



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN"

FERNANDO CESAR LUSSANI

IMAGENS E MICROTOMOGRAFIAS DE RAIOS X POR  
CONTRASTE DE FASE E CONTRASTE DE ESPALHAMENTO

Campinas  
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN"

FERNANDO CESAR LUSSANI

IMAGENS E MICROTOMOGRAFIAS DE RAIOS X POR  
CONTRASTE DE FASE E CONTRASTE DE ESPALHAMENTO

Tese apresentada ao Instituto de Física  
"Gleb Wataghin" da Universidade Estadual  
de Campinas como parte dos requisitos exi-  
gidos para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Manuel Giles Antunez de Mayolo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VER-  
SÃO FINAL DA TESE DE DOUTORADO DE-  
FENDIDA PELO ALUNO FERNANDO CE-  
SAR LUSSANI E ORIENTADA PELO PROF.  
DR. CARLOS MANUEL GILES ANTUNEZ DE  
MAYOLO.

A handwritten signature in blue ink, reading "Carlos Giles", is written over a horizontal line.

Campinas  
2015

Agência de fomento: CNPq  
Nº processo: 142800/2010-4

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Física Gleb Wataghin  
Valkíria Succí Vicente - CRB 8/5398

L975i Lussani, Fernando Cesar, 1985-  
Imagens e microtomografias de raios X por contraste de fase e contraste de espalhamento / Fernando Cesar Lussani. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Carlos Manuel Giles Antunez de Mayolo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física Gleb Wataghin.

1. Raios X. 2. Contraste de fase por propagação. 3. Espalhamento (Física). 4. Imagem de raio-X. 5. Microtomografia por raio-X. I. Antunez de Mayolo, Carlos Manuel Giles, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física Gleb Wataghin. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** X-ray images and microtomography using scattering and phase contrast

**Palavras-chave em inglês:**

X-rays

Phase contrast by propagation

Scattering (Physics)

X-ray imaging

X-ray microtomography

**Área de concentração:** Física

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Carlos Manuel Giles Antunez de Mayolo [Orientador]

Mario Antonio Bernal Rodriguez

Alessandra Tomal

Martin Eduardo Poletti

Jean Rinkel

**Data de defesa:** 20-08-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **FERNANDO CESAR LUSSANI** – RA: 032799 APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 20 / 08 / 2015.

**COMISSÃO JULGADORA:**

---

Prof. Dr. Carlos Manuel Giles Antunez de Mayolo  
Orientador do Candidato - DFMC/IFGW/UNICAMP

---

Prof. Dr. Mario Antonio Bernal Rodriguez - DFA/IFGW/UNICAMP

---

Profa. Dra. Alessandra Tomal – DFA/IFGW/UNICAMP

---

Prof. Dr. Martin Eduardo Poletti – FFCLRP/USP

---

Prof. Dr. Jean Rinkel – LNLS/CNPEM

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha família pelo apoio durante o desenvolvimento desta tese, especialmente a minha mãe dona Arenela Wiellenz e as minhas irmãs Cássia Lussani e Rubia Wiellenz.

Ao meu orientador Prof. Carlos Giles pela oportunidade, dedicação e paciência durante a elaboração desse trabalho e em especial por fomentar o desenvolvimento de instrumentação na área de imagens com ênfase em aplicações biomédicas. Também gostaria de agradecer os membros do Laboratório de Cristalografia e aplicações de raios X Dr. Calos Leite, Sr. José da Silva e os amigos do laboratório Rafael Celestre, José Mardegan, Kelin Tasca, Damaris Maimone, Natasha Tomm, Carlos Sato, Carlos Galdino, Lucas Gonçalves, George Kontorgios e Rafael Vescovi pela convivência e inúmeras lições aprendidas.

Ao professor Christoph Rose-Petruck da Universidade de Brown pela acolhida durante o estágio de doutorado sanduíche bem como aos amigos Francisco Schunk e Daniela Rand por mostrarem os primeiros passos na área de imagens por espalhamento.

Aos amigos de longa data Terezinha e João Bosco Zimmerman, Andre Froes, Bruno Miguez, Ronaldo Savioli, Daniel Valente, Danilo Borin, Eduardo Carvalho, Plinio Tsai, Nirvana França, Jonathan Raichart, Loyane Ferreira, Virna Carvalho, Estela Piccin, Ethel Beluzzi e Harumi Sakuma pela convivência, paciência e por serem uma contínua fonte de inspiração.

Aos colaboradores Prof. Dr. Mario Marostica Junior, Cibele Furlan, Professora Dra. Fresia Ricardi Branco, Professora Dra. Cecilia Zavaglia, Dr. Xianghui Xiao, a todos estes fica aqui registrado meus agradecimentos pela ajuda, discussões e colaborações nesse projeto.

# Resumo

O escopo desta tese foi o estudo, implementação, caracterização e aplicação das técnicas de imagens de raios X por contraste de fase e contraste de espalhamento. Este trabalho inicialmente descreve a formação das imagens por contraste de fase pelo método da propagação. Apresenta simulações de primeiros princípios para esta técnica comparando estes com a literatura. Em seguida reporta o desenvolvimento da instrumentação para uma estação experimental de microtomografias de raios X bem como os métodos de processamento de dados para reconstruções tomográficas. Microtomografias com alta resolução foram obtidas e são apresentadas com o intuito de caracterizar a instrumentação e suas aplicações. Essa técnica de instrumentação foi aplicada, em particular, no estudo da histomorfometria óssea em ratos Sprague-Dawley com o objetivo de quantificar os efeitos da dieta alimentar na estrutura óssea trabecular e compacta. Argumenta-se que ocorre uma ligeira tendência a diferenciação nesses tecidos em função da dieta alimentar. Além disso, neste trabalho foi implementado, caracterizado e aplicado a técnica de imagens harmônicas por espalhamento em amostras biológicas, detecção de fraturas e espalhamento anisotrópico. Também são descritos os esforços na melhoria da qualidade sinal-ruído dessa técnica.

# Abstract

The main scope of this work was the study, implementation, characterization and application of x-ray phase contrast and scattering contrast imaging techniques. First we describe the production of phase contrast images and early attempts to simulate phase contrast phenomena following the known literature. We also report efforts toward development of an experimental x-ray microtomography station as well as imaging processing techniques for tomography reconstruction. We present results on high resolution x-ray microtomography. This technique was applied in the study of Sprague-Dawley bone morphometric properties aiming quantification of high-fat diet effects on compact and trabecular bone structure. It is argued about a tendency to differentiation on these tissues according to the diet. We also implemented, characterized and applied harmonic scattering imaging in biological samples, fracture detection and anisotropic scattering describing the efforts to enhance the signal to noise ratio in this technique.

## Glossário e Abreviações

FFTW	Fast Fourier Transform in West
FFT	Fast Fourier Transform
FBP	Filtered Backk Projection
FDK	Feldkamp-Davis-Kress
VTK	Vizualization ToolKit
PCI	Phase Constrast Imaging
DEI	Diffraction Enhanced Imaging
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
WAXS	Wide Angle X-ray Scattering
TIE	Transport of Intensity Equation
PCI	Phase Contrast Imaging
CPU	Central Processing unit
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
BV	Bone Volume
TV	Total Volume
MV	Marrow Volume
MV/TV	Marrow Occupation
BV/TV	Bone/Volume relation
STD	Grupo Standard
HF	Grupo High Fat
P	Grupo Fitosterol
CLA	Ácido Linoléico Conjugado
APS	Advanced Photon Source
PDSE	Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior
FOV	Field Of View
HSV	Hue Saturation Value
PSF	Point Spread Function
LSF	Line Spread Function
SNR	Signal to Noise Ratio
CNR	Contrast to Noise Ratio
FRT	Fractional Fourier Transform

# Sumário

Agradecimentos	5
Resumo	6
Abstract	6
Glossário e Abreviações	7
<b>1 Introdução</b>	<b>10</b>
<b>2 Imagens por Contraste de Fase</b>	<b>16</b>
2.1 Equação de Fresnel-Kirchoff . . . . .	17
2.1.1 Fonte Emissora . . . . .	17
2.1.2 Interação com a amostra . . . . .	19
2.1.3 Formação das Imagens no Detetor . . . . .	21
2.2 Efeitos de Fase nas Imagens e Aplicações Biomédicas . . . . .	22
2.2.1 Recuperação da informação de Fase - Equação de Transporte de Intensidade	23
2.3 Simulação da Equação de Fresnel-Kirchoff . . . . .	24
<b>3 Microtomografias de raios X</b>	<b>28</b>
3.1 Reconstruções Tomográficas . . . . .	30
3.1.1 Transformada de Radon . . . . .	30
3.1.2 <i>Filtered Back Projection</i> . . . . .	32
3.2 Desenvolvimento de um Microtomografo e Rotinas de reconstrução. . . . .	35
3.2.1 Instrumentação Para Aquisição de Projeções . . . . .	35
3.2.2 Algoritmo de reconstrução . . . . .	38
3.2.3 Visualização e Extração de Dados . . . . .	41
3.3 Testes e Aplicações . . . . .	42
<b>4 Microtomografias no Estudo da Morfometria Óssea</b>	<b>47</b>
4.1 Formação do Tecido Ósseo . . . . .	48
4.1.1 Morfometria Óssea . . . . .	49
4.1.2 Influência de Lipídeos e Sucrose . . . . .	52
4.2 Microtomografias em tecidos Ósseos . . . . .	52
4.2.1 Materiais e Métodos . . . . .	52

4.3	Análises e Resultados . . . . .	54
<b>5</b>	<b>Imagens de Espalhamento Harmônicas</b>	<b>60</b>
5.1	Formação das Imagens de Espalhamento . . . . .	61
5.2	Caracterização Experimental . . . . .	67
5.3	Espalhamento Anisotrópico . . . . .	71
5.4	Fraturas em Materiais . . . . .	76
5.5	Estudos Exploratórios em Tecidos Biológicos . . . . .	80
<b>6</b>	<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>82</b>
	<b>Apêndice A Interação de raios X com a Matéria</b>	<b>85</b>
	<b>Apêndice B Algoritmo de simulação para a equação de Fresnel-Kirchoff</b>	<b>88</b>
	<b>Apêndice C Implementação do algoritmo <i>Filtered Back Projection</i></b>	<b>91</b>
	<b>Referências</b>	<b>93</b>

# Capítulo 1

## Introdução

### Introdução

A produção de imagens de raios X tem início com a descoberta dessa radiação por Wilhelm Roentgen em 1895 e a produção das primeiras imagens em chapas fotográficas sensibilizadas através da emissão de raios X por um tubo de raios catódicos de Crookes [1, 2]. Nas imagens de raios X o contraste é produzido pela interação dos fótons de raios X com a matéria. Nas radiografias tradicionais a absorção fotoelétrica e em alguns casos, a absorção devido ao efeito Compton são as interações mais importante nesse processo e o contraste provém da modulação do sinal de absorção devido a variação de densidade eletrônica da amostra.

No entanto as interações da radiação com a matéria que produzem espalhamento também são importantes para a formação de imagens tais como o espalhamento Thomson coerente, o espalhamento Compton incoerente e para radiação em altas energias a produção de pares. (uma revisão dessas interações da radiação eletromagnética ionizante com a matéria é apresentada no Apêndice A.)

Em escala mesoscópica as múltiplas interações ao longo de um segmento  $l$  atenuam a intensidade do feixe de fótons de raios X seguindo a lei de Beer-Lambert [3]:

$$I = I_0 e^{-\mu l}$$

onde  $I$  é a intensidade atenuada,  $I_0$  a intensidade inicial e o coeficiente de atenuação  $\mu$  é dado pela secção de choque total  $\sigma_{Total}$  de todas as interações:

$$\frac{\mu}{\rho} = \sigma_{Total} \frac{N_A}{A}$$

no qual  $N_A = 6.022045 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  é o número de Avogrado,  $\rho$  a densidade do material,  $A$  a massa molar e  $\sigma_{Total} = \sigma_{pe} + \sigma_{Compton} + \sigma_{Thomson} + \sigma_{pp}$  é a secção de choque total para os

---

quatro processos [4](detalhes no Apêndice A).

Como o feixe de raios X não interage apenas com um único elétron mas com um grande número destes, o espalhamento é dependente também da distribuição espacial desses elétrons. Se a amostra possui uma distribuição eletrônica homogênea, então os inúmeros espalhadores se comportam como um gás homogêneo de elétrons. Uma vez que o espalhamento ocorre em toda a extensão do material, os efeitos de fase ficam evidentes entre as interfaces através do que denominamos de refração da luz ou de maneira equivalente como uma mudança de fase das frentes de onda ao longo da direção de propagação do feixe [5].

Quando o objeto não é homogêneo, possuindo estruturas internas tais como moléculas, fibras, heteroestruturas etc. ocorre o espalhamento coerente a baixo ângulo. A mudança da densidade eletrônica em pequenas dimensões (na escala de  $nm$ ) introduz mudanças nas fases das ondas espalhadas que, ao se reconstruir, produzem um padrão de espalhamento para pequenos ângulos (SAXS-*Small Angle X-Ray Scattering*) e para ângulos elevados (WASX - *Wide Angle X-ray Scattering*). Nesse caso, o espalhamento está ligado as estruturas internas do mesmo [6].

Tanto a mudança de fase ou refração, bem como o espalhamento a baixo ângulo, se originam do espalhamento Thomson coerente e coletivo dos elétrons no material. Ou seja, ambos os efeitos possuem o mesmo fenômeno como princípio; o comportamento ondulatório dos fótons de raios X [7]. As mudanças de fase coletiva são exclusivas ao processo Thomson pois as inúmeras frentes de onda, oriundas de cada elétron do material, podem ser consideradas em fase com respeito a onda incidente. O espalhamento Compton também é uma interação importante que afeta a formação de imagens. Em geral ele introduz um *blurring* na imagem devido ao espalhamento não coerente.

Todos estes três processos carregam informação do objeto nas imagens radiográficas por projeção, também conhecida como técnica de projeção de Roentgen (Figura 1.1). Nesta técnica de imageamento, uma fonte produz fótons que atravessam o objeto e atingem o detector. A imagem é resultante de todas as interações dos fótons ao atravessar o objeto.

Em uma imagem convencional de raios-x, como na Figura 1.1, o contraste é produzido principalmente pela absorção do feixe ao longo do caminho fonte-detetor nos diferentes pontos da amostra. Os efeitos de contraste de fase e de espalhamento se sobrepõem ao contraste de absorção e em alguns casos isso implica na perda da nitidez da imagem. A título de exemplo, no ponto 1 o fóton sofre espalhamento a baixo ângulo devido a uma partícula em suspensão (nanopartícula, fibras, moléculas, etc). No ponto 2, outro fóton, seguindo o mesmo caminho fonte-detetor, sofre refração ou mudança de fase ao passar entre as regiões homogêneas com densidades  $\rho$  e  $\rho'$ . Em um terceiro ponto, os fótons sofrem espalhamento Compton incoerente devido ao espalhamento isolado de um único elétron.

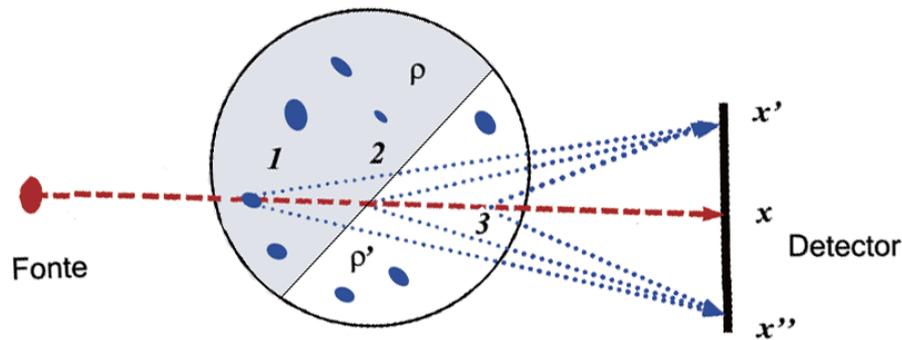


Fig. 1.1: Interação de um feixe de raios X com um objeto constituído de duas regiões com densidade  $\rho$  e  $\rho'$  e uma suspensão de microestruturas. 1- Espalhamento a baixo ângulo SAXS. 2-refração e contraste de fase na interface. 3-Espalhamento Compton incoerente de um único elétron.(Adaptado)

A separação das componentes de absorção, refração e espalhamento a baixo ângulo implica na obtenção de imagens puras de absorção e portanto maior nitidez ou contraste da imagem. Ao mesmo tempo, as informações do contraste de fase e do espalhamento podem ser utilizadas no estudo de outros parâmetros da amostra bem como na melhoria da qualidade, nitidez e resolução das imagens de raios X tanto no contexto de técnica de medida como no contexto de imagens clínicas [8].

Com o avanço dos detectores e geradores de raios X vários métodos foram desenvolvidos para separar essas três componentes em uma imagem. No campo das imagens por contraste de fase, quatro técnicas se destacam: método da propagação, que descrevemos nessa tese [9], interferometria de Talbot [10], interferometria de Bonse-Hart [11] e imagens por realce de difração [12].

No campo das imagens por contraste de espalhamento a baixo ângulo, três técnicas se destacam: Mapeamento SAXS [13], o método de campo escuro por interferometria de Talbot [14] e recentemente, as Imagens de Espalhamento Harmônicas por Heterodinagem que descrevemos nesta tese [15].

Na Figura 1.2 mostramos uma aplicação recente da técnica de campo escuro por interferometria de Talbot e a capacidade em diferenciar os três regimes [14]. Na parte (a) o espécime (um rato) é visto por meio da absorção. Na parte (b) o contraste é produzido pela mudança de fase e refração. Na parte (c) o contraste é produzido pelo espalhamento a baixo ângulo. Observa-se que na imagem de contraste de fase as interfaces dos tecidos são realçadas. Na imagem de espalhamento, estruturas como pulmão e a pelagem do rato são realçados pois o pulmão é constituído de alvéolos micro estruturados e pelos contém fibras orientadas de queratina que produzem espalhamento a baixo ângulo.

As imagens de espalhamento a baixo ângulo possuem grande potencial pois são capazes

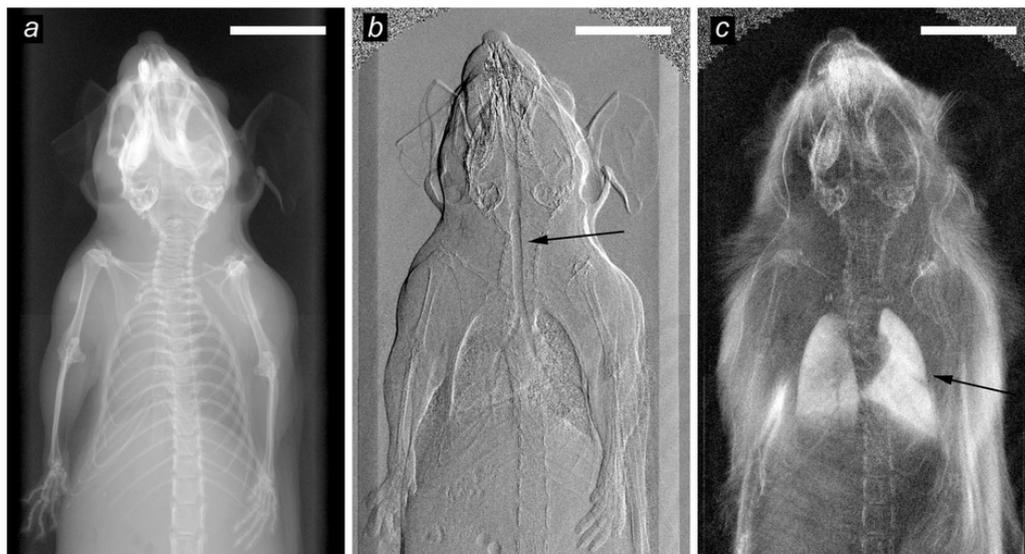


Fig. 1.2: Exemplo de imagem de absorção (a), contraste de fase (b) e contraste de espalhamento (c) obtida no trabalho de Bech et.al. pelo método de Campo escuro por interferometria de Talbot. Imagem reproduzida de Bech [14].

de mapear a estrutura molecular do espécime. A informação que elas carregam está ligada a composição química, tamanho e forma das estruturas dispersas no meio como moléculas, fibras, colóides etc. Da mesma maneira, as imagens por contraste de fase são capazes de realçar detalhes das imagens que não poderiam ser vistos nas imagens de absorção e possivelmente com uma menor dose de radiação entregue a amostra. Grande empenho tem sido colocado na tentativa de encontrar técnicas capazes de mapear esses processos de maneira eficiente e prática e passíveis de aplicações científicas e comerciais [16].

Esta tese teve como objetivo o estudo, desenvolvimento de instrumentação e caracterização de imagens de raios X por contraste de espalhamento a baixo ângulo e microtomografias por contraste de fase e contraste de absorção, bem como a aplicação dessas técnicas nas diversas áreas do conhecimento científico, e em específico, na área de biomedicina como ferramenta de análise das características morfométricas e morfológicas de tecidos ósseos.

No capítulo 2 descrevemos um conjunto de estudos exploratórios na área de formação de imagens por fonte microfoco e exploração do contraste de fase na obtenção de imagens. Descrevemos o processo de formação de imagens por contraste de fase e a implementação de um algoritmo de simulação para as equações de Fresnel-Kirchoff por primeiros princípios.

O estudo da formação de imagens pelo método de propagação utilizando o formalismo de Fresnel-Kirchoff e do método de Rytov para as equações de transporte de intensidade são importantes tanto do ponto de vista das técnicas de obtenção de imagens bem como do ponto de vista pedagógico. Uma descrição completa e unificada do processo de formação de imagens bem como de microtomografias para amostras inomogêneas, espessas e espalhadoras em todos

---

os regimes de formação de imagens não é encontrado na literatura. Em determinados regimes, a introdução de elementos óticos difrativos só pode ser descrita por meio de simulações. Dessa maneira, o entendimento detalhado desses processos bem como simulações *ab-initio* são importantes como ferramentas de estudo e de desenvolvimento de métodos inovadores de obtenção de imagens de raios X.

No capítulo 3 descrevemos os esforços envolvendo a implementação de uma estação de microtomografias utilizando uma fonte de raios X microfoco e a implementação de algoritmos de reconstrução tomográfica em conjunto com a utilização de ferramentas de análise das reconstruções microtomográficas.

Do ponto de vista de instrumentação, nosso trabalho teve como objetivo a realização de um *setup* experimental de baixo custo, com alta resolução e fótons de raios X de energia média capaz de ser aplicado na biologia, biomedicina e ciências dos materiais. Este esforço resultou em uma estação robusta e que pode ser utilizada em diversas áreas de estudo como descrito ao longo desse trabalho.

As microtomografias encontram aplicação não apenas no estudo de aspectos qualitativos de pequenas amostras mas também na obtenção de aspectos quantitativos simples como medidas de espessura, volume, etc. assim como em estudos relacionados a área de fenômenos complexos. A facilidade de obtenção de um conjunto de dados onde várias ferramentas estatísticas podem ser aplicadas é um campo fértil para inúmeras aplicação dessa técnica.

No capítulo 4 aplicamos a técnica de microtomografia no estudo quantitativo de aspectos morfométricos do tecido ósseo envolvendo processos ligados a área de nutrição e formação óssea. Encontramos grandezas quantitativas tais como dimensão fractal e conectividade da complexa rede de trabéculas existente no tecido ósseo demonstrando a capacidade dessa técnica na obtenção de informações na área de biomedicina e biologia.

Finalmente, no capítulo 5 descrevemos os estudos realizados com a técnica de imagens por contraste de espalhamento harmônico por heterodinagem de raios X. Esta técnica consiste na modulação espacial da iluminação de uma amostra e extração de informações de espalhamento por meio de técnicas de processamento da imagem [15]. As imagens espaciais harmônicas são recentes e suscitam grande interesse como uma nova ferramenta de análise e diagnóstico. O envolvimento com esta técnica foi desenvolvido em um estágio sanduíche no exterior no grupo do Prof. Christoph Rose-Petruck da Brown University em Providence, Rhodes Island, EUA.

Neste trabalho descrevemos a caracterização e aplicação dessa técnica na obtenção de imagens da anisotropia de espalhamento de raios X em amostras de tecido vegetal. Também desenvolvemos estudos com o objetivo de melhorar a relação sinal-ruído nessas imagens e por fim mostramos imagens exploratórias em tecidos carcinogênicos e em espacial na diferenciação

de nódulos sebáceos benignos do restante do tecido.

## Capítulo 2

# Imagens por Contraste de Fase

Na ótica geométrica o processo de formação de imagens parte do pré-suposto de que um feixe de luz atravessando um objeto qualquer, tal como uma lente ou um espelho, descreve uma trajetória retilínea como descrito na teoria corpuscular da luz de Newton. Não há a associação dos fenômenos óticos a qualquer processo ondulatório. O avanço da ótica de luz visível, por meio da descrição ondulatória de Christiaan Huygens, no século XVII e as demonstrações experimentais de Thomas Young, no século XIX, mostraram que a componente ondulatória tem efeitos importantes no processo de formação de imagens e nos fenômenos óticos [17].

Concomitante ao tratamento ondulatório da luz, o conceito de fase, mudança de fase e coerência ótica foi incluído necessariamente na descrição dos processo óticos. No século XX, a informação de fase na formação das imagens óticas passou a ser utilizada na instrumentação ótica e resultou em técnicas inovadoras de microscopia nos trabalhos de Fritz Zernike [18] e na invenção da holografia por Denis Gabor [19].

A ausência de fontes de raios X coerentes no passado impediu o uso de técnicas de imagens por contraste de fase. Neste caso a informação de fase é importante nos processos de espalhamento Thomson como a difração e o espalhamento a baixo ângulo onde o comprimento de coerência lateral é maior do que a distância interatômica. Os primeiros resultados de imagens por contraste de fase, no método de propagação [20], sem o uso de elementos óticos como lentes e espelhos, foram possíveis com o advento do microscópio de raios X por Cosslet e Nixon em 1957 [21] que desenvolveram as primeiras fontes microfoco de raios X e do desenvolvimento de fontes de raios X alternativas como os síncrotrons de terceira e quarta geração capazes de gerar raios-x com elevada coerência lateral.

Nessas duas formas de produção de raios X, ou pelo diâmetro do ponto de emissão do feixe não ultrapassar alguns micrômetros ou por se posicionar o objeto a grandes distâncias da fonte obtêm-se frentes de onda parcialmente coerentes e portanto a observação dos fenômenos de fase

nas imagens de raios X é possível.

## 2.1 Equação de Fresnel-Kirchoff

O modelo utilizado para descrever o processo de formação de imagens levando em consideração os efeitos de contraste de fase baseia-se na equação de Fresnel-Kirchoff oriunda da ótica difrativa. Três regimes de formação de imagens difrativas ocorrem em dependência da distância da amostra ao detector e do comprimento de onda; campo próximo, Fresnel e Fraunhofer. As regiões difrativas de campo próximo e campo longínquo (Fraunhofer) não são levadas em consideração nesta descrição devido a natureza dos arranjos e condições experimentais utilizadas que são específicas a cada regime de imageamento. Detalhes específicos a cerca das técnicas e métodos nos demais regimes são encontrados em Veen e Pfeifer [22].

A Figura 2.1 mostra o diagrama esquemático do processo físico de formação de imagens por contraste de fase. Três processos são representados: emissão de raios X por uma fonte na posição  $\vec{\xi}$ ; absorção e interação das ondas eletromagnéticas (fótons) com o objeto na posição  $\vec{X}$  e formação de um padrão de interferência no detetor, localizado em  $\vec{x}$ . Estes três processos são descritos por meio das equações de onda do eletromagnetismo clássico. Os pontos localizados em  $\vec{\xi}$  emitem ondas esféricas que cobrem todo o plano da amostra. Nesse plano estas ondas são atenuadas e sofrem mudança de fase, seguindo para o detector onde formarão o padrão de interferência.

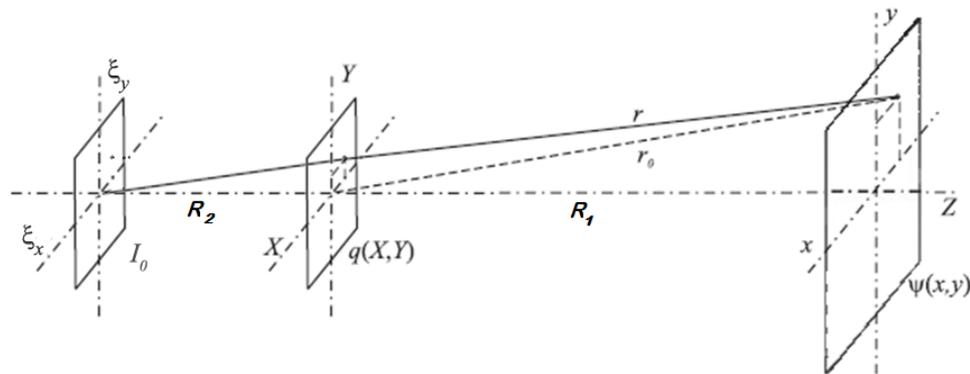


Fig. 2.1: Diagrama esquemático do processo físico de produção de imagens por contraste de fase. Uma fonte espacial F localizada em  $\xi$  emite fótons de raios X que atingem o plano do objeto O em  $X$ . A interação da luz com a amostra produz um padrão de interferência, no detetor D, localizado no plano  $(x, y)$  em  $r$ . Reproduzido a referência [22]

### 2.1.1 Fonte Emissora

A fonte de raios X é descrita como um plano de emissão nas coordenadas  $\vec{\xi}$ . Cada ponto do plano emissor ilumina os pontos  $(X, Y)$  da amostra, localizada a uma distância  $R_1$ . A

intensidade do campo eletromagnético medido em  $\vec{X}$  devido a um único emissor pontual é dado pela propagação de uma onda eletromagnética esférica [17]:

$$E(\vec{X}) = E_0 \frac{e^{ik|\vec{\xi}-\vec{X}|}}{|\vec{\xi}-\vec{X}|} \quad (2.1)$$

onde  $k$  é o número de onda definido como  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  e  $E_0$  a amplitude da onda no ponto de origem  $\vec{\xi}$ . Uma vez que a fonte não é pontual, cada elemento do plano emissor contribui para a iluminação do objeto com uma amplitude  $s(\vec{\xi})$ . Dessa maneira o campo elétrico no objeto será a resultante da contribuição de todas as fontes pontuais existentes no plano, ou seja:

$$E(\vec{X}) = \oint s(\vec{\xi}) \frac{e^{ik|\vec{\xi}-\vec{X}|}}{|\vec{\xi}-\vec{X}|} d\vec{\xi} \quad (2.2)$$

Esta expressão é válida apenas para fontes monocromáticas com comprimento de onda  $\lambda$ . Para fontes policromáticas, como é o caso dos tubos convencionais de raios X ou fontes síncrotrons, pode-se dizer que cada elemento emite com um espectro de emissão  $h(\lambda)$ . Supondo que o espectro de emissão é homogêneo ao longo do plano de emissão e acrescentando essa informação, a Equação 2.2 passa a ser:

$$E(\vec{X}) = \int h(\lambda) \oint s(\vec{\xi}) \frac{e^{ik(\lambda)|\vec{\xi}-\vec{X}|}}{|\vec{\xi}-\vec{X}|} d\vec{\xi} d\lambda \quad (2.3)$$

uma vez que o número de onda  $k(\lambda)$  da equação 2.1 depende de  $\lambda$ .

A parte imaginária da Equação 2.3 mostra que o campo elétrico possui uma fase associada para cada ponto do plano do objeto. A consequência é a existência de um intervalo de distâncias  $C_L$  no plano  $(X, Y)$  no qual as ondas estão em fase. Denomina-se  $C_L$  comprimento de coerência lateral. Esta grandeza é definida como a distância onde todas as frentes de ondas oriundas do plano emissor estejam defasadas de no máximo  $\pi/2$ . Mostra-se por meio do Teorema de van Cittert-Zernike que o comprimento de coerência lateral para uma fonte extensa monocromática é igual a [17, 18]:

$$C_L = \frac{R_1 \lambda}{2D} \quad (2.4)$$

onde  $R_1$  é a distância entre o objeto e a fonte e  $D$  é o diâmetro médio da fonte emissora com comprimento de onda  $\lambda$ .

A grandeza  $C_L$  depende linearmente com a distância  $R_1$  e é inversamente proporcional ao diâmetro da fonte  $D$ . Dessa maneira, quanto menor a dimensão da fonte, maior será a

região espacial no objeto em que a iluminação será coerente transversalmente para um dado comprimento de onda  $\lambda$ . Para a obtenção de imagens por contraste de fase é importante que a iluminação do objeto tenha um comprimento de coerência lateral mínimo (da mesma dimensão do detalhe a observado) de maneira que os efeitos de mudança de fase da onda possam produzir padrões de interferência no detector.

### 2.1.2 Interação com a amostra

Considera-se que o objeto possui dimensões reduzidas comparadas com as distâncias  $R_1$  e  $R_2$ . Ao passar pelo interior da amostra, os raios X sofrem os quatro processos descritos no Capítulo 1. Entretanto apenas a mudança de fase e a absorção são consideradas nesse caso. Tanto o espalhamento Compton incoerente quanto o espalhamento a baixo ângulo são desconsiderados.

Como descrito no primeiro capítulo, um objeto delgado com densidade  $\rho$  absorve fótons segundo a lei de Beer-Lambert [9,10]. Para um dado comprimento de onda, a absorção é linear e é dada pela relação  $e^{-\mu L}$ , onde  $\mu$  é o índice de atenuação por unidade de comprimento e  $L$  a espessura do material. Ao passar pela amostra, agora espessa, a perda de intensidade do feixe é dada pela integral da absorção ao longo do caminho radiológico na direção  $Z$ :

$$I(X, Y) = I_0(X, Y)e^{-\int \mu(X, Y, Z) dZ} \quad (2.5)$$

A absorção e a mudança de fase são descritos de maneira similar pela função transmissão  $q(X, Y)$  para cada ponto  $(X, Y)$  do plano do objeto, representando a variação da amplitude e da fase da onda incidente [22]:

$$q(X, Y) = e^{\frac{4\pi}{\lambda} \int -\beta(X, Y, Z) + i\delta(X, Y, Z) dZ} \quad (2.6)$$

onde o coeficiente de atenuação  $\mu(X, Y, Z)$  da Equação 2.6 é reescrito através do índice de refração complexo:

$$n = 1 - \delta + i\beta \quad (2.7)$$

Aqui,  $\beta$  representa a absorção e  $\delta$  a mudança de fase. Nessa representação,  $\beta$  equivale a  $\beta = \mu\lambda/4\pi$  e o termo  $\delta$  é a mudança de fase da onda por unidade de comprimento. Em um meio homogêneo  $\delta$  é dado por [5, 22]:

$$\delta = \frac{\lambda^2 r_e n_e}{2\pi} \quad (2.8)$$

com  $r_e = 2.818 \times 10^{-15} m$  o raio clássico do elétron e  $n_e$  a densidade eletrônica média do material.

Na tabela 2.1 apresentamos valores comuns de  $\delta$  e  $\beta$  para alguns compostos para energia do fóton de 8.04 keV (Cu  $K_\alpha$ ). No espectro de raios X convencional, o valor de  $\beta$  é da ordem de  $10^{-10} - 10^{-11} m^{-1}$  e  $\delta$  costuma ter valores da ordem de  $10^{-6} - 10^{-7} m^{-1}$ . A diferença de magnitude para  $\delta$  e  $\beta$  também é acentuada para materiais com interesse biológico. Na figura 2.2 mostramos como  $\beta$  e  $\delta$  se comportam para diversas energias no caso de tecido mamário e tecido ósseo. Observa-se que na maior parte do espectro de emissão de raios X, a parte real é três a quatro ordens de grandeza superior a parte imaginária de  $n$ .

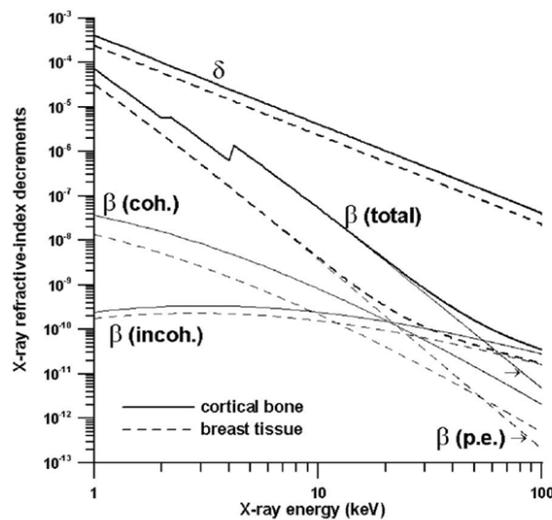


Fig. 2.2: Parte real e parte imaginária do índice de refração  $n$  para tecidos biológicos (tecido ósseo e tecido mamário) em função da energia do fóton. Observa-se que para o tecido ósseo e o tecido mamário  $\delta$  e  $\beta$  se diferenciam em várias ordens de grandeza. Figura obtida da referência [23].

Nas imagens convencionais de raios X observa-se a produção de contraste na imagem devido ao índice  $\beta$  do objeto e em geral a componente da mudança de fase é atenuada devido falta de coerência lateral descrita na secção 2.1.1. Entretanto, uma vez que  $\delta$  possui valores 1000 vezes superiores a  $\beta$ , a informação carregada pela componente de fase, uma vez medida, pode tornar as imagens de raios X sensíveis a estes efeitos.

Tab. 2.1: Tabela com valores de  $\delta$  e  $\beta$  para compostos químicos comuns e energia do fóton de 8 KeV.

Elemento	$\delta$ ( $10^{-6}$ )	$\beta$ ( $10^{-8}$ )
Teflon	6.77	3.35
Polipropileno	3.77	0.40

Assim, abre-se um campo de aplicação e estudo que é a obtenção de imagens de raios X por meio dos efeitos de contraste de fase quando há coerência espacial parcial da fonte de raios X.

### 2.1.3 Formação das Imagens no Detetor

Após a passagem pelo objeto, as ondas eletromagnéticas atingem o plano detetor a uma distância  $r_2$  e produzem um padrão de interferência devido a natureza ondulatória dos fótons de raios X. O campo elétrico em um ponto  $\vec{x}$  é governado pela integral de Fresnel-Kirchoff [17]:

$$\psi(\vec{x}) = A_0 \frac{i}{\lambda} \int \frac{e^{-ik|\vec{x}-\vec{X}|}}{|\vec{x}-\vec{X}|} d^2\vec{X} \quad (2.9)$$

Entende-se a equação de Fresnel-Kirchoff como um propagador que liga as ondas produzidas em um ponto  $\vec{X}$  até o ponto  $\vec{x}$  [17].

Colocando esta integral em coordenadas cartesianas ao longo do eixo  $Z$  e utilizando a aproximação de pequenos ângulos, obtêm-se uma expressão para a intensidade medida no detetor uma vez que sabemos os efeitos que acontecem no objeto e a iluminação no plano do objeto em virtude da equação 2.3. Se o plano do objeto está localizado em  $z = 0$ , o ponto  $\vec{x} = (x, y, r_2)$  corresponde a um pixel da imagem formada no detetor na posição  $(x, y)$  e  $\vec{X} = (X, Y, 0)$  corresponde a um ponto no plano do objeto. Podemos reescrever a equação 2.9 colocando a equação 2.1 em termos dessas coordenadas e assim obter uma expressão para a amplitude formada no detetor ao propagar a função transmissão  $q(X, Y)$  iluminada por uma fonte pontual localizada em  $\vec{\xi} = (\xi_x, \xi_y, -r_1)$  [9]:

$$\begin{aligned} \psi(x, y) &= A_0 \frac{i}{\lambda} \frac{e^{-ik(r_1+r_2)}}{r_1 r_2} \int e^{-ik(\xi_x-X)^2/2r_1} e^{-ik(x-X)^2/2r_2} \\ &\times \int e^{-ik(\xi_y-Y)^2/2r_1} e^{-ik(y-Y)^2/2r_2} q(X, Y) dX dY \end{aligned} \quad (2.10)$$

No momento da detecção o quadrado do módulo da amplitude,  $|\psi(x, y)|^2$  é medido. Além disso, podemos aproximar a fonte como um plano de emissão com intensidade  $s(\xi_x, \xi_y) = \frac{1}{\pi\sigma^2} e^{-(\xi_x^2 + \xi_y^2)/\sigma^2}$ . Esta aproximação é válida para fontes microfoco e pode ser estendida para fontes sincrotrons. Dessa maneira, a intensidade real  $I(x, y)$  medida no detetor é uma combinação de fontes pontuais emitindo o espectro  $h(\lambda)$ :

$$I(x, y) = \int h(\lambda) \int \int |\psi(x, y)|^2 s(\xi_x, \xi_y) d\xi_x d\xi_y d\lambda \quad (2.11)$$

de maneira que a descrição fenomenológica do processo de formação de imagens por contraste de fase é o resultado da integração de quatro variáveis: coordenadas do objeto, coordenadas da fonte emissora e distribuição espectral da fonte.

## 2.2 Efeitos de Fase nas Imagens e Aplicações Biomédicas

O contraste de fase é o resultado da interação de todos os fatores da equação 2.11 na geração do padrão de interferência no detetor. A mudança de fase  $\frac{2\pi}{\lambda} \int \delta(X, Y, Z) dZ$  adiciona uma componente a mais na formação da imagem além da absorção. Em geral, o efeito é o aparecimento de realces na imagem, especialmente nas interfaces do objeto, como mencionado no Capítulo 1.

Para amostras delgadas e homogêneas, negligenciando-se a absorção, a função  $q(X, Y)$  assume apenas a componente complexa  $q(X, Y) = e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} \delta T(X, Y)}$  onde  $T(X, Y)$  é a espessura da amostra. Pogani e Wilkins [9] mostraram que nesse regime, a imagem  $I(x, y)$  produzida através da iluminação de uma onda plana (equivalente a  $(\xi_x, \xi_y)$  estar no infinito), é uma função da Laplaciana da mudança de fase  $\phi(X, Y) = \delta T(X, Y)/\lambda$  nas direção do plano do objeto :

$$I(x = X, y = Y) = 1 - z \nabla^2 \phi(X, Y) \quad (2.12)$$

Assim, a ocorrência de um gradiente na fase ao longo do plano  $(X, Y)$  do objeto induz mudanças nas intensidades medidas no detetor. De maneira geral, toda borda de um objeto é um gradiente de fase e assim, um efeito nítido do fenômeno de contraste de fase é o aparecimento de contraste na borda no objetos.

Além disso, o contraste de fase pode ser entendido como um filtro no espaço de frequências. Tomando a equação 2.12 e aplicando a transformada de Fourier:

$$FT \{I(x, y)\} (u) \cong FT \{-\nabla^2 \phi(x, y)\} (u) \cong u^2 FT \{\phi(x, y)\} (u) \quad (2.13)$$

o resultado é um filtro passa alta no espaço de frequência do objeto devido as propriedades da transformada de Fourier com respeito a derivação e o surgimento do termo  $u^2$ . Assim, as imagens de raios X por contraste de fase atuam como um filtro de frequência, como pode ser visto na figura 2.3, realçando as altas frequências e dessa maneira as bordas e pequenas nuances do objeto [9].

O realce da interface de objetos com baixo contraste de absorção é apenas um dos aspectos da aplicação das imagens de raios X por contraste de fase. O fato de que  $\delta$  é 3 – 4 ordens de grandeza superior em magnitude com respeito a  $\beta$  implica em imagens de raios X com com contraste mais intensos, pois os efeitos oriundos da modulação da fase se destacam em relação a modulação por contraste de absorção [24].

A aplicação dos efeitos de fase no campo de imagens médicas é imediata, haja visto a preocupação em diminuir a dose de radiação entregue ao paciente em casos clínicos. Keyrilainem

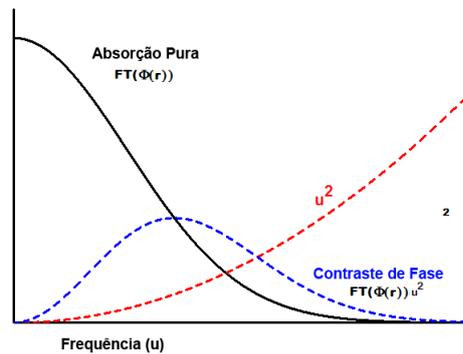


Fig. 2.3: Efeito do contraste de fase em uma imagem no espaço de Frequência. A densidade espectral da imagem original (linha cheia) passa por um filtro passa alta (linha tracejada) e o resultado é uma imagem com o pico da densidade espectral deslocada para altas frequências (linha pontilhada).

*et al.* reportaram um aumento no contraste da ordem de 10 vezes para algumas amostras [24]. Neste mesmo sentido, Bravin *et al.* [16] e Momose [25], argumentam que seria possível uma redução na radiação entregue ao paciente ao se utilizar feixes de raios X mais energéticos (acima de 100 keV) sem perda do contraste em relação ao ruído (CNR), pelo fato que  $\delta$  não se altera significativamente em altas energias quando comparado a  $\beta$ .

### 2.2.1 Recuperação da informação de Fase - Equação de Transporte de Intensidade

Embora os efeitos de borda e contraste sejam inerentes aos fenômenos de contraste de fase, em imagens convencionais e clínicas, ainda carece um entendimento analítico completo pelo fato de que as amostras, neste caso, são espessas e a densidade eletrônica sofre mudança ao longo do caminho radiológico. Além disso, a componente de fase é perdida na formação da imagem quando o termo de absorção não pode ser desprezado e a aproximação utilizada na obtenção da equação 2.12 não é válida.

Uma maneira de tratar a mudança de fase no interior de objetos extensos e recuperar o contraste de fase é reescrevendo as equações de Maxwell/Fresnell-Kirchoff sob a ótica de uma equação de transporte de intensidade (*TIE - Transport of Intensity Equation*). Esse método é conhecido como aproximação de Rytov [17] e para uma onda se propagando na matéria [26,27] a amplitude complexa  $\psi(r)$  é decomposta em uma função transversal  $I(r_{\perp})$  e uma fase  $\phi(z)$ . A solução sugerida tem o formato  $\psi(r) = I(r_{\perp}, z)e^{-\phi(r_{\perp}, z)}$  e neste caso a equação de onda passa a ser:

$$\nabla_{\perp} \cdot (I(r_{\perp}, z) \nabla_{\perp} \phi(r_{\perp}, z)) = -\frac{2\pi}{\lambda} \frac{\partial}{\partial z} I(r_{\perp}, z) \quad (2.14)$$

onde  $I(r_{\perp}, z)$  e  $\phi(r_{\perp}, z)$  correspondem a amplitude e fase da onda se propagando no plano do objeto, agora descrito pelas coordenadas  $(r_{\perp}, z)$ . Este formalismo traz vantagens quando comparado a equação de Fresnel-Kirchoff quando se diz respeito a recuperar a fase do objeto uma vez que as variáveis de integração estão dentro do próprio objeto que não é mais considerado delgado.

Para um espécime de constituição homogênea e espessura  $T(x, y)$  ao longo do plano do objeto  $(x, y)$  a intensidade e a fase medida na saída do objeto em  $z = 0$  podem ser aproximadas como  $I(r_{\perp}, z = 0) = I_0 e^{-\mu T(r_{\perp})}$  e  $\phi(r_{\perp}, z = 0) = -\frac{2\pi}{\lambda} \delta T(r_{\perp})$  [28]. Paganin *et al.* mostraram que o uso dessas condições de contorno na da equação de transporte de intensidade 2.14 implica na obtenção de uma equação analítica e precisa para recuperar a fase e portanto a espessura da amostra. Se  $I(r_{\perp}, z = R_2)$  é a intensidade medida no detetor a uma distância  $z = R_2$  do objeto localizado em  $z = 0$ , a espessura do objeto homogêneo é recuperada por [29]:

$$T(r_{\perp}) = -\frac{\lambda \phi(r_{\perp}, z = 0)}{2\pi \delta} = \frac{-1}{\mu} \cdot \log \left( F^{-1} \left\{ \frac{\mu F \{I(r_{\perp}, z = R_2)\} / I_0}{R_2 \delta |k|^2 + \mu} \right\} \right) \quad (2.15)$$

onde  $F$  e  $F^{-1}$  representam a transformada de Fourier direta e inversa, respectivamente,  $\mu$  é o coeficiente de absorção linear,  $\delta$  o índice de refração complexo e  $k$  é a frequência no espaço de Fourier [28, 29].

Nesta tese utilizamos o método desenvolvido por Paganin *et al.* para corrigir as imagens por contraste de fase obtidas com fonte síncrotron no Laboratório Nacional Argonne em Chicago nos Estados Unidos [30]. As imagens de contraste de fase foram utilizadas em reconstruções tomográficas, as quais serão tratadas no capítulo 5 e envolvem o estudo sistemático e quantitativo das características morfométricas de tecidos ósseos de ratos.

## 2.3 Simulação da Equação de Fresnel-Kirchoff

Como mencionado anteriormente, o processo de geração das imagens por contraste de fase envolve vários fatores e a descrição mais simples exige uma integração em quatro variáveis da equação 2.11. Fatores como o tamanho da fonte, comprimento de onda e distâncias entre fonte-objeto e objeto-fonte afetam a imagem final e resultados analíticos são obtidos apenas em situações específicas.

Um dos objetivos dessa tese foi compreender o funcionamento da integral de Fresnel-Kirchoff nesses vários domínios. Para tanto foi desenvolvido um código que pudesse simular a formação da imagem para um objeto com uma função transmissão  $q(X, Y)$  qualquer. Na literatura Guohua *et al.* [31] desenvolveram uma metodologia para encontrar a imagem  $I(x, y)$  no caso

de  $q(X, Y)$  ser separável e da forma  $q(X, Y) = q_x X \cdot q_y Y$ . Da mesma maneira [32] descreve um procedimento em que as integrais de Fresnel podem ser convertidas em transformadas de Fourier baseado em restrições do objeto e das distâncias  $r_1$  e  $r_2$ .

Neste trabalho partimos das equações 2.10 e 2.11 e colocamos como objetivo desenvolver o cálculo das equações de Fresnel-Kirchoff usando uma metodologia de cálculo tão próxima quanto possível de um cálculo físico de primeiros princípios (*ab-initio*). As integrais foram obtidas pelo método de integração analítica de Simpson e o algoritmo de simulação foi escrito em linguagem C++ (Código comentado no apêndice B).

Nesta implementação o número de pontos amostrados tanto do objeto quanto da imagem podem ser alterados dependendo da precisão desejada. Após testes sucessivos bons resultados foram encontrados para as dimensões do objeto entre  $10 \mu m$  e  $200 \mu m$  quando o mesmo é representado como um *grid* de 40000 pontos espaçados de  $0.01 \mu m$  e o detetor é um *grid* com 2000 pontos espaçados de  $2 \mu m$ .

### Influência do comprimento de onda no contraste de fase

Aplicamos o formalismo descrito acima para objetos simples e aqui descrevemos o caso de um cilindro ao longo da direção  $y$  no plano do objeto. O cilindro homogêneo de raio  $a = 50 \mu m$ , foi modelado como estando a  $r_1 = 15 cm$  da fonte, a uma distância  $r_2 = 60 cm$  do detetor e sendo constituído de um material com  $\delta = 10^{-6}$  e  $\beta = 0$ , portanto um objeto que não apresenta contraste de absorção, apenas contraste de fase.

Neste caso  $q(X, Y) = 1$  para regiões fora do objeto ( $|X| > a$ ). Para as regiões que compreendem o cilindro a fase muda proporcionalmente a espessura  $2a\sqrt{1 - (\frac{X}{a})^2}$  para  $|X| \leq a$  e  $q$  fica da forma  $q(X, Y) = e^{-\frac{4\pi}{\lambda}ia\sqrt{1 - (\frac{X}{a})^2}}$ . Na figura 2.4 mostramos como a fase muda ao longo do perfil do objeto para um cilindro com raio de  $50 \mu m$ ,  $\delta = 10^{-6}$  e  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ . Para uma fonte pontual o resultado é o perfil mostrado na figura 2.5. Observamos que nas bordas do cilindro ocorre o aparecimento de oscilações na intensidade da imagem projetado no detetor.

Para uma fonte monocromática extensa, essas oscilações são suavizadas devido ao *blurring* introduzido pelo fato de a fonte ser não pontual. Para uma fonte extensa com perfil de emissão Gaussiano e largura a meia altura da ordem de  $2\mu m$  os resultados da simulação estão mostrados na Figura 2.6 para três energias de emissão: 10 keV, 30 keV e 60 keV, respectivamente.

Podemos observar que a largura das oscilações na borda (largura do contraste) se tornam mais estreitas a medida que a energia do feixe aumenta, mas predominantemente não se observam variações acentuadas no intervalo de energias em que foi feito o cálculo e especialmente em energias mais altas. Entretanto a intensidade dos picos (máximos das oscilações na borda) aumentam em função da energia. Isso nos indica que se desejarmos observar contraste de fase

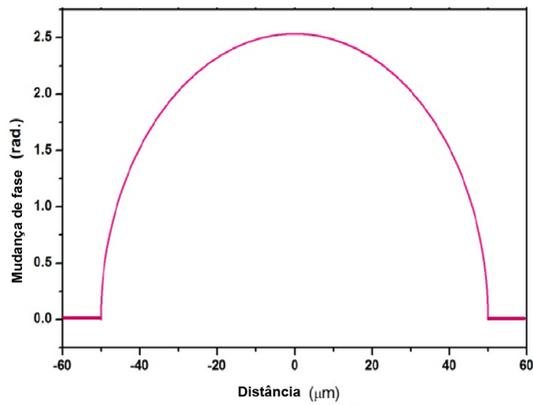


Fig. 2.4: Perfil da mudança de fase para um objeto cilíndrico orientado ao longo do eixo  $Y$ . A mudança de fase corresponde a um objeto homogêneo com  $\delta = 10^{-6}$  e  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ .

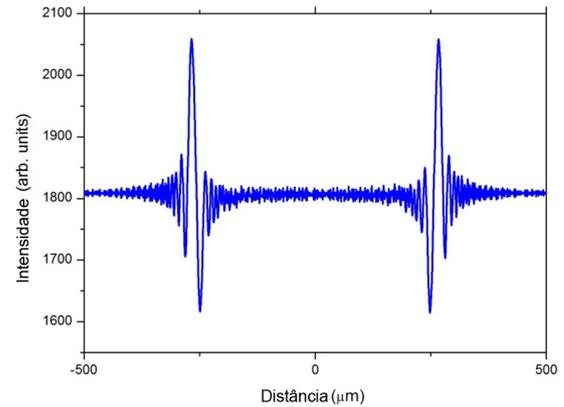


Fig. 2.5: Perfil da Imagem simulada para o cilindro descrito na Figura 2.4 com  $r_1 = 15\text{cm}$  e  $r_2 = 60\text{cm}$  e fonte pontual monocromática. O diâmetro da imagem final projetada é 4 vezes maior que o diâmetro do cilindro, mostrando a habilidade da equação de Fresnel-Kirchoff em descrever a magnificação de um objeto de fase. (Neste caso, aproximadamente 4.)

com altas energias necessitamos de detetores com tamanho de pixel menores quando comparados com energias mais baixas. Da mesma maneira fontes com feixes mais energéticos implicam que o sinal de contraste observado será maior caso o detetor tenha a mesma eficiência em altas energias em acordo com as observações apresentadas em [16] mencionadas na secção 2.2.

### Influência do diâmetro da fonte no contraste de fase

O tamanho da fonte de emissão desempenha papel fundamental na observação do contraste de fase pelo método de propagação. Apenas o advento de fontes de raios X com emissão limitada a alguns micrometros é que possibilitou a observação de imagens por contraste de fase. Na Figura 2.7 mostramos o cálculo do comportamento do mesmo cilindro iluminado com raios X de energia 10 keV para três diâmetros da fonte de emissão :  $2 \mu\text{m}$ ,  $6 \mu\text{m}$  e  $12 \mu\text{m}$ . Podemos observar que a medida de que o raio da fonte aumenta ocorre o alargamento das oscilações na borda do objeto. Ao mesmo tempo, a intensidade dos picos de máximo, quando normalizados, diminuem como esperado.

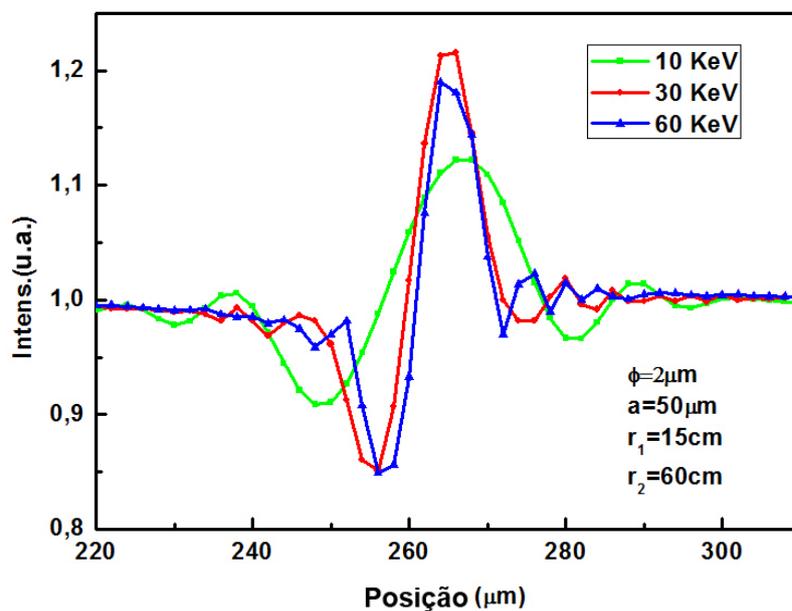


Fig. 2.6: Simulação do contraste de fase na borda do cilindro de raio  $a = 50 \mu\text{m}$  iluminado com fonte monocromática de diâmetro  $4 \mu\text{m}$  para diferentes energias: 10 keV, 30 keV e 60 keV.

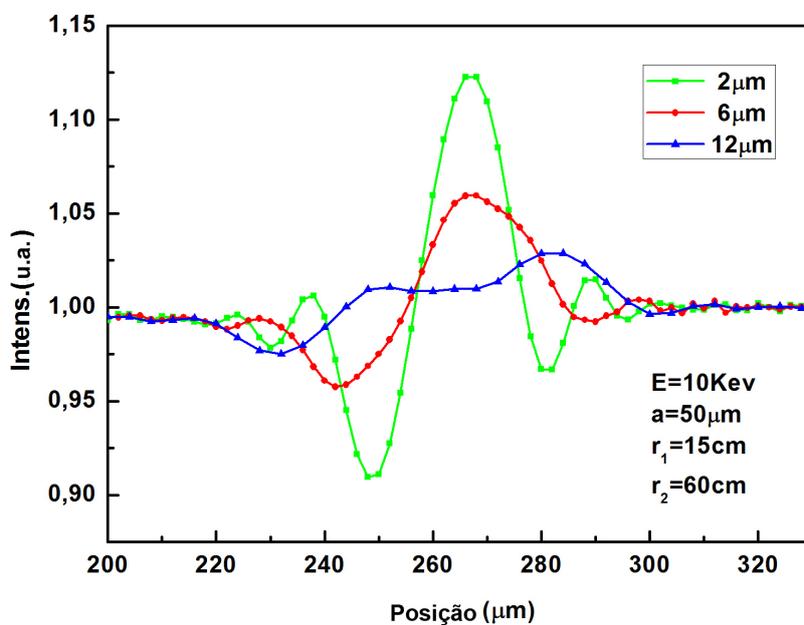


Fig. 2.7: Simulação do Contraste de Fase para a borda de um cilindro de raio  $a = 50 \mu\text{m}$  iluminado com fonte monocromática de energia 10 keV e aberturas de 2, 6 e  $12 \mu\text{m}$ .

## Capítulo 3

# Microtomografias de raios X

A palavra tomografia se origina da união do prefixo grego "*tomos*" e do sufixo "*graphya*" que significam "secção, corte" e "escrever", respectivamente. Essa conotação foi introduzida em trabalhos subsequentes a radiografia de Roentgen [1] onde se buscava mapear secções específicas do interior de um objeto em filmes radiográficos convencionais. Essas técnicas ficaram conhecidas como Planografia ou Laminografia e foram desenvolvidas nas primeiras décadas século XX [33].

As reconstruções tomográficas computadorizadas propriamente ditas foram desenvolvidas após a segunda metade do século XX por Allan Cormack e Godfrey Hounsfield [34]. Como o nome sugere, nas reconstruções tomográficas obtêm-se um conjunto de imagens que representam a densidade em certas secções de um objeto e portanto podem ser entendidas como cortes seccionais do mesmo. O conjunto dessas secções ou planos reproduzem virtualmente o objeto nas três dimensões.

As primeiras reconstruções tomográficas computadorizadas foram utilizadas como técnicas clínicas e naturalmente avanços foram realizados com objetivo de melhorar a qualidade das mesmas incluindo novos algoritmos, novas formas de processamento [35, 36] bem como diferentes formas de extração de dados e novos *setup* experimentais. Estes avanços culminaram, posteriormente, no reconhecimento de Hounsfield e Cormack com prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1979 devido a importância dessa técnica nas aplicações para o diagnóstico médico [37].

Paralelamente, as microtomografias adquiriram espaço como técnicas científicas de caracterização e em especial, com o advento de fontes síncrotron, da microscopia de raios X e fontes de raios X microfoco possibilitou-se a utilização dessa técnica em escalas micrométricas como ferramenta de estudo em biomedicina, paleontologia, ciência dos materiais e biologia [38, 39]. Historicamente, a primeira citação da técnica da microtomografia de raios X aparece no traba-

lho de Elliot e Dover [40] como o conjunto de técnicas que utilizam a reconstrução tomográfica por raios X na obtenção de imagens tridimensionais de objetos em escalas milimétricas e micrométricas.

Uma característica importante da técnica de microtomografia é ser uma ferramenta não destrutiva e não invasiva. Obter informações quantitativas do objeto sem a perda do mesmo é de grande relevância. As amostras podem conter valor histórico, econômico ou exigir estudos posteriores através de outras técnicas. Ao mesmo tempo, a ausência de preparação prévia da amostra e o volume da mesma não ser um fator restritivo na maioria dos casos, faz dessa técnica uma ferramenta de análise robusta em diversas áreas do conhecimento.

Na área de paleontologia, as microtomografias tem sido utilizadas como ferramentas de análise de fósseis de interesse científico [41]. A utilização dos raios X como elemento de sonda possibilita que fósseis e artefatos paleontológicos de interesse geológico sejam analisados e não destruídos durante o processo. Na biologia encontramos aplicações no estudo de pequenos animais e insetos à procura de aspectos morfológicos [42, 43]. Nesse caso a preservação do espécime também é importante pois estudos subsequentes ou *in vivo* ao longo de um intervalo de tempo podem ser necessários.

Na área da ciência dos materiais encontramos um campo fértil de aplicações tanto do ponto de vista da caracterização como do estudo de processos dinâmicos como fratura, fadiga e cisalhamento de novos compostos, objetos porosos e ligas metálicas bem como a dinâmica de fluídos em interfaces [44, 45]. Além disso, grandezas morfométricas como dimensão fractal ou conectividade em microestruturas são facilmente obtidas de modo que as microtomografias possuem aplicação direta em áreas interdisciplinares do conhecimento [46].

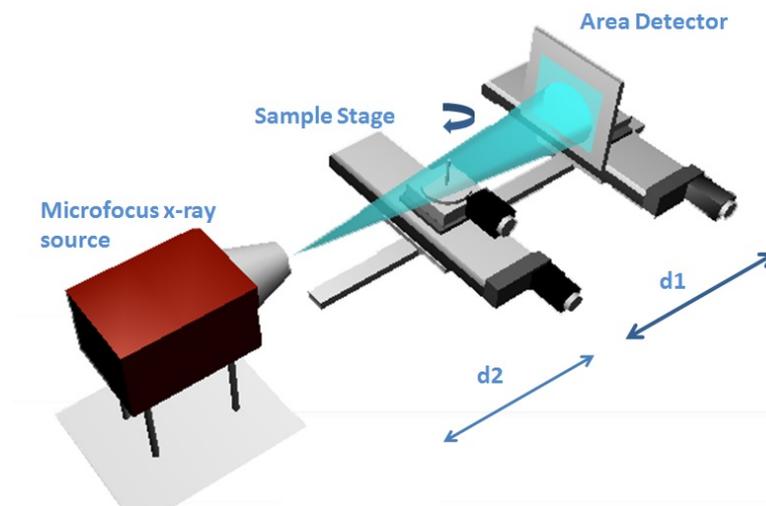


Fig. 3.1: Microtomografia de raios x. A fonte ilumina o objeto que projeta um padrão (projeção tomográfica) no detector. Ao rotacionar o objeto e coletar múltiplas imagens do mesmo obtém-se um conjunto de dados usados na reconstrução tomográfica. Adaptado de [47].

Parte dessa tese consistiu no desenvolvimento da instrumentação e implementação de uma estação de microtomografia bem como de algoritmos para reconstrução tomográfica no Laboratório de Cristalografia e Aplicações de Raios X do Instituto de Física Gleb Wataghin - Unicamp, trabalho este que descrevemos nesse capítulo [47]. Inicialmente apresentamos os aspectos teóricos envolvidos nas reconstruções tomográficas passando então para a descrição dos desenvolvimentos e implementações realizadas. Por fim, abordamos exemplos de aplicação da técnica com o objetivo de caracterizar a instrumentação.

## 3.1 Reconstruções Tomográficas

Na Figura 3.1 mostramos o diagrama de um *setup* experimental frequentemente utilizado e implementado nessa tese. Uma fonte de raios X ilumina um objeto com feixe cônico e policromático. A absorção dos fótons de raios X na amostra produz uma imagem ou projeção tomográfica no detetor digital. Rotaciona-se o objeto de maneira a se acumular um conjunto de imagens ou projeções em intervalos angulares regulares e por meio de um algoritmo de reconstrução obtém-se uma reconstrução virtual e tridimensional do mesmo [39].

### 3.1.1 Transformada de Radon

Reconstruir as características físicas de um objeto extenso é possível graças ao conceito matemático adjunto a transformada de Radon. Esta relação matemática foi introduzida no início do século XX por Johan Radon e foi o ponto de partida para as reconstruções tomográficas de Cormack e Hounsfield [48]. Dada uma função  $f(x, y)$  em duas dimensões que representa uma grandeza física no plano  $z = z_0$ , a transformada de Radon  $R\{f(x, y)\}(\theta, r)$  é definida como [39]:

$$R\{f(x, y)\}(\theta, r) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t \sin \theta + r \cos \theta, -t \cos \theta + r \sin \theta) dt \quad (3.1)$$

A transformada de Radon pode ser interpretada como uma integral de linha da função  $f(x, y)$  ao longo do caminho  $\Gamma_r$  definido por  $x(t) = t \sin \theta + r \cos \theta, y(t) = -t \cos \theta + r \sin \theta$ . Na Figura 3.2 mostramos uma família de caminhos  $\Gamma_r$  para múltiplos parâmetros  $r$  e para o ângulo  $\theta$ . A integral de Radon ao longo das linhas em azul resultam em uma função projeção  $P_\theta(r)$ .

A família de projeções  $P_\theta(r)$  está ligada a função  $f(x, y)$  pelo teorema da projeção de Fourier. Tomando a transformada de Fourier da equação 3.2 que define  $P_\theta(r)$  :

$$P_\theta(k) = F\{P_\theta(r)\}(k) = \int_{-\infty}^{+\infty} P_\theta(r) e^{-ikr} dr = \quad (3.2)$$

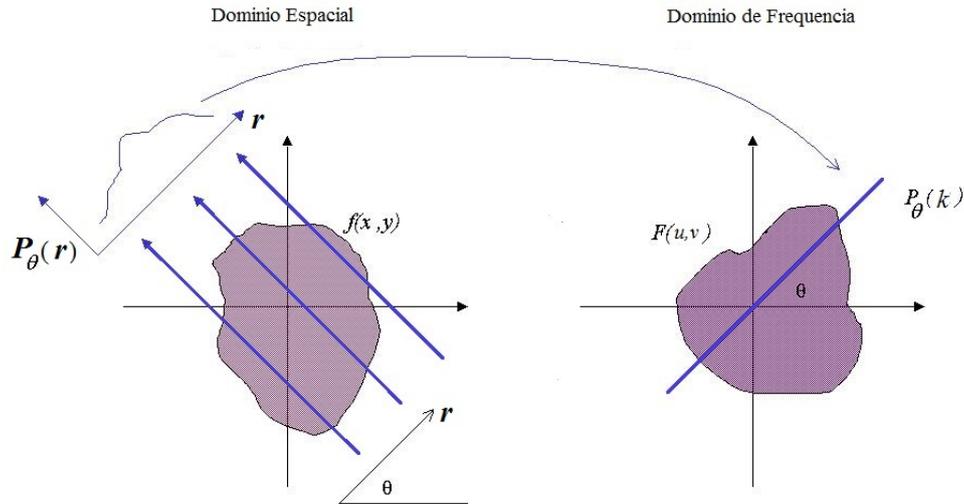


Fig. 3.2: Transformada de Radon e Teorema da Projeção de Fourier. A transformada de Fourier da projeção de  $f(x, y)$  no ângulo  $\theta$  é idêntica a transformada de Fourier de  $f(x, y)$ ,  $F(u, v)$  ao longo da reta  $u = r \cos \theta, v = r \sin \theta$  no espaço de frequência. Adaptado de [49].

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(t \sin \theta + r \cos \theta, -t \cos \theta + r \sin \theta) e^{-ikr} dr dt \quad (3.3)$$

Rescrevendo as coordenadas  $r$  e  $t$  por meio da transformação:

$$\begin{aligned} x(t, r) &= t \sin \theta + r \cos \theta \\ y(t, r) &= -t \cos \theta + r \sin \theta \end{aligned} \quad (3.4)$$

e invertendo-se este sistema de equações para encontrar  $dx$  e  $dy$ , obtém-se a identidade [38,39]:

$$P_{\theta}(k) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) e^{ixk \cos \theta + iyk \sin \theta} dx dy \quad (3.5)$$

Mostrando que a transformada de Fourier  $P_{\theta}(k)$  é idêntica a transformada de Fourier  $F(u, v)$  ao longo da reta  $u = k \cos \theta, v = k \sin \theta$  como representado na Figura 3.2. Dessa maneira, para reconstruir a função  $f(x, y)$  basta que seja obtido um conjunto de projeções  $P_{\theta}(r)$  e os espectros no espaço de Fourier sejam colados ao longo do plano  $F(u, v)$ .

A conexão entre o teorema da projeção, estritamente matemático, e as reconstruções tomográficas ocorre pelo fato de que toda imagem por absorção de raios X é uma transformada de Radon atuando sobre o coeficiente de atenuação linear  $\mu(x, y, z)$  (Capítulo 2). Se os efeitos de contraste de fase e difração são desprezíveis a imagem no detetor segue a equação de

Beer-Lambert (equação 2.6 do Capítulo 2) e para o arranjo mostrado na Figura 2.1:

$$\log \frac{I(x, y)}{I_0(x, y)} = - \int_{-\infty}^{+\infty} \mu(x, y, z) dz \quad (3.6)$$

A integral da equação 3.6 é idêntica a transformada de Radon para o ângulo  $\theta = 0$  no plano  $YZ$  daquela figura. Assim, ao se tomar o logaritmo de  $I(x, y)/I_0(x, y)$  automaticamente obtemos a transformada de Radon para  $\mu(x, y, z)$  e dessa forma podemos reconstruir esta grandeza [38,39] através de sucessivas projeções para diferentes ângulos de rotação do objeto.

### 3.1.2 Filtered Back Projection

Uma forma computacionalmente mais simples de reconstruir o objeto é através do método da retro projeção filtrada (*Filtered Back Projection-FBP*) onde a reconstrução é realizada pela projeção inversa de  $P_\theta(r)$ . Este método tem como base o fato de que uma secção do objeto  $f(x, y)$  no espaço real é dada pela transformada de Fourier:

$$f(x, y) = \int \int F(u, v) e^{2\pi i(xu+yv)} du dv \quad (3.7)$$

Se introduzimos a mudança de variável  $u = k \cos \theta$  e  $v = k \sin \theta$  na equação acima, esta adquire a forma:

$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_0^\pi F(k \cos \theta, k \sin \theta) e^{2\pi i(xk \cos \theta + yk \sin \theta)} |k| d\theta dk \quad (3.8)$$

Sabemos por meio do teorema da projeção que  $P_\theta(k) = F\{P_\theta(r)\}(k) = F(k \cos \theta, k \sin \theta)$ . Colocando essa identidade na equação acima encontramos:

$$f(x, y) = \int_0^\pi \int_{-\infty}^{+\infty} |k| P_\theta(k) e^{2\pi i(xk \cos \theta + yk \sin \theta)} dk d\theta \quad (3.9)$$

A integral em  $k$  pode ser interpretada como a transformada inversa de Fourier da função  $|k| P_\theta(k)$  no ponto  $-(x \cos \theta + y \sin \theta)$ . Sabemos também, pelo teorema da convolução, que a integral da multiplicação de duas funções no espaço de frequência é uma convolução no espaço real. Uma vez que  $P_\theta(k)$  tem a forma  $P_\theta(r)$  no espaço real, se denominamos  $H(r)$  a transformada de Fourier inversa de  $H(k) = |k|$ , a equação 3.9 pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$f(x, y) = \int_0^\pi H \star P_\theta(x \cos \theta + y \sin \theta) d\theta \quad (3.10)$$

assim,  $f(x, y)$  é equivalente a projeção estereográfica ao longo do ângulo  $\theta$  da convolução de

$P_\theta(r)$  pela função filtro  $H(r)$  nos pontos  $r = x \cos \theta + y \sin \theta$ . Na Figura 3.3 mostramos a forma do filtro de frequência  $H(r)$  (função rampa) aplicado a  $P_\theta(r)$  previamente a projeção inversa.

### Filtragem e Eliminação do Ruído

Em um sistema ideal as medidas de  $P_\theta(r)$  não possuem ruído. Entretanto em sistemas reais o ruído produzido pela instrumentação introduz componentes de alta frequência nas projeções. O filtro rampa, preliminar a projeção filtrada, induz o enaltecimento das altas frequências e a amplificação deste ruído na reconstrução tomográfica de  $f(x, y)$ . Para contornar este problema modula-se o filtro rampa buscando uma atenuação das componentes de alta-frequência. A apodização das altas frequências pode ser obtida de várias maneiras e diferentes filtros são descritos na literatura [38,39].

Entre os filtros mais comuns destacamos o filtro de Hanning [38], que mostramos na Figura 3.3. Este filtro consiste de uma função da forma  $H(k) = (1 + \cos \frac{2\pi k}{k_c})/2$ , para  $|k| \leq k_c$  e  $H(k) = 0$ , para  $k \geq k_c$ , onde  $k_c$  é a frequência de corte. Todas as componentes com frequência acima de  $k_c$  são excluídas e assim o ruído final da reconstrução é reduzido.

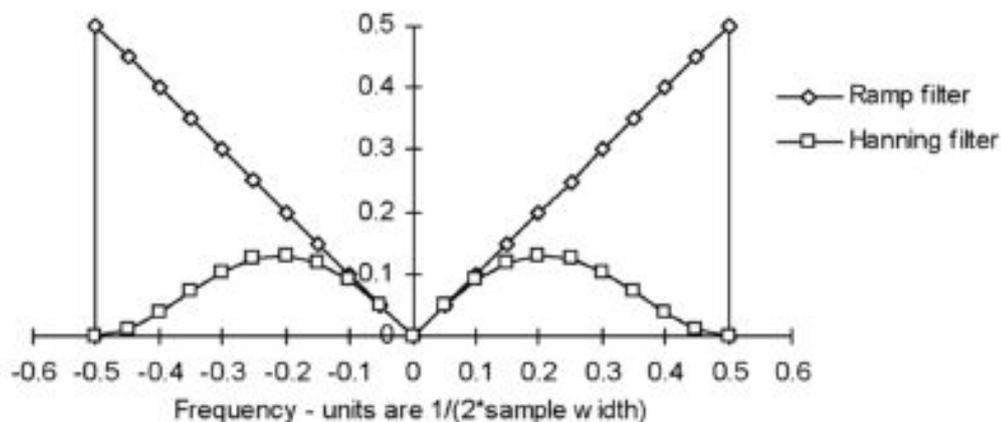


Fig. 3.3: Gráfico do filtro linear no espaço de frequência  $H(k) = |k|$ , utilizado no algoritmo FBP e o filtro de Hanning onde o filtro linear é atenuado em alta-frequências. Adaptado de [50].

### Correção para feixe Cônico

A emissão de raios X ocorre ao longo de todo o ângulo sólido  $4\pi$  no ponto focal de emissão na superfície do anodo emissor. Em geral, o feixe é colimado na saída do tubo de modo a formar um leque ou um cone com divergência característica. No limite em que o objeto e detector estão longe da fonte emissora podemos considerar o feixe cônico como sendo aproximadamente paralelo e as equações da secção anterior são válidas, pois a divergência do feixe,  $\delta = \frac{L}{l_1+l_2}$  é

pequena. À medida que se aproxima o amostra da fonte ocorre um aumento na magnificação, como discutido no Capítulo 1. Entretanto, perde-se o regime de feixes paralelos e o método FBP necessita de correções no momento da reconstrução.

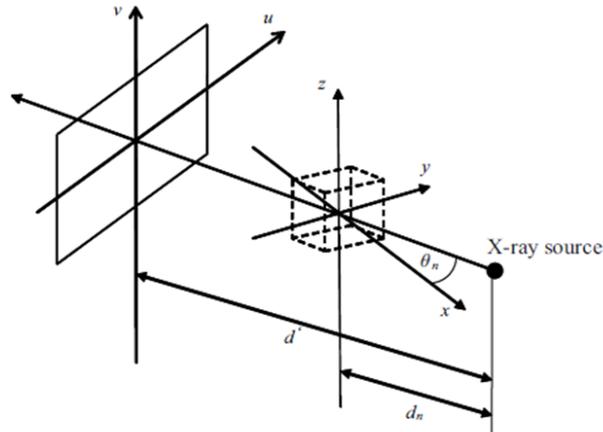


Fig. 3.4: Representação geométrica dos parâmetros utilizados na reconstrução tomográfica para a correção Feldkmap-Davis-Kress. A projeção adquire as coordenadas  $(u, v)$ , o objeto é descrito com as coordenadas  $(x, y, z)$  e as distâncias objeto-amostra e objeto-fonte são  $d'$  e  $d_n$  respectivamente. Imagem obtida da referência [51].

O algoritmo FBP é corrigido através do modelo desenvolvido por Feldkamp-Davis-Kress [35]. Esta correção é válida para um intervalo amplo de magnificações e uma descrição do tratamento matemático envolvido na correção pode ser encontrado com detalhes nas referências [35, 39].

Recupera-se o objeto, ou a função  $f(x, y, z)$ , através das projeções  $P_\theta(u, v)$ , como mostrado na Figura 3.4. Na reconstrução por feixes paralelos cada secção do objeto no plano  $z = z_0$  é obtido através da sua projeção respectiva  $P_\theta(r)$ . No caso da correção FDK é necessário a utilização de toda a informação contida no plano de projeção  $(u, v)$  pois o feixe cônico carrega informações dos planos adjacentes ao plano a ser reconstruído.

Feldkamp-Davis-Kress mostraram que é possível recuperar  $f(x, y, z)$  através das relações:

$$f(x, y, z) = \sum \frac{1}{2\pi K} W(x, y, \theta_n) \hat{P}_{\theta_n}(u(x, y, \theta_n), v(x, y, z, \theta_n)) \quad (3.11)$$

onde é introduzida uma correção  $W(x, y, \theta_n)$  na projeção  $\hat{P}_{\theta_n}(u, v)$ :

$$W(x, y, \theta_n) = \left( \frac{d_n}{d_n - x \cos \theta_n - y \sin \theta_n} \right)^2 \quad (3.12)$$

e uma transformação de coordenadas:

$$u(x, y, \theta_n) = \frac{d'(-x \cos \theta_n + y \sin \theta_n)}{d_n - x \cos \theta_n - y \sin \theta_n} \quad (3.13)$$

$$v(x, y, z, \theta_n) = \frac{d'z}{d_n - x \cos \theta_n - y \sin \theta_n} \quad (3.14)$$

Nestas equações  $d'$  é a distância entre o objeto e o detetor,  $d$  a distância entre objeto e a fonte e  $\hat{P}_\theta(u, v)$  é a projeção  $P_\theta(u, v)$  filtrada no espaço de frequência por um dos filtros descritos na secção 3.1.2 em ambas as direções.

## 3.2 Desenvolvimento de um Microtomografo e Rotinas de reconstrução.

A aquisição de dados de tomografia é um processo que pode ser dividido em três etapas:

1. Aquisição de um conjunto de projeções  $P_\theta(u, v)$ .
2. Reconstrução do objeto  $f(x, y, x)$  virtualmente.
3. Visualização e extração de dados relevantes.

No contexto hospitalar, para a aquisição de um conjunto de projeções tomográficas, o objeto(paciente) permanece fixo e ambos detetor e fonte se movimentam. Detetor e fonte, em geral, descrevem uma trajetória helicoidal em torno do objeto [38]. No caso das microtomografias utiliza-se uma montagem semelhante a aquela mostrada na Figura 3.1. Este *setup* consiste em um detetor de área bidimensional fixo (3), um porta amostra com estágio de rotação acoplado (2) e uma fonte de raios X do tipo microfoco (1). Neste caso, a resolução espacial depende de três fatores: 1- Magnificação; 2-Tamanho do ponto focal de emissão; e 3-Tamanho do pixel do detetor.

Na Figura 3.5 e na Figura 3.6 mostramos a fonte de raios X, o porta amostra, o detetor de área e uma imagem do primeiro sistema desenvolvido no Laboratório de Cristalografia de Raios X.

### 3.2.1 Instrumentação Para Aquisição de Projeções

Na implementação do sistema de aquisição de microtomografias utilizamos os detetores digitais CMOS modelos RadIcon-HR e RadIcon-4K da fabricante Rad-Icon [52]. Uma imagem dos detetores é mostrada na Figura 3.5 (b) e (c). Estes detetores possuem sensibilidade para feixes de raios X com energias entre 8 keV e 150 keV e o método de detecção é indireto consistindo de um filme cintilador sobre a matriz de detecção de luz visível. O detetor HR possui tamanho de pixel de  $22.5 \mu\text{m}$  e uma matriz de  $1200 \times 1600$  pixels. O modelo 4K possui tamanho do pixel de

48  $\mu\text{m}$  e é composto de uma matriz de 2000 x 2048 pontos. Com estas especificações é possível a obtenção de reconstruções tomográficas da ordem de 2000 x 2000 x 2000 voxels. Ambos os detetores são conectados a um computador pessoal por meio de uma placa da captura de vídeo (Frame Grabber PCI PXD-1000). O tempo de aquisição de cada projeção é controlado por meio desse componente e esta por sua vez opera entre intervalos de aquisição de 30 ms e 6700 ms.

Todo o sistema foi montado em uma cabana blindada previamente existente no laboratório. Ambos, detetor e estágio de rotação, foram montados em um sistema de trilhos de maneira a possibilitar a escolha das distâncias  $d_1$  e  $d_2$  (Capítulo 2) e assim a magnificação do objeto  $M = \frac{d_1+d_2}{d_1}$  bem como o regime de imagem.

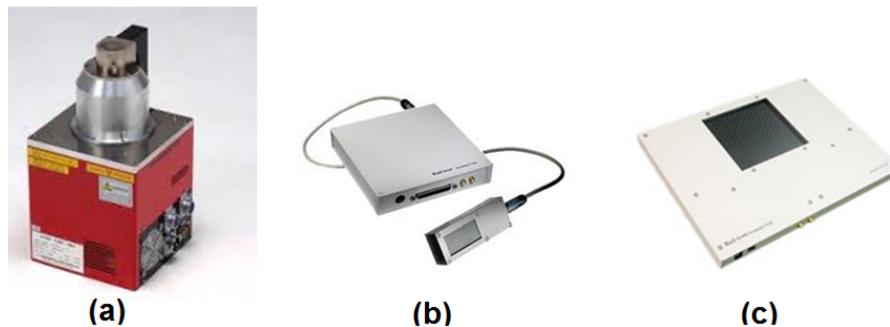


Fig. 3.5: Equipamento utilizados na montagem da estação de microtomografias [52, 53]: a) Fonte Microfoco Hamamatsu HL-6180. (b) Detetor CMOS RadIcon HR. b) Detetor RadIcon CMOS 4K.

Utilizamos uma fonte microfoco Hamamatsu modelo HL-6180 como fonte geradora de raios X (Figura 3.5-a). Esta fonte opera com potência de saída de 8 W e a tensão no tubo pode ser ajustada entre 40 kV e 130 kV. O diâmetro do foco de emissão é inferior a 5  $\mu\text{m}$  e o alvo é constituído de um filme de Tungstênio montado sobre uma janela de Berílio [53] produzindo o espectro de emissão característico do Tungstênio.

## Controle

O controle do estágio de rotação e da aquisição das projeções foi implementado por meio de um *script* escrito na plataforma de desenvolvimento National Instruments LabView [54]. O algoritmo em uma primeira etapa inicializa a *Frame Grabber* PXD-1000 e o sistema de controle dos motores de passo do porta amostra. Em seguida as projeções são adquiridas por meio da segunda etapa: coleta-se uma projeção e a amostra é rotacionada para cada intervalo de ângulo especificado até obtenção de todas as projeções no intervalo de rotação de 180 graus para o regime de feixe paralelo ou 360 graus para o regime de feixe cônico.

Em uma etapa anterior à aquisição das projeções, coletamos um conjunto de imagens de

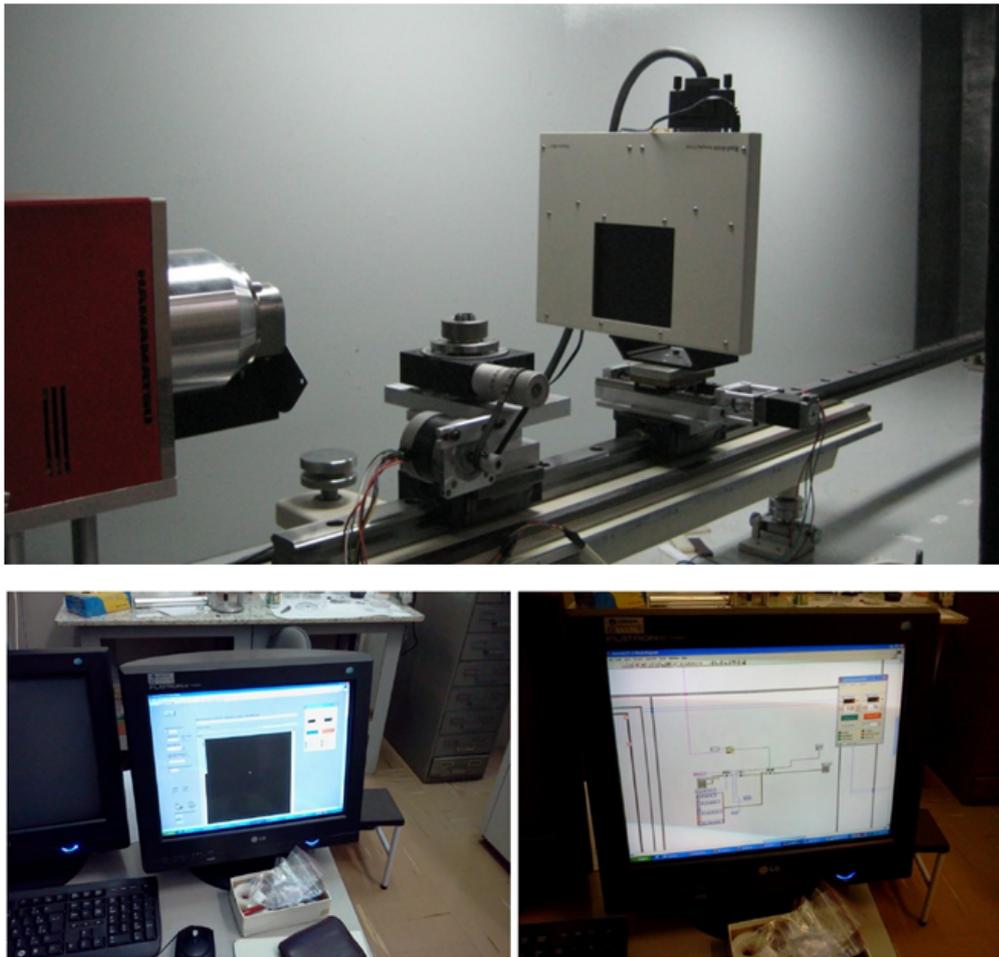


Fig. 3.6: Visão do sistema de microtomografias implementado. Na figura, acima, imagem interior mostrando a fonte de raios X microfoco, o estágio de rotação e porta amostra e a direita o detector de área Rad-Icon 4K. Na parte inferior: imagem do sistema de controle escrito em LabView.

campo claro (*Bright Field*) e de campo escuro (*Dark Field*) e cada imagem da amostra é normalizada por meio da expressão:

$$P_{\theta}(u, v) = -\log \left\{ \frac{I_{\theta}(u, v) - I_{DF}(u, v)}{I_{BF}(u, v) - I_{DF}(u, v)} \right\} \quad (3.15)$$

onde  $I_{DF}(u, v)$  é a imagem de campo escuro,  $I_{BF}(u, v)$  a imagem de campo claro e  $I_{\theta}(u, v)$  a imagem coletada para o ângulo  $\theta$ . Nesta nomenclatura  $P_{\theta}(u, v)$  seria a transmissão normalizada da amostra.

Tanto as projeções como as imagens de campo escuro e campo claro são armazenadas individualmente como uma imagem binária em formato .RAW com 16 bits por pixel para os níveis de cinza.

A mecânica do estágio de rotação foi escolhida de modo a obter avanços de até  $0.05^{\circ}$  e

assim microtomografias com até 7600 projeções. Inicialmente utilizamos um estágio de rotação montado no próprio laboratório. Em seguida o *setup* foi melhorado introduzindo-se um estágio de rotação Physik Instrumente PI-688 controlado pelo módulo eletrônico PI-638 também da mesma fabricante [55]. Na Figura 3.7 mostramos a montagem final com estes controladores.

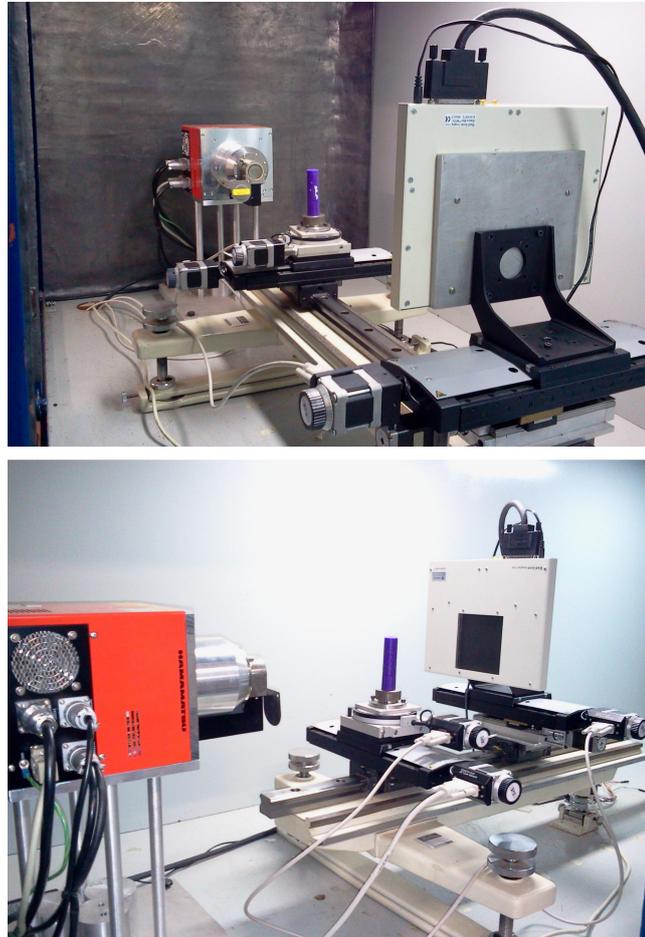


Fig. 3.7: Visão do sistema de aquisição de microtomografias otimizado. Adaptado de [47].

### 3.2.2 Algoritmo de reconstrução

Para este propósito utilizamos os algoritmos FBP e FDK como descritos anteriormente. A reconstrução das microtomografia se assemelha aos métodos utilizados nas tomografias convencionais com exceção de alguns detalhes técnicos específicos.

Um fator decisivo é o volume de dados obtidos em uma projeção tomográfica. Por se tratar de reconstruções em alta resolução espacial é necessário a implementação de rotinas próprias de reconstrução que otimizem memória e tempo de processamento da CPU. No método FBP o algoritmo de reconstrução tem complexidade  $N^4$  onde  $N$  é o número de pixels em uma

direção do detetor. No caso da reconstrução para feixe cônico ocorre a necessidade de cálculos adicionais que podem incrementar a complexidade do algoritmo em mais uma ordem. Além disso, do ponto de vista acadêmico é interessante a criação e utilização de plataformas próprias que possibilitem adaptações e testes aos algoritmos bem como de técnicas de processamento previamente existentes.

Com estas considerações escrevemos rotinas de reconstrução tomográfica para o *setup* implementado nesse trabalho. Seguimos a implementação numérica descrita nas referências [51] e [39]. Inicialmente desenvolvemos *script* para a plataforma MathWorks Matlab [56]. Posteriormente implementamos os mesmos algoritmos em linguagem C++ para a melhoria no desempenho e tempo de reconstrução. Os algoritmos utilizam o formalismo para feixe paralelo bem como feixe cônico. No Apêndice C mostramos o código fonte em Matlab para a reconstrução na condição de feixes paralelos.

## Descrição Geral

O programa carrega as projeções tomográficas na memória volátil da unidade de processamento. Os filtros rampa e a correção das projeções para o algoritmo FDK são realizadas no espaço de frequência através da transformada de Fourier de cada projeção individual, aplicação do filtro e recuperação da projeção no espaço real por meio da transformada de Fourier inversa. Nesta etapa utilizamos a biblioteca numérica para transformadas de Fourier discretas FFTW (*Fast Fourier Transform in the West*) escrita em linguagem C [57, 58]. Este pacote é disponibilizado gratuitamente através da licença GNU e é utilizado amplamente pela comunidade científica [59].

## Centralização dos Tomogramas

A magnificação  $M$  está associada a distância entre fonte-objeto,  $d_1$  e a distância objeto-detetor,  $d_2$  que nesse arranjo é flexível, pois tanto detetor como porta amostra correm livre sobre o trilho central. Decorre que o centro de rotação do objeto com respeito ao centro do detetor não é fixo devido ao *backlash* associado as partes mecânicas. Dessa maneira é necessário que o centro de rotação do objeto seja determinado toda vez que se altera experimentalmente as distâncias  $d_1$  e  $d_2$ . A negligência disso resulta no aparecimento de artefatos nas reconstruções em forma de  $U$  (*U-shaped artifacts*) como pode ser observado na figura 3.8.

Para contornar esse problema alguns métodos são descritos na literatura. Na referência [60] o centro de rotação é determinado a partir do centro de massa  $c_m(v, \theta)$  ou momento de inércia da linha  $v$  que na condição de feixe paralelo é dada por:

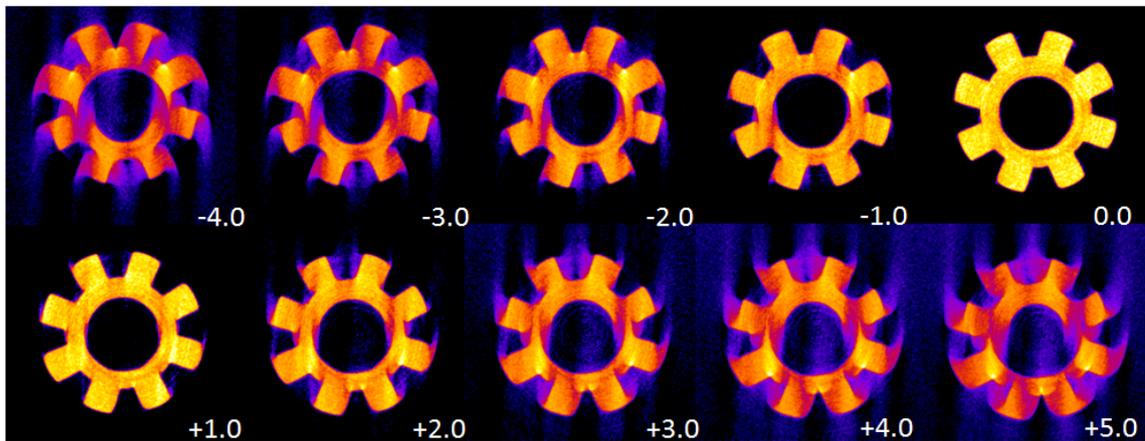


Fig. 3.8: Reconstrução do corpo de prova mostrado na Figura 3.10. A numeração indica o desalinhamento do centro de rotação e do centro da projeção (em números de pixels desalinhado).

$$c_m(v, \theta) = \frac{\sum_u P_\theta(u, v)u}{\sum_u P_\theta(u, v)} \quad (3.16)$$

O centro de massa é uma grandeza própria do objeto e determina-se o centro de rotação através da média de  $c_m(v, \theta)$  ao longo das  $N$  projeções em  $\theta$ :

$$cr(v) = \frac{\sum c_m(v, \theta)}{N} \quad (3.17)$$

Esta técnica encontra o centro de rotação com precisão em casos onde o contraste de fase ou sinais de espalhamento não estão presentes. Os efeitos de contraste de fase introduzem erros no cálculo de  $c_m(v, \theta)$  devido aos efeitos de borda descritos no capítulo anterior. Outros métodos tentam eliminar esse problema por meio de algoritmos iterativos como descrito na referência [61]. Entretanto, o resultado destes métodos depende das dimensões do pixel do detetor, tamanho da amostra e resolução desejada. Em escalas micrométricas ou sub-micrométricas o método usual ainda é a comparação visual. O centro de rotação é determinado por um dos métodos descritos acima e realiza-se um refinamento visual na sequência.

Nas reconstruções descritas nessa tese utilizamos o método do centro de massa. Para magnificações da ordem de  $M \leq 4$  este método se demonstrou robusto e no caso de reconstruções com magnificações maiores utilizamos o refinamento visual como descrito anteriormente.

### Artefatos em Anel

Natural às reconstruções tomográficas são os artefatos em anel (*Ringing Artifacts*). Estes artefatos aparecem devido a não linearidade de um conjunto de pixels do detetor e se caracterizam por anéis nas secções reconstruídas. Na Figura 3.9 (a) mostramos uma secção transversal

de um corpo de teste onde esses artefatos aparecem e na figura (b) a mesma reconstrução após a eliminação dos mesmos. Esses defeitos na matriz de pixels do detetor acarretam em reconstruções não verossímeis e portanto necessitam ser eliminadas quando se deseja a extração de dados quantitativos das reconstruções.

Nesse trabalho escolhemos o método descrito nas referências [61,62]. Para cada linha  $v$  do detetor calcula-se a média ao longo de todas as projeções:

$$\bar{P}_v(u) = \frac{\sum_{\theta} P_{\theta}(u, v)}{N} \quad (3.18)$$

A não linearidade de um pixel específico aparece como uma protuberância na curva  $\bar{P}_v(u)$  e uma vez que o objeto é rotacionado esta curva é uma função diferenciável em  $u$ . Aplica-se um filtro passa baixa a média e corrige-se cada linha da projeção inicial por meio da diferença entre a média das projeções  $\bar{P}_v(u)$  e a média das projeções filtradas e suavizadas  $\tilde{P}_v(u)$ :

$$P'_{\theta}(u, v) = P_{\theta}(u, v) + (\bar{P}_v(u) - \tilde{P}_v(u)) \quad (3.19)$$

Esse processamento é feito com base na imagem de transmissão e portanto após a etapa de processamento descrito na equação 3.15.

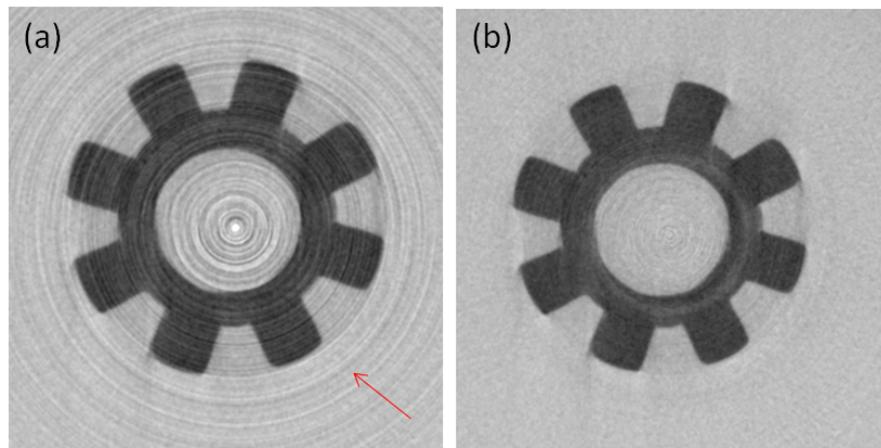


Fig. 3.9: Secção reconstruída para o corpo de prova. (a) Reconstrução sem a correção para artefatos em anel. (b) Reconstrução com correção para artefatos em anel (frequência de corte 0.7).

### 3.2.3 Visualização e Extração de Dados

Após a reconstrução e obtenção da distribuição de densidade  $f(x, y, z)$  passamos a etapa de visualização e extração dos dados relevantes, tanto do ponto de vista morfológico quanto morfométrico. A visualização é feita pelo software de código aberto Volview [63] onde a densi-

dade  $f(x, y, z)$  é renderizada por algoritmos que simulam o processo de formação de imagens pela técnica *Maximum Intensity Projection*. Os detalhes matemáticos a cerca do processo de renderização podem ser encontrados na referência [63].

Na Figura 3.10 mostramos uma reconstrução para um corpo de prova utilizando essa técnica. Nas Figuras 3.10(b) e (c) mostramos uma secção transversal do objeto e uma projeção tomográfica e na Figura 3.10(a) o objeto reconstruído com auxílio do software VolView.

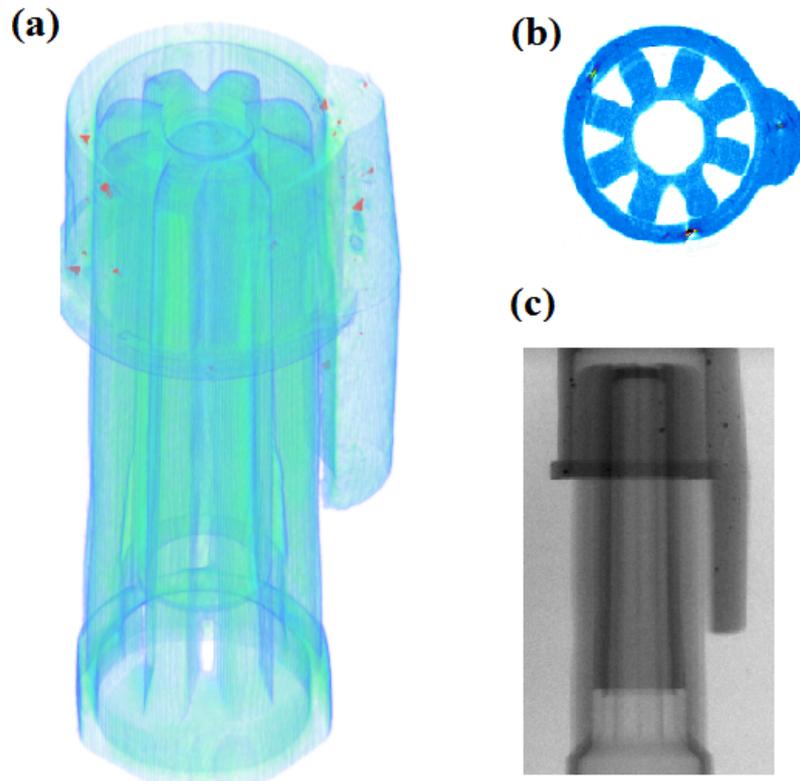


Fig. 3.10: Corpo de prova consistindo de uma tampa de caneta a base de Polietileno. (a) Reconstrução tri-dimensional (b) Reconstrução de uma secção transversal do objeto. (c) Projeção original do objeto. Energia do feixe 60 keV, corrente do tubo 80  $\mu\text{A}$ , 1440 projeções em intervalos de  $0.25^\circ$  com tempo de exposição de 18 segundos.

### 3.3 Testes e Aplicações

A seguir, mostramos alguns exemplos das microtomografias obtidas com o equipamento desenvolvido e os softwares de reconstrução implementados. Estes testes provam a versatilidade do equipamento que desenvolvemos tanto do ponto de vista do amplo espectro de aplicações como da energia dos fótons utilizado bem como da estrutura das amostras.

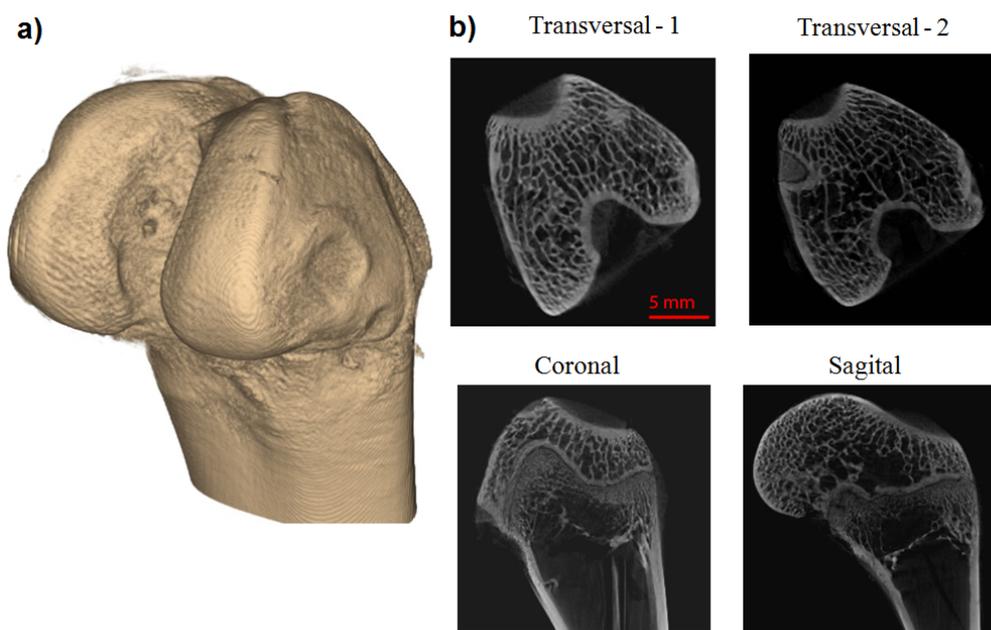


Fig. 3.11: Microtomografia da região anterior de um fêmur de coelho *ex vivo*:(a) reconstrução 3D de todo o volume do fêmur. (b) cortes transversais de duas regiões mostrando o tecido ósseo compacto, tecido ósseo trabecular.(c) Corte coronal e (d) corte sagital. Adaptado de [47].

## Biologia

Na Figura 3.11 mostramos a reconstrução para um fêmur de rato *ex vivo* com dimensões de  $5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 30\text{ mm}$ . As projeções foram adquiridas com a fonte de raios X em  $80\text{ keV}$  e  $40\text{ }\mu\text{A}$ . A magnificação utilizada foi  $4.5\times$  e um voxel com largura de  $5\text{ }\mu\text{m}$  foi obtido para distância fonte-amostra de  $150\text{ mm}$  e distância entre fonte-objeto de  $800\text{ mm}$ . O volume renderizado foi obtido de um conjunto de 720 projeções com espaçamento angular de  $0.5^\circ$ . A reconstrução foi feita utilizando-se o algoritmo *Filtered Back-Projection* com correção FDK e filtro de Shepp-Logan com  $\omega_c = 0.8$  para a frequência de corte juntamente do filtro de eliminação de artefatos em anéis com frequência de corte de 0.4.

Na Figura 3.11 (a) mostramos a reconstrução tridimensional do fêmur e na Figura 3.11(b) mostramos dois cortes transversais próximos a parte mais alta do fêmur (epífise ou cabeça do fêmur). Nesses cortes podemos ver claramente a reconstrução da região trabecular. Nas demais figuras mostramos uma secção coronal e sagital ao longo de todo o fêmur onde podemos ver a região do tecido trabecular e na parte mais abaixo a região do osso compacto. Estas imagens mostram a versatilidade do equipamento em reconstruir estruturas biológicas moles com alta resolução.

## Paleontologia

Como mencionamos no início desse capítulo, as microtomografias são ferramentas de grande valor na área da paleontologia pois os espécimes contem valor histórico e não podem ser seccionados. Na Figura 3.12 mostramos uma microtomografia obtida para um inseto preso em um pedra ambar datada do período cenozóico.

As projeções foram coletadas com energia do feixe em 60 keV, corrente do tudo de 60  $\mu A$ , tempo de exposição 5 segundos e distância entre fonte e amostra de 34 cm e distância entre amostra ao detetor de 195 cm. As projeções foram adquiridas em intervalos de  $0.5^\circ$  totalizando 720 projeções.

Uma análise da Figura 3.12(a) mostra que efeitos de contraste de fase estão presentes e são relevantes na formação das projeções tomográficas dessa amostra. Por ser composta predominantemente por âmbar, um elemento orgânico pouco absorvedor, o contraste do objeto é obtido graças aos efeitos de contraste de fase devido a fonte microfoco. Essa reconstrução mostra a capacidade do equipamento no que tange a microtomografias utilizando o efeito de contraste de fase.

## Ciência dos Materiais

A caracterização de materiais através de microtomografias tem sido utilizado em estudos na área de metalurgia, cimentos e materiais compostos [44, 45]. Grande parte desses estudos buscam por grandezas como distribuição do tamanho de micropartículas no interior da amostras, conectividade e porosidade das estruturas do material.

Um fator importante nessas aplicações é a energia do feixe incidente. Estas amostras contêm elementos químicos com número atômico  $Z$  elevado o que as tornam fortes absorvedoras. É o caso, por exemplo, de ligas metálicas, materi-

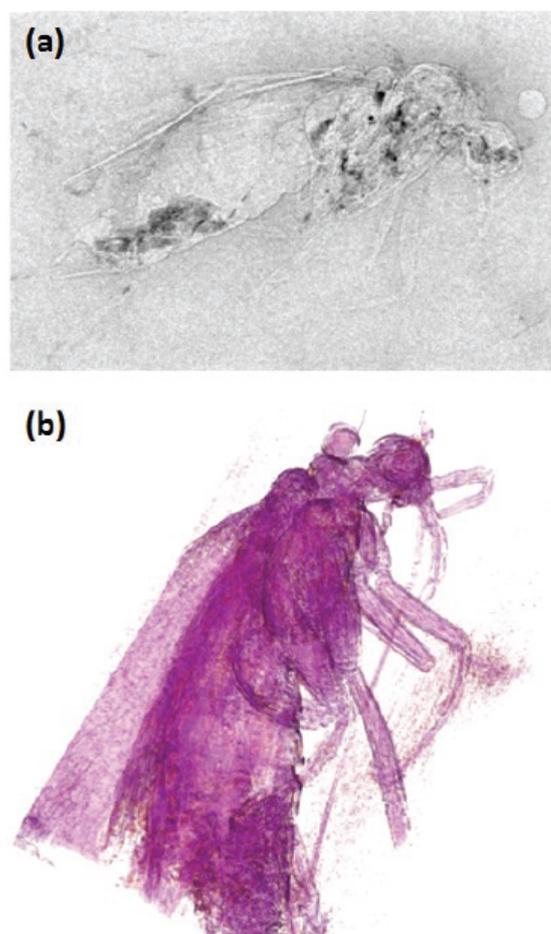


Fig. 3.12: Microtomografia de um inseto preso em âmbar com datação do período Cenozóico (Cortesia da Prof. Frésia Ricardi, Instituto de Geografia - Unicamp). (a) Projeção tomográfica do inseto. (b) Reconstrução tridimensional onde podemos observar asas, patas e o aparelho bucal do inseto. Reproduzido da referência [47].

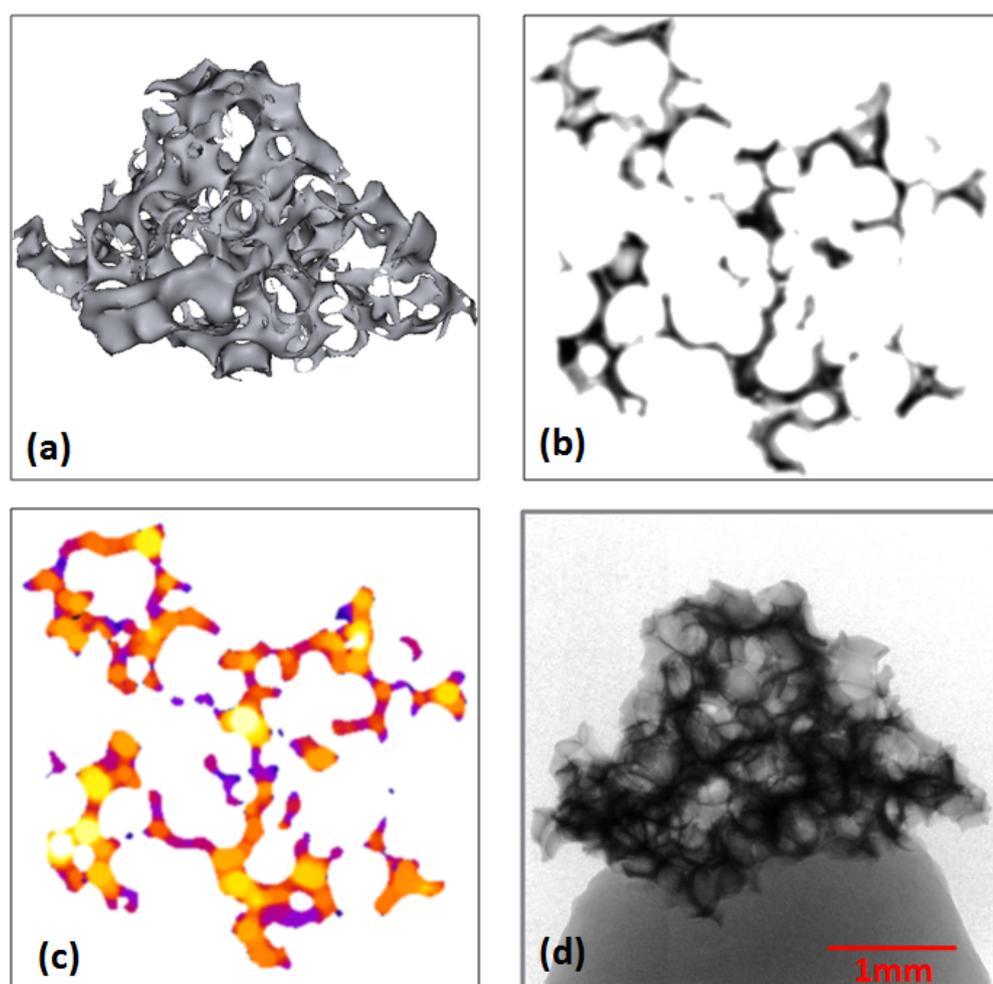


Fig. 3.13: Microtomografia de uma esponja de Titânio (Cortesia Prof. Cecília Zavaglia - Faculdade de Engenharia Mecânica - Unicamp) utilizada em estudos de implantes ósseos. (a) Reconstrução tomográfica visualizada em 3D. (b) Imagem de uma projeção sem tratamento para  $\theta = 45$ . (c) Pós processamento de uma seção transversal mostrando um mapa da espessura da parede dos alvéolos. (d) Seção original reconstruída utilizada para obter a Figura (b). Reproduzido da referência [47].

ais compósitos metálicos, cimentos, rochas etc. Nesse caso para a aquisição das tomografias é necessário reduzir a dimensão da amostra, o que nem sempre é desejável ou deve-se aumentar a energia máxima dos fótons emitidos pela fonte de modo que o comprimento de penetração do feixe incidente aumente.

Nesse sentido, as fontes microfoco se destacam em comparação com as fontes síncrotron que possuem um limitante na energia do feixe cedido a amostra. Fontes microfoco podem operar com energias do feixe mais altas e assim são melhor indicadas quando é necessário a aquisição de dados em que a amostra é fortemente absorvedora.

Com o objetivo de demonstrar a capacidade do sistema desenvolvido, obtivemos a reconstrução tomográfica de uma esponja metálica a base de Titânio e desenvolvida no Laboratório de Biomecânica da Faculdade de Engenharia Mecânica - Unicamp. Na Figura 3.13 mostramos

---

os resultados obtidos. A amostra consistiu de uma pequena peça com dimensões de  $2 \times 2 \times 3 \text{ mm}^3$ . Foram coletadas 720 projeções em 360 graus. A magnificação escolhida foi  $M = 2.4 \times$  e o tempo de aquisição de cada projeção foi 12s com corrente do tubo em  $80 \mu\text{A}$  e tensão de aceleração em 130 keV.

Na Figura 3.13(a) mostramos a reconstrução tridimensional e na Figura 3.13(d) uma das projeções coletadas com a estação de microtomografia. Nas Figuras 3.13(b) e (c) mostramos uma secção transversal (indicada como um traço vermelho na figura reconstruída em (a)). Na Figura 3.13(c) mostramos, em um mapa de cores, a espessura da parede dos alvéolos que consiste essa esponja. O mapa de espessura foi obtido após o processamento da secção reconstruída mostrada na Figura 3.13(b). A espessura da parede foi obtida por meio do software de análise de imagens ImageJ. Os detalhes e métodos utilizados na quantificação dos dados de microtomografia e em especial da morfometria óssea são descritos no capítulo 5.

## Capítulo 4

# Microtomografias no Estudo da Morfometria Óssea

Dentre o amplo espectro de aplicações envolvendo a técnica de microtomografias como elemento de análise encontra-se a aplicação no estudo e caracterização de propriedades morfométricas em tecidos biológicos e em especial em tecidos ósseos. Propriedades geométricas como ocupação óssea, volume, espessura etc. estão ligadas a qualidade do tecido e a possíveis condições patológicas do mesmo [46,64].

O estudo das propriedades histomorfométricas nesses tecidos também chama atenção devido a complexidade dos processos envolvidos. Fatores bioquímicos e genéticos afetam as propriedades histológicas e morfométricas. Vários trabalhos apontam conclusões distintas e as vezes contraditórias devido a miríade de técnicas de análise utilizadas como aponta Gerbaix *et.al.* [65].

Do ponto de vista de saúde pública, no ano de 2000 estima-se que o número de fraturas ósseas ocorridas apenas no continente Europeu foi da ordem de 3.7 milhões de casos e os custos diretos envolvendo uma patologia específica, a osteoporose, da ordem de USS 76.7 bilhões. Com o crescimento demográfico acentuado estima-se que os gastos envolvendo osteoporose serão da ordem de USS 130 bilhões em 2050 [66].

Nesse contexto, em particular, a caracterização estrutural por meio de microtomografias chama atenção uma vez que esta possibilita a obtenção de imagens e medidas com resolução micro e sub-micrométrica sem a necessidade de preparação prévias das amostras ou seccionamento das mesmas [67]. Além disso, a técnica de microtomografia é robusta em termos de condições do experimento, custos e facilidade de realização das medidas. Dessa maneira, a utilização das microtomografias no estudo das propriedades de tecidos ósseos em laboratório parece direta desde que aliada a técnicas complementares [65,68,69].

## 4.1 Formação do Tecido Ósseo

Do ponto de vista histológico, a formação da estrutura óssea ocorre por meio de quatro agentes: matriz óssea, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos como representado na Figura 4.1 e descrito em [64]. A matriz óssea é composta por fibras de colágeno e microcristais de hidróxiapatita formando a estrutura base do tecido que atua na sustentação do organismo e como reservatório de cálcio e fosfato dentre outras funções [69].

O colágeno e a hidróxi-apatita são segregados especificamente pelas células denominadas osteoblastos. De maneira geral, os osteoclastos são responsáveis pela absorção e desconstrução da matriz celular e osteoblastos pela regeneração dessa mesma matriz [64]. Quando um osteoblasto segrega a matriz óssea no seu entorno, este fica preso na matriz e esta célula passa a ser um osteócito. Osteócitos também atuam na regeneração da estrutura base e possivelmente desempenham papéis relacionados a sinalização de fraturas e remodelagem óssea [64, 70].

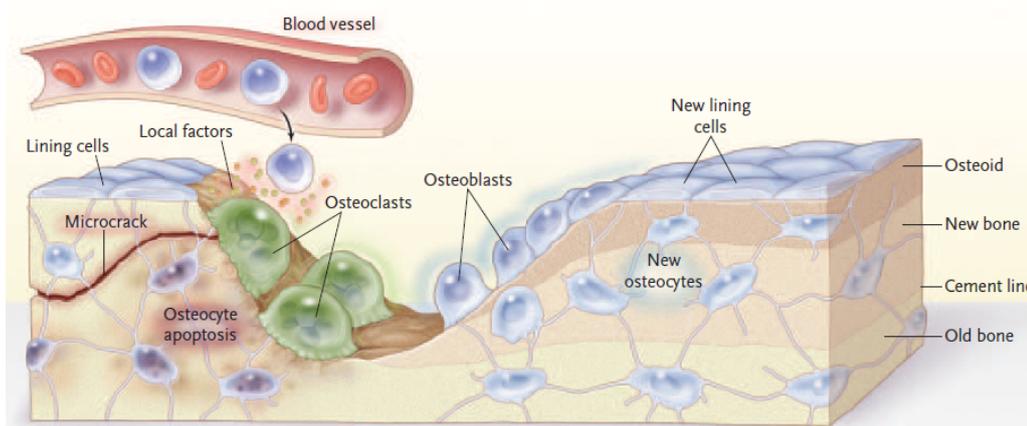


Fig. 4.1: Processo de formação e regeneração óssea. Osteoclastos atuam na desmineralização da matriz óssea enquanto que osteoblastos e osteócitos atuam no crescimento e reconstituição dessa matriz. Imagem extraída de Seeman [64].

Todos esses processos ocorrem de maneira simultânea ao longo do ciclo de vida do tecido e um conjunto complexo de reações bioquímicas e mecanismos de comunicação celular orquestram essa dinâmica. Dessa maneira, o ciclo de destruição e regeneração óssea está sujeito a processos bioquímicos locais bem como àqueles sistêmicos provenientes de outras cadeias bioquímicas do organismo [71].

A atividade dos osteoclastos e osteoblastos é fator determinante nas características morfológicas da matriz óssea pois a ativação ou inativação dessas células determina quanto de material ósseo é produzido e mantido pelo organismo [71, 72]. Estas células se encontram nas superfícies da matriz óssea e portanto os seus efeitos são evidentes em regiões onde a razão superfície/volume ósseo é considerável [73].

### 4.1.1 Morfometria Óssea

Na Figura 4.2 mostramos as partes constituintes de um fêmur. As extremidades são compostas do tecido trabecular e nessa região aparece uma superfície de transição (linha epifiseal) que delimita a epífise do restante da estrutura. Na diáfise ocorre a transição do tecido trabecular para o tecido ósseo compacto, que é composto do periósteo e endósteo (osso tubular) e da cavidade medular.

A função do tecido trabecular ou osso esponjoso é prover o osso com uma estrutura rígida de conexão e ao mesmo tempo diminuir o peso da estrutura. Aliado a isso, na região medular entre as trabéculas ocorre a segregação de vários compostos necessários a existência do organismo. A diáfise, entretanto, suporta uma carga de tração maior e portanto o osso nessa região é compacto e recebe cargas elevadas.

A atividade dos osteoclastos e osteoblastos durante a fase de crescimento desses tecidos ou na regeneração celular determinam as propriedades morfométricas das trabéculas e das paredes ósseas [46, 74]. Estudos mostram, por exemplo, que associado a desmineralização ocorre a diminuição da espessura trabecular e aumento do espaçamento alveolar [68]. Ao mesmo tempo, a mineralização pode incrementar ou preservar essas estruturas dependendo de cada caso particular [75].

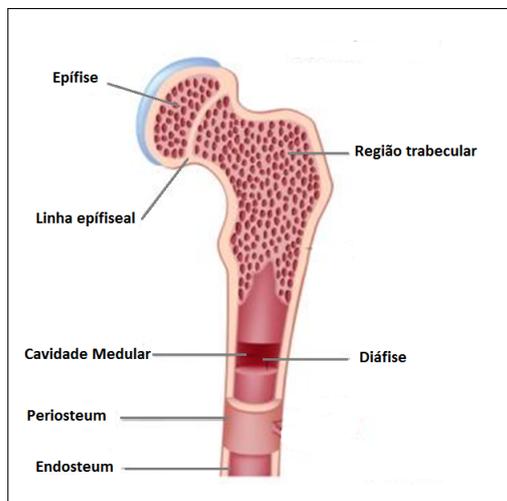


Fig. 4.2: Partes anômicas de um fêmur. As extremidades são denominadas epífise e a parte central diáfise. Ambas as partes têm estrutura e função óssea distintas. Adaptado de [64].

intensidade máxima  $I_{max}$  e intensidade mínima  $I_{min}$ , ou seja,  $I_{min} \leq \mu(x, y, z) \leq I_{max}$ . O mapeamento binário ocorre pela aplicação, no caso mais simples, de uma função de corte do tipo:

Esses parâmetros podem ser extraídos por meio das microtomografias de raios-x como apontado por Feldkamp et. al. [76], historicamente o primeiro trabalho a introduzir a quantificação histomorfométrica em reconstruções tomográficas. Inicialmente, determina-se os voxels correspondentes a matrix óssea e os voxels correspondentes ao tecido medular por meio do mapeamento das escalas de cinza em uma matriz binária de "0" e "1" obtida por um algoritmo de *thresholding*.

O valor de  $\mu(x, y, z)$ , para uma dada secção  $z$ , é normalizado entre uma região de valores com

$$\mu_{bin}(x, y, z) = \begin{cases} 1 & : se \quad \mu(x, y, z) > I_{thresh} \\ 0 & : se \quad \mu(x, y, z) \leq I_{thresh} \end{cases}$$

onde  $I_{thresh}$  é um valor arbitrário ou determinado por métodos de segmentação específicos [77]. Encontramos diversos métodos de segmentação da escala de cinza na literatura e nesse trabalho utilizamos o método ISOData [78].

Na Figura 4.3 (a) mostramos um plano reconstruído para a região da epífise de um femur de rato onde observamos a formação trabecular. O máximo de intensidade (matriz óssea) assume o valor  $I_{max} = 255$  e a região medular  $I_{min} = 0$ . Na Figura 4.3 (b) mostramos o mapeamento binário resultante da aplicação do método ISOData com  $I_{thres} = 110$ .

### Ocupação Volumétrica

A ocupação volumétrica é a razão entre o volume de tecido da matriz óssea comparada com o volume total (número de voxels) reconstruído. Essa grandeza é obtida pela contagem do número de voxels logicamente iguais a "1" (BV - *Bone Volume*) provenientes do mapeamento binário (*binary threshold*) do volume total TV (TV - *Total Volume*) e encontrando-se a razão (BV/TV) [46].

A razão de ocupação óssea reflete a compactação da matriz óssea. Essa grandeza é distinta da densidade mineral óssea [46, 68] que é uma medida da densidade da matriz, massa óssea por volume de estrutura. Quanto maior a ocupação óssea maior é o volume de estrutura óssea por unidade de volume total.

### Espessura e Espaçamento Trabecular

A espessura trabecular é encontrada através da medida da menor distância entre as duas superfícies de uma trabécula, independentemente da orientação da estrutura trabecular renderizada. Um tratamento detalhado e extenso a cerca dessas técnicas pode ser encontrado em Doube e Odgaard [46, 79].

Na Figura 4.3(c) mostramos o mapa de cores obtido através do método de Odgaard para a espessura trabecular oriunda da máscara da Figura 4.3(b) e na Figura 4.3(c) para o espaçamento trabecular. A obtenção de parâmetros tais como a média e o desvio padrão dessas grandezas é automática a partir dos mapas de espessura e espaçamento obtidos.

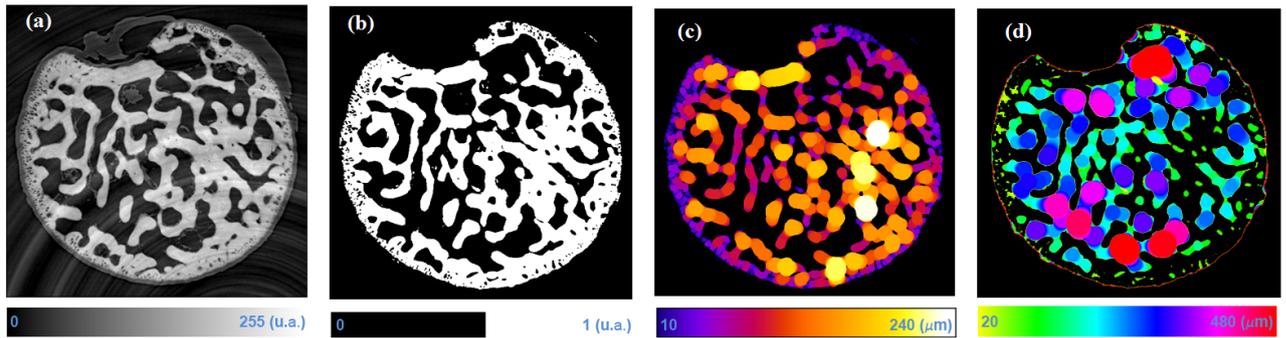


Fig. 4.3: Processamento de uma secção tomográfica ( $3,5 \times 3,5 \text{ mm}^2$ ) para obtenção de medidas da espessura e separação trabecular. a) plano reconstruído mostrando as intensidades reconstruídas. Em cinza a matriz óssea e em preto a região medular. b) Mapa binário obtido pelo algoritmo ISOData descrito no texto. c) Mapa da espessura trabecular em cada região do plano. d) Mapa do espaçamento trabecular em cada região do plano.

## Conectividade Óssea

A conectividade da estrutura trabecular é um fator importante na caracterização desses arranjos assim como a espessura e o espaçamento. Trabéculas com um número reduzido de conexões possuem resistência a fratura elevada em comparação com aquelas de múltiplas conexões [46,80]. Portanto, a medida da conectividade trabecular pode ser um fator de comparação entre grupos de estudos amostrais distintos nos mais diversos estudos.

Na literatura, Hahn *et al.* [80] encontra a conectividade calculando a concavidade das estruturas tridimensionais, enquanto Odgaard *et al.* [46] define uma medida de conectividade como o número de cortes necessários para dividir a estrutura trabecular em duas partes desconexas. Neste trabalho utilizamos o método de Odgaard pois esta metodologia é direta quando comparada a metodologia descrita em Hahn, que tem como base uma estimativa da concavidade da estrutura.

## Dimensão Fractal

Outro parâmetro associado a organização trabecular é a dimensão fractal dessas estruturas [81]. O trabalho inicial de Benoit Mandelbrot [82] na aplicação da dimensão fractal em problemas naturais é aplicado no contexto da organização trabecular.

Fazzalari [81] argumenta que a dimensão fractal está em dependência linear com a espessura e o espaçamento das trabéculas e como consequência, estaria ligada a qualidade da estrutura óssea. Portanto, é uma grandeza que deve ser investigada no contexto da histomorfometria para um entendimento geral das qualidades da estrutura óssea.

### 4.1.2 Influência de Lipídeos e Sucrose

Estudos mostram a existência de efeitos da dieta alimentar, em particular ao alto teor de lipídeos e sucrose, na atividade bioquímica, número de osteoblastos e osteoclastos bem como na concentração sérica de hormônios de comunicação intercelular [69, 71, 83]. Dietas com alto teor de lipídeos induzem a gênese de osteoclastos em detrimento dos osteoblastos [84] e é observado alterações na concentração de agentes bioquímicos ligados a atividade inflamatória do organismo [71].

Por outro lado, constata-se inúmeros agentes orgânicos capazes de contrabalancear esses efeitos. Em específico, o fitosterol (P) e o ácido linoléico conjugado (CLA) inibem os efeitos das dietas com alto teor de lipídeo (HF) em tecidos moles de ratos quando administrados em conjunto [85, 86]. Esses efeitos se originam dos mecanismos anti-inflamatórios desses compostos e são perceptíveis em células hepáticas e em mediadores bioquímicos dispersos na corrente sanguínea dos animais [69, 85, 86]. Além disso, medidas específicas mostram que o CLA e P são absorvidos no tecido ósseo e no *serum* tanto de aves quanto de ratos e há evidências de alterações bioquímicas em ambos os casos [71, 87].

## 4.2 Microtomografias em tecidos Ósseos

Diante da comprovação da ação desses compostos em tecidos moles e nos processos bioquímicos levanta-se a questão de qual seria o efeito estrutural e morfométrico associado a parâmetros estruturais como, por exemplo, a espessura trabecular, a ocupação óssea, a conectividade trabecular e o volume de tecido ósseo nesses organismos. Estes parâmetros podem ser medidos por meio das microtomografias de raios X e subsequente processamento dos volumes reconstruídos como mencionado acima. A seguir, descrevemos os estudos realizados nesse sentido, na tentativa de elucidar os efeitos do CLA e P na histomorfometria óssea em dietas HF.

### 4.2.1 Materiais e Métodos

Tendo como interesse o estudo dos efeitos do CLA e do Fitosterol em dietas HF na morfometria óssea obtivemos amostras *ex vivo* de fêmur de rato *Sprague-Dawley* através de uma colaboração com o Departamento de Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp.

Cinco grupos de animais contendo três animais por grupo foram tratados com dietas distintas. Um grupo contendo alto teor de lipídios (HF), um grupo padrão (STD), um grupo tratado

com alto teor de lipídeos e fitosterol (HF+P), um grupo com tratado com alto teor de lipídeos e Ácido Linoléico Conjugado (HF+CLA) e um quinto grupo alimentado com lipídeos, fitosterol e CLA (HF+P+CLA). Após um período de oito semanas de vida os animais foram sacrificados e as amostras de fêmur coletadas e acondicionadas em álcool etílico 75% sob refrigeração a 4°C. Os protocolos de obtenção das amostras, métodos e procedimentos éticos são descritos com detalhes nas referências [88], [85] e [86].

As medidas de microtomografia foram realizadas no Laboratório Nacional de Argonne, na linha 2-BM do *Advanced Photon Source* - APS [89]. Estas medidas foram feitas com feixe de luz síncrotron monocromático produzido por um *bending magnet* acoplado a um monocromador de multicamadas. A energia dos fótons incidentes foi 31 KeV com largura de banda de 0.1 KeV, otimizado para o máximo contraste possível. A detecção foi realizada por uma câmera PCO4000 com FOV de 6mmx4mm e largura do pixel de 5 $\mu$ m para o sistema de focalização com magnificação em 10 $\times$ . Cada microtomografia foi composta de 1800 projeções em passos de 0.1°. Amostras de femur de três animais por grupo e cinco secções por fêmur foram submetidas a análise resultando em 75 conjuntos de projeções microtomográficas com volume de 1000  $\times$  1000  $\times$  600 voxels.

A reconstrução das microtomografias foi realizada por meio do algoritmo Tomopy [30], disponibilizado pela própria linha de luz. Aplicamos a correção para os efeitos de contraste de fase ( $\beta = 0.005$ ) e as secções reconstruídas foram normalizadas para uma escala de cinza de 16 bits entre 0 e 255. Após a reconstrução, os dados foram tratados para a obtenção dos parâmetros estruturais ósseos e medidas quantitativas foram extraídas com o auxílio do software BoneJ [79]. Este software é um "*plugin*" de código aberto para processamento de dados de morfometria óssea na plataforma de processamento de imagens ImageJ [90].

Parâmetros estruturais na região da epífise e diáfise do fêmur foram obtidos para cada amostra. Na região da epífise, seguimos o trabalho de Cao *et al.* [72]. Em cada reconstrução tomográfica, um cubo de 1mm x 1mm x 1mm foi escolhido no centro da região epifiseal localizado 1mm abaixo da parte mais externa da cabeça do fêmur. Escolhemos essa região porque a mesma sofre uma intensa carga mecânica e é a região onde possivelmente os efeitos da mudança trabecular são mais evidentes. Para essa região extraímos medidas da ocupação volumétrica, espessura e espaçamento trabecular bem como a conectividade e a dimensão fractal.

Na região da diáfise selecionamos um anel entre 3 mm e 1 mm acima do ponto de fratura no ensaio mecânico e a superfície externa, espessura da parede óssea, ocupação volumétrica do tecido mole e tecido ósseo foi determinado. Na Figura 4.4 mostramos as duas regiões selecionadas para uma amostra do grupo darão a título de exemplo. Na parte (a) mostramos o cubo extraído da região da epífise e na parte (b) a secção extraída da diáfise do fêmur.

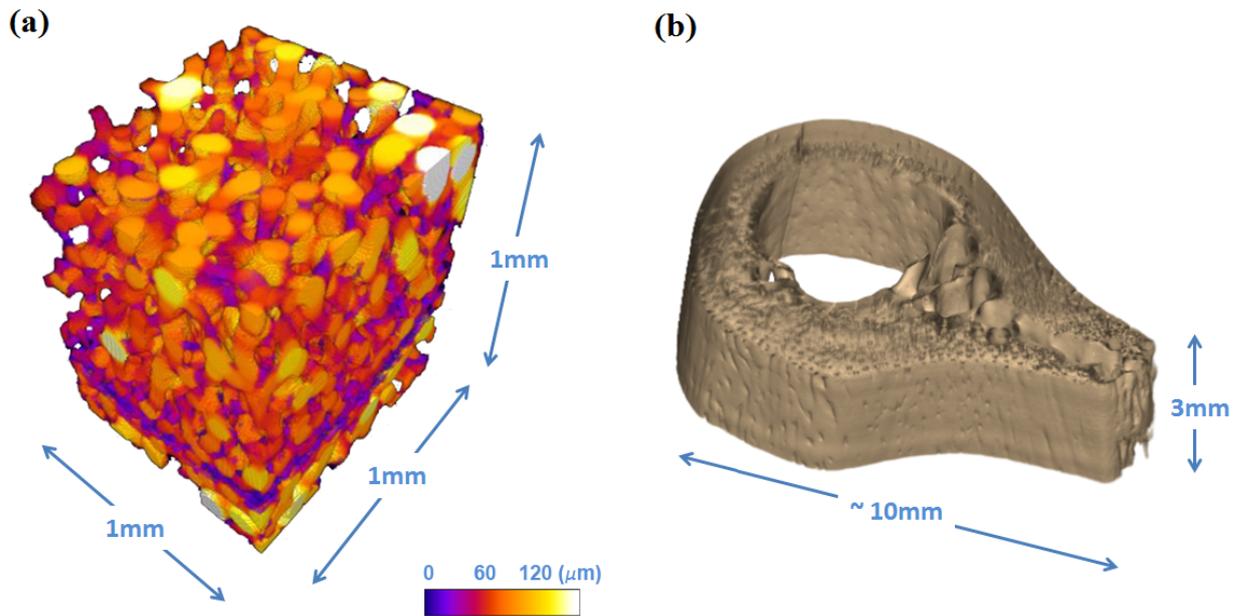


Fig. 4.4: Exemplo de volumes reconstruídos utilizados para a extração dos parâmetros histomorfológicos. (a) Volume trabecular da epífise extraído da amostra número P6 do grupo padrão. A escala de cores mostra a espessura trabecular ponto a ponto no volume. (b) Volume da diáfise reconstruído e utilizado para análise.

Os valores encontrados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para análise da significância estatística entre os grupos [91]. O teste de Kruskal-Wallis foi escolhido pelo número pequeno de amostras por grupo. Nesta circunstância, este é o teste estatístico mais adequado [91].

### 4.3 Análises e Resultados

Medidas de peso e carga de ruptura pelo método de flexão em três pontos [92] foram coletadas previamente ao estudo com as microtomografias. No ensaio de carga de ruptura a medida da tensão  $\tau = \frac{F}{A}$  versus deformação  $\epsilon = \frac{\Delta x}{x}$  do objeto ( $\tau \times \epsilon$ ) é encontrada. Em geral a carga de ruptura  $F$  é menor em relação ao máximo da curva de tensão versus deformação. Ambas as informações são quantificadores da resistência do material e nesse caso do material ósseo. Nas Figuras 4.5 e 4.6 mostramos as médias dessas medidas. Observa-se que o peso do fêmur nas dietas com alto teor de lipídeos é em média 15% menor que na dieta padrão. Da mesma forma, a carga de ruptura bem como a carga de deformação máxima no ensaio mecânico é menor para todas as dietas contendo HF quando comparado ao grupo STD, com exceção do grupo HF+CLA+P.

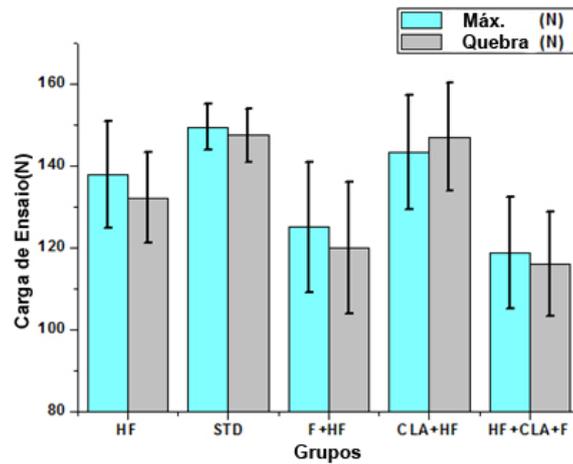


Fig. 4.5: Carga de ruptura(N) e carga máxima (N) no ensaio de flexão de três pontos para cada grupo amostral(média estatística).

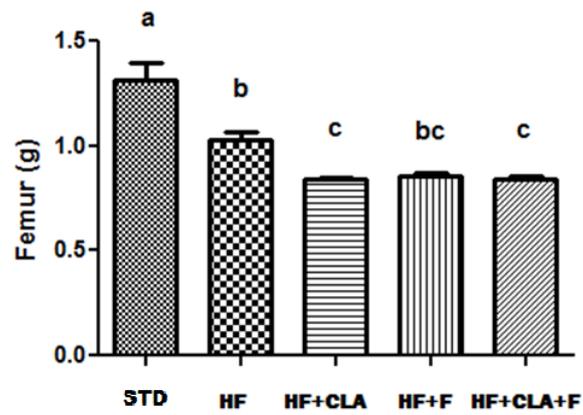


Fig. 4.6: Média do peso do fêmur inteiro para cada grupo amostral(média estatística). Obtido da referência [88].

## Estrutura Trabecular

Na Tabela 4.2 mostramos a média e a mediana das medidas realizadas em cada grupo amostral bem como o teste de confiabilidade estatística. Nessa região medimos para cada amostra os seguintes parâmetros estruturais: ocupação volumétrica, espaçamento trabecular, espessura trabecular, conectividade e dimensão fractal. Estas variáveis apresentaram p-valor acima de 0.05 no teste de Kruskal-Wallis em todos os casos e para o espaçamento trabecular médio encontramos  $p = 0.35$ . Esses valores mostram que para essa região do fêmur não ocorreram mudanças significativas na estrutura morfológica das amostras em função das dietas apresentadas aos animais pois a confiabilidade estatística  $p < 0.05$  não foi alcançada.

## Osso Compacto

Ao contrário da região trabecular, o osso compacto(diáfise) mostrou mudanças estatísticas significativas,  $p < 0.05$ , para alguns grupos. Na Figura 4.7 mostramos, a título de exemplo, quatro secções oriundas de amostra específicas entre os grupos avaliados.

Na Tabela 4.1 mostramos as medidas realizadas. Nessa região, além da ocupação volumétrica do osso compacto, BV/TV, analisamos o volume do tecido medular e em específico o volume da cavidade medular MV. Assim, a tabela apresenta as razões BV/TV, MV/TV e também MV/BV para a secção da diáfise.

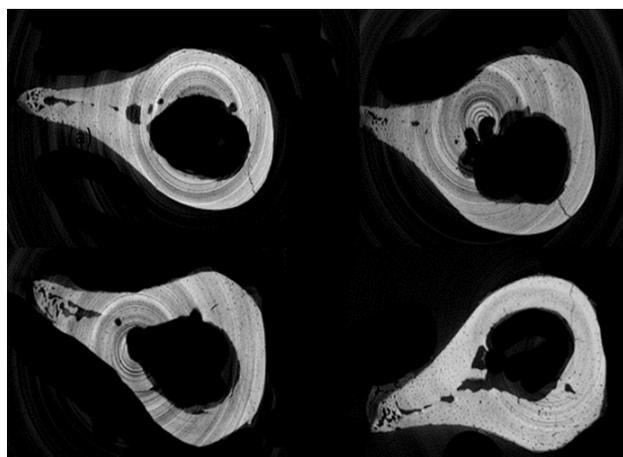


Fig. 4.7: Secção transversal da estrutura óssea compacta (diáfise do fêmur) para uma amostra de cada grupo de estudo. Em sequência: STD, HF, HF+CLA, HF+P.

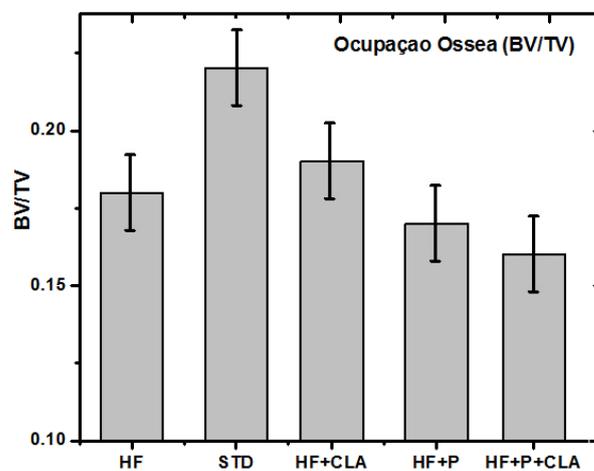


Fig. 4.8: Razão de ocupação volumétrica (BV/TV) para a região da diáfise. Valores altos de (BV/TV) indicam uma tendência de compactação da estrutura óssea.

Na Figura 4.8 mostramos o gráfico da ocupação volumétrica (BV/TV) para essa região. Esta grandeza apresentou valor superior no grupo padrão, STD, com relação a todos os demais grupos mostrando que existe uma possível falta de material nessa região com respeito as dietas

com alto teor de gordura. O p-valor dessa medida foi 0.08 o que nos aponta uma tendência. Valores conclusivos necessitam de estudos mais detalhados.

Na Figura 4.9 mostramos um gráfico com as medidas para o parâmetro perímetro externo. Esta grandeza obteve  $p = 0.02$  no teste de Kruskal-Wallis. Podemos observar que os grupos HF e STD apresentaram valores superiores quando comparados com os grupos HF+CLA, HF+P e HF+CLA+P. Essa medida corrobora com os resultados exibidos pelo ensaio de flexão e peso, mas não explica, por exemplo, o motivo pelo qual o grupo HF+P+CLA apresenta uma tração de ruptura acima dos demais grupo alimentados com um alto teor de gordura.

Outra grandeza que apresentou tendência a diferenciação entre os grupos foi a razão entre o volume do tecido medular e do tecido ósseo compacto MV/BV(Figura 4.10). Essa medida resultou em um p-valor de 0.13, acima do intervalo de confiança estatística, mas suficiente para se considerar uma possível tendência com respeito a estes valores. Podemos observar que nessa medida, os grupos HF e STD apresentam o mesmo comportamento: valores menores, mas distintos dos demais grupos. Espera-se que quanto menor o valor da razão MV/BV, maior será a facilidade de ruptura em um ensaio de flexão dessas estruturas pois o volume da parede óssea é inversamente proporcional. Comparando essas medidas com as medidas do ensaio de flexão podemos observar uma certa correlação entre as medidas. O ensaio de flexão mostrou que o grupo STD é o mais resistente. Da mesma forma, o grupo STD tem o menor valor de MV/BV corroborando com as medidas no ensaio de flexão.

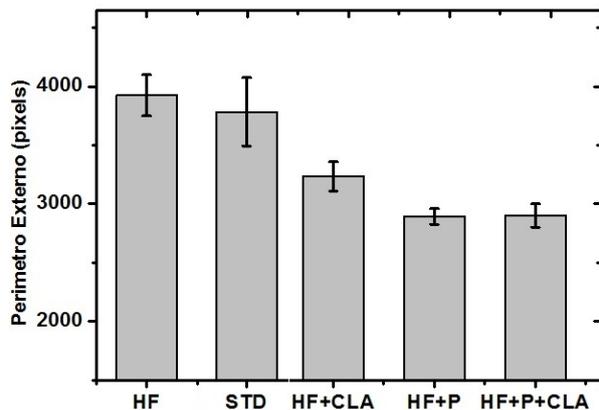


Fig. 4.9: Perímetro externo para a região do osso compacto. As medidas mostram que os grupos HF e STD não exibem diferenças significativas. Entretanto os demais grupos, comparativamente apresentaram o perímetro externo abaixo do valor do grupo padrão.

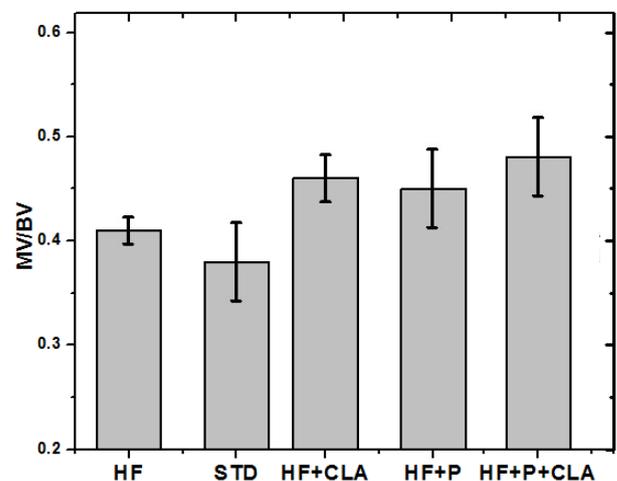


Fig. 4.10: Razão de ocupação entre a estrutura medular e estrutura óssea (MV/BV). Essa razão é obtida encontrando-se o número de voxels tanto na região medular quanto na região do osso compacto e obtendo-se a razão entre esses valores.

Os parâmetros estruturais onde  $p < 0.1$  demonstram mudanças ou tendência a mudanças de acordo com cada grupo de estudo. Entretanto, uma correlação única entre todas as grandezas

não é observada. Este fato nos indica certa tendência de que as dietas com alto teor de gordura influenciam os parâmetros histomorfométricos negativamente e exclusivamente como apontado em outros estudos na literatura. Da mesma maneira, O Ácido Linoléico Conjugado, Fitosterol ou a combinação de ambos parecem não ter influencia sobre esses tecidos especificamente, com exceção dos resultados para o perímetro externo na região central do osso compacto.

Estudos na literatura com a mesma metodologia e parâmetros experimentais são encontrados apenas em Cao [72]. Este mostrou que as estruturas trabeculares na tíbia de animais sujeitos a uma dieta com alto teor de gordura similar e exclusiva, apresentam mudanças significativas na décima quarta semana de vida [72]. É interessante observar que similarmente ao nosso estudo, algumas medidas histomorfométricas resultaram em p-valor acima de 0.8 nesse caso.

Um fator importante que necessita consideração é o fato de que nossas amostras constituíram-se de animais com oito semanas de vida e as medidas foram realizada no fêmur dos animais. Levanta-se assim, a questão do tempo de vida como parâmetro influenciador no desenvolvimento das estruturas ósseas e a possibilidade de que estes efeitos sejam pronunciáveis, e talvez sensíveis, apenas a partir de uma determinada idade nos animais e em peças anatômicas específicas, como é o caso da tíbia no estudo de Cao [72,93,94].

Variável	Dieta	Média	Mediana	p-valor
Perímetro Externo	HF+P+CLA	2900	2835	0.0224
	HF+CLA	3232	3246	
	HF+P	2892	2913	
	HF	3923	3252	
	STD	3783	3522	
Espessura Média	HF+P+CLA	82	82	0.4290
	HF+CLA	91	88	
	HF+P	82	85	
	HF	71	84	
	STD	85	79	
Ocupação Volumétrica (BV/TV)	HF+P+CLA	0.16	0.16	0.0825
	HF+CLA	0.19	0.18	
	HF+P	0.17	0.17	
	HF	0.18	0.18	
	STD	0.22	0.21	
Ocupação Medular (MV/TV)	HF+P+CLA	0.08	0.08	0.5358
	HF+CLA	0.08	0.09	
	HF+P	0.08	0.08	
	HF	0.08	0.07	
	STD	0.08	0.08	
Ocupação MV/BV	HF+P+CLA	0.48	0.48	0.1778
	HF+CLA	0.46	0.42	
	HF+P	0.45	0.44	
	HF	0.41	0.40	
	STD	0.38	0.37	

Tab. 4.1: Médias, medianas e teste de Kruskal-Wallis para a estrutura óssea compacta (diáfise). Os valores são oriundos do processamento descrito no texto pelo *plugin* BoneJ.

Variável	Dieta	Média	Mediana	p-valor
Ocupação Volumétrica (BV/TV)	HF+P+CLA	0.56	0.57	0.5747
	HF+CLA	0.52	0.57	
	HF+P	0.52	0.51	
	HF	0.54	0.52	
	STD	0.54	0.50	
Espessura Trabecular Médio	HF+P+CLA	19	19	0.5523
	HF+CLA	21	22	
	HF+P	19	18	
	HF	16	15	
	STD	19	17	
Espaçamento Trabecular Médio	HF+P+CLA	22	19	0.3546
	HF+CLA	26	26	
	HF+P	22	19	
	HF	20	20	
	STD	25	25	
Conectividade Trabecular	HF+P+CLA	64	72	0.6968
	HF+CLA	42	43	
	HF+P	77	72	
	HF	76	82	
	STD	53	49	
Dimensão Fractal	HF+P+CLA	2.6	2.6	0.6327
	HF+CLA	2.5	2.4	
	HF+P	2.5	2.6	
	HF	2.6	2.6	
	STD	2.5	2.5	

Tab. 4.2: Teste de Kruskal-Wallis, médias e medianas para a estrutura óssea trabecular (secção volumétrica na epífise). Os valores são oriundos do processamento do volume reconstruído descrito no texto por meio do *plugin* BoneJ.

## Capítulo 5

# Imagens de Espalhamento Harmônicas

A informação proveniente do espalhamento de raios X, quando detectada e resolvida espacialmente, possibilita o entendimento de parâmetros ligados a estrutura química da amostra [13, 24]. Essa informação habilita novas aplicações e modalidades de instrumentação tanto na área de análise científica quanto clínica [8].

Historicamente, vários estudos foram desenvolvidos com a intenção de quantificar a informação de espalhamento [95–98]. A caracterização e extração dessa informação é delicada pois envolve o espalhamento de raios X em dependência a vários fatores tais como inhomogeneidade da amostra, espessura, composição química, trajetória dos fótons espalhados etc.

Recentemente, uma nova modalidade de imagens de espalhamento de raios X foi introduzida nos trabalhos de Wen et al. [15]. As imagens espaciais harmônicas por espalhamento ou imagens heteródinas<sup>1</sup> são obtidas através de equipamentos convencionais de raios X por meio da modulação do feixe incidente através de uma grade e extração da informação de espalhamento através do processamento da imagem no espaço de Fourier. Na Figura 5.1 mostramos o esquema básico para a geração dessas imagens como proposto na literatura [15].

Essa técnica foi um dos objetos de estudo dessa tese e no decorrer desse projeto realizamos um estágio sanduíche por meio do programa PDSE-Capes no Laboratório do Prof. Dr. Cristoph Rose-Petruck do Departamento de Química da Universidade de Brown, expoente no uso dessa técnica em imagens de raios X médicas, de onde inclusive se origina o termo heterodinagem de raios X utilizado na literatura.

Nesse capítulo, inicialmente descrevemos a formulação matemática do processo de formação de imagens harmônicas. Em seguida, descrevemos os estudos realizados na tentativa caracterização, melhoria e utilização dessas imagens em contexto práticos como detecção de fraturas

---

<sup>1</sup>Esse termo foi primeiramente introduzido por Wu [99] em apologia a técnica de batimento de sinais que leva o mesmo nome.

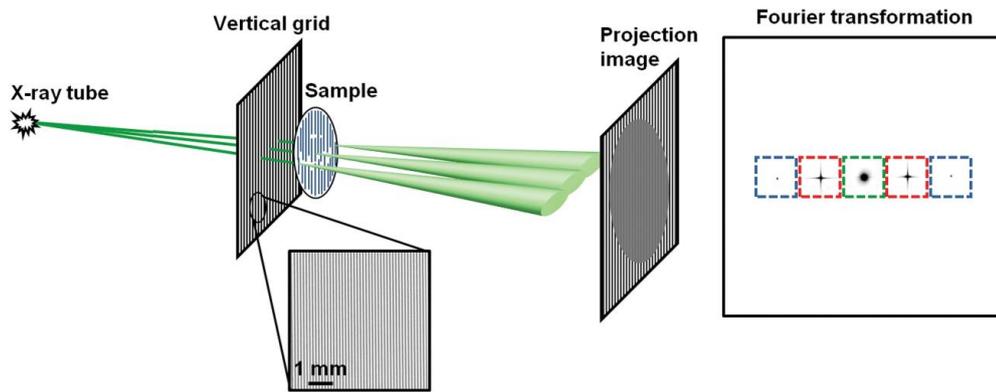


Fig. 5.1: Montagem experimental introduzida por Wen et al. para as imagens espaciais harmônicas. A iluminação proveniente da fonte é modulada por uma grade que é projetada, por sua vez, no detector. A absorção e o espalhamento que ocorre na amostra introduz artefatos ou distorções nessa imagem que então são detectados pelo processamento do sinal no espaço de frequência. Imagem adaptada de [15].

em materiais, anisotropia de espalhamento e imagens em amostras biológicas.

## 5.1 Formação das Imagens de Espalhamento

Os detalhes do processo de formação das imagens de espalhamento e absorção por heterodinagem são mostrados na Figura 5.2. A formação das imagens pelo método harmônico tem como princípio a modulação periódica da iluminação oriunda da fonte no domínio espacial e a partir dessa modulação, obter a separação das componentes de espalhamento e absorção que ocorrem em uma amostra [15, 99]. Aqui descrevemos a formação de imagens para um sistema ótico de feixe paralelo e no regime geométrico, entretanto essa análise teórica pode ser estendida ao regime de feixe cônico e em contraste de fase [100].

A amostra é constituída de camadas sucessivas de material, na direção  $z$ , com coeficiente de atenuação linear  $\mu(x, y, z)$  e secção de choque de espalhamento  $\sigma(\vec{q}; x, y, z)$ . A intensidade medida em cada ponto do objeto é  $F(x, y, z)$  e esta, por sua vez, é uma função de  $z$  devido a variação do coeficiente de atenuação e da secção de choque de espalhamento ao longo da amostra<sup>2</sup>. Os fótons interagem com as múltiplas camadas de espessura  $\delta Z$  (Figura 5.2) ao atravessar o interior do objeto. No ponto  $(x, y)$  de cada camada ocorre a remoção de uma quantidade de fótons  $\mu(x, y)F(x, y)\delta Z$  e espalhamento de fótons nas regiões vizinhas  $(x', y')$ , de maneira que ocorre uma perda total de fótons no ponto  $(x, y)$  dada por:

$$\delta F(x, y) \approx -\mu(x, y, z)F(x, y)\delta Z + \int \frac{F(x, y)}{(D - z)^2} \sigma(q_0 \frac{x - x'}{D - z}, q_0 \frac{y - y'}{D - z}; x, y, z) dx' dy' \quad (5.1)$$

<sup>2</sup>Aqui seguimos em parte a nomenclatura utilizada em Wen [15].

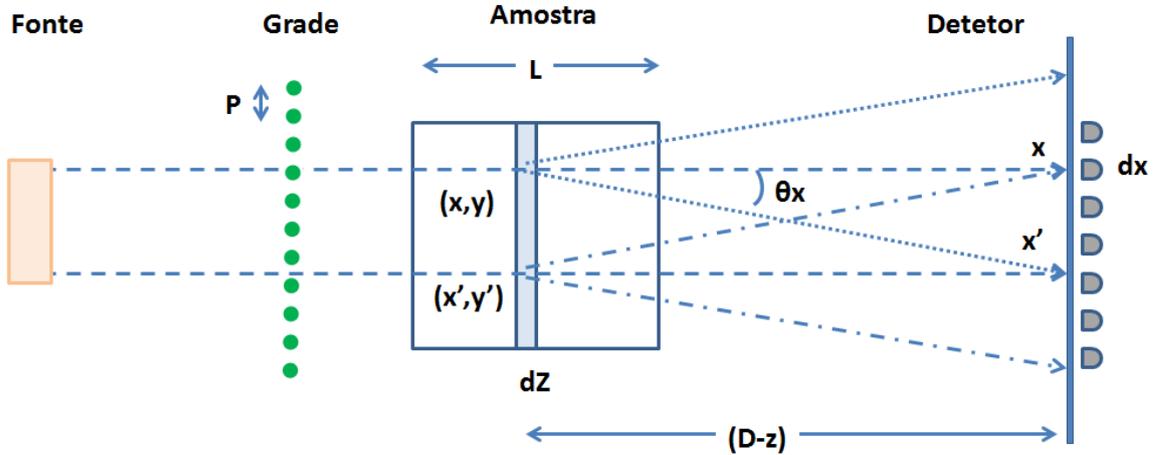


Fig. 5.2: Formação da Imagem por Heterodinagem. Os fótons atingem a amostra, composta de sucessivas camadas  $dZ$ , após passarem pela grade de período  $P$ . Quando os fótons atingem o ponto  $r = (x, y)$ , parte sofre absorção e são detectados em  $r = (x, y)$  e parte são espalhados e são detectados em  $r' = (x', y')$ . O processo inverso também ocorre, ou seja, um fóton espalhado em  $r' = (x', y')$  é detectado em  $r = (x, y)$ .

onde  $\sigma(q_0 \frac{x-x'}{D-z}, q_0 \frac{y-y'}{D-z}; x, y, z)$  é a secção de choque diferencial no ponto  $(x, y, z)$  do objeto. Ela representa o número de fótons por ângulo sólido espalhados na direção:

$$\vec{q} = (q_x, q_y) = (4\pi \frac{\sin \theta_x}{\lambda}, 4\pi \frac{\sin \theta_y}{\lambda}) = (q_0 \frac{x-x'}{D-z}, q_0 \frac{y-y'}{D-z})$$

para  $q_0 = \frac{4\pi}{\lambda}$ , de maneira que:

$$\sigma(q_0 \frac{x-x'}{D-z}, q_0 \frac{y-y'}{D-z}; x, y, z) \frac{dx' dy'}{(D-z)^2}$$

representa o número de fótons espalhados que atingem o elemento de área  $dx' dy'$  no ângulo sólido  $d\Omega = \frac{dx' dy'}{(D-z)^2}$ .

Além de perder fótons para a vizinhança, no detector, o ponto  $r = (x, y)$  recebe os fótons espalhados das regiões vizinhas em  $r' = (x', y')$ . Se contamos os fótons espalhados entre  $z$  e  $z + \delta z$  a intensidade no detector é dada por:

$$\frac{dF(x, y)}{dz} = -\mu(x, y, z)F(x, y) + \int \frac{F(x, y) - F(x', y')}{(z-D)^2} \sigma(x-x', y-y', z) dx' dy' \quad (5.2)$$

Se a amostra é não espalhadora, a seção de choque diferencial  $\sigma$  é nula. A equação acima é reduzida a forma:

$$\frac{dF(x, y)}{dz} = -\mu(x, y, z)F(x, y) \quad (5.3)$$

e a intensidade no detector é dada pela lei de Beer-Lambert convencional, uma vez que  $F(x, y)$  carrega uma dependência implícita a  $z$  associada ao termo  $\mu(x, y, z)$  e a solução trivial da equação 5.3 é obtida por integração:

$$F(x, y) = F_0(x, y)e^{-\int \mu(x, y, z) dz} \quad (5.4)$$

### Modulação pela Grade

Na grade anterior a amostra ocorre a modulação do feixe incidente  $G(x, y)$  devido a absorção do feixe. Para uma grade com linhas verticais a modulação ocorre na direção horizontal. Podemos descrever esta grade como uma soma de termos periódicos, múltiplos do período  $P$ , da forma  $G(x, y) = A_0 + A_1 \sin \frac{2\pi x}{P} + A_2 \sin \frac{4\pi x}{P} + \dots$  que correspondem as componentes harmônicas da imagem da grade projetadas no detector. Assim, no espaço de frequência,  $G(k_x, k_y)$  assume a representação:

$$g(k_x, k_y) = \sum_n g_n \delta(k_x - \frac{2\pi n x}{P}) \delta(k_y) \quad (5.5)$$

onde  $g_n$  está ligado a  $A_n$  pela normalização da transformada de Fourier.

A modulação da imagem do objeto  $F(x, y)$  pela grade  $G(x, y)$  resulta em uma imagem  $F_G(x, y) = F(x, y)G(x, y)$ . Esta imagem, no espaço de frequência, é a convolução de  $G(k)$  e  $F(k)$ . Se a função  $F(k)$  é limitada em  $|k| \leq \frac{2\pi}{P}$ , então:

$$F_G(k) = F(k) \star G(k) = \sum_n g_n F(k_x - \frac{2\pi n}{P}, k_y) \quad (5.6)$$

A transformada inversa de Fourier da região  $\frac{2\pi n}{P} - \frac{\pi}{P} \leq k_x \leq \frac{2\pi n}{P} + \frac{\pi}{P}$  de  $F_G(k)$  é denominada imagem Harmônica de ordem  $n$ , representada como  $H_n(x, y)$ . No domínio espacial, ela assume a forma:

$$H_n(x, y) = g_n F(x, y) e^{-\frac{2i\pi n x}{P}} \quad (5.7)$$

Se o objeto não é espesso, então  $F(x, y)$  sofre influência de  $G(x, y)$  ao longo de todo o caminho em  $z$  e podemos supor que a imagem final será modulada pelo termo  $g_n e^{-\frac{2i\pi n x}{P}}$ . Introduzindo  $H_n(x, y)$  na equação 5.2, obtém-se a expressão [15]:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dz} \left\{ g_n F(x, y) e^{-\frac{2i\pi n x}{P}} \right\} &= -\mu(x, y, z) g_n F(x, y) e^{-\frac{2i\pi n x}{P}} \\ &- \int \frac{g_n F(x, y) e^{-\frac{2i\pi n x}{P}} - g_n F(x', y') e^{-\frac{2i\pi n x'}{P}}}{(z - D)^2} \sigma(x - x', y - y', z) dx' dy' \end{aligned} \quad (5.8)$$

introduzindo a identidade  $1 = e^{-\frac{2i\pi n x}{P} + \frac{2i\pi n x}{P}}$  na segunda exponencial dentro da integral e também partindo do pressuposto que para pequenas regiões  $F(x, y) \approx F(x', y')$ , após rearranjar os termos, encontramos:

$$\frac{dH_n(x, y)}{dz} = -\mu(x, y, z) H_n(x, y) - H_n(x, y) \int \frac{1 - e^{i(x-x')2\pi n/P}}{(z - D)^2} \sigma(x - x', y - y', z) dx' dy' \quad (5.9)$$

A equação 5.9 nos mostra que, se  $n = 0$  então os termos que contribuem para o espalhamento são cancelados e dessa maneira, a região central do espaço de Fourier  $H_0(x, y)$ , carrega apenas a informação de absorção por meio de  $\mu(x, y, z)$ :

$$\frac{dH_0(x, y)}{dz} = -\mu(x, y, z) H_0(x, y) \quad (5.10)$$

Com solução:

$$H_0(x, y) = H_0^0(x, y) e^{-\int \mu(x, y, z) dz}$$

A condição inicial  $H_0^0$  é a própria imagem da grade antes do feixe passar pelo objeto, portanto:

$$H_0(x, y) = G_0(x, y) e^{-\int \mu(x, y, z) dz} \quad (5.11)$$

Na parte integral da equação 5.9, apenas  $\sigma(\vec{r}, x, y, z)$  e  $1/(D - Z)^2$  estão em dependência com  $z$ . Nesse caso, para  $n \neq 0$ , podemos reescrever a integral como uma função resultante  $U_n(x, y)$  que contem toda a informação do espalhamento para a região  $n$ . Nesse caso, a equação 5.9 fica:

$$\frac{dH_n(x, y)}{dz} = - \left\{ \mu(x, y, z) + \frac{U_n(x, y, z)}{(D - z)^2} \right\} H_n(x, y) \quad (5.12)$$

Com solução:

$$H_n(x, y) = G_n(x, y) e^{-\int \left\{ \mu(x, y, z) + \frac{U_n(x, y, z)}{(D - z)^2} \right\} dz}$$

onde a condição inicial  $H_n^0(x, y)$  foi substituída pela imagem harmônica da grade  $G_n(x, y)$ . As regiões  $H_n(x, y)$  carregam as informações de espalhamento  $\sigma(\vec{r}, x, y, z)$  moduladas pela grade através do termo  $1 - e^{i(x-x')2\pi n/P}$ . A modulação de  $\sigma$  é a origem do termo heterodinagem ou batimento de frequências. Além disso, a região harmônica também carrega a componente de absorção  $\mu(x, y, z)$ .

Na prática, para se extrair a imagem com a informação do espalhamento, a região Harmônica  $H_n(x, y)$  deve ser normalizada pela imagem da região  $H_0(x, y)$  que contem os efeitos de absorção. Wen *et al.* [15] mostra que a informação de espalhamento pura,  $U'_n(x, y)$ , é obtida pela seguinte expressão:

$$U'_n(x, y) = -\log \left[ \left( \frac{H_n(x, y)}{G_n(x, y)} \right) / \left( \frac{H_0(x, y)}{G_0(x, y)} \right) \right] \quad (5.13)$$

uma vez que seguindo a Equação 5.11 e a Equação 5.12, tomando o logaritmo do quociente das quatro imagens, resulta no termo

$$U'_n(x, y) = \int \frac{U_n(x, y, z)}{(D - z)^2} dz \quad (5.14)$$

A descrição acima representa a modulação de uma grade em uma única direção. Na prática, a modulação é obtida por meio de grades bidimensionais que introduzem modulação tanto na direção vertical quanto na direção horizontal devido a construção da grade. A descrição matemática é a mesma para este caso. No entanto, esta modulação introduz picos harmônicos em ambas as direções vertical e horizontal. Denominamos essa regiões por  $H_{n,m}(x, y)$  onde  $(n, m)$  indicam a região harmônica na horizontal e na vertical, respectivamente.

## SAXS e as imagens harmônicas

Na Equação 5.9, o sinal das imagens harmônicas depende da secção de choque para o espalhamento elástico a baixo ângulo  $\sigma(\vec{q}, x, y, z)$ . Este, por sua vez, depende da estrutura do objeto em nível molecular, pois o espalhamento a baixo ângulo se origina das interações coerentes dos fótons de raios X e das microestruturas da amostra como proteínas, cadeias poliméricas e nano estruturas.

Dessa maneira, as imagens harmônicas estão ligadas ao espalhamento a baixo ângulo e portanto, a teoria SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) de Guinier e Porod [6, 101]. Nessa técnica é comum chamar o vetor de espalhamento como  $\vec{q} = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$  onde  $\theta$  é o angulo de espalhamento e  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação incidente. O intervalo de espalhamento para ângulos pequenos (tipicamente  $q < 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ ) se denomina regime de Guinier. Nesta região o raio de giração  $R_g$  determina a intensidade do sinal espalhado [6] e O sinal de espalhamento

em função do ângulo  $\vec{q}$  é dado por:

$$I(|\vec{q}|) = I_0 e^{-\frac{R^2}{3|q|}}$$

Na região onde o ângulo de espalhamento é alto, fatores intra moleculares dominam a formação do sinal [101]. Ambos os regimes determinam a imagem final de espalhamento através das distorções no padrão de modulação da grade. Com a técnica de heterodinagem, podemos em princípio, mapear esses efeitos de forma em escala submicrométrica na imagem convencional de raios X em escala milimétrica.

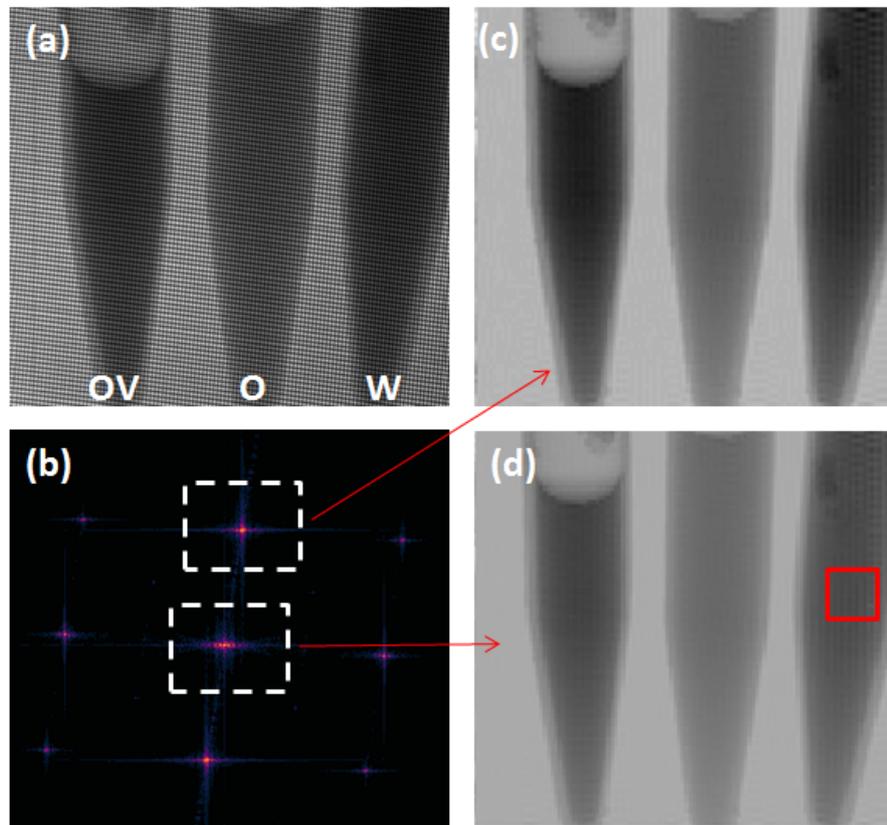


Fig. 5.3: Imagem de espalhamento por heterodinagem de uma amostra contendo três tubos com água, óleo vegetal e ovalbumina. Na parte (a) a imagem modulada. Na parte (b) a imagem no espectro de frequência e em (c) e (d) a imagem de espalhamento e a imagem de absorção, respectivamente.

Nas Figuras 5.3 e 5.4 apresentamos um ensaio realizado em uma amostra contendo três tubos Eppendorf com soluções de água (W), óleo (O) e ovalbumina (OV). Na Figura 5.3(a) apresentamos a imagem modulada por uma grade com período de 150 linhas por polegada, distância detetor-amostra e amostra-fonte de 1 m. O tempo de exposição da imagem foi 10 min em uma fonte de raios-x de foco fino (abertura  $\approx 40 \mu\text{m} \times 12 \text{mm}$ ) com anodo de Cobre, tensão no tubo de 30 KeV e corrente de 20 mA utilizando um detetor Rad-Icon CMOS HR. Na

Figura 5.3 (b) mostramos a transformada de Fourier dessa imagem com as regiões harmônicas e nas Figuras (c) e (d) as imagens de espalhamento da região harmônica  $H_{01}$  e absorção da região  $H_{00}$ .

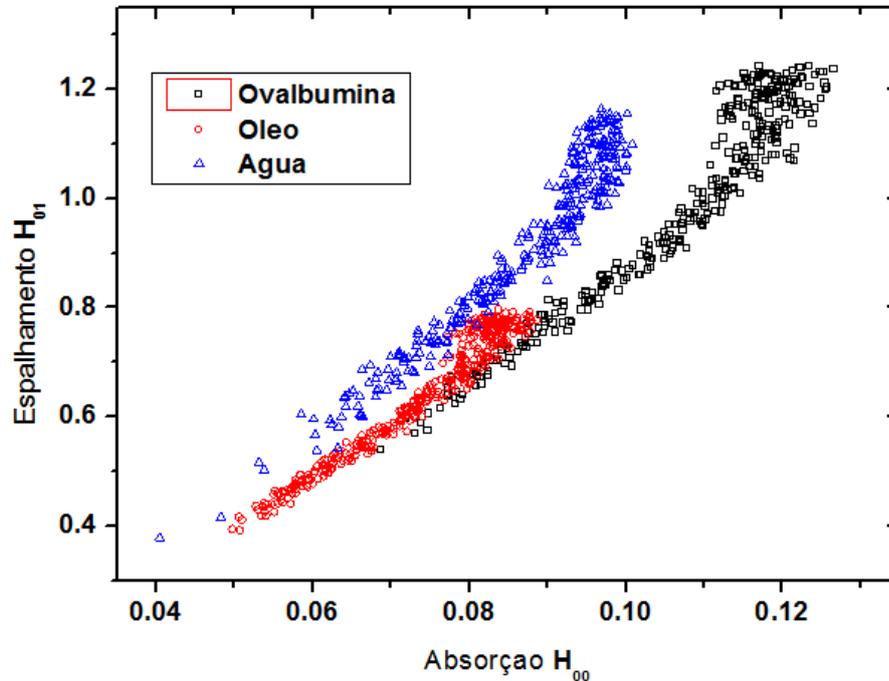


Fig. 5.4: Curva de dispersão para as intensidades de absorção e espalhamento pelo método de heterodinagem no caso das amostras de água, óleo e ovalbumina da Figura 5.3. Estes resultados originam-se da média estatística de um quadrado de 20x20 pixel da imagem de cada tubo em cada região harmônica.

A Figura 5.4 mostra um gráfico de dispersão para os sinais de espalhamento e absorção medidos em uma região de 20 x 20 pixels em cada tubo Eppendorf como mostrado na Figura 5.3(d). O coeficiente angular da reta, resultante do ajuste linear dessas dispersões, mostra diferenças para cada composto ( $\alpha = 13.2 \pm 0.2$  para ovalbumina,  $\alpha = 11.0 \pm 0.1$  para óleo e  $\alpha = 14.1 \pm 0.2$  para água). Essas diferenças são explicadas pela diferença no sinal de espalhamento para cada composto químico, como apontado por Wen e colaboradores, no caso de água e óleo e aqui estendido para o caso da proteína ovalbumina.

## 5.2 Caracterização Experimental

Os trabalhos de Wen *et al.* demonstraram os princípios de formação das imagens harmônicas e possíveis aplicações na diferenciação de tecidos e compostos [15,102]. Alguns trabalhos, como o de Rand *et al.* [103], mostraram a influência do tamanho de nanopartículas de Ouro no contraste das imagens de espalhamento através no número de nanopartículas suspensas em uma solução. Da mesma maneira, Lynch *et al.* [104] mostrou que a técnica de modulação de

grades é seletiva ao tamanho de nanopartículas de sílica monodispersas. Entretanto, um estudo quantitativo e experimental, com respeito a Equação 5.2, não é encontrado na literatura.

### Distância Amostra-Detector

Estudamos o comportamento do sinal de espalhamento em função da distância do objeto ao do detector em nanopartículas de Dióxido de Titânio ( $TiO_2$ ) e Óxido de Ferro ( $FeO$ ) de diferentes diâmetros. Inicialmente, três soluções, duas delas contendo nanopartículas monodispersas de  $TiO_2$  com tamanho de 125 nm e outra contendo  $FeO$  de tamanho 125 nm em uma solução de Álcool Etílico 99% foram submetidas a imagens com uma fonte policromática de raios-x de Cu, com energia máxima do feixe de 40 keV, corrente do tubo 20 mA e detector Rad-Icon HR com grades de 150 lpi (*line per inch*) de período de modulação as quais projetadas no detector induziam uma modulação com período de 300  $\mu\text{m}$ . O tempo total de exposição foi de 5 minutos (300 s) obtidos através da acumulação de exposições individuais de 5 s. Na Figura 5.5 mostramos a montagem experimental realizada e na Figura 5.6 uma das imagens obtidas onde observamos a modulação da grade e três amostras contendo as suspensões com nanopartículas e o álcool solvente.

O processamento da imagem, como descrito na equação 5.13, resulta nas imagens  $H_{00}(x, y)$  e  $H_{10}(x, y)$ . Similar ao exemplo para água, óleo e álcool, a intensidade de uma região de  $20 \times 20$  pixels de cada tubo de Eppendorf mostra uma ligeira diferença nas imagens harmônicas quando comparadas com as imagens de absorção.

Um gráfico da média das intensidades para a região  $H_{10}$  em função da distância amostra ao detector  $D$  é mostrado na Figura 5.7 e na Figura 5.8 o gráfico da absorção para região  $H_{00}$  em função de  $D$ . Nas medidas realizadas, as intensidades correspondentes a absorção não se alteram com a aproximação da amostra do detector. Entretanto, para a região de espalhamento harmônico, ocorre uma perda significativa da intensidade do sinal a medida que aproximamos o conjunto amostra e grade do detector.

Acreditamos que existem duas razões para a perda do sinal de espalhamento ao se aproximar amostra do detector. A intensidade final de espalhamento é inversamente proporcional a distância  $D$ . Quando tomamos o logaritmo da intensidade espalhada através da equação 5.14, a contribuição para o sinal de espalhamento passa a ser uma função linear de  $D$  e assim a medida que se aproxima amostra da fonte o sinal de espalhamento diminui.

Além disso, uma vez que curva de espalhamento a baixo ângulo segue a lei de Guinier, à medida que aproximamos o elemento espalhador do detector, a área de espalhamento projetada diminui e dessa forma a distorção da grade. Como consequência o sinal de espalhamento detectado sofre atenuação.

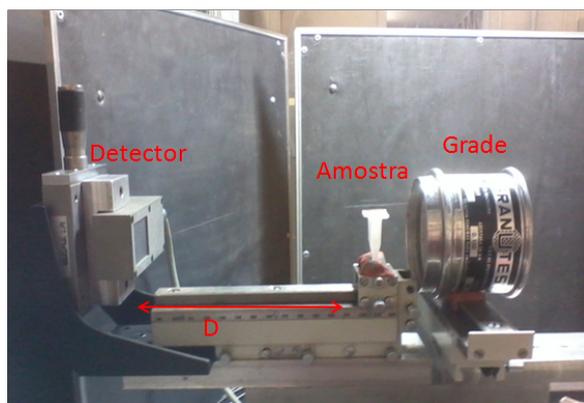


Fig. 5.5: Montagem experimental mostrando a grade de modulação, as amostras e o detector. A fonte de raios-x está a direita, fora do plano da imagem.

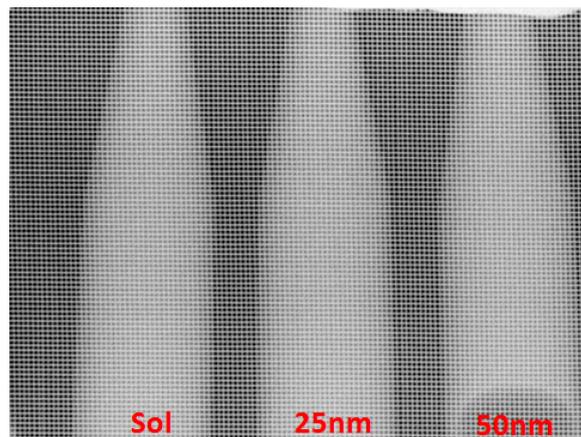


Fig. 5.6: Imagem resultante do experimento: três tubos Eppendorf contendo soluções monodispersas moduladas pela grade.

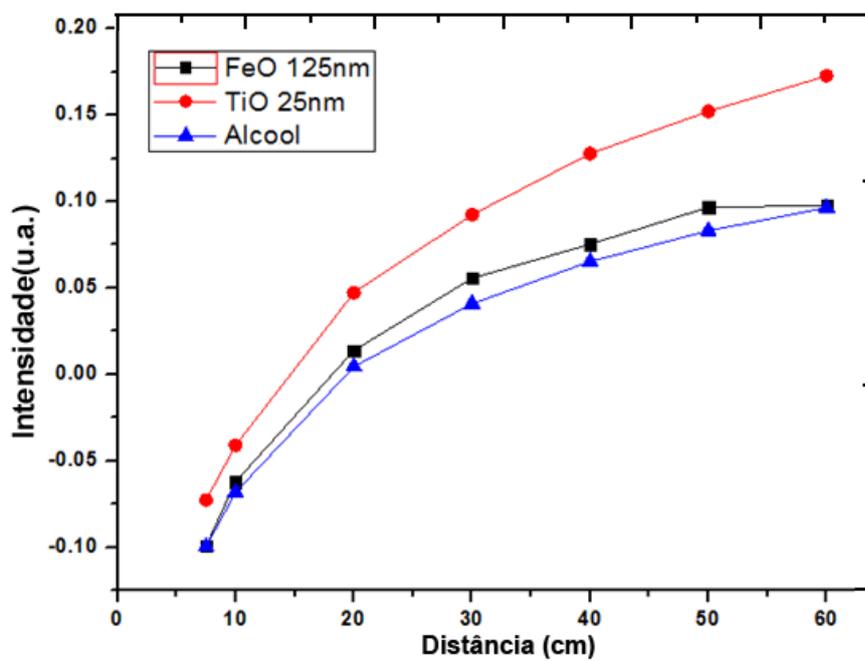


Fig. 5.7: Curva da intensidade de espalhamento das amostras na região harmônica  $H_{10}$  para os três espécimes: Álcool,  $TiO_2$  e  $FeO$ . Cada valor é obtido através da média estatística de uma região de 20 por 20 pixels em cada amostra.

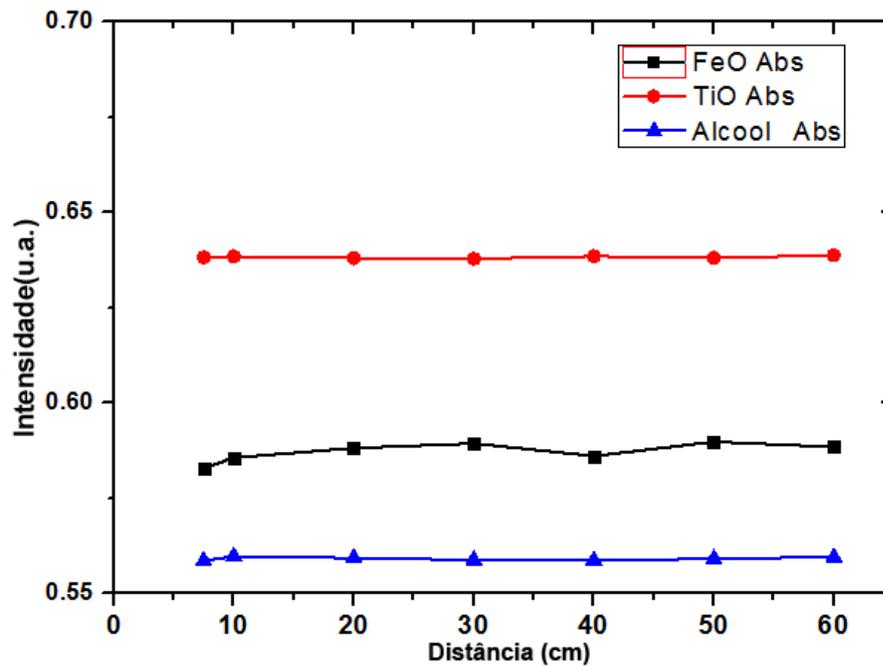


Fig. 5.8: Curva da absorção na região harmônica  $H_{00}$  para os três espécimes: Álcool,  $TiO_2$  e  $FeO$ . Esta curva mostra o sinal de absorção constante ao longo da distância detetor-amostra, como esperado.

### Espessura da Amostra

A equação 5.14 nos diz que a intensidade espalhada é dada pela integral de  $U_n(x, y)$  ao longo da direção  $z$ :

$$U'_n(x, y) = \int \frac{U_n(x, y, z)}{(D - z)^2} dz \quad (5.15)$$

se admitimos que o detetor está longe da amostra,  $D \gg z$  e que  $U_n(x, y, z)$  é uniforme, então segue de imediato que o resultado da integral acima é proporcional a  $L/D^2$  onde  $L$  é a espessura da amostra.

Testamos essa hipótese através do seguinte experimento: Planos espalhadores constituídos de lâminas de madeira com fibras orientadas ao longo da grade de modulação foram empilhados de modo que a espessura total da amostra fosse dependente do número de planos aglomerados. Cada plano consistiu de uma lamina de  $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  de largura e espessura de  $1 \text{ mm}$  cada. As imagens foram obtidas com uma fonte de  $Cu$  operando a  $40 \text{ KeV}$  e  $30 \text{ mA}$ , tempo de exposição de  $10 \text{ s}$ , distância detetor ao objeto de  $1 \text{ m}$ , grade de  $100 \text{ lpi}$  e detetor Rad-Icon HR. Os mesmos segmentos de fibra de madeira foram utilizados nos experimentos descritos na próxima seção e uma imagem deles pode ser vista na Figura 5.10.

Ao lançar o gráfico da intensidade do sinal de absorção  $H_{00}(x, y)$  e espalhamento  $H_{01}(x, y)$

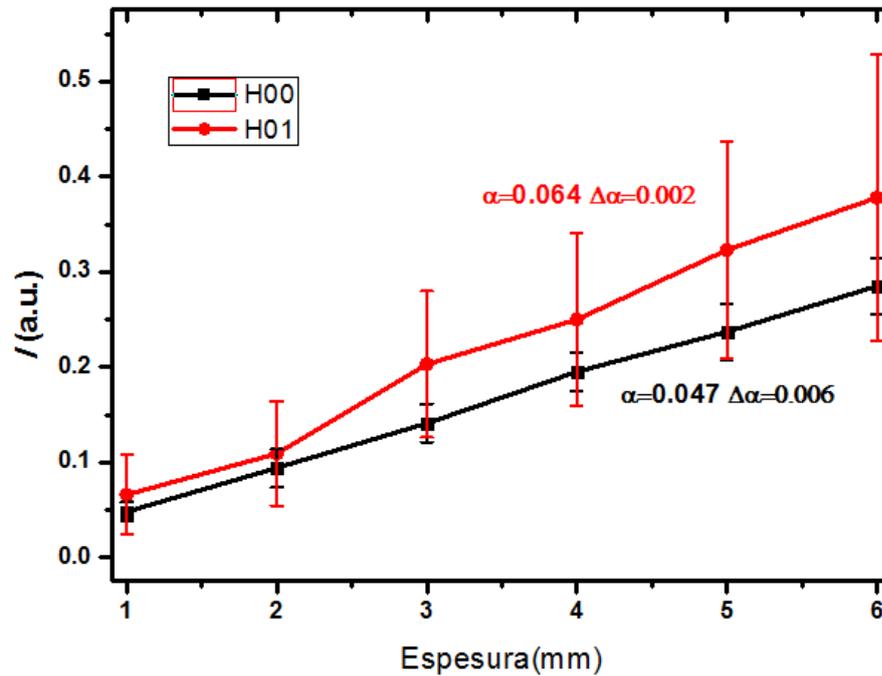


Fig. 5.9: Sinal de absorção e espalhamento em função da espessura de uma amostra espalhadora. Neste caso fibras de madeira orientadas. O sinal de espalhamento bem como o sinal de absorção exibem comportamento linear em função da espessura do meio espalhador homogêneo.

em função da espessura total dos planos de madeira obtivemos o gráfico da Figura 5.9. Este gráfico nos mostra que, em concordância com a teoria de Wen *et al.* o sinal de espalhamento bem como o sinal de absorção tem dependência linear com respeito a espessura da amostra, desde que o número de elementos espalhadores por unidade de volume seja homogêneo. Além disso, o coeficiente angular da reta para o sinal de espalhamento,  $\alpha_{10} = 0.047 \pm 0.006$  é nitidamente superior ao coeficiente angular da reta para o sinal de absorção,  $\alpha_{00} = 0.064 \pm 0.002$ , mostrando que o sinal de espalhamento não está associado ao sinal de absorção.

### 5.3 Espalhamento Anisotrópico

A curva de espalhamento SAXS é obtida através da média estatística do espalhamento produzido por uma estrutura supondo uma distribuição aleatória de orientações em um solvente. Dessa aproximação decorrem expressões analíticas para o espalhamento, tal como a equação de Debye-Scherring e as equações de Guinier e Porod [6]. À medida que as estruturas espalhadoras adquirem uma orientação e formato não isotrópico, como é o caso de fibras e cadeias poliméricas ou protéicas ordenadas, o espalhamento adquire uma orientação característica e dessa maneira anisotropia.

A particularidade das imagens espaciais harmônicas em diferenciar o espalhamento com respeito a absorção pode ser utilizada no estudo da anisotropia de espalhamento uma vez que ao se modular a imagem com uma grade bidimensional ocorre a produção de picos harmônicos tanto na direção vertical quanto na direção horizontal da imagem e como discutido na seção anterior, estes carregaram as componentes de espalhamento horizontal e vertical separadamente.

Na Figura 5.10 mostramos uma imagem produzida pelo contraste de espalhamento de quatro segmentos de fibra de madeira correspondente ao tronco da espécie *Eucalyptus Deblugta*. A imagem foi obtida com uma fonte de Cu operando a 40 keV e 30 mA, tempo de exposição de 10 s, distância detetor ao objeto de 1 m, grade de 100 lpi e detetor Rad-Icon HR. A imagem modulada pela grade (Figura 5.10-a), após o recorte das respectivas regiões harmônicas, (Figura 5.10-b), mostra que no primeiro harmônico (Figura 5.10-c) a intensidade é homogênea com respeito a orientação da fibra. Entretanto a intensidade na região harmônica  $H_{10}$  é dependente da orientação da fibra. Fibras com orientação vertical espalham na direção horizontal e portanto na região  $H_{10}$  o sinal de espalhamento tem uma intensidade maior comparado com as fibras orientadas horizontalmente que espalham na direção vertical (Figura 5.10-d).

Nesse contexto, Potdevin *et al.* e Jensen *et al.* demonstraram a habilidade dos sistemas de imagens de raios X por interferometria de Talbot em selecionar o espalhamento anisotrópico para amostras como tecidos biológicos e em especial tecido ósseo [105, 106]. Nessa técnica a amostra é rotacionada e imagens para cada ângulo de rotação são obtidas. Através desse procedimento um mapa do espalhamento anisotrópico é calculado [105, 107].

Na literatura não se encontra uma adaptação da técnica de heterodinagem de raios X com a mesma intenção. A anisotropia de espalhamento é relatada nos trabalhos de [15, 102] mas não é caracterizada para todas as direções de anisotropia. Dessa forma, com o objetivo de caracterizar o espalhamento anisotrópico e determinar a direção principal do espalhamento montamos um *setup* experimental como mostrado na Figura 5.11.

Uma grade bidimensional com período de 200 lpi foi colocada em uma posição anterior a amostra. Esta por sua vez foi montada em um estágio de rotação com eixo de rotação paralelo a direção do feixe incidente. O aparato foi implementado com um estágio de rotação Thorlabs PRM-1Z8 [108] e a amostra foi sustentada em um filme de Kapton transparente na parte vazada do rotacionador. Utilizamos uma fonte microfoco Oxford TrueFocus com anodo de Tungstênio, tensão de operação do tubo de 80 keV e corrente de emissão de 0.1 mA. O detetor utilizado foi um detetor CMOS Rad-Icon HR com tempo de exposição de 12000 ms.

Ao se rotacionar a amostra por um ângulo  $\omega$  as intensidades  $H_{10}(\omega)$  e  $H_{01}(\omega)$  para cada pixel ou ponto da imagem refletem as intensidades em função do ângulo de espalhamento e a anisotropia local. A Figura 5.12-a mostra uma imagem das fibras utilizadas (Lamina metálica

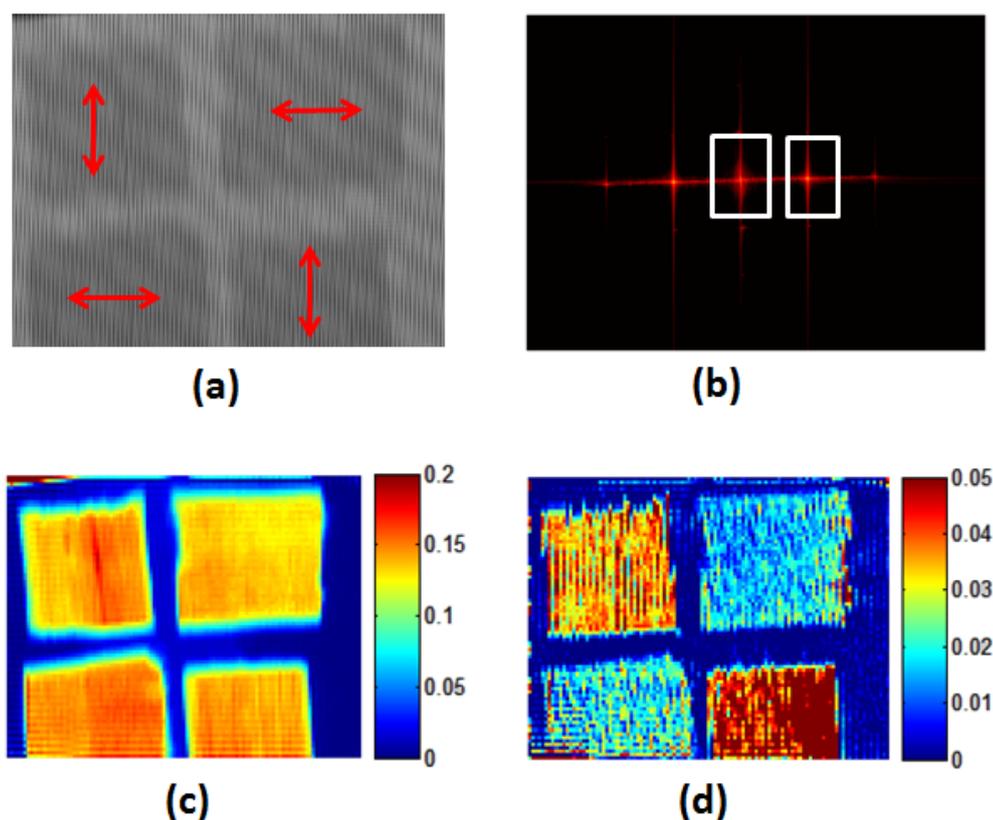


Fig. 5.10: Imagem Harmônica Espacial de fibras de madeira orientadas. a) Imagem de raios X modulada por uma grade descrita no texto e contendo 4 segmentos de fibra de madeira (*Eucalyptus Deblugta*) orientadas como na figura. b) Transformada de Fourier da imagem em (a). c) Transformada de Fourier inversa da primeira região harmônica em (b) d) Transformada inversa de Fourier da segunda região harmônica em (b) mostrando a anisotropia de espalhamento devido a orientação das fibras. Quando as fibras estão orientadas verticalmente ocorre o máximo espalhamento na direção horizontal de modo que a intensidade da imagem harmônica dessas fibras excede a intensidade na região onde as fibras estão dispostas horizontalmente

a esquerda, e fibras de carbono e madeira, à direita, acima e abaixo, respectivamente) para  $\omega = 0^\circ$  e a Figura 5.12-b mostra a montagem experimental realizada no Departamento de Química da Universidade de Brown no Laboratório do Prof. Dr. Christoph Rose-Petruck. Na Figura 5.13 mostramos as intensidades de espalhamento em função de  $\omega$  para fibras de madeira e fibra de carbono utilizando essa montagem.

Nesse caso, tanto as fibras de carbono como as fibras de madeira estão dispostas na mesma direção. Pelo gráfico da Figura 5.13 podemos perceber que a intensidade do espalhamento tem comportamento de uma senóide com respeito ao ângulo  $\omega$  para uma dada região harmônica. A intensidade em  $H_{10}$  é máxima para  $\omega = 0^\circ$  como esperado e cai para zero quando as fibras estão rotacionadas de  $\omega = 90^\circ$ . Da mesma maneira, a intensidade para a região harmônica  $H_{01}$  é defasada de  $90^\circ$  da região  $H_{10}$  pois as componentes do sinal de espalhamento na horizontal e na vertical são ortogonais.

Para um objeto não homogêneo cada pixel das imagens  $H_{10}$  e  $H_{01}$  reflete o espalhamento na

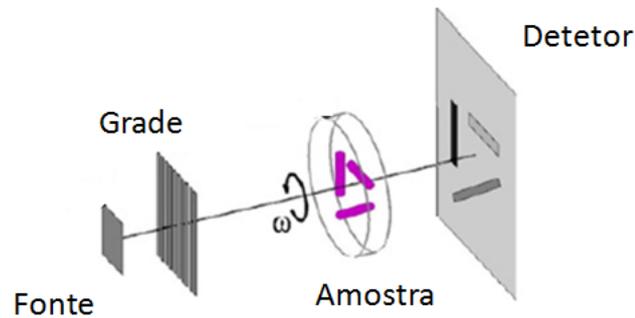


Fig. 5.11: Montagem experimental para caracterização da anisotropia de espalhamento. Um estágio de rotação gira a amostra no ângulo  $\omega$  em relação ao detector e a grade de modulação disposta anterior a amostra. A separação das componentes  $H_{10}$  e  $H_{01}$  revelam a orientação principal do espalhamento. Adaptado de [105].

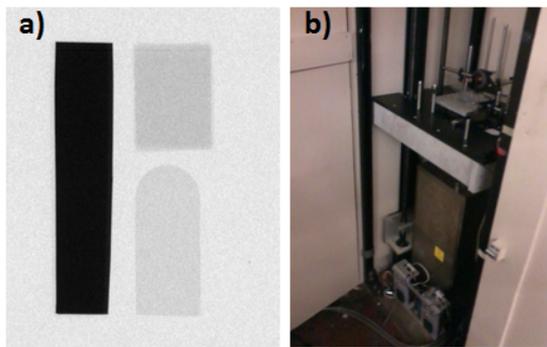


Fig. 5.12: Montagem experimental realizada na Universidade de Brown. a) Imagem das fibras. b) Montagem mostrando a fonte de raios X, grade de modulação e as amostras. O detector fica acima, a direita, fora da imagem.

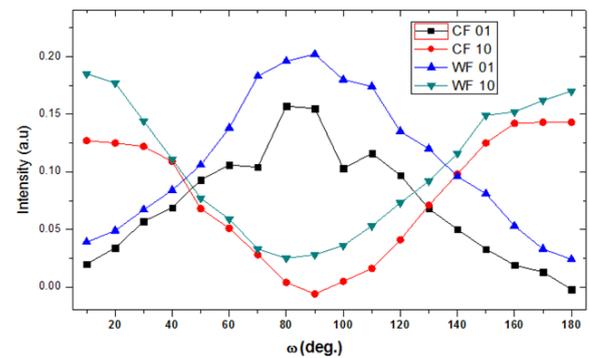


Fig. 5.13: Intensidades  $H_{10}(\omega)$  e  $H_{01}(\omega)$  para as regiões de fibra de carbono(CF) e fibra de madeira(WF) da figura 5.12-a. As intensidades demonstram um comportamento senóide em função do ângulo  $\omega$ .

região através da equação 5.9. Jensen *et al.* [106] introduz um modelo simples para o espalhamento no contexto das imagens por interferometria de Talbot. Nesse trabalho o espalhamento na direção horizontal e vertical é dado pela simples projeção vetorial da curva de espalhamento  $\sigma(\vec{q}, x, y)$  para o vetor de espalhamento  $\vec{q}$  no plano da imagem. Dessa maneira uma fibra, por exemplo, exibe um certo máximo de espalhamento ao longo do ângulo  $\omega$  devido a direção preferencial do elemento espalhador. Na Figura 5.14 mostramos a imagem de absorção(Abs) de uma bifurcação de um arbusto bem como as respectivas imagens de espalhamento para a região  $H_{10}$  para os ângulos  $\omega = 0^\circ, 60^\circ, 120^\circ, 180^\circ$  e  $240^\circ$ , respectivamente.

Jensen *et al.* apresenta um modelo simples para o comportamento da anisotropia que também pode ser adaptado a técnica de heterodinagem. Para um elemento espalhador no ponto  $(x, y)$  da imagem, orientado no ângulo  $\phi(x, y)$ , é de se esperar que os sinais em  $H_{10}$  e

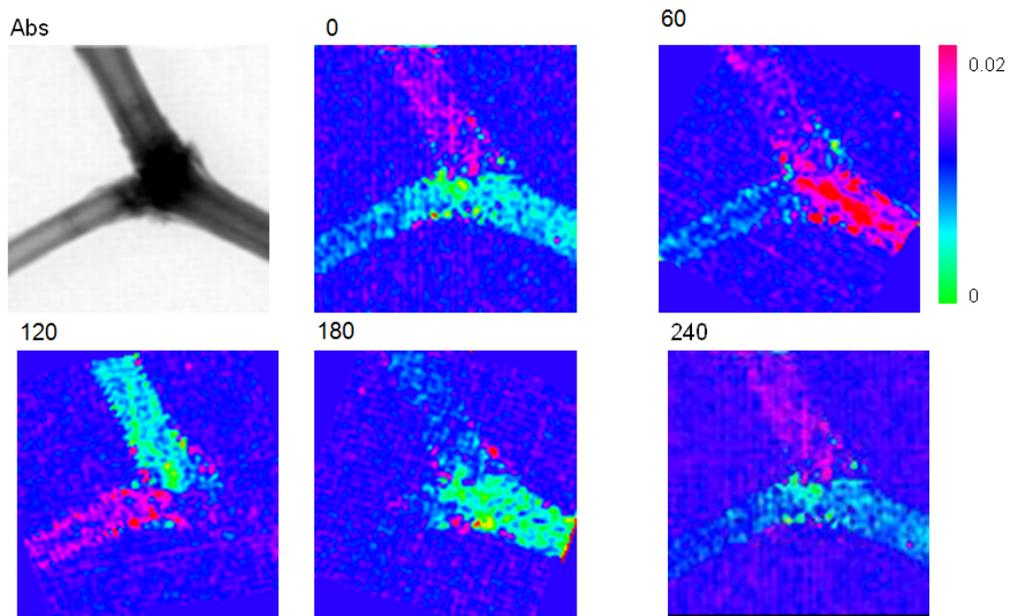


Fig. 5.14: Imagem de absorção e espalhamento para diversos ângulos de espalhamento de uma bifurcação de uma arbusto. As fibras do arbusto espalham preferencialmente na direção perpendicular a casca do ramo de modo que as intensidades da região harmônica  $H_{10}$  é modulada pelo ângulo  $\omega$ .

$H_{01}$  sejam aproximadamente:

$$H_{10}(\omega) = a_0 + b_0 \cos(2\pi\omega + \phi) \quad (5.16)$$

$$H_{01}(\omega) = a'_0 + b'_0 \sin(2\pi\omega + \phi) \quad (5.17)$$

De modo que a anisotropia ou direção preferencial de espalhamento se reflete como uma fase  $\phi$  na intensidade de espalhamento em uma curva que relaciona o sinal espalhado na região harmônica e o ângulo  $\omega$ .

Na Figura 5.15 (a) e (b) mostramos o sinal de espalhamento para três regiões do mesmo objeto da Figura 5.14. Cada região do objeto, contendo fibras orientadas em regiões distintas, produz um sinal de espalhamento único com período  $2\pi$  ao longo do ângulo  $\omega$  e com uma fase  $\phi$  para cada ponto.

Podemos extrair a fase  $\phi$  do sinal  $H_{10}(\omega)$  aplicando-se a transformada de Fourier nesse sinal. Uma vez que o período da modulação é  $2\pi$  a intensidade  $a_0$  será a parte real do sinal no espaço de Fourier para a frequência zero,  $n = 0$ . Da mesma maneira,  $b_0$  pode ser extraída da componente de frequência  $n = 1$  por meio do valor da parte real e  $\phi$  por meio da parte imaginária. Este procedimento foi implementado em MatLab e com isso foi possível obter uma mapa bidimensional  $\phi(x, y)$  para o ângulo preferencial de orientação dos elementos espalhadores na amostra.

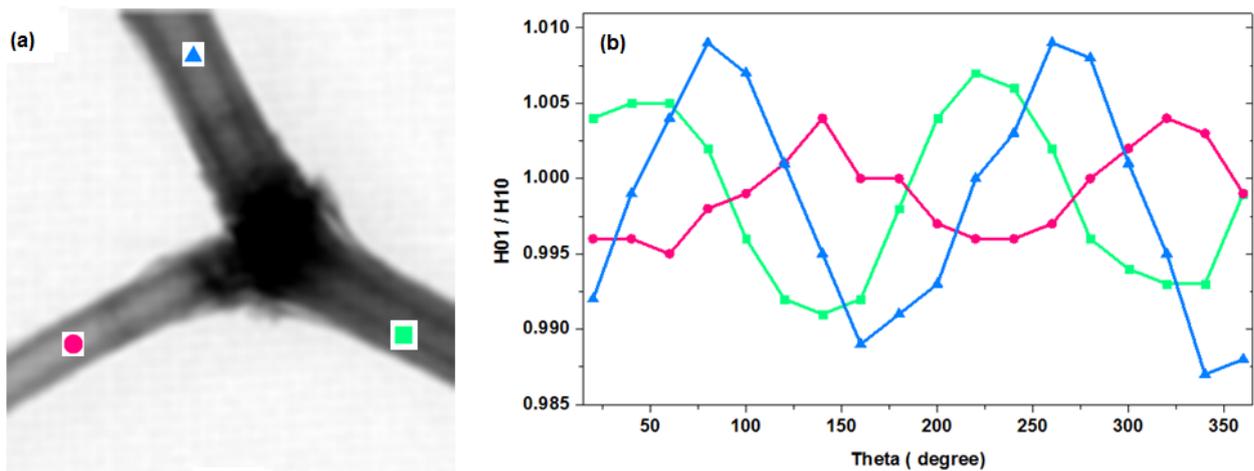


Fig. 5.15: Curvas para o espalhamento anisotrópico na direção  $H_{10}$ . a) Imagem de absorção da amostra: Uma bifurcação de um arbusto e três pontos de onde se obtém a curva de espalhamento em função do ângulo  $\omega$  como mostrado na figura (b). b) O sinal de cada região do objeto carregando a informação intrínseca da direção preferencial de espalhamento  $\phi$ .

Na Figura 5.16 mostramos a imagem do arbusto das Figuras 5.14 e 5.15 processada pelo método descrito acima. As intensidades de cor foram obtidas através da relação  $I_{cor}(x, y) = \phi(x, y) \cdot H_{00}(x, y)$  e mapeadas na escala de cor HSV [56]. Podemos observar que cada ramo do arbusto tem uma orientação distinta e um padrão na intersecção dos ramos aparece revelando detalhes da estrutura das fibras.

## 5.4 Fraturas em Materiais

Um obstáculo na utilização da técnica de heterodinagem encontra-se no fato de que as imagens harmônicas possuem uma razão sinal-ruído baixa quando comparada com as imagens de absorção. Podemos considerar três pontos principais como causa: 1) Erro no alinhamento da grade com as linhas do detetor que provocam batimentos entre a função transferência do detetor e da grade e acarretam na formação de muitos picos adjacentes aos picos harmônicos. 2) As imagens harmônicas estão nas regiões de alta frequência da imagem e o sinal de espalhamento é baixo devido a modulação da grade. Uma vez que nessas regiões ocorre a dominância do ruído no detetor a qualidade do sinal deteriora-se. Sinais com significância estatística são coletadas através da análise de múltiplos pixels mas a distinção pixel a pixel ainda carece de melhorias na técnica. 3) Naturalmente ocorre a convolução da função transferência (*PSF-Point Spread Function*) do detetor com a função transferência da grade. Isso provoca a contaminação das regiões harmônicas com artefatos intrínsecos ao detetor e a grade.

Um dos objetivos desse trabalho foi caracterizar o ruído nos sistemas de imagens com o objetivo de obter uma melhora na relação sinal-ruído. A aplicação de filtros espaciais não

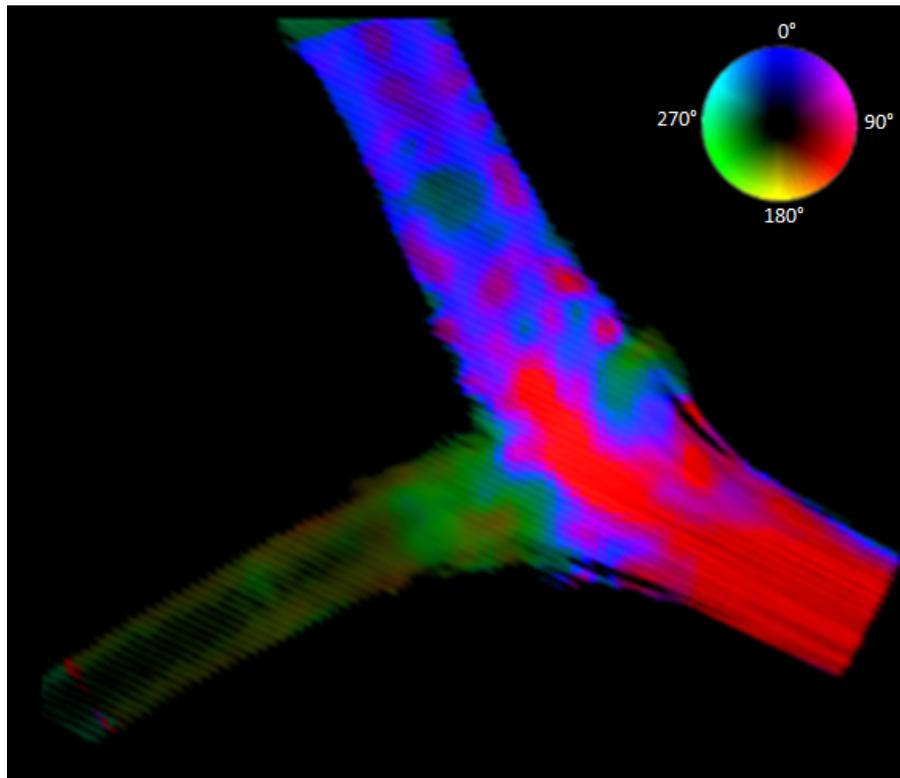


Fig. 5.16: Imagem da anisotropia de espalhamento para a bifurcação do arbusto da Figura 5.15(a) mostrando a direção preferencial de orientação das fibras obtidas pelo método de imagens espaciais harmônicas. O padrão de cores é o resultado do mapa  $I_{cor}(x, y) = \phi(x, y) \cdot H_{00}(x, y)$ , como descrito no texto.

resulta em melhorias significativas na relação sinal-ruído e deteriora a resolução espacial das imagens. Este é um problema agravante uma vez que o corte inevitável no espaço de frequência já introduz uma perda da resolução espacial nas imagens processadas [15].

Uma alternativa seria a aplicação de filtros no domínio do tempo. Alguns trabalhos mostram que a filtragem de radiografia e angiografias através de filtros temporais pode produzir melhoras no contraste [109–111]. Nossa estratégia foi adquirir múltiplas imagens de um mesmo objeto em movimento e aplicar um filtro passa baixa temporal. Na Figura 5.17 podemos ter uma idéia do processo de obtenção das imagens. Para cada imagem modulada extraímos a componente harmônica e obtemos uma sequência temporal de imagens  $H_{mn}(x, y, t)$  ao longo do tempo  $t$ . A medida que movemos o objeto lentamente, os artefatos introduzidos pela grade e pelo processamento da imagem, se concentram nas regiões de alta frequência temporal enquanto que tanto as imagens harmônicas por absorção quanto de espalhamento puras se concentram nas regiões de baixa frequência temporal.

Matematicamente, a sequência de imagens harmônicas  $H_{mn}(x, y, t)$ , no espaço de frequência temporal  $k$ , têm a forma  $H_{mn}(x, y, k)$ . Aplicando-se um filtro  $A(k) = 1$  se  $k < K_0$  e  $A(k) = 0$  se  $k \geq K_0$  para cada pixel da imagem harmônica para  $K_0$  suficientemente pequeno, obtemos

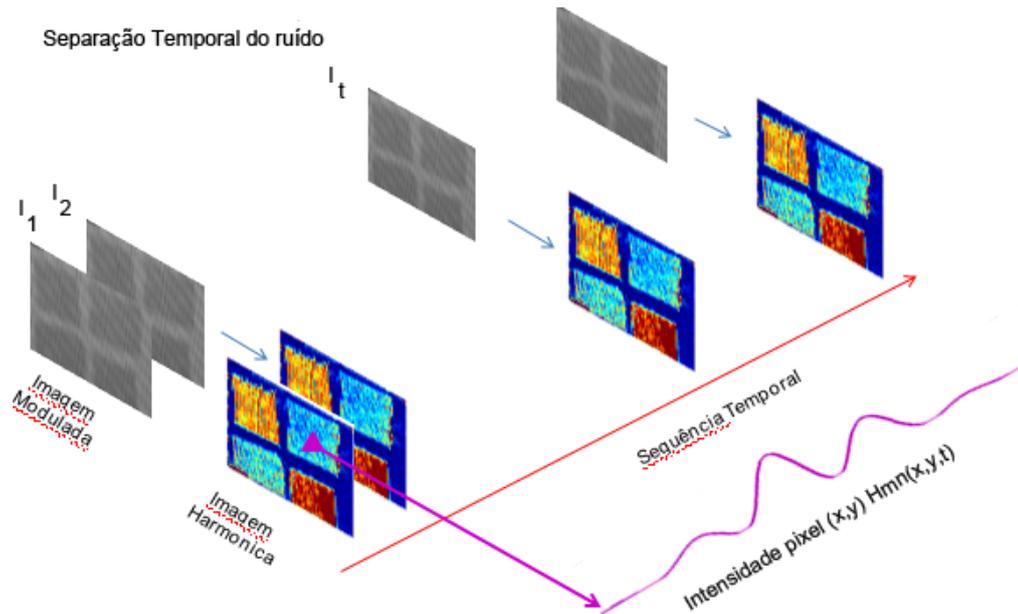


Fig. 5.17: Representação da técnica de processamento de imagens com filtragem no domínio temporal. Uma sequência de imagens do objeto em movimento é coletada. Então para cada pixel da imagem, um filtro temporal de baixa frequência é aplicado, eliminando os ruídos e os artefatos inerentes a produção da imagem.

um novo conjunto de imagens:

$$\hat{H}_{mn}(x, y) = F^{-1} \{H_{mn}(x, y, k) \cdot A(k)\}$$

onde  $F^{-1}$  é a transformada de Fourier inversa.

Aplicamos esse processamento nas imagens de um cristal de titânio-safira com uma quebra ou fratura. Na figura 5.18 mostramos a montagem realizada. Escolhemos este espécime com o objetivo de detectar fraturas em materiais densos através da refração dos raios X na região da fratura. Este cristal permite a orientação da fratura em relação ao feixe de raios X e ao mesmo tempo pode ser considerado como um meio cristalino rico em elementos químicos metálicos pesados que simulam a absorção dos raios X em ligas metálicas e objetos com alto índice de absorção.

Na Figura 5.19 mostramos as imagens da região harmônica  $H_{10}$  do cristal antes e após a aplicação do filtro temporal. Foram coletadas 150 imagens enquanto o cristal era rotacionado em um estágio rotacionador a passos de  $0.05^\circ$  descrevendo uma rotação total de  $10^\circ$ . As imagens foram coletadas com a fonte microfoco descrita acima com energia do feixe de 80 keV e corrente do tubo em 20 mA e tempo de aquisição de 10 segundos. A largura do pixel utilizado foi  $96 \mu\text{m}$  e a grade introduziu uma modulação de 100 linhas por polegada (100 lpi ou aproximadamente  $100 \mu\text{m}$ ). Em seguida aplicamos o filtro passa baixa para  $K_0 \approx 0.1$  e recuperamos as imagens harmônicas.

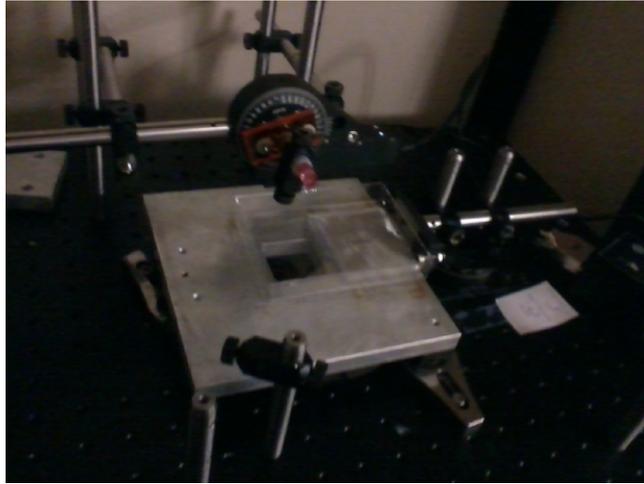


Fig. 5.18: Montagem experimental realizada na Universidade de Brown onde podemos observar o cristal com a fratura em um estágio rotacionador perpendicular ao feixe de raios X. Nessa montagem, fonte e detector ficam abaixo e acima da mesa óptica onde se monta a grade e o cristal e não podem ser vistos. A direita podemos observar um estágio de rotação auxiliar montado na mesa óptica que permite o alinhamento da grade com as linhas e colunas do detector de raios X.

Na Figura 5.19 (b) mostramos a imagem 35 da sequência onde podemos observar o realce da fratura do cristal, fenômeno que não observamos Figura 5.19 (a). Além disso e mais importante, o ruído de fundo na região do cristal e fora do cristal diminuíram significativamente. A relação sinal-ruído passou de aproximadamente de 100 para 250 após a aplicação do filtro mostrando um aumento do SNR por um fator de 2,5 .

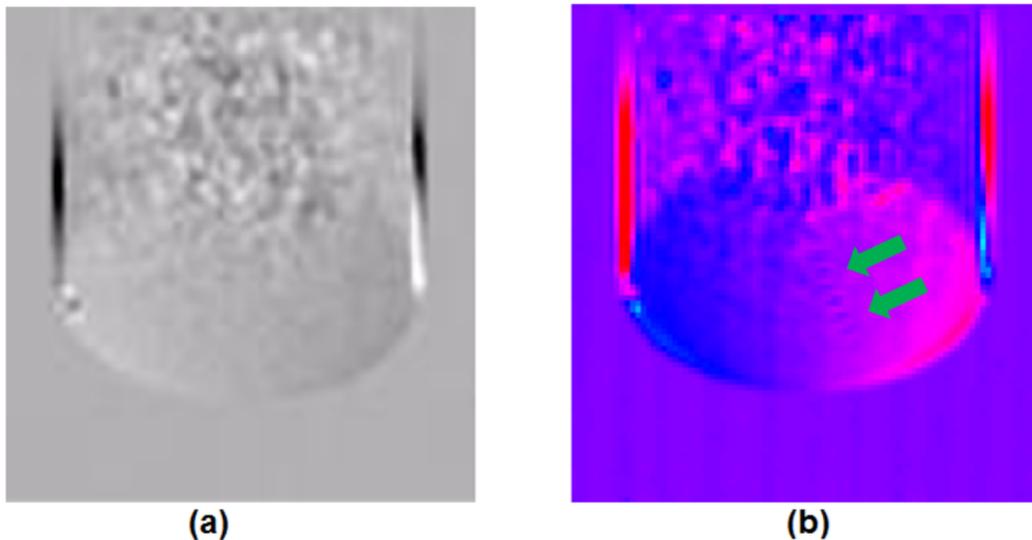


Fig. 5.19: Imagem #35 da sequência temporal de 150 imagens. a) Imagem da região harmônica  $H_{10}$  anterior a aplicação do filtro temporal. b) Imagem da mesma região harmônica após a aplicação do filtro de baixa-frequência temporal mostrando o realce da região da fratura (setas em verde). A escala de cores foi utilizada para realçar o contraste na região da fratura.

## 5.5 Estudos Exploratórios em Tecidos Biológicos

O espalhamento pode ser utilizado como um mecanismo intensificador das imagens por contraste de fase tal como demonstrado por Wu et. al. [99]. A aplicação das imagens de espalhamento no realce do contraste de fase é natural pois ambos os fenômenos, espalhamento a baixo ângulo e refração, tem como princípio comum o espalhamento inelástico de raios X como demonstrado por Davis [7] e Rytov [17].

O trabalho de Wuet *al.*, mostra que os contornos de um fio de Nylon sofrem aumento do contraste por meio da técnica de heterodinagem. Em um experimento com tecidos moles, utilizamos amostras de tecidos de carcinoma ductal invasivo com o objetivo de avaliar uma possível aplicação dessa técnica. O espécime utilizado foi o mesmo da referência [112] no contexto das imagens por contraste de difração DEI (*Diffraction Enhanced Imaging*) [12, 25]. As imagens por contraste de difração mostraram o realce das bordas em nódulos de gordura benignos do espécime como descrito em [112] e que reproduzimos na Figura 5.20 (d). Nas Figuras 5.20 (a), (b), (c) mostramos o mesmo espécime através da técnica de espalhamento harmônico. As imagens foram coletadas com energia do feixe em 40 keV, corrente do tubo com anodo de Cobre de 30 mA, distância amostra ao detector de 1 metro e tempo de exposição de 10 segundos em um detector Rad-Icon 4K. Na parte (a) mostramos a imagem modulada e nas figuras (b) e (c) as imagens por absorção e de espalhamento harmônico, respectivamente. A comparação entre as imagens mediante as duas técnicas mostra que não ocorrem mudanças significativas nas imagens de absorção possivelmente devido a a natureza das estruturas analisadas não demonstram uma forte anisotropia nos diferentes tecidos. Entretanto, tanto as imagens por realce de difração quanto as imagens harmônicas mostram um realce na borda dos nódulos de gordura como pode ser visto na Figura 5.20(b).

Este fato é notável e chama atenção pois a diferença de densidade dos tecidos foi diferenciada em ambas as técnicas. A instrumentação simples, facilmente adaptável em contextos clínicos mostra o grande potencial da técnica de imagens por espalhamento harmônico em avanços futuros na área de imagens por difração e utilização dessa ferramenta como instrumento de análise.

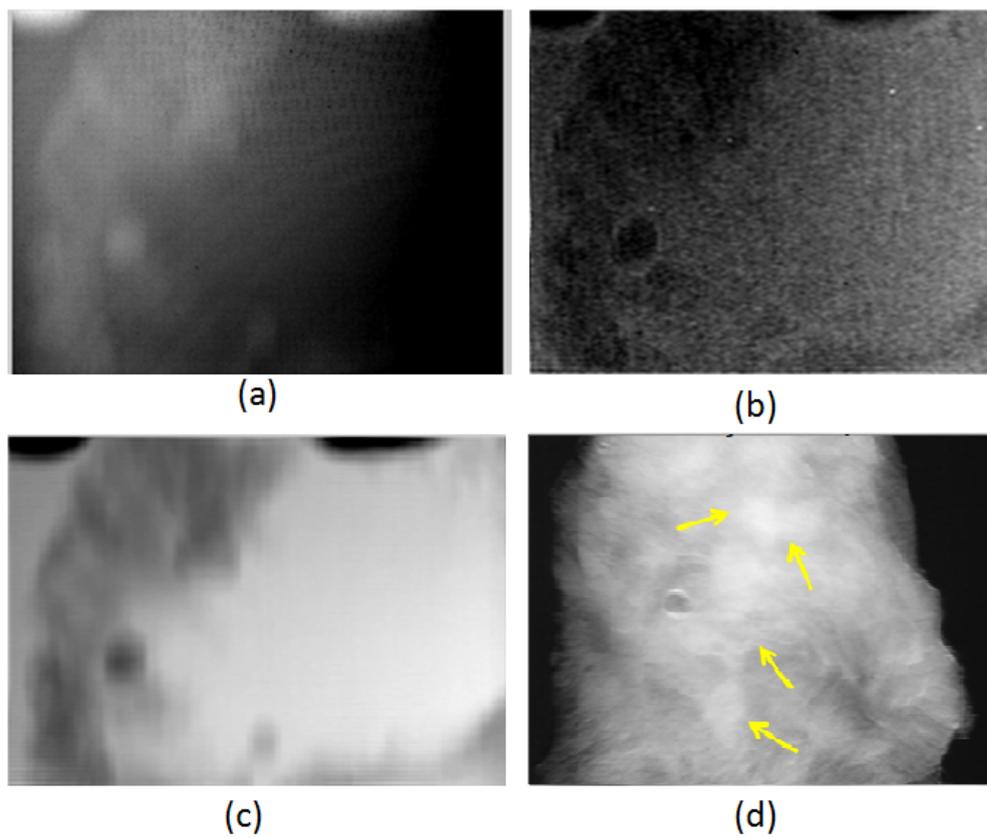


Fig. 5.20: Aplicação em imagens de carcinomas. a) Imagem de uma amostra de carcinoma ductal invasivo modulado pela grade. b) Imagem de espalhamento mostrando o realce de contraste de borda um nódulo de gordura benigno. c) imagem de absorção para comparação com (b). d) Imagem da mesma amostra obtida pelo método DEI em ambiente síncrotron. Imagem extraída da referência [112].

## Capítulo 6

# Conclusões e Perspectivas

O princípio norteador dessa tese foi a implementação, desenvolvimento e aplicação de técnicas de imagens e microtomografias de raios X por meio do contraste de fase e quando possível, do espalhamento elástico a baixo ângulo dos fótons de raios X. Para tanto, foi necessário a implementação e o desenvolvimento de técnicas de imagens que utilizam fontes de raios X microfoco assim como a técnica de imagens por espalhamento harmônicas heteródinas. Também foi necessário o desenvolvimento de técnicas computacionais de processamento de imagens e o estudo das suas particularidades.

A formação de imagens por contraste de fase envolve diversos parâmetros tais como espectro de emissão, não linearidade da amostra, comportamento ondulatório das frentes de onda etc. exigindo que integrais múltiplas sejam calculadas. Como consequência simulações a partir de primeiros princípios podem resultar em altos tempos de processamento computacional. Isto se agrava se levarmos em conta a alta resolução nos detalhes da amostra e do *setup* simulado. Na literatura existem propostas para contornar esses problemas como a utilização de processos matemáticos mais abrangentes, tais como a representação de espaço de fase [113], a aproximação para o regime de Fourier (FRT-Fractional Fourier Transform [114]), ou a utilização de métodos estatísticos de simulações de Monte Carlo [115]. Acreditamos que essas técnicas podem diminuir o tempo computacional e a resolução desses cálculos e possibilitar a criação de ferramentas de simulação para as imagens por contraste de fase bem como novas técnicas de processamento e obtenção desses padrões no contexto das imagens de raios X.

A implementação de uma estação de trabalho para a obtenção de microtomografias de raios X teve como princípio a construção de um equipamento robusto e de baixo custo bem como o domínio da técnica e das suas particularidades. Obtivemos microtomografias com resolução espacial de até  $4 \mu m$  e volume de  $2000 \times 2000 \times 2048$  voxels e várias aplicações multidisciplinares foram desenvolvidas em colaboração com outros grupos de pesquisa nas áreas de paleontologia,

biomedicina e ciência dos materiais.

O *know-how* obtido através do desenvolvimento dessa instrumentação e de ferramentas de processamento de imagens para as reconstruções em microtomografias possibilitou a ampliação dos horizontes e utilização desse conhecimento na área de imagens de espalhamento harmônicas. A utilização do espalhamento de raios X como fonte de informação vem sendo explorada a algum tempo e várias propostas foram apresentadas na literatura tais como as imagens por realce de difração, interferometria de Talbot, mapeamento do espalhamento a baixo ângulo de raios X etc. As imagens harmônicas despertam como um novo conjunto de técnicas com a mesma finalidade, porém tecnicamente mais simples, do ponto de vista da instrumentação, deixando a extração da informação à cargo das etapas de processamento da imagem.

Essa metodologia é atraente do ponto de vista de futuras aplicações a nível prático. Nesta tese mostramos que essa técnica pode ser reproduzida em laboratório com fontes convencionais de raios X bem como fontes microfoco. A caracterização do sinal de espalhamento em função da distância amostra-detector para nanopartículas dispersas em um meio líquido mostrou uma variação significativa e em conformidade com a teoria proposta na literatura. Além disso, nesta tese adaptamos o processo de formação das imagens harmônicas ao contexto do espalhamento anisotrópico de raios X e obtivemos imagens de anisotropia espacial. Em comparação a outros métodos a técnica de heterodinagem é robusta e a obtenção de imagens de anisotropia é um arranjo importante que mostra a versatilidade desse tipo de imageamento.

Uma lição fundamental a cerca desta técnica, foi a necessidade do desenvolvimento de algoritmos e técnicas de correção para o ruído introduzido no processamento da imagem. Este ruído, como discutido no último capítulo, ocorre pelo fato do sinal de espalhamento ser pequeno, de pequenas imperfeições no alinhamento da grade com o detector e da própria grade de modulação. Desenvolvemos técnicas de melhoria da relação sinal ruído e conseguimos duplicar o valor de SNR em alguns casos por meio de filtros temporais possibilitando a detecção de fraturas e interfaces na área de ciência dos materiais. Eliminar esses artefatos, tanto por meio de algoritmos de correção ou através de detectores de raios X com melhor resolução espacial e detecção direta é uma alternativa a ser investigada na tentativa de melhoria da qualidade dessas imagens.

A aplicação destas ferramentas foi desenvolvida no âmbito das propriedades histomorfométricas em tecidos ósseos. Estudos desta natureza são importantes pois fornecem o elo de ligação entre a instrumentação e aplicação destas técnicas como ferramenta de análise. Além disso, proporcionam um vasto conhecimento técnico multidisciplinar. Nosso estudo detectou a influência das dietas hiperlipídicas em alguns parâmetros estruturais ósseos em ratos *Sprague-Dawley* na região do osso compacto do fêmur mas não detectamos influencia na região trabecular desses

espécimes. Acreditamos que múltiplos fatores influenciam o desenvolvimento dessas estruturas e uma análise sistemática, envolvendo outras partes do tecido ósseo, idade dos animais seja necessária para um entendimento holístico de todos fatores envolvidos [72, 73, 94].

Em particular, fenômenos biológicos são complexos e envolvem cadeias extensas de processos bioquímicos internos e ambientais externos ao organismo. A técnica de microtomografia, por sua vez, possibilita a obtenção de valores quantitativos morfométricos com relativa facilidade e estatisticamente relevantes bem como em grande número. A aplicação dessa técnica na obtenção de dados estatísticos, explorando as múltiplas correlações e grandezas matemáticas como conectividade, tortuosidade, dimensão fractal etc. pode ser uma ferramenta importante no entendimento da complexidade dos processos biológicos e na modelagem desses fenômenos bem como no entendimento de propriedades espaciais de sistemas complexos em geral [81, 116].

## Apêndice A

### Interação de raios X com a Matéria

raios X são constituídos de fótons com energia  $E_\nu = \hbar\nu$  entre algumas centenas de eV e várias centenas de keV. Ao interagir com a matéria, os fótons estão sujeitos a quatro tipos de interação, que estão sumarizados na Figura A.1, absorção por efeito fotoelétrico, espalhamento Thomson, espalhamento Compton e produção de pares [117].

No processo de absorção fotoelétrica, os fótons transferem a energia  $E_\nu = \hbar\nu$  para os elétrons ligados a um núcleo atômico. Estes elétrons adquirem energia cinética e subsequentemente decaem em quantas de energia menores emitindo múltiplos fótons de menor energia ou contribuindo para a agitação térmica da rede de átomos e portanto, o aumento da temperatura.

No espalhamento Thomson, os fótons, vistos como pacotes de onda eletromagnética, aceleram os elétrons, que por sua vez irradiam outros fótons com o mesmo comprimento de onda. Neste processo clássico, não ocorre a perda da energia do fóton. Consequentemente, o comprimento de onda do fóton incidente é igual ao comprimento de onda do fóton espalhado.

Este espalhamento é descrito pela seção de choque diferencial  $\frac{d\sigma(\theta, \phi)}{d\Omega}$  que dita a intensidade da onda espalhada nas direções  $\theta$  e  $\phi$ . Através das equações de Maxwell ou descrição clássica do espalhamento mostra-se que:

$$\frac{d\sigma_{Thomson}}{d\Omega} = \frac{r_e^2}{2}(1 + \cos^2 \phi) \quad (\text{A.1})$$

No espalhamento Compton, o fóton incidente transfere energia cinética ao elétron. Neste processo, o fóton espalhado possui um comprimento de onda maior, quando comparado ao comprimento de onda do fóton incidente e vale a relação:

$$\lambda' = \lambda + \frac{h}{2m_e c}(1 - \cos \phi) \quad (\text{A.2})$$

Onde  $\lambda'$  é o comprimento de onda do fóton espalhado,  $\lambda$  o comprimento de onda do fóton

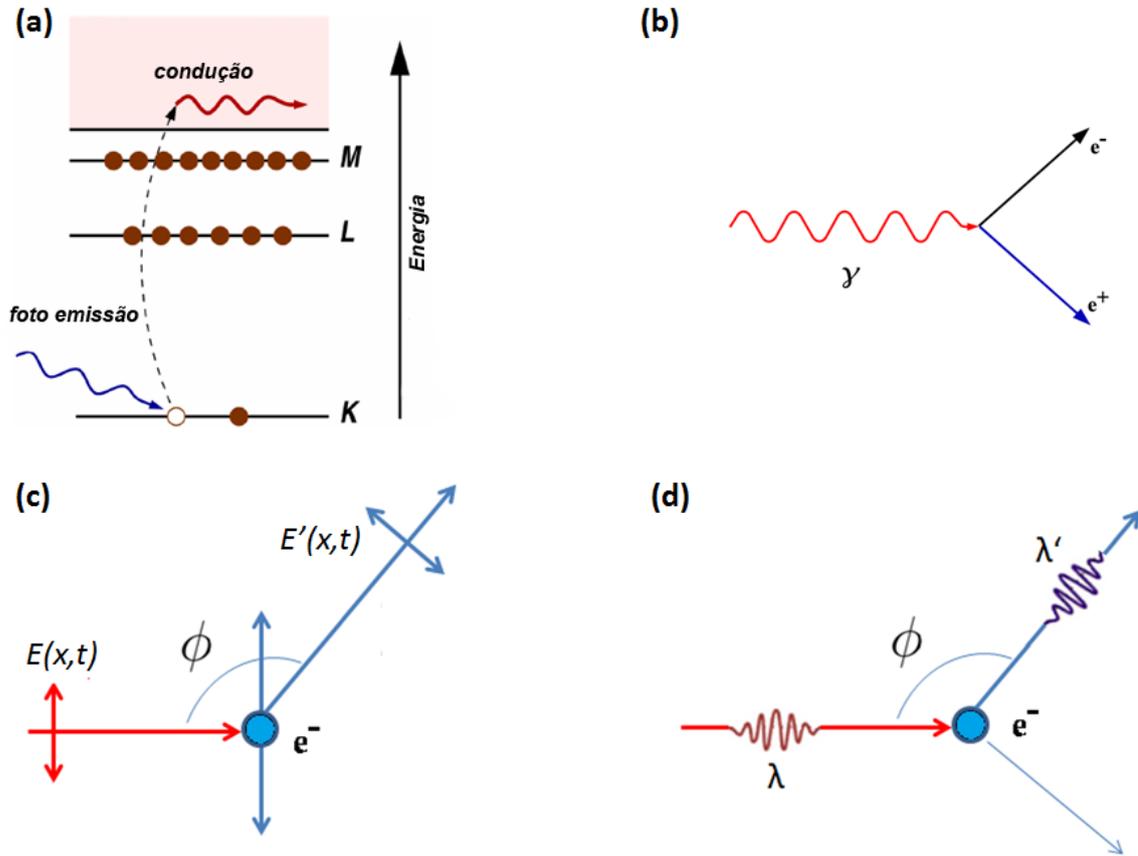


Fig. A.1: Principais interações do fóton de raios X com um elétron solitário. a) Absorção fotoelétrica. b) Produção de pares  $e^+$  e  $e^-$ . c) Espalhamento Thomson d) Espalhamento Compton. (Figura adaptada de [3]).

incidente,  $h$  a constante de Planck e  $m_e$  a massa do elétron. A secção de choque diferencial para o espalhamento Compton é dada pela fórmula de Klein-Nishina [118]:

$$\frac{d\sigma_{Compton}}{d\Omega} = \frac{r_e^2}{2[1 + \alpha(1 - \cos\phi)]^2} \left[ (1 + \cos^2\phi) + \frac{\alpha^2(1 - \cos\phi)^2}{1 + \alpha(1 - \cos\phi)} \right] \quad (\text{A.3})$$

onde  $\alpha = \frac{E_\nu}{mc^2}$  e  $E_\nu$  é a energia do fóton incidente.

O espalhamento Compton está ligado a natureza quântica da interação elétron-fóton e a expressão acima é oriunda da eletrodinâmica quântica [5]. Para fótons com baixa energia,  $\alpha \rightarrow 0$  e a secção de choque diferencial se reduz a secção de choque diferencial clássica do espalhamento Thomson.

Tanto o espalhamento coerente Thomson e o incoerente Compton ocorrem na interação fóton-matéria. Entretanto o espalhamento Compton é dominante apenas em energias próximas da energia de repouso do elétron 0,511 MeV.

O quarto processo é a produção de pares elétron-pósitron em energias acima de duas vezes

a energia de repouso do elétron. Nesse processo, o fóton de raios X é absorvido criando pares  $e^-$  e  $e^+$ . Em fontes convencionais este processo pode ser negligenciado pois a energia do fóton raramente ultrapassa 1,022 MeV.

Na Figura A.2 mostramos a secção de choque total,  $\int \sigma d\Omega$ , em átomos de Carbono para os quatro processos em função da energia do fóton. Na região de baixa energia, a absorção fotoelétrica é dominante e na região de energia média os três processos ocorrem simultaneamente. Apenas em alta energia a secção de choque total para a produção de pares se torna significativa.

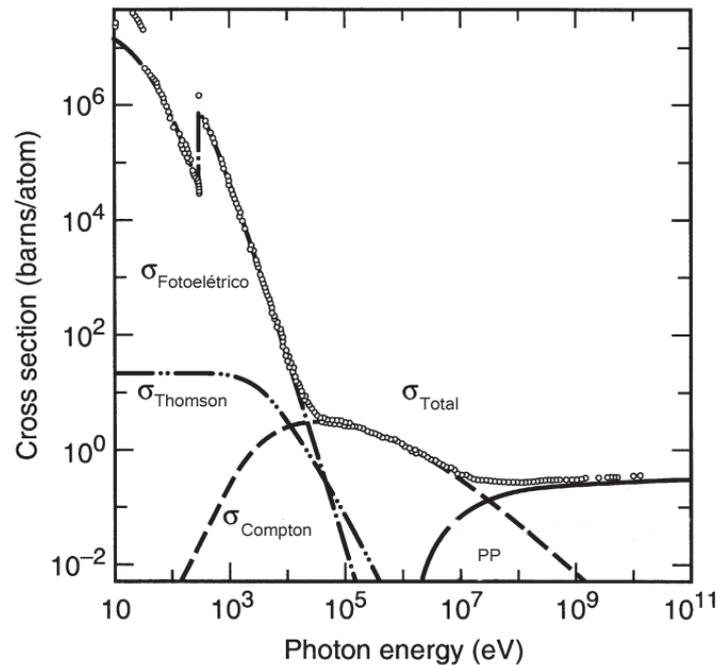


Fig. A.2: Secção de choque total  $\sigma_{Total}$  para os quatro processos de interação fóton-matéria no espectro de raios X em átomos de Carbon  $C^{12}$ . Adaptado de [4, 119].

## Apêndice B

# Algoritmo de simulação para a equação de Fresnel-Kirchoff

```

#include <iostream>
#include <cmath>
#include <complex>
#include<math.h>
#include<fstream>
#include <cstdlib>
#include <time.h>
#define pi 3.14159265359
typedef complex<double> cplx;
using namespace std;
int main()
{
int i;
int index, index_det,index_obj;
int k,m,n;
//-----//
double a,l,mu,r1,r2,r;
double d_x,e_x,o_x,Ien;
complex<double> Ix,v;
//-----Gera o grid objeto-----//
double obj_step = 0.01; // step do sinal do objeto - 0.02 um
double obj_width = 700; // tamanho do objeto 200 um
int obj_np=round(obj_width/obj_step);
cplx* obj_q;
obj_q=(cplx*) malloc(obj_np* sizeof(cplx));
for (i=0;i<obj_np; i++ )
{
obj_q[i].imag()=0;
obj_q[i].real()=1;
}
//----- define o cilindro no grid -----//
a=50; // raio do cilindro em um
l=120.0; // lambda em picometros: 10^-12m
// em m 1A=10^-10 m
// p/ W ka --> 1240/70000ev=0.017nm= 17*10^-12
mu = 1; // mu x 10^-6
r1=0.15; // 15cm = 0.15m
r2=0.63; // 1m = 1m
//-----//
for (index=0;index<obj_np;index++)
{
r=(index-(obj_np/2))*obj_step;
if ( abs(r)<=a )

```

```

    {
        v.real(0);
        v.imag(2*(pi/l)*mu*a*sqrt(1 - pow(r/a,2)) );
        obj_q[index]= exp(v);
        //cout << obj_q[index].real() << " " <<
        obj_q[index].imag() << endl ;
    }
}
//-----abre arquivo de Log-----//
ofstream mylog;
mylog.open("log.txt",ofstream::trunc);
//-----define detetor-----//
double det_step=2; // Passo do detetor em um/ tamanho do pixel
double det_width=2000; // Field of View do detetor em um
int det_np=round(det_width/det_step );
complex<double>* Im;
Im=(complex<double>*) malloc(det_np* sizeof(complex<double>));
for (i=0;i<det_np; i++ )
{
    Im[i].imag()=0;
    Im[i].real()=0;
}
complex<double>* Ie;
Ie=(complex<double>*) malloc(det_np* sizeof(complex<double>));
for (i=0;i<det_np; i++ )
{
    Ie[i].imag()=0;
    Ie[i].real()=0;
}
mylog << obj_np << " " <<obj_np << endl;
mylog << det_np << " " << det_np << endl;
time_t start_time = clock();
float time1;
//-----Define dimensoes da Fonte -----//
double f_size= 12; // raio em um
double f_step=0.1; // step da fonte em um
int f_np = round(f_size/f_step);
for (k=0;k<=f_np;k++)
{
    e_x = (k-(f_np/2))*f_step;
    time1 = (float) (clock() - start_time) / CLOCKS_PER_SEC;
    mylog << e_x << " " << time1 << endl;
    cout << "projecting ray for e_x: " << e_x << " um "
    << " total calculation time: " << time1 << "s " << endl;
    for (index_det=0; index_det<det_np;index_det++)
    {
        d_x=(index_det - (det_np/2))*det_step;
        Ix.real()=0; //intensidade no ponto det_x
        Ix.imag()=0;
        // inicio do loop sobre toda a imagem
        for (index_obj=0;index_obj < obj_np; index_obj++)
        {
            // Calcula a posicao do ponto no objeto
            o_x=(index_obj-(obj_np/2))*obj_step;
            v.real(0);
            v.imag(-2*(pi/l)*( pow(e_x-o_x,2)/(2*r1))+
            (pow(d_x-o_x,2)/(2*r2)) );
            Ix=Ix +exp(v)*obj_q[index_obj];
        }
        Ie[index_det]=abs(Ix);
        Ien=(double) Ie[index_det].real()/f_np;
        Im[index_det]=Im[index_det].real()+Ien;
    }
}
}

```

---

```
ofstream arq;
arq.open("saida.txt",ofstream::trunc);
for (i=0;i<det_np;i++)
{
    arq << (i - (det_np/2))*det_step
<< " " << Im[i].real() <<endl ;
}
arq.close();
mylog.close();
return 0;
}
```

## Apêndice C

# Implementação do algoritmo *Filtered Back Projection*

```

clear;
num_im=360;           % Numero de projecoes;
dtheta=1.0;          % Passo em graus;
height= 91;          % Altura da projecao;
width = 91;          % Largura da projecao;
slice=65;            % Secção inicial;
num_slice=1;         % Número de secções;
fcutt=0.8;           % Frequencia de corte p/ filtros Hanning, Shepp-Logan;
ring_smooth=0.3;     % Frequencia de corte para artefatos em anel;
cr=101.7;            % Centro de rotação;
data_folder='meu_dir'; % Diretório contendo as Projeções
job_n=2;              % Rotina a ser executado:
                      %      1- Reconstruir o volume
                      %      2- Encontrar Cent. de Rot. por estimativa

mkdir(data_folder,'slices');
%-----%
cm=zeros(1,num_im);
cm_ln=zeros(1,num_im);
sino=zeros(num_im,width,num_slice);
sino_pure=zeros(num_im,width,num_slice);
for (i=1:num_im)
    %---index-----%
    index=i-1;
    %---open/correct Image-----%
    nomearq=strcat(data_folder,'image', sprintf('%04i',index),'.tif');
    fprintf(1,'load %s\n',nomearq);
    Pn=imread(nomearq);
    Pn=double(Pn);
    Pn=Pn-offset;
    Pn=Pn./gain;
    Pn=Pn*ave_gain;
    %Transforma Intensidades em mu-----%
    Pn=-16000*log(Pn/16000);
    %---transforma para sinograma-----%
    for (j=1:num_slice)
        sino_pure(i,:,j)=Pn(slice+(j-1),:);
    end
    %-----encontra centro de massa-----%
    m_tot=0;
    m_tot_ln=0;
    for j=1:width

```

```

                m_tot=m_tot+Pn(slice,j);
                cm(i)=cm(i)+Pn(slice,j)*j;
            end
            cm(i)=cm(i)/m_tot;
        end
        if (job_n==2)
            num_slice=1;
        end
        for(j=1:num_slice)
            %-----Gera filtro de Hanning-----%
            the_filter=hannfilter( size(sino_pure,1), size(sino_pure,2) ,fcutt);
            %-----Remove artefatos em Anel-----%
            w_cut=size(sino_pure,2)*ring_smooth/2;
            ring_smooth_filter=zeros(1,size(sino_pure,2));
            for i=1:size(sino_pure,2)
                if (abs(i-size(sino_pure,2)/2) < w_cut)
                    ring_smooth_filter(i)=(1+cos( pi*abs(i-size(sino_pure,2)/2)/w_cut ) )/2 ;
                end
            end
            zing=mean(sino_pure(:,j),1)/num_im;
            zing_fourier=fftshift(fft(zing));
            zing_fourier=zing_fourier.*ring_smooth_filter;
            zing_smooth=ifft( ifftshift(zing_fourier));
            correction= zing-zing_smooth;
            for (i=1:num_im)
                sino_pure(i,:,j)=sino_pure(i,:,j) - correction;
            end
            %-----Aplica filtro de Hanning para cada plano-----%
            sino = projfilter(sino_pure(:,j),the_filter);
            %-----faz sinograma > 0 -----%
            minimo_filtro=min(min(sino));
            if (minimo_filtro < 0)
                sino=sino-minimo_filtro;
            end
            %-----Encontra Centro de Rotacao-----%
            ave_cr=(cm(1)+cm(num_im/2))/2;
            % cr=(cm(1)+cm(num_im))/2;
            %nome=strcat('sino/cm',int2str(slice),'.raw');
            %id = fopen(nome, 'w');
            %x = fwrite(id,cm,'double','l');
            %fclose(id);
            %-----%
            sina=zeros(num_im,1);
            cosa=zeros(num_im,1);
            for (i=1:num_im)
                sina(i)= sin(pi*i*dtheta/180);
                cosa(i)= cos(pi*i*dtheta/180);
            end
            %-----%
            if (job_n==1)
                f=backproject(sino,cr,sina,cosa,width,num_im);
                nomearq=strcat(data_folder,'/slices/slice-',num2str(slice+(j-1)),
                    '- ',num2str(fcutt),'-',num2str(cr),'.tif');
                savetiff(f,nomearq);
            end
            elseif (job_n==2)
                for (dcr=-10:0.5:10)
                    cr=ave_cr+dcr;
                    f=backproject(sino,cr,sina,cosa,width,num_im);
                    nomearq=strcat(data_folder,'/slices/slice-',num2str(slice+(j-1)),
                        '- ',num2str(fcutt),'-',num2str(cr),'.tif');
                    savetiff(f,nomearq);
                end
            end
            end
            %-----%

```

---

```
function x=backproject(sino,cr,sina,cosa,width,num_im)
if (cr >= size(sino,2)/2 )
    rec_w=2*(size(sino,2)-cr);
else
    rec_w=2*cr ;
end
rec_w=rec_w-2;
f=zeros(width,width);
for (x=1:width)
for (y=1:width)
    ix=x-width/2;
    iy=y-width/2;
    r=sqrt(ix*ix+iy*iy);
    if(r< (rec_w)/2)
        for (i=1:num_im)
            index = cr + ix*sina(i)+iy*cosa(i);
            gap=index-floor(index);
            f(x,y)=f(x,y)+ gap*sino(i,floor(index))+ (1-gap)*sino(i,floor(index)+1);
        end
    end
end
end
x=f;
end
```

## Referências Bibliográficas

- [1] W. C. Röntgen. Über eine neue art von strahlen. *Der Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg Jahrgang*, 1895.
- [2] W. C. Röntgen. On a new kind of rays. *Nature*, 53:274–277, 1896.
- [3] M. Newville. *Fundamentals of XAFS*. University of Chicago, 2004.
- [4] J.H. Hubbell. Photon mass attenuation and energy-absorption coefficients from 1 keV to 20 MeV. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 33:1269–1290, 1982.
- [5] R.B. Leighton R. P. Feynman, M. Sands. *The Feynman Lectures on Physics*. Addison Wesley, 1971.
- [6] G. Fournet A. Guinier. *Small-angle scattering of X-rays*. Wiley, 1st edition, 1955.
- [7] T.J. Davis. Unified treatment of small-angle x-ray scattering, x-ray refraction and absorption using the rytov approximation. *Acta Cryst.*, A50:686–690, 1994.
- [8] A. Bravin, J. Keyrilainen, M. Fernandez, S. Fiedler, C. Nemoz, M. Karjalainen-Lindsberg, M. Tenhunen, P. Virkkunen, M. Leidenius, and K. Von Smitten. High-resolution ct by diffraction-enhanced x-ray imaging: mapping of breast tissue samples and comparison with their histo-pathology. *Physics in medicine and biology*, 52(8):2197, 2007.
- [9] A. Pogany, D. Gao, and S.W. Wilkins. Contrast and resolution in imaging with a micro-focus x-ray source. *Review of Scientific Instruments*, 68(7):69 – 72, 1997.
- [10] O. Bunk F. Pfeiffer, T. Weitkamp and C. David. Phase retrieval and differential phase-contrast imaging with low-brilliance x-ray sources. *Nature*, 2(4):258 – 261, 2006.
- [11] U. Bonse and M. Hart. An x ray interferometer. *Applied Physics Letters*, 6(8):155–156, 1965.

- 
- [12] D Chapman, W Thomlinson, R E Johnston, D Washburn, E Pisano, N Gm $\tilde{A}$  $\frac{1}{4}$ r, Z Zhong, R Menk, F Arfelli, and D Sayers. Diffraction enhanced x-ray imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 42(11):2015, 1997.
- [13] C. Giannini, D. Siliqi, M. Ladisa, D. Altamura, A. Diaz, A. Beraudi, T. Sibillano, L. De Caro, S. Stea, F. Baruffaldi, and O. Bunk. Scanning SAXS-WAXS microscopy on osteoarthritis-affected bone - an age-related study. *Journal of Applied Crystallography*, 47(1):110–117, Feb 2014.
- [14] M. Bech, A. Tapfer, A. Velroyen, A. Yaroshenko, B. Pauwels, J. Hostens, P. Bruyndonckx, A. Sasov, and F. Pfeiffer. In-vivo dark-field and phase-contrast x-ray imaging. *Scientific reports*, 3, 2013.
- [15] H. Wen, E.E. Bennett, M.M. Hegedus, and S.C. Carroll. Spatial harmonic imaging of x-ray scattering - initial results. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 27(8):997–1002, Aug 2008.
- [16] A. Bravin, P. Coan, and P. Suortti. X-ray phase-contrast imaging: from pre-clinical applications towards clinics. *Phys. Med. Biol.*, 58:R1âR35, 2013.
- [17] M. Born, E. Wolf, and A.B. Bhatia. *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. Cambridge Univ Pr, 1999.
- [18] F. Zernike. The concept of degree of coherence and its application to optical problems. *Physica*, 5:785–795, 1938.
- [19] A. Ash. Denis gabor: 1900-1979. *Nature*, 280(431-433), 1979.
- [20] P.C. Diemoz, A. Bravin, and P. Coan. Theoretical comparison of three x-ray phase-contrast imaging techniques: propagation-based imaging, analyzer-based imaging and grating interferometry. *Opt. Express*, 20(3):2789–2805, Jan 2012.
- [21] V.E. Cosslett and W.C. Nixon. X-ray shadow microscope. *Nature*, 168(24-25), 1957.
- [22] F. Veen and F. Pfeiffer. Coherent x-ray scattering. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16:5003, 2004.
- [23] T. E. Gureyev, S. C. Mayo, D. E. Myers, Ya. Nesterets, D. M. Paganin, A. Pogany, A.W. Stevenson, and S.W. Wilkins. Refracting roentgens rays: Propagation-based x-ray phase contrast for biomedical imaging. *Journal of Applied Physics*, 105(10), 2009.

- 
- [24] J. Keyrilainen, M. Fernandez, S. Fiedler, A. Bravin, M.L. Karjalainen-Lindsberg, P. Virkkunen, E.M. Elo, M. Tenhunen, P. Suortti, and W. Thomlinson. Visualisation of calcifications and thin collagen strands in human breast tumour specimens by the diffraction-enhanced imaging technique: a comparison with conventional mammography and histology. *European journal of Radiology*, (53):226–237, 2005.
- [25] I Koyama, A. Momose, J. Wu, T.T. Lwin, and T. Takeda. Biological imaging by x-ray phase tomography using diffraction-enhanced imaging. *Japanese Journal of Applied Physics*, 44(11R):8219, 2005.
- [26] M. R. Teague. Deterministic phase retrieval: a green’s function solution. *J. Opt. Soc. Am.*, 73(11):1434–1441, 1983.
- [27] M. R. Teague. Image formation in terms of the transport equation. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2(11):2019–2026, Nov 1985.
- [28] D. Paganin, S. C. Mayo, T. E. Gureyev, P. R. Miller, and S. W. Wilkins. Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object. *Journal of Microscopy*, 206(1):33–40, 2002.
- [29] T. Weitkamp, D. Haas, D. Wegrzynek, and A. Rack. *ANKAphase*: software for single-distance phase retrieval from inline X-ray phase-contrast radiographs. *Journal of Synchrotron Radiation*, 18(4):617–629, Jul 2011.
- [30] Tomopy - tomography reconstructions routines in python - advanced photon source. <http://www.github.tomopy.com>.
- [31] G. Cao, T.J. Hamilton, C. Rose-Petruck, and G.J. Diebold. X-ray phase-contrast imaging: transmission functions separable in cartesian coordinates. *J. Opt. Soc. Am. A*, 24(4):1201–1208, Apr 2007.
- [32] H.M. Ozaktas and D. Mendlovic. Fractional fourier transforms and their optical implementation. *J. Opt. Soc. Am. A*, 10(12):2522–2531, Dec 1993.
- [33] B. Pollack. Experiences with planography. *Chest*, 24(6):663–669, 1953.
- [34] A. M. Cormack. Representation of a function by its line integrals, with some radiological applications. *J. Applied Physics*, (34):2722, 1963.
- [35] L. A. Feldkamp, L. C. Davis, and J. W. Kress. Practical cone-beam algorithm. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1(6):612–619, 1984.

- 
- [36] L. A. Shepp and J. B. Kruskal. Computerized tomography: The new medical X-ray technology. *Amer. Math. Monthly*, 85:420–439, 1978.
- [37] J. Lindsten. *Nobel Lectures, Physiology and Medicine 1971-1980*. World Scientific Publishing Co., 1992.
- [38] G. T. Herman. *Fundamentals of computerized tomography: Image reconstruction from projection (2nd ed.)*. Springer, 2009.
- [39] A. C. Kak and Malcolm Slaney. *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. IEEE Press, 1988.
- [40] J. C. Elliott and S. D. Dover. X-ray microtomography. *Journal of Microscopy*, 126(2):211–213, 1982.
- [41] P. Tafforeau, R. Boistel, E. Boller, A. Bravin, M. Brunet, Y. Chaimanee, P. Cloetens, M. Feist, J. Hoszowska, J.-J. Jaeger, R.F. Kay, V. Lazzari, L. Marivaux, A. Nel, C. Nemoz, X. Thibault, P. Vignaud, and S. Zabler. Applications of x-ray synchrotron microtomography for non-destructive 3d studies of paleontological specimens. *Applied Physics A*, 83(2):195–202, 2006.
- [42] A. de Almeida, J. Soares, A.A. Meneses, S. C. Cardoso, D. Braz, E. Garcia, M. S. Gonzalez, P. Azambuja, and R.C. Barroso. Phase contrast x-ray synchrotron imaging for assessing external and internal morphology of rhodnius prolixus. *Applied Radiation and Isotopes*, 70(7):1340 – 1343, 2012.
- [43] J. J. Socha and F. De Carlo. Use of synchrotron tomography to image naturalistic anatomy in insects. *Proc. SPIE*, 7078:70780A–70780A–7, 2008.
- [44] E. Maire, J. Y. Buffiere, L. Salvo, J. J. Blandin, W. Ludwig, and J. M. Letang. On the application of x-ray microtomography in the field of materials science. *Adv. Eng. Mater.*, 3:539 – 546, 2011.
- [45] H. Czychos. *Springer Handbook of Materials Measurement Methods*. Springer Verlag, 2006.
- [46] A. Odgaard. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone*, 20(4):315 – 328, 1997.

- 
- [47] F.C. Lussani, R.F.C. Vescovi, T.D. Souza, C.A.P. Leite, and C. Giles. A versatile x-ray microtomography station for biomedical imaging and materials research. *Review of Scientific Instruments*, 86(6):063705, 2015.
- [48] D. Ludwig. The radon transform on euclidean space. *Comm. Pure Appl. Math.*, 19(12):49–81, 1966.
- [49] Transformada de radon. [http://www.mssl.ucl.ac.uk/www\\_solar/moses/moses-web/Pages/fourier-slice-theorem.jpg](http://www.mssl.ucl.ac.uk/www_solar/moses/moses-web/Pages/fourier-slice-theorem.jpg). Ultimo acesso: 28/09/2015.
- [50] Filtro de hanning. [http://depts.washington.edu/nucmed/IRL/pet\\_intro/intro\\_src/section4.html](http://depts.washington.edu/nucmed/IRL/pet_intro/intro_src/section4.html). Ultimo acesso: 28/09/2015.
- [51] Y. Okitsu, F. Ino, and K. Hagihara. Accelerating cone beam reconstruction using the cuda-enabled gpu. In *High Performance Computing-HiPC 2008*, pages 108–119. Springer, 2008.
- [52] Dalsa - rad-icon imaging. <http://www.rad-icon.com/>.
- [53] Hamamatsu photonics. <http://www.hamamatsu.com>.
- [54] National instruments labview. <http://www.ni.com/labview/>.
- [55] Physik instrumente. <http://www.physikinstrumente.com>.
- [56] Mathworks matlab. <http://www.matlab.com>.
- [57] Fast fourier transform. <http://www.fftw.org>.
- [58] J. C. Bowman and M. Roberts. Efficient dealiased convolutions without padding. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 33(1):386–406, 2011.
- [59] Free software foundation. <http://www.fsf.org/>.
- [60] A. Schreyer T. Donath, F. Beckmann. Automated determination of the center of rotation in tomography data. *J. Opt. Soc. Am.*, 23(5):1048–1057, 2006.
- [61] S. Y. Lee E. Anas, J. G. Kim and M. K. Hasan. Comparison of ring artifact removal methods using flat panel detector based ct images. *BioMedical Engineering OnLine*, 10(72), 2011.
- [62] M. Rivers. A tutorial on x-ray phase contrast cirocomputed tomography. <http://www.mcs.anl.gov/research/projects/X-ray-cmt/rivers/tutorial.html>.

- 
- [63] Volview. <http://www.kitware.com/opensource/volview.html>.
- [64] E. Seeman and P. D. Delmas. Bone quality - the material and structural basis of bone strength and fragility. *New England Journal of Medicine*, 354(21):2250–2261, 2006.
- [65] M. Gerbaix, L. Metz, F. Mac-Way, C. Lavet, C. Guillet, S. Walrand, A. Masgrau, M. Linnossier, L. Vico, and C. Daniel. Impact of an obesogenic diet program on bone densitometry, micro architecture and metabolism in male rat. *Lipids in Health and Disease*, 11, 2012.
- [66] J.A. Kanis, O. Johnell, A. Oden, B. Jonsson, C. De Laet, and A. Dawson. Risk of hip fracture according to world health organization criteria for osteoporosis and osteopenia. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27:585–590, 2000.
- [67] H. M. Britz, J. Jokihaara, O.V. Leppanen, T. Jarvinen, and D. M. L. Cooper. 3d visualization and quantification of rat cortical bone porosity using a desktop micro-ct system: a case study in the tibia. *Journal of Microscopy*, 240(1):32–37, 2010.
- [68] B. Borah, T. Dufresne, J. Nurre, R. Phipps, P. Chmielewski, L. Wagner, M. Lundy, M. Bouxsein, R. Zebaze, and E. Seeman. Risedronate reduces intracortical porosity in women with osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(1):41–47, 2010.
- [69] B. A. Watkins and M. F. Seifert. Conjugated linoleic acid and bone biology. *Journal of the American College of Nutrition*, 19:4:478 – 486, 2000.
- [70] Y. Han, S. C. Cowin, M. B. Schaffler, and S. Weinbaum. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:16689–94, 2004.
- [71] Y. Li, M. F. Seifert, D. M. Ney, M. Grahn, A.L. Grant, K.D.G. Allen, and B. A. Watkins. Dietary conjugated linoleic acids alter serum igf-i and igf binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids. *J Bone Miner Res*, 14:1153 – 1162, 1999.
- [72] J. J. Cao, B. R. Gregoine, and H Gao. High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in tibia in mice. *Bone*, 44:1097–1104, 2009.
- [73] E. Seeman. From density to structure: growing up and growing old on the surfaces of bone. *J Bone Miner Res*, 12:509–521, 1997.

- 
- [74] T. Hildebrand, A. Laib, R. Muller, J. Dequeker, and P. Ruegsegger. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: Microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(7):1167–1174, 1999.
- [75] M. B. Schaffler and D. B. Burr. Stiffness of compact bone: Effects of porosity and density. *Journal of Biomechanics*, 21(1):13–16, 1988.
- [76] L.A. Feldkamp, S.A. Goldstein, A.M. Parfitt, G. Jesion, and M. Kleerekoper. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed-tomography. *J. Bone Miner. Res.*, 4(1):3–11, 1989.
- [77] R.C. Gonzalez, R.E. Woods, and S.L. Eddins. *Digital image processing using MATLAB*. Pearson Prentice Hall, 2003.
- [78] T. W. Ridler and S. Calvard. Picture thresholding using an iterative selection method. *Systems, Man and Cybernetics, IEEE Transactions on*, 8(8):630–632, Aug 1978.
- [79] M. Doube, M.M. Klosowski, I. Arganda-Carreras, F.P. Cordelieres, R.P. Dougherty, J.S. Jackson, B. Schmid, J.R. Hutchinson, and S.J. Shefelbine. Bonej: Free and extensible bone image analysis in imagej. *Bone*, 47(6):1076–1079, Dec 2010.
- [80] M. Hahn, M. Vogel, M. Pompesius-Kempa, and G. Delling. Trabecular bone pattern factor â a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone*, 13(1):327–330, 1992.
- [81] N.L. Fazzalari and I. H. Parkinson. Fractal dimension and architecture of trabecular bone. *J Pathol*, 178(100-5), 1996.
- [82] B. Mandelbrot, D.E. Passoja, and A.J. Paullay. Fractal character of fracture surfaces of metals. 1984.
- [83] M. Rahman, A. Bhattacharya, J. Banu, and G. Fernandes. Conjugated linoleic acid protects against age-associated bone loss in c57bl/6 female mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18:467–474, 2007.
- [84] T. Kyung, J. Lee, T. Van Phan, R. Yu, and H. Choi. Osteoclastogenesis by bone marrow-derived macrophages is enhanced in obese mice. *Journal of Nutrition*, 139:502 – 506, 2009.
- [85] C. Furlan, R. Marineli, and M.R. Marostica. Conjugated linoleic acid and phytosterols counteract obesity induced by high-fat diet. *Food Research*, 51:429–435, 2012.

- 
- [86] R. da Silva Marineli, C. Furlan, and M.R. Marostica. Antioxidant effects of the combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation in sprague dawley rats. *Food Research*, 49:487–493, 2012.
- [87] B.A. Watkins, C.L. Shen, K.D.G. Allen, and M.D. Seifert. Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturates and acetylsalicylic acid alter ex vivo pge2 biosynthesis, tissue igf-i levels, and bone morphometry in chicks. *J Bone Miner Res*, 11:1321 – 1332, 1996.
- [88] C. P. B Furlan. *O efeito do Acido Linoleico Conjugado (CLA) e dos fitosteróis na prevenção da obesidade induzida por dieta hiperlipídica utilizando modelo experimental*. Tese de Mestrado - Unicamp, 2011.
- [89] Argonne national laboratory - advanced photon source. <http://www.aps.anl.gov>.
- [90] C.A. Schneider, W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7):671 – 675, Jun 2012.
- [91] E. L. Lehmann. *Nonparametrics: Statistics methods based on ranks*. 1975.
- [92] O. Leppanen, H. Sievanen, J. Jokihaara, I. Pajamaki, and T. Jarvinen. Three-point bending of rat femur in the mediolateral direction: Introduction and validation of a novel biomechanical testing protocol. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(8):1231–1237, 2006.
- [93] F.C. Lussani, C.B. Furlan, M.M. Junior, and C. Giles. Osteocyte distribution n-point correlation function analysis - (a ser submetido).
- [94] F.C. Lussani, C.B. Furlan, M.M. Junior, and C. Giles. Influence of conjugated linoleic acid and phytosterols on bone morphometry using synchrotron phase contrast x-ray microtomography - (a ser submetido).
- [95] L. Alan Love and Robert A. Kruger. Scatter estimation for a digital radiographic system using convolution filtering. *Medical Physics*, 14(2):178–185, 1987.
- [96] J. R. Cunningham H. E. Johns. *The Physics of Radiology*. Charles C. Thomas, 1983.
- [97] G. Harding and J. Kosanetzky. Status and outlook of coherent-x-ray scatter imaging. *J. Opt. Soc. Am. A*, 4(5):933–944, May 1987.
- [98] G. Harding and B. Schreiber. Coherent x-ray scatter imaging and its applications in biomedical science and industry. *Radiation Physics and Chemistry*, 56(1â2):229 – 245, 1999.

- 
- [99] B. Wu, Y. Liu, C. Rose-Petruck, and G.J. Diebold. X-ray spatial frequency heterodyne imaging. *Applied Physics Letters*, 100(6), 2012.
- [100] E.E. Bennett, R. Kopace, A.F. Stein, and H. Wen. A grating-based single-shot x-ray phase contrast and diffraction method for in vivo imaging. *Med. Phys.*, 37(11):6047–6054, 2010.
- [101] G. Porod. *Kolloid Zeitschrift*, 124(83), 1951.
- [102] H.H. Wen, E.E. Bennett, M.M. Hegedus, and S. Rapacchi. Fourier x-ray scattering radiography yields bone structural information. *Radiology*, 251(3):910–918, 2009.
- [103] D. Rand, V. Ortiz, Y. Liu, Z. Derdak, J.R. Wands, M. Taticek, and C. Rose-Petruck. Nanomaterials for x-ray imaging: Gold nanoparticle enhancement of x-ray scatter imaging of hepatocellular carcinoma. *Nano Letters*, 11(7):2678–2683, 2011.
- [104] S.K. Lynch, V. Pai, J. Auxier, A.F. Stein, E.E. Bennett, C.K. Kemble, X. Xiao, W. Lee, N.Y. Morgan, and H.H. Wen. Interpretation of dark-field contrast and particle-size selectivity in grating interferometers. *Appl. Opt.*, 50(22):4310–4319, Aug 2011.
- [105] G. Potdevin, A. Malecki, T. Biernath, M. Bech, T.H. Jensen, R. Feidenhans, I. Zanette, T. Weitkamp, J. Kenntner, J. Mohr, P. Roschger, M. Kerschnitzki, W. Wagermaier, K. Klaushofer, P. Fratzl, and F. Pfeiffer. X-ray vector radiography for bone micro-architecture diagnostics. *Physics in Medicine and Biology*, 57(11):3451, 2012.
- [106] T. H. Jensen, M. Bech, O. Bunk, T. Donath, C. David, R. Feidenhans, and F. Pfeiffer. Directional x-ray dark-field imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 55(12):3317, 2010.
- [107] Pierre Thibault, Martin Dierolf, Andreas Menzel, Oliver Bunk, Christian David, and Franz Pfeiffer. High-resolution scanning x-ray diffraction microscopy. *Science*, 321(5887):379–382, 2008.
- [108] Thorlabs - motorized rotation stage. <http://www.thorlabs.com/>.
- [109] J. A. Nelson, F. J. Miller, R. A. Kruger, P. Y. Liu, and W. Bateman. Digital subtraction angiography using a temporal bandpass filter: initial clinical results. *Radiology*, 145(2):309–313, 1982.
- [110] Robert A. Kruger. A method for time domain filtering using computerized fluoroscopy. *Medical Physics*, 8(4):466–470, 1981.

- 
- [111] K.H. Hohne, U. Obermoller, M. Riemer, and G. Witte. Fourier domain techniques for digital angiography of the heart. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 3(2):62–67, June 1984.
- [112] J.R. L. Mardegan. *Aplicacoes da Radiografia por Contraste de Fase em Mamografia in vitro*. Tese de Mestrado - Unicamp, 2009.
- [113] X. Wu and H. Liu. Phase space formulation for phase contrast x-ray imaging. *Applied Optics*, 44(28):5847–5853, 2005.
- [114] D. Mas, J. Garcia, C. Ferreira, L.M. Bernardo, and F. Marinho. Fast algorithms for free-space diffraction patterns calculation. *Optics Communications*, 164(4):233–245, 1999.
- [115] D. G. Fischer, S. A. Prahl, and D. D. Duncan. Monte carlo modeling of spatial coherence: free-space diffraction. *J. Opt. Soc. Am. A*, 25(10):2571–2581, Oct 2008.
- [116] L. F. Costa, M. P. Viana, and M. E. Beletti. Complex channel networks of bone structure. *Applied physics letters*, 88(3):033903, 2006.
- [117] J. Als-Nielsen and D McMorrow. *Elements of Modern X-ray Physics*. Wiley and Sons:, 2001.
- [118] W. Cong and G. Wang. X-ray scattering tomography for biological applications. *Journal of X-Ray Science and Technology*, 19:219–227, 2011.
- [119] A. C. Thompson and D. Vaughan, editors. *X-ray Data Booklet*. Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California, second edition, 2001.