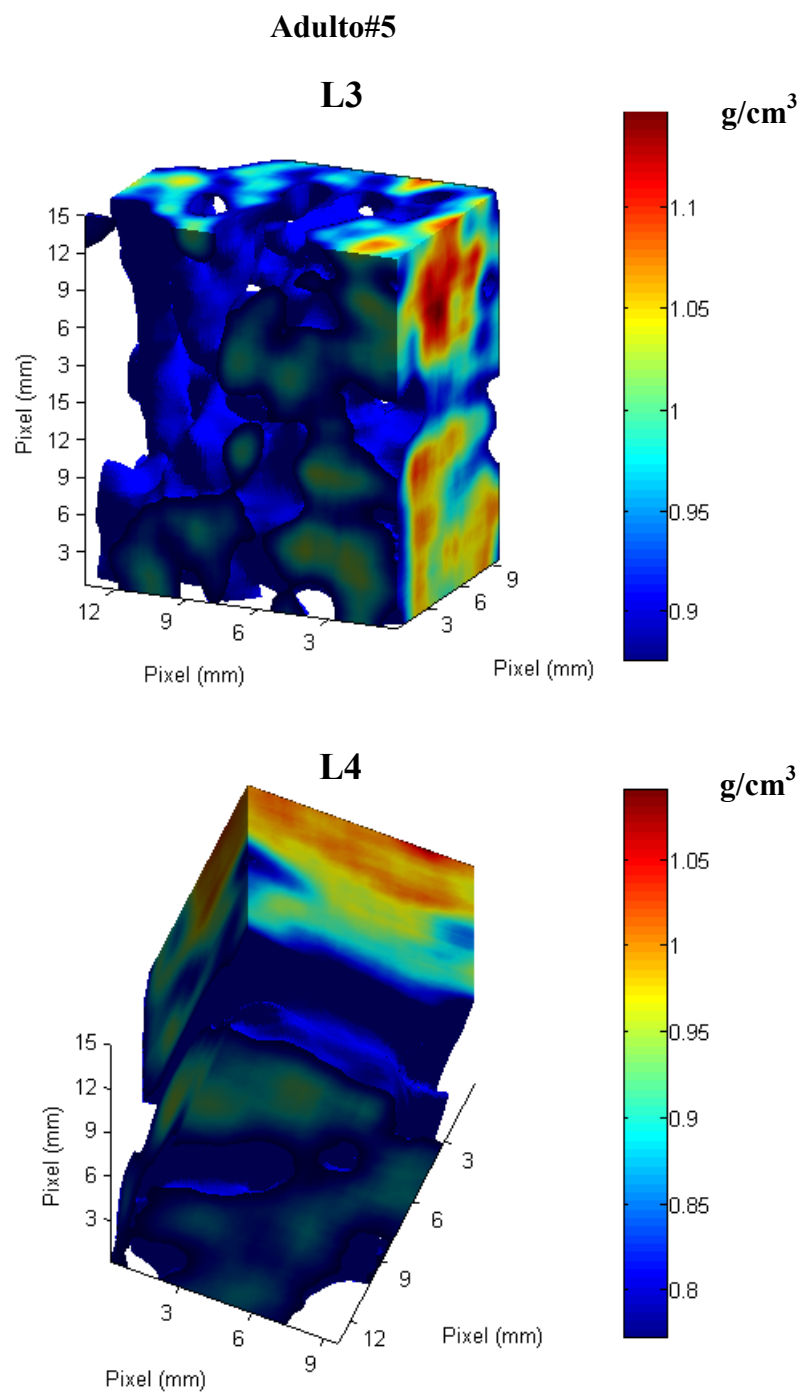
**Figura A.13:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo adulto (amostra #2).



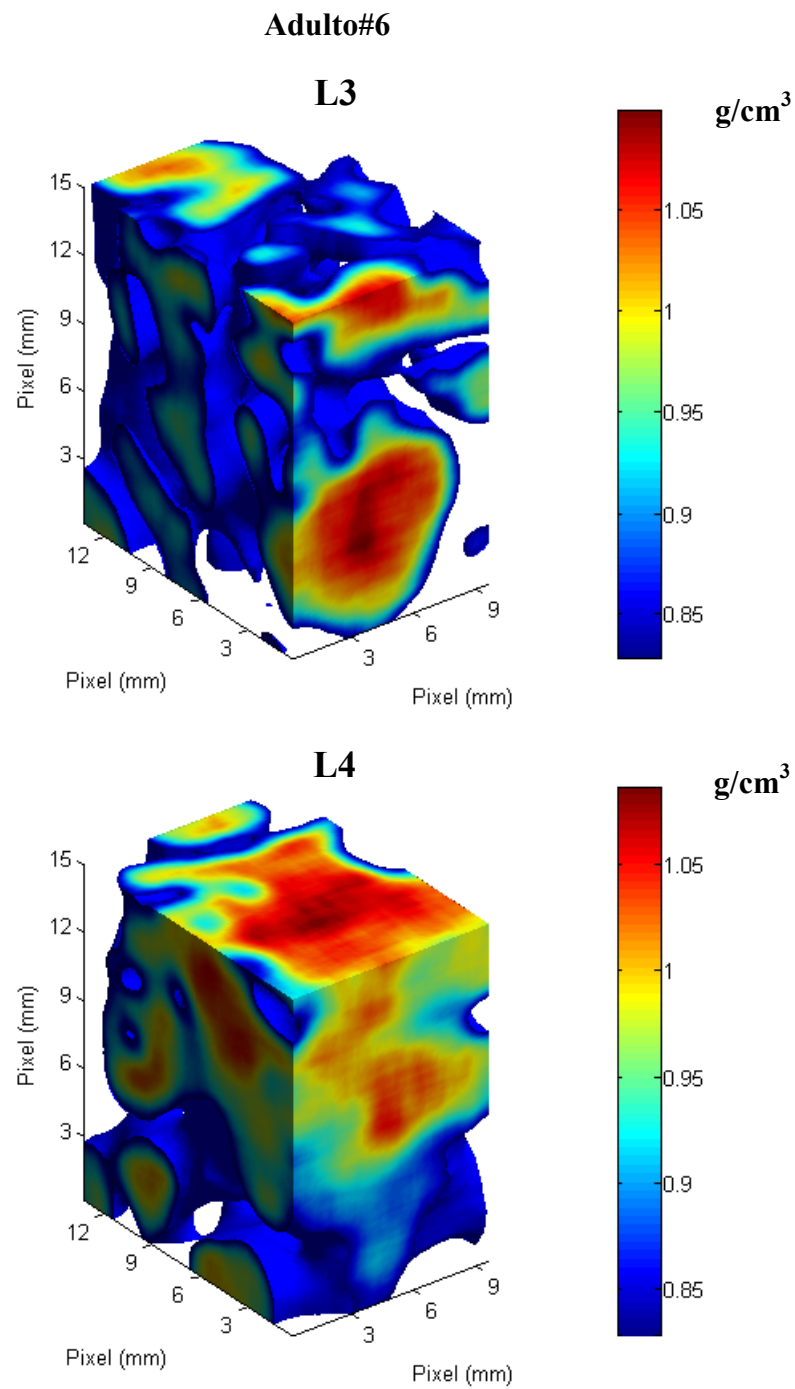
**Figura A.14:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo adulto (amostra #3).



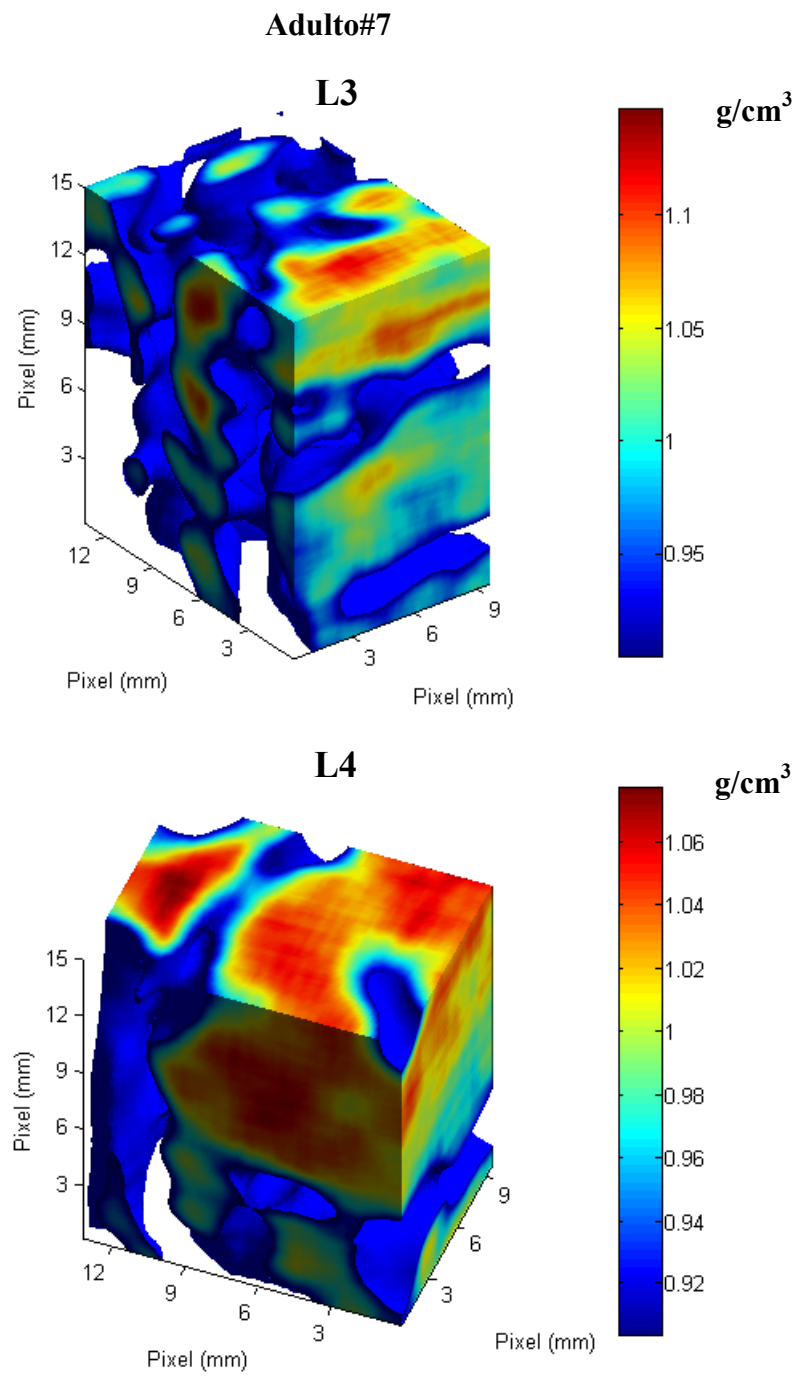
**Figura A.15:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo adulto (amostra #4).



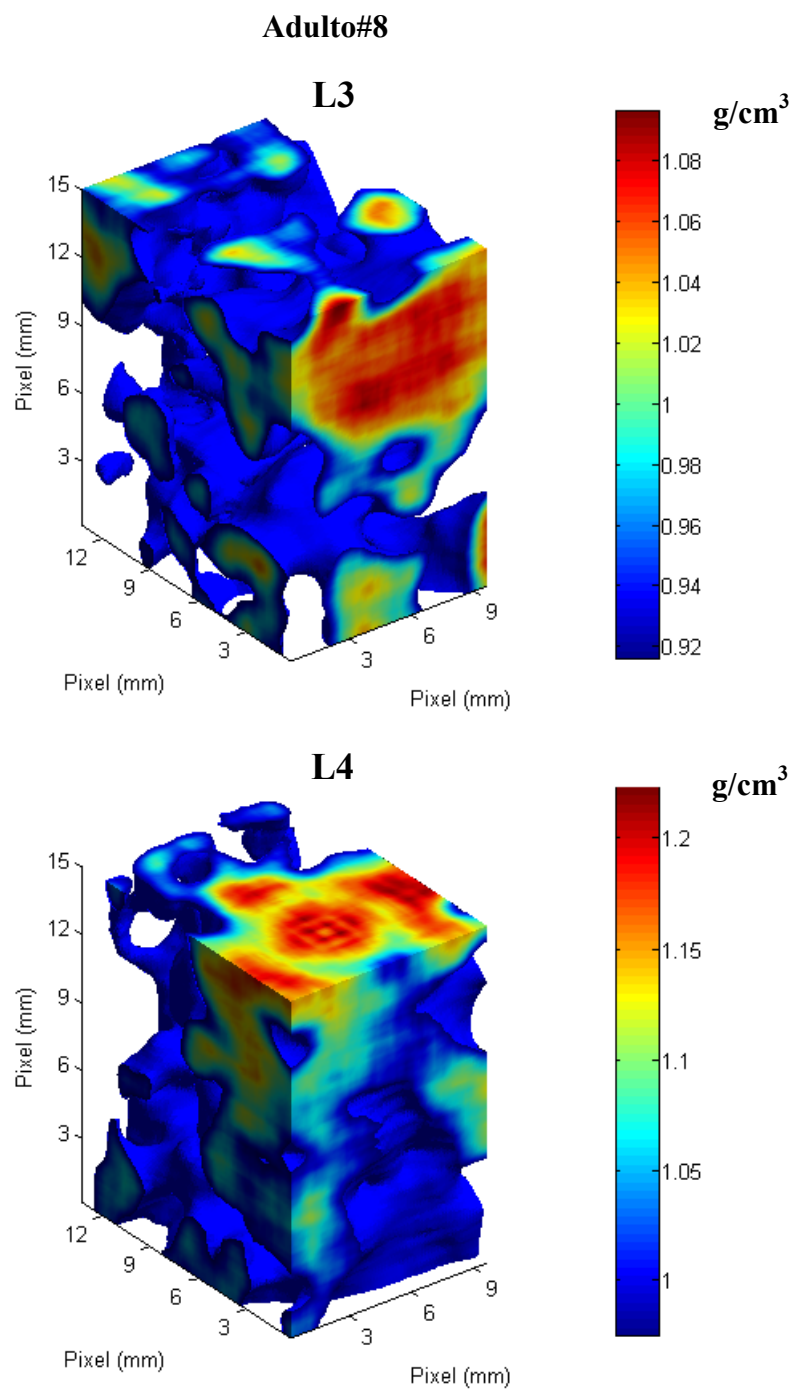
**Figura A.16:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo adulto (amostra #5).



**Figura A.17:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo adulto (amostra #6).



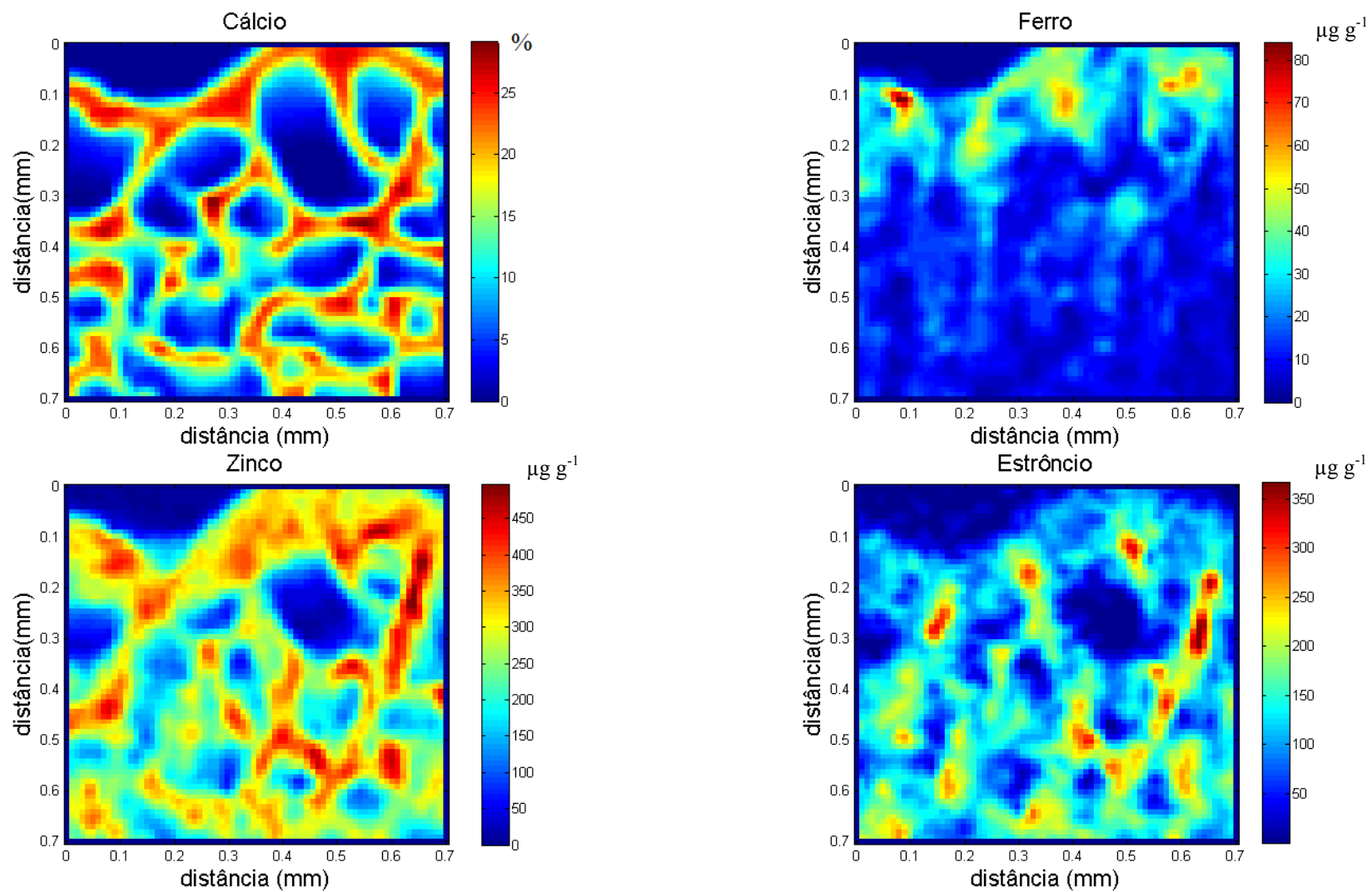
**Figura A.18:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo adulto (amostra #7).



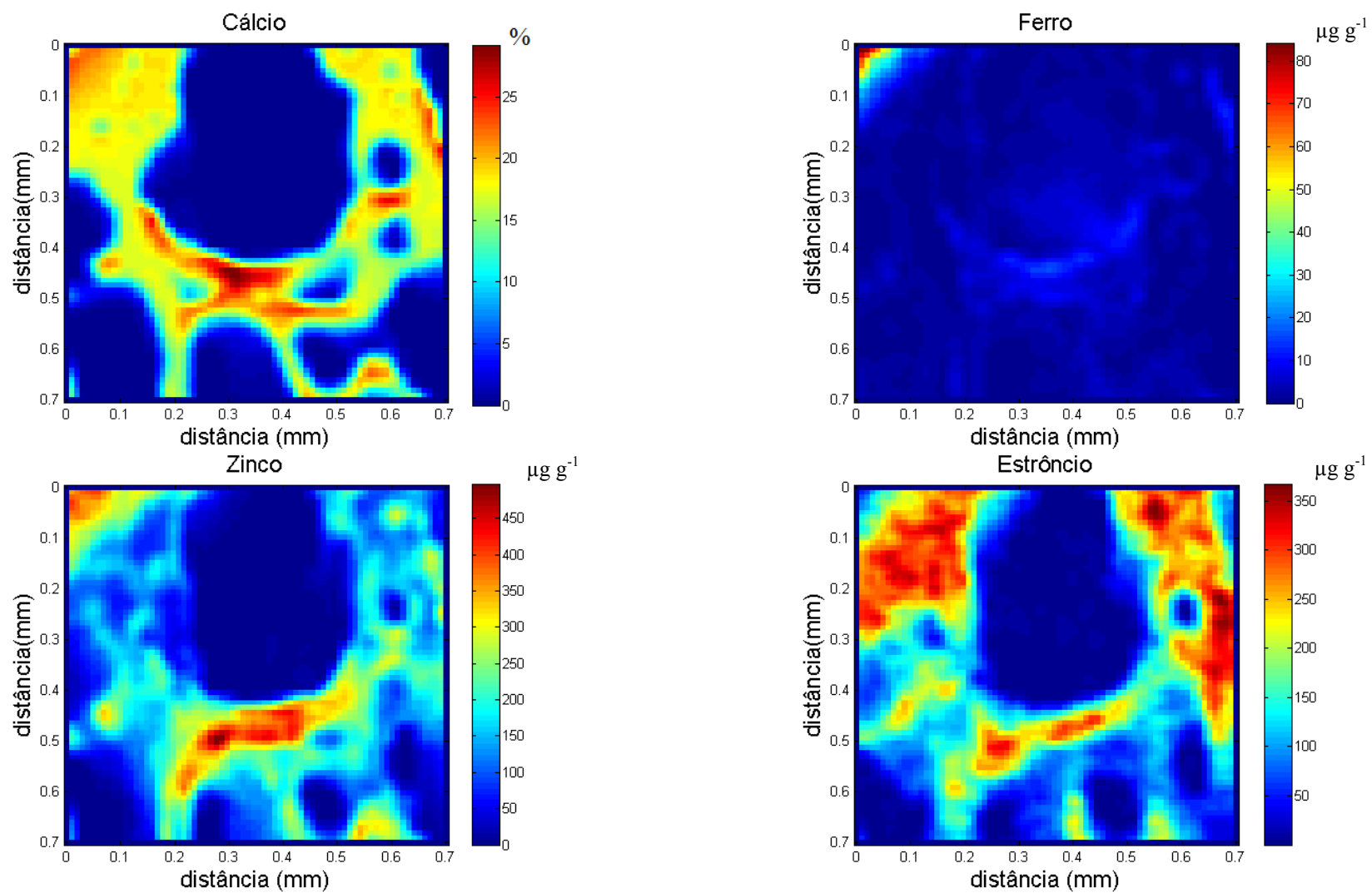
**Figura A.19:** Imagens 3D das ROIs microtomográficas em densidade ( $\text{g/cm}^3$ ) das L3 e L4 do grupo adulto (amostra #8).

**ANEXO B**  
**IMAGENS DO MAPEAMENTO BIDIMENSIONAIS DO CÁLCIO,  
FERRO, ZINCO E ESTRÔNCIO POR MICROFLUORESCÊNCIA  
DE RAIOS X**

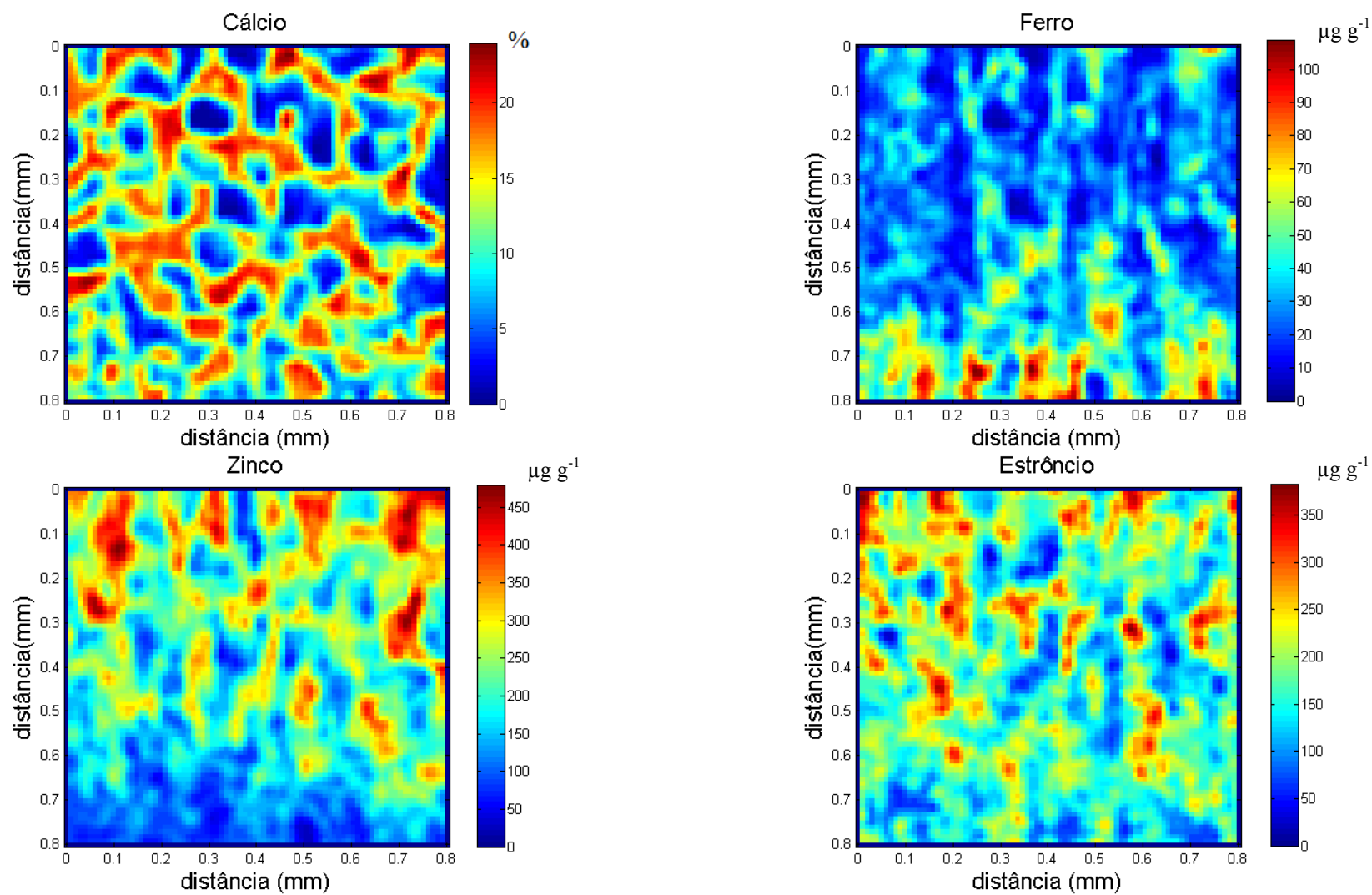




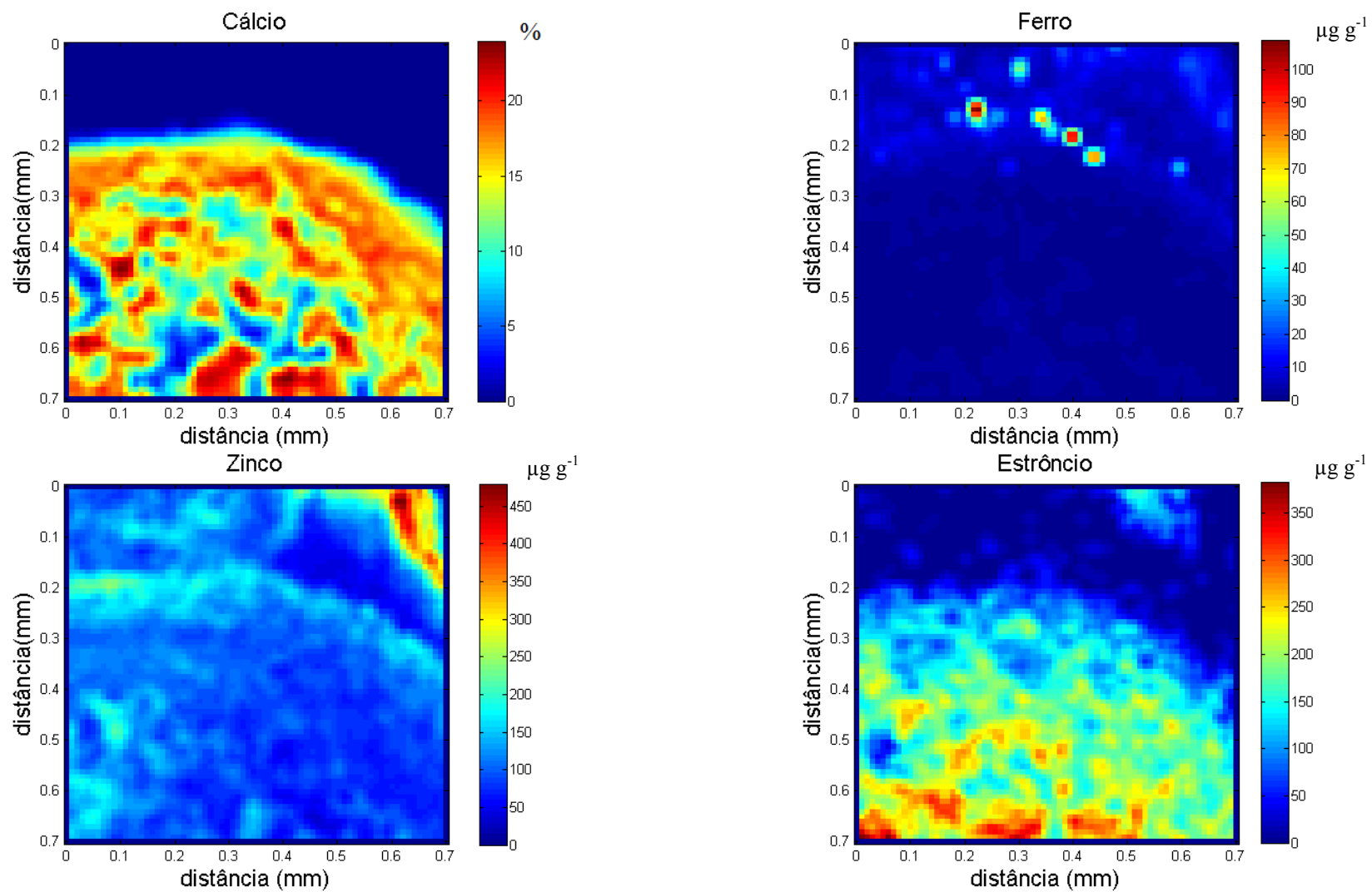
**Figura B.1:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo controle (amostra#1).



**Figura B.2:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo controle (amostra#2).



**Figura B.3:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo hipertireoidismo (amostra#1).



**Figura B.4:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo hipertireoidismo (amostra#2).

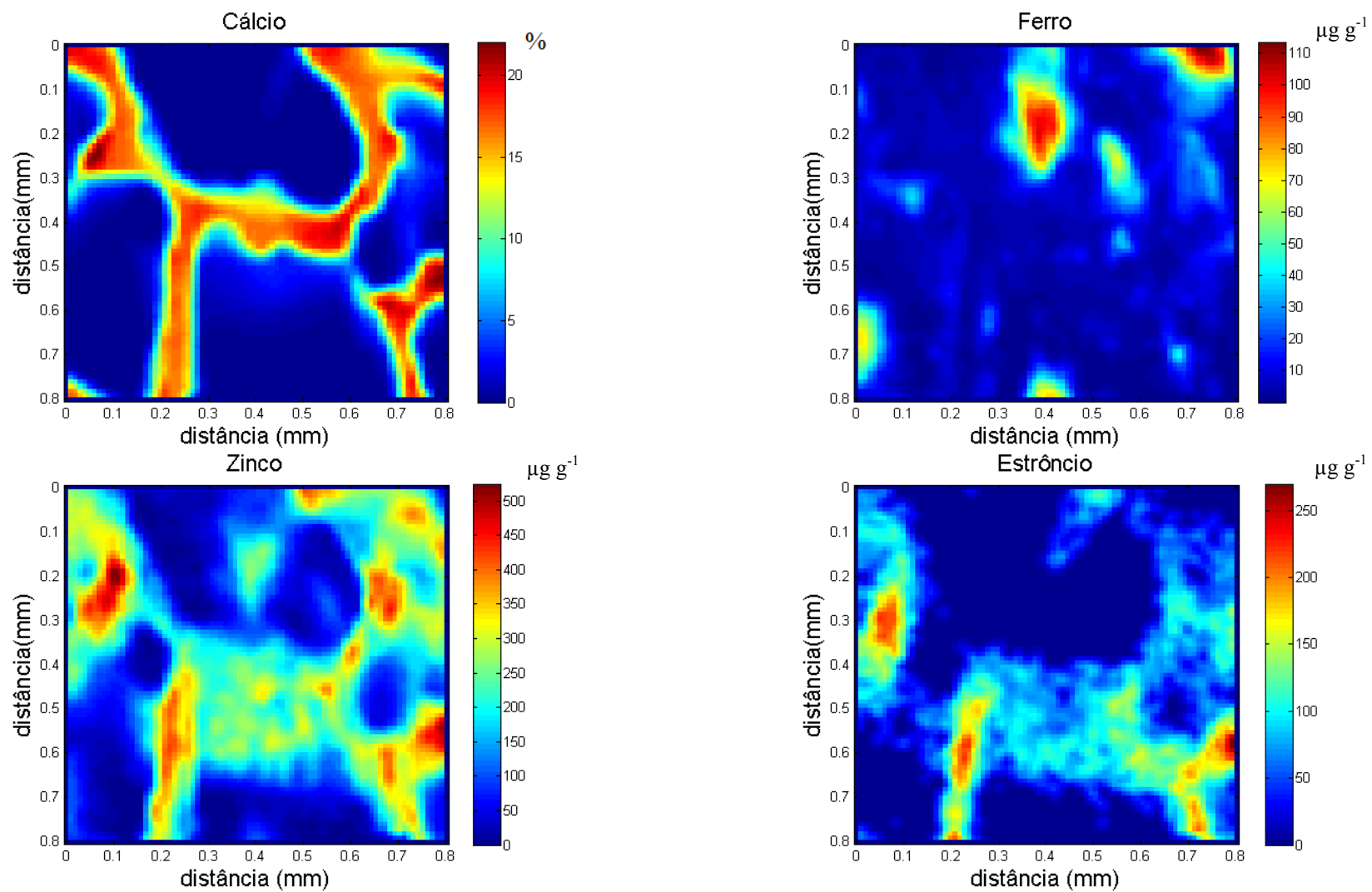


Figura B.5: Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo jovem (amostra#1).

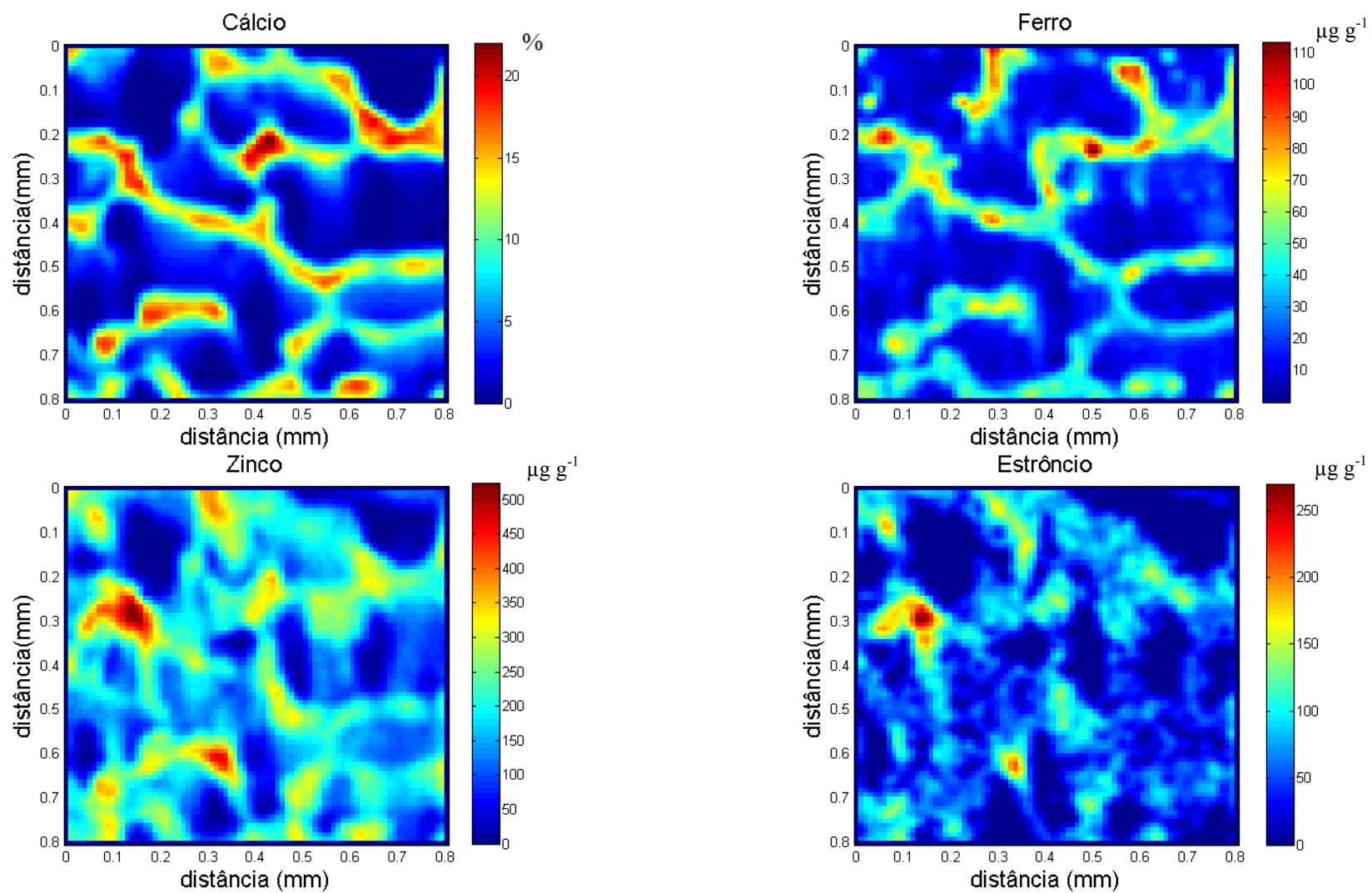
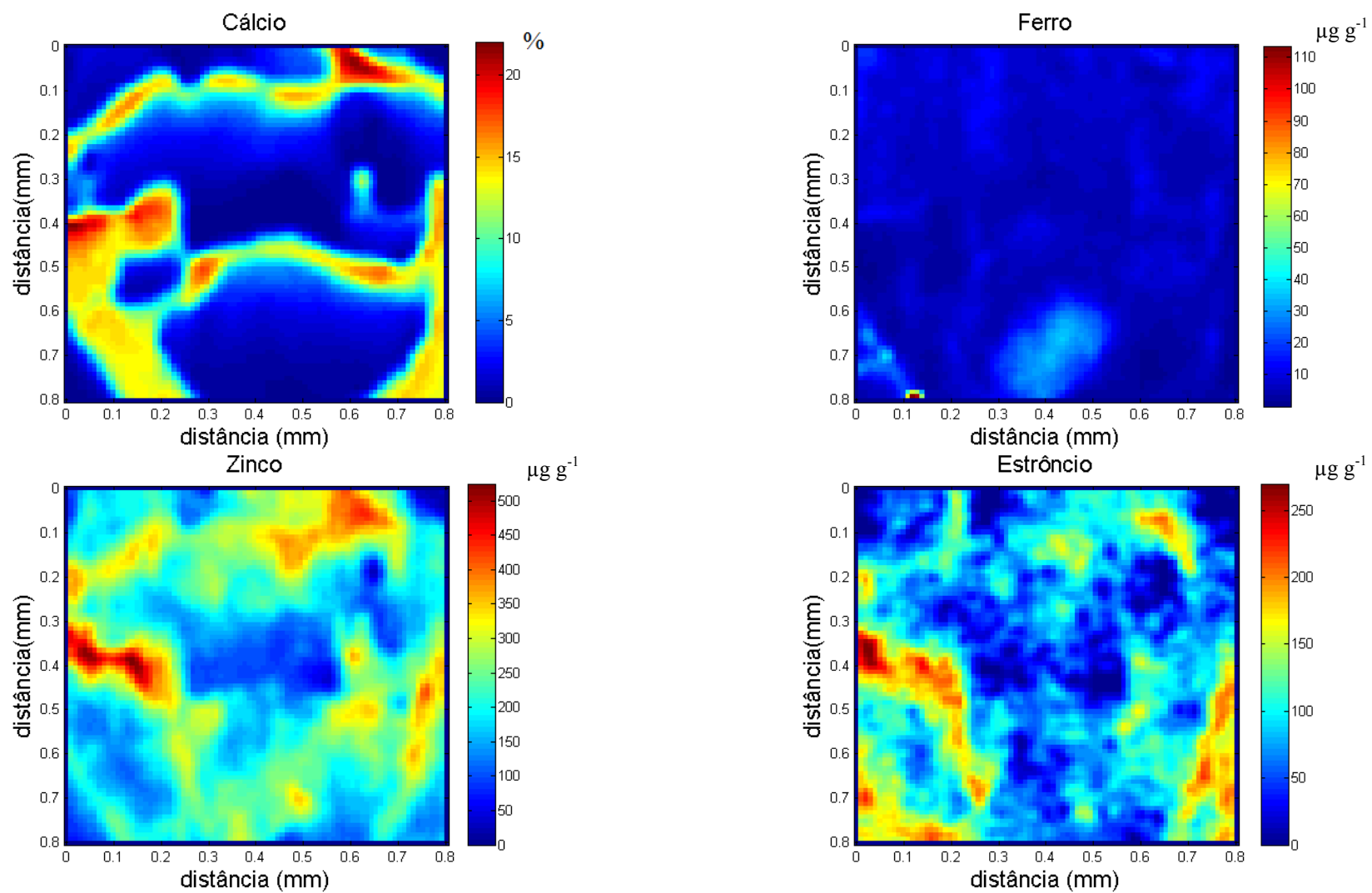
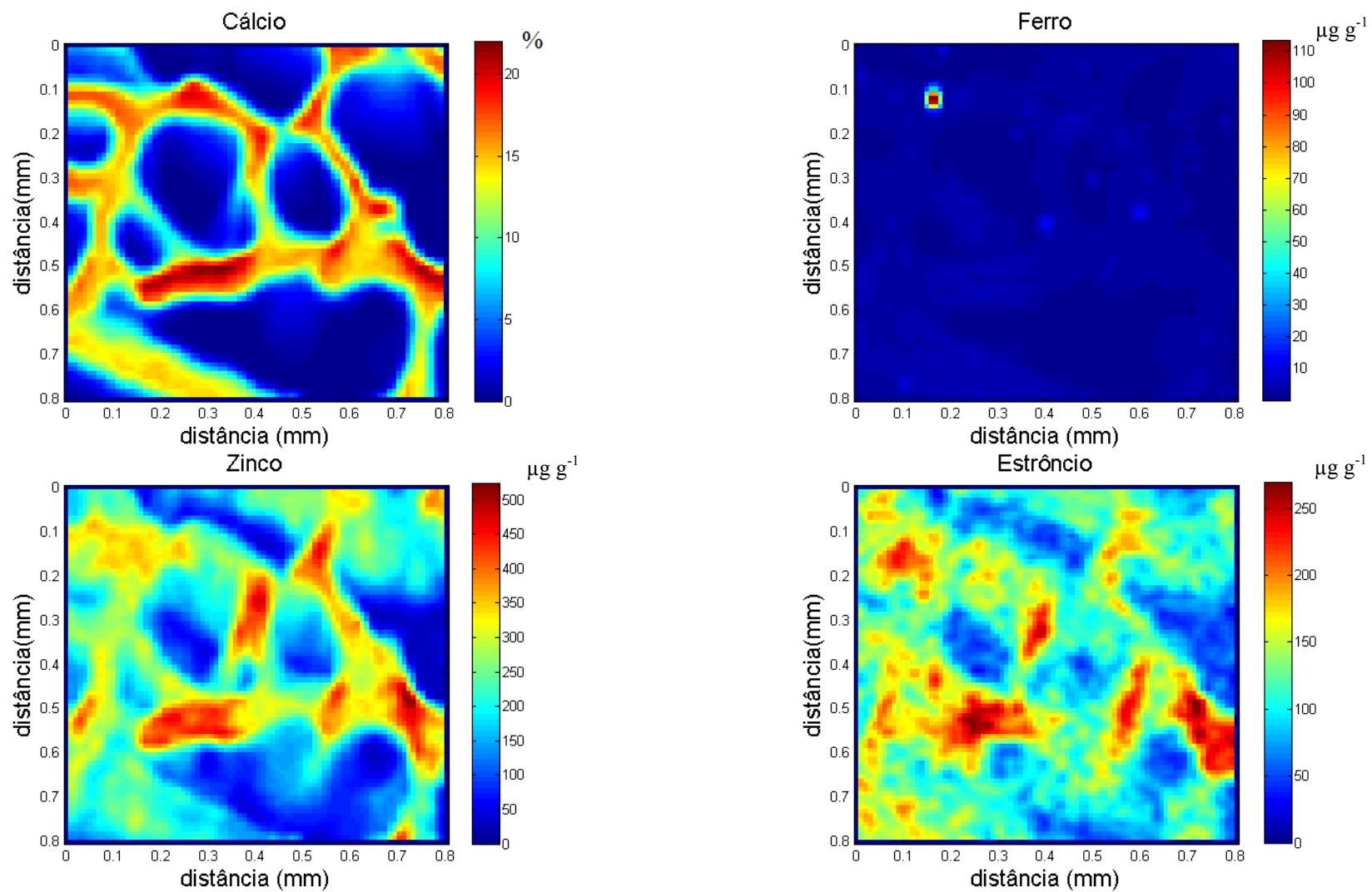


Figura B.6: Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo jovem (amostra#2).

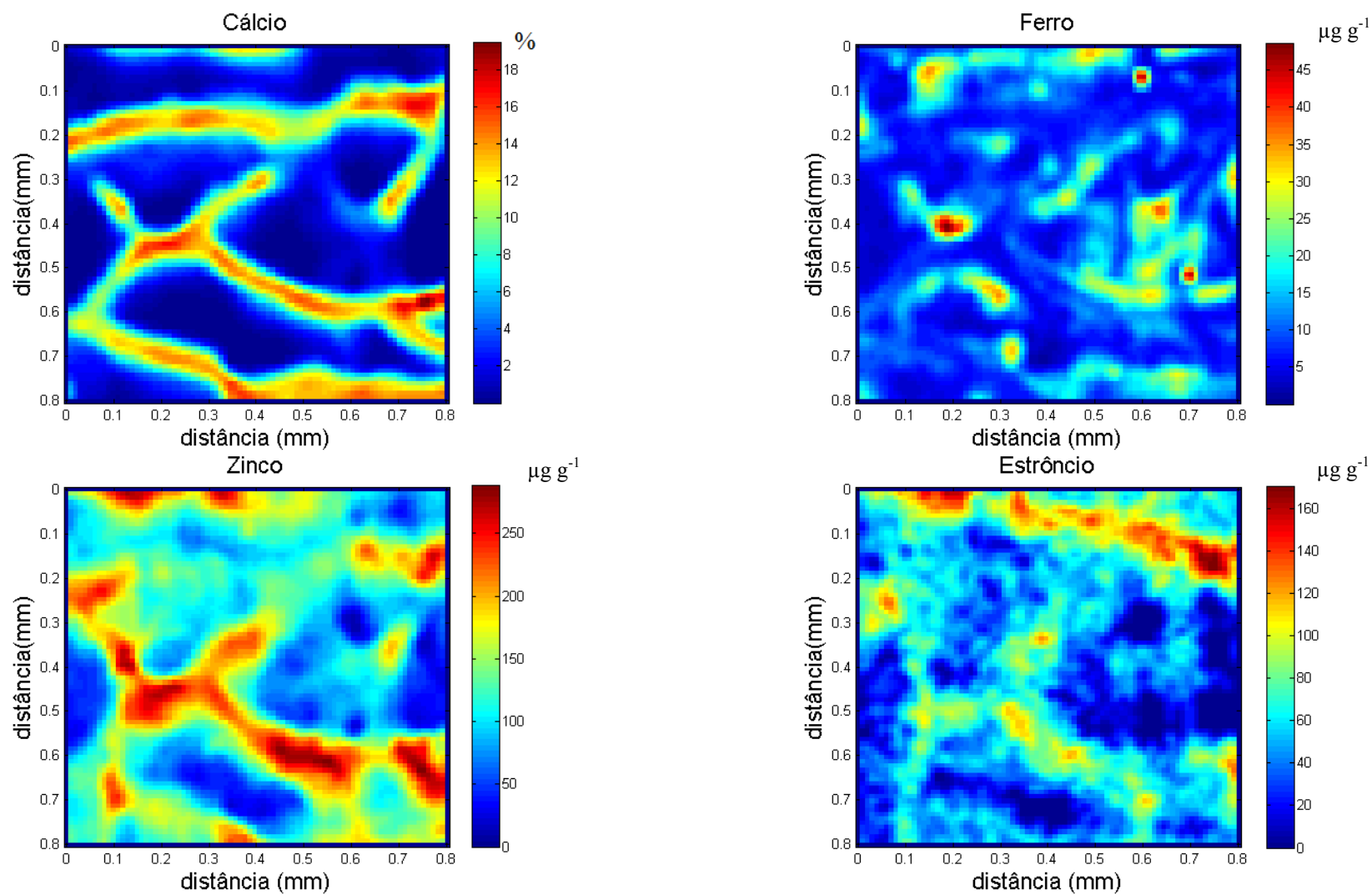


**Figura B.7:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo jovem (amostra#3).

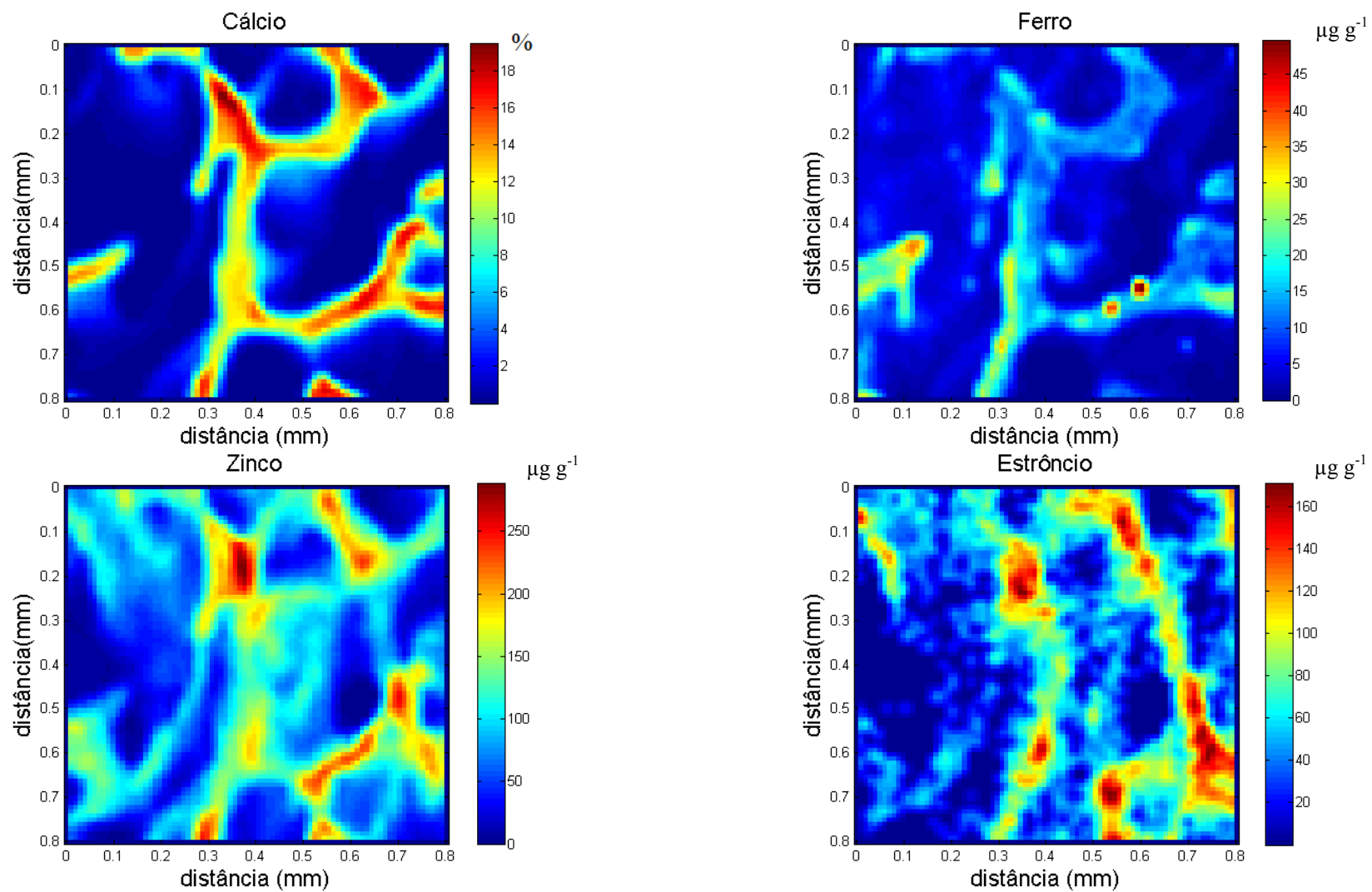


**Figura B.8:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo jovem (amostra#4).

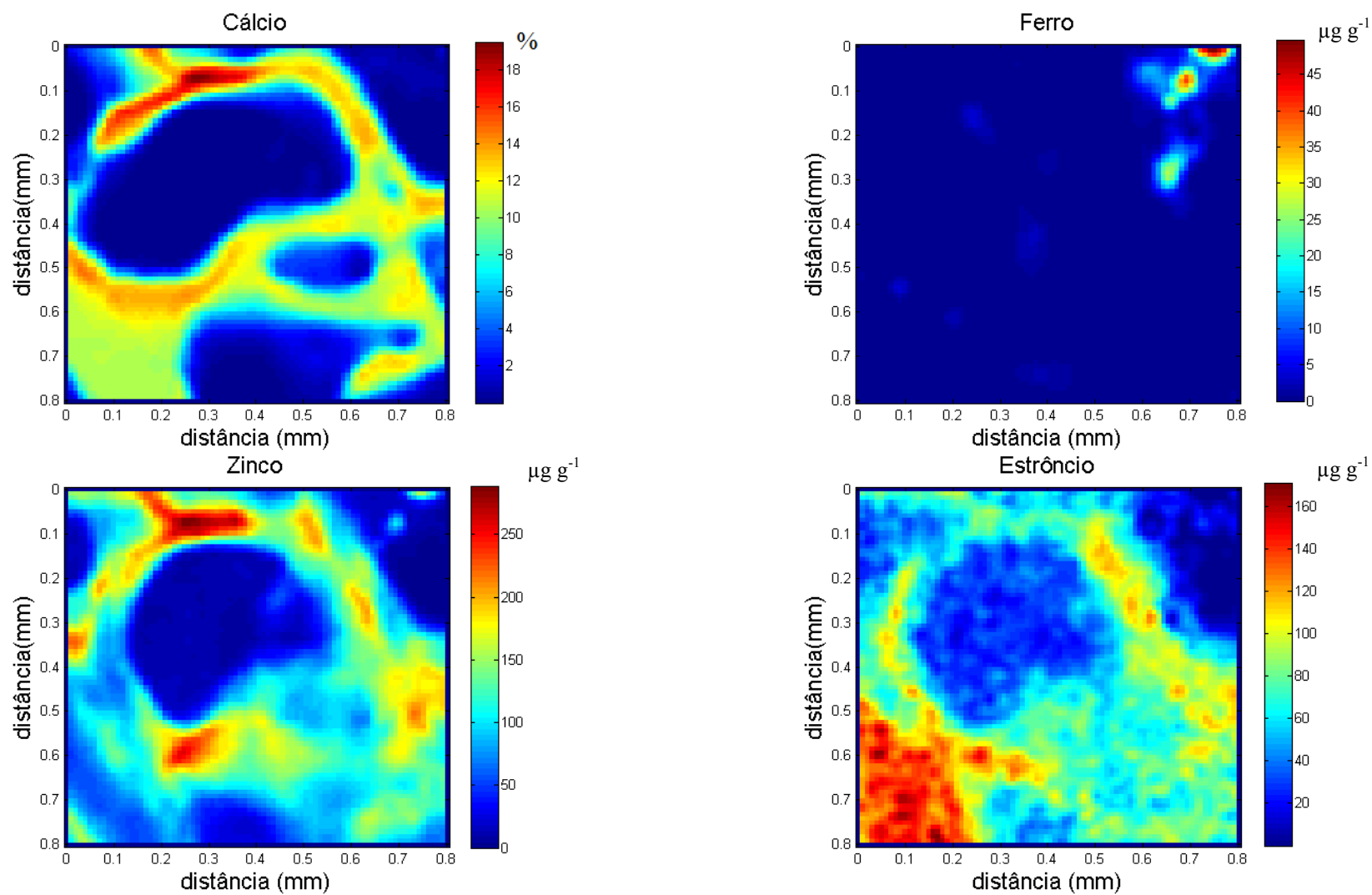




**Figura B.9:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo adulto (amostra#1).



**Figura B.10:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo adulto (amostra#2).



**Figura B.11:** Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo adulto (amostra#3).

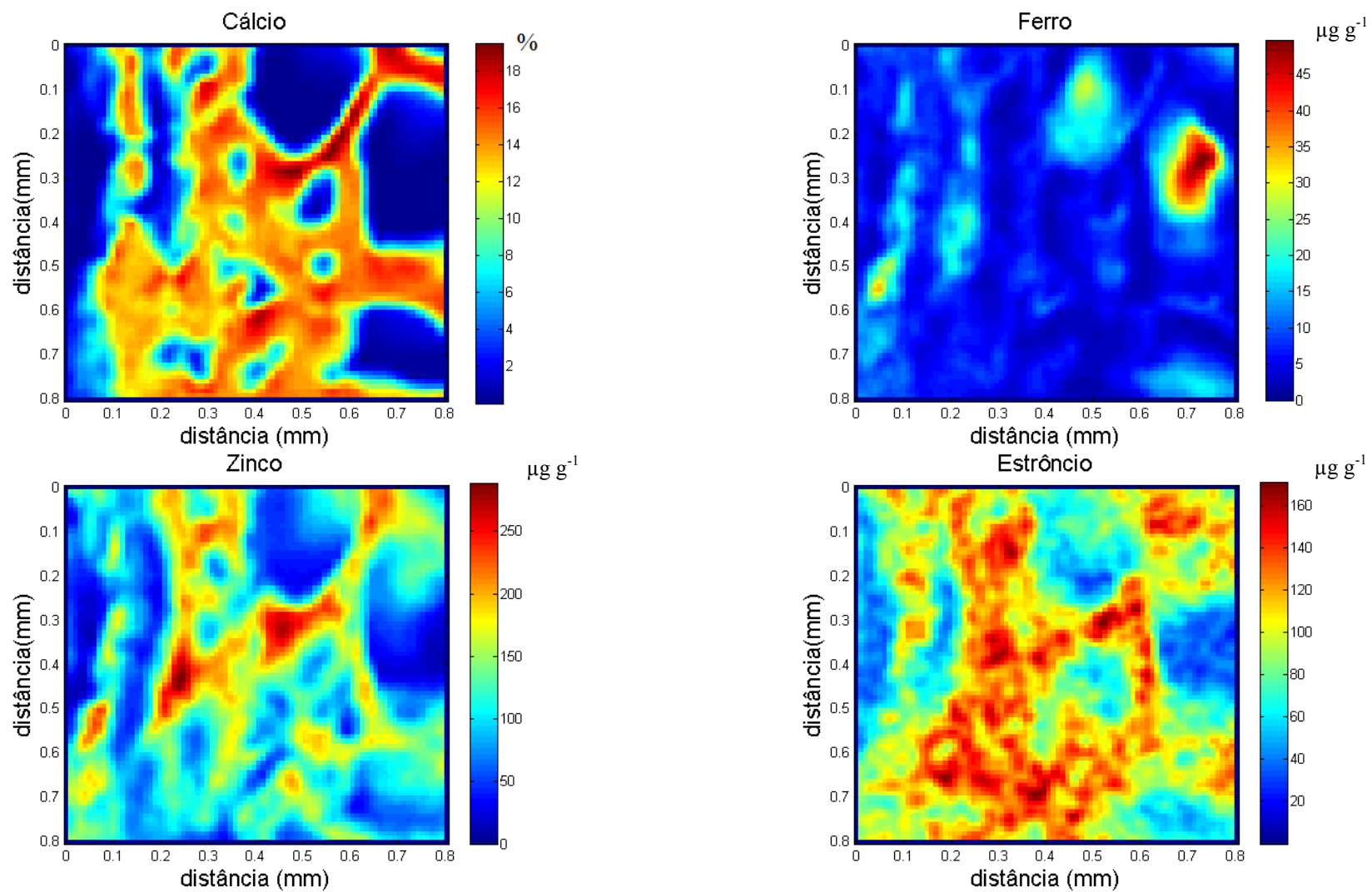


Figura B.12: Imagens do mapeamento bidimensionais do Cálcio, Ferro, Zinco e Estrôncio da L4 grupo adulto (amostra#4).

**ANEXO C**  
**TABELAS COM AS CONCENTRAÇÃO DO CÁLCIO, FERRO,**  
**ZINCO E ESTRÔNCIO DO MAPEAMENTO BIDOMENSIONAL**  
**POR MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X**

**Tabela C1:** Resultado das concentrações elementares do mapeamento bidimensional das amostras de vértebras lombares L4 dos protocolos 1.

Parâmetros	Protocolo 1	
	Grupo Controle (n=3)	Grupo Hipertireoidismo (n=3)
	L4	L4
Ca (%)	25,3±1,1	26,4±1,5
Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	81,4±0,5 <sup>b</sup>	105,3±1,2 <sup>b</sup>
Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	468,4±1,3	454,3±1,5
Sr ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	355,1±2,3 <sup>b</sup>	366,2±3,8 <sup>b</sup>

*Valores representados como: média ± desvio padrão.*

<sup>b</sup> *Estatisticamente significativo ao protocolo,  $\alpha=0,05$ .*

**Tabela C2:** Resultado das concentrações elementares do mapeamento bidimensional das amostras de vértebras lombares L4 dos protocolos 2.

Parâmetros	Protocolo 2	
	Grupo Jovem (n=5)	Grupo Adulto (n=5)
	L4	L4
Ca (%)	23,7±2,1	19,5±1,1
Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	110,5±4,2 <sup>b</sup>	47,2±3,8 <sup>b</sup>
Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	513,4±3,1 <sup>b</sup>	280,3±1,7 <sup>b</sup>
Sr ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	275,3±4,5 <sup>b</sup>	161,0±5,1 <sup>b</sup>

*Valores representados como: média ± desvio padrão.*

<sup>b</sup> *Estatisticamente significativo ao protocolo,  $\alpha=0,05$ .*

**ANEXO D**  
**ROTINAS EM MATLAB USADAS NA TESE**

## ROTINA D1: Correção do endurecimento de feixe

```

close all;
clear all;
% -0.0072  1.0450  0.0184
x=linspace(1,120,120);
a=input('Primeiro coeficiente:','s');
a1=str2num(a);
a=input('Segundo coeficiente :','s');
a2=str2num(a);
a=input('Terceiro coeficiente:','s');
a3=str2num(a);
a=input('Quarto coeficiente:','s');
a4=str2num(a);
arq=input('Nome do arquivo de entrada (p1):','s');
arq1 = [arq, '.prj'];
arqu = strcat(arq, 'bg.prj');
[cMat,ma] = imread(arqu, 'prj');
%close(arqu);

%fid=fopen(arq1, 'rt');
arq2=input('Nome do arquivo de saida (p2) :','s');
arqu = strcat(arq2, 'bg.prj');
imwrite(cMat,ma,arqu, 'prj');
%close(arqu);

arq3= [arq2, '.prj'];
nomearquivo=arq;
nomearquivos=arq2;
ext='bmp';
for m=1:300
if (m < 10)
    arquivo = strcat(nomearquivo, '00', int2str(m), '.', ext);
    arquivos = strcat(nomearquivos, '00', int2str(m), '.', ext);
else
if (m < 100)
    arquivo = strcat(nomearquivo, '0', int2str(m), '.', ext);
    arquivos = strcat(nomearquivos, '0', int2str(m), '.', ext);
else
    arquivo = strcat(nomearquivo, int2str(m), '.', ext);
    arquivos = strcat(nomearquivos, int2str(m), '.', ext);
end;
end;
[cMatx,ma] = imread(arquivo, 'prj');

for kk=1:442
for ii=1:764
p1(ii)=-log(double(cMatx(kk,ii))/double(cMat(kk,ii)));
if p1(ii)~=0

```



```

    m1(ii)=a1*p1(ii)*p1(ii)*p1(ii)+a2*p1(ii)*p1(ii)+a3*p1(ii)+a4;
    if m1(ii)<0
        m1(ii)=0;
    end;
    else
        m1(ii)=0;
    end;
    bii=fix(double(cMat(kk,ii))*exp(-m1(ii)));
    b(kk,ii)=uint8(bii);
end;
end;
imwrite(b,ma,arquivos,'bmp');
%close(arquivo);
end;
close all;

```

ROTINA D2: Calculo da densidade

```

close all;
clear all;
arq=input('Nome do arquivo :','s');
arq1 = [arq, '.hdr'];
fid=fopen(arq1,'r')
z=fscanf(fid,'%s',2)
z1=fscanf(fid,'%s',1)
z2=fscanf(fid,'%g',1)
z1=fscanf(fid,'%s',1);
z2=fscanf(fid,'%g',1);
z1=fscanf(fid,'%s',1);
z2=fscanf(fid,'%g',1);
z=fscanf(fid,'%s',2);
z=fscanf(fid,'%s',2);
z1=fscanf(fid,'%s',1);
z1=fscanf(fid,'%s',1);
z=fscanf(fid,'%s',2);
z3=fscanf(fid,'%e',1)
maxd=z3
z=fscanf(fid,'%s',2);
z3=fscanf(fid,'%e',1)
mind=z3
tp=input('Tamanho do pixel na camera: ');
tpm=input('Magnificacao: ');
tampixel=tp/tpm;
mupixel=maxd*255*100000/tampixel
denst=double(0.985*mupixel+0.0096)
close all;

```

## ROTINA D3: Segmentação e Imagem 3D

```

function [BW PARAM] = seg_oth(I)

J = imnormalize(I);
% ASF
IADF = asfilter(J,'COR','square',4);

% Top-Hat y Top-Bottom para resaltar las regiones oseas de interes
se = strel('disk',15);
Itop = imtophat(IADF, se);
Ibot = imbothat(IADF, se);
Ienhance = imsubtract(imadd(Itop, IADF), Ibot);

% Threshold da imagen com otsu
Iseg = otsu_method(Ienhance);
Iseg = bwareaopen(Iseg,20);
BW = asfilter(Iseg,'CO','square',2);

% Calcula parametros BVTV e TbN
C = edge(double(BW),'canny');
PARAM.BVTV = numel(find(BW))/numel(BW(:));
PARAM.TbN = numel(find(C))/numel(BW(:));

%*****
% Metodo otsu
function [Iseg,sep] = otsu_method(I)
n = 2;
I = single(I);
unI = sort(unique(I));
nbins = min(length(unI),256);
if nbins==n
    Iseg = single(ones(size(I)));
    graycol = linspace(0,1,n);
    for i = 1:n-1
        Iseg(I==unI(i)) = graycol(i);
    end
    sep = 1;
    return
elseif nbins<n
    Iseg = NaN(size(I),'single');
    sep = 0;
    return
elseif nbins<256
    [histo,pixval] = hist(I(:),unI);
else
    [histo,pixval] = hist(I(:),256);
end

```

```

P = histo/sum(histo);
clear unI;
w = cumsum(P);
mu = cumsum((1:nbins).*P);
sigma2B =...
    (mu(end)*w(2:end-1)-mu(2:end-1)).^2./w(2:end-1)./(1-w(2:end-1));
[lixo,k] = max(sigma2B);
Iseg = single(ones(size(I)));
sep = round(pixval(k+1));
Iseg(I <= sep) = 0;

%*****
% Filtro ASF
function Y = asfilter(F,seq,strele,radele)
if (size(F,3) > 1) || isvector(F)
    error('Input gray image must be 2D');
end
if strcmpi(strele,'arbitrary')
    b = strel(strele,radele);
else
    b = strel(strele,radele);
end

Y = double(F);

switch seq
    case 'CO' % performs closing after opening
        Y = imopen(Y,b);
        Y = imclose(Y,b);
    case 'COR' %performs closing by reconstruction after opening by reconstruction
        Y = imreconstruct(imopen(Y,b),Y);
        Y = imreconstruct(Y,imclose(Y,b));
end

%*****
% Normaliza imagem
function In = imnormalize(Y)
Y = double(Y);
mx = max(Y(:));
mn = min(Y(:));
In = uint8(255*((Y-mn)/(mx-mn)));

```

## ROTINA D3: Imagem em concentração

```

function [elementox]= lm_leelm(fid,elementos);
tmp=0;
b=txtscan(fid,'%s',2*elementos+1);
jk1=1;
for jk=1:elementos
    bz=b{1,1};
    % bz(jk1+1);
    bzz=str2mat(bz(jk1+1));
    tmp1=strcat(bzz(3),bzz(4));
    elementox(jk)=str2num(tmp1);
    jk1=jk1+2;
end;
le_leelm=tmp;

close all;
clear all;
nomeelem={' ',' ',' ',' ',' ',' ','...
           ',' ',' ',' ',' ',' ',' ','...
           '',' ',' ','Fósforo','...
           'Strontium',' ','Argônio','Potássio','Cálcio','...
           ',' ',' ','Ferro',' ','Níquel','...
           'Cobre','Zinco',' ',' ',' ',' ','...
           ','Estrôncio',' ',' ',' ',' ',''};
arq=input('Nome do arquivo:','s');
arq1 = [arq,'.dat'];
fid=fopen(arq1,'r');
xelementos=input('Numero de Elementos:','s');
elementos=str2num(xelementos);
elemento=zeros(elementos,1);
elemento=lm_leelm(fid,elementos);
disp('Elementos quimicos encontrados:');
disp(elemento);
%pause
tamost=input('Tamanho da amostra em x (mm):','s');
tamostx=str2num(tamost);
tamost=input('Tamanho da amostra em y (mm):','s');
tamosty=str2num(tamost);
tamxya=input('Tamanho da matriz em x:','s');
tamx=str2num(tamxya);
tamxya=input('Tamanho da matriz em y:','s');
tamy=str2num(tamxya);
max=zeros(elementos,1,'double');

for k=1:tamx
    for kk=1:tamy
        for kjk=1:elementos
            arquivo=fscanf(fid,'%s',1);
            a(k,kk,kjk)=fscanf(fid,'%e',1);
        end
    end
end

```

```

        if (a(k,kk,kjk)>max(kjk,1))
            max(kjk,1)=a(k,kk,kjk);
        end;
    end;
    lixo=fgetl(fid);
end;
xlinha=linspace(0,tamostrx,tamx);
ylinha=linspace(0,tamostry,tamy);
clabx=1;
while clabx<10
for kjk=1:elementos
    c(:,:)=a(:,:,kjk);
    max2=0;
    for k=1:tamx
        for kk=1:tamy
            for kkk=0:1
                for kkkk=0:1
                    cc(2*k-1+kkk,2*kk-1+kkkk)=c(k,kk);
                    if c(k,kk)>max2
                        max2=c(k,kk);
                    end;
                end;
            end;
        end;
    end;
end;
end;
end;

figure;
colorlabels = {'default', 'hsv', 'hot', 'pink', ...
               'cool', 'bone', 'prism', 'flag', ...
               'gray', 'rand'};
max22=0;
ccd=zeros(2*tamx,2*tamy,'double');
for m=2:(2*tamx-1)
    for n=2:(2*tamy-1)

        % Aplicando filtro de mediana na imagem com ruído

        % Filtro de mediana
        ccd(m,n)=1/9*(cc(m-1,n-1)+cc(m-1,n)+cc(m-1,n+1)...
                    +cc(m,n-1)+cc(m,n)+cc(m,n+1)...
                    +cc(m+1,n-1)+cc(m+1,n)+cc(m+1,n+1));
        if ccd(m,n)>max22
            max22=ccd(m,n);
        end;

        %-----
    end;
end;
ccc=ccd*max2/max22;

```

```

imagesc(xlinha,ylinha,c);
xlabel('distância (mm)','FontSize',16);
ylabel('distância(mm)','FontSize',16);
title(nomeelem(elemento(kjk)), 'FontSize', 16);
colormap(colorlabels {clabx});
colorbar;
figure
imagesc(2*xlinha,2*ylinha,cc);
xlabel('distância (mm)','FontSize',16);
ylabel('distância(mm)','FontSize',16);
title(nomeelem(elemento(kjk)), 'FontSize', 16);
colormap(colorlabels {clabx});
colorbar;
figure
imagesc(xlinha,ylinha,ccc);
xlabel('distância (mm)','FontSize',16);
ylabel('distância(mm)','FontSize',16);
title(nomeelem(elemento(kjk)), 'FontSize', 16);
colormap(colorlabels {clabx});
colorbar;
end;
clab=input('Entre o colorlabel (1-9) - >9 sai:','s');
clabx=str2num(clab);
if clabx<10
    close all
end;
end;
%pause;
close all;

```