

IMAGE J COMO FERRAMENTA PARA MEDIDA DA ÁREA DE PARTÍCULAS DE MAGNETITA EM TRÊS ESCALAS NANOMÉTRICAS

*Adriana Hannickel^a, Marcelo Henrique Prado da Silva^a, Henrique Lins De Barros^b
e Márcio Portes de Albuquerque^b*

*^aSeção de Engenharia Mecânica e de Materiais (SE/4) – Instituto Militar de Engenharia (IME)
Praça General Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, 22.290-270, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*

*^bCentro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Laboratório de Difração de Raios X
Rua Xavier Sigaud 150, Urca
ahannickel@uol.com.br*

RESUMO

Um dos objetivos do processamento de imagens digitais é a extração de informações fornecidas por parâmetros que possibilitarão a descrição, interpretação ou entendimento da cena pelo computador. Neste trabalho, utilizou-se o software de processamento e análise de imagens digitais ImageJ como ferramenta para medição de partículas de magnetita obtidas por três rotas diferentes (química, biológica e física). Estas rotas produziram partículas em três tamanhos distintos de uma escala nanométrica: nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPION) com 10 nm, cristais de magnetita em cadeia presentes no citoplasma de bactérias magnetotáticas com 100 nm e partículas de magnetita moída encontradas no pigmento de tintas comerciais com 1000 nm.

Palavras-Chave: ImageJ; Processamento de Imagens Digitais; Magnetita.

ABSTRACT

One of the objectives of digital image processing is to obtain information provided by parameters that enable the description, interpretation or understanding of the scene by the computer. In this study, the software for processing and analyzing digital image, ImageJ, was chosen as a tool for measuring magnetite particles obtained by three different routes (chemical, biological and physical). Each of these routes produced particles in three different sizes of an nanometers scale: superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) within 10 nm; magnetite crystals found in the cytoplasm of magnetotactic bacteria within 100 nm; magnetite particles in pigments of painting inks, within 1000 nm.

Keywords: ImageJ; Digital Image Processing; Magnetite.

INTRODUÇÃO

O ImageJ é um software para processamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA, em linguagem Java. Com este software é possível exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 bits. Permite o processamento de diversos formatos de imagem como TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS. Suporta a técnica de empilhamento de imagens, isto é, uma série de imagens que compartilham uma única janela para animações. Além disso, a leitura de um arquivo de imagem pode ser feita paralelamente a outras operações. A janela contendo os resultados (área, perímetro, orientação etc) permite que estes sejam exportados para um arquivo, como por exemplo, no formato XLS (Microsoft Excel). No ImageJ, o cálculo das áreas é feito pela contagem de pixels das regiões selecionadas pelo usuário ou por um algoritmo específico (RASBAND, 2011).

O ImageJ atua na imagem pela intensidade, ou nível de cinza dos pixels. Em vários casos é necessário adicionar ao programa principal um plugin. Plugins são programas de computador usado para adicionar funções a outros programas maiores, provendo alguma funcionalidade especial ou muito específica. Para a medição das partículas deste trabalho foi utilizado o plugin Watershed [SAGE, 2008].

A transformação watershed é baseada na simulação de inundação: considerando a imagem de entrada em níveis de cinza como uma superfície topográfica, o objetivo é produzir linhas de divisão de águas nesta superfície. Para tal, um “furo” é feito em cada mínimo regional da superfície. Mínimo regional é uma zona plana não adjacente a nenhuma outra zona plana com menor altitude (nível de cinza). Uma zona plana é uma área onde todos os pixels têm o mesmo nível de cinza. A superfície é então, submersa a uma taxa constante, de modo que a água entre pelos mínimos regionais. Quando frentes de água, vindas de diferentes mínimos regionais, estão prestes a se encontrar, uma barreira é construída para evitar tal encontro. Em algum momento, o processo chega a um estado tal que somente os topos das barreiras estão visíveis acima do nível da água, correspondendo às linhas de watershed. Dessa forma, quando a transformação watershed é aplicada, induzimos o aparecimento de linhas de divisão de águas sobre as bordas dos objetos, separando-os (KLAVA, 2009).

Para entender o papel desempenhado pelo watershed em toda a cadeia de tratamento de informação no processamento de imagens, é necessário entender a etapa de segmentação de imagens. De modo simplificado, segmentar uma imagem significa separá-la em suas partes constituintes, diferenciando-as. A segmentação é considerada, dentre todas as etapas do processamento de imagens, a mais crítica do tratamento da informação. É na etapa de segmentação que são definidas as regiões de interesse para processamento e análise posteriores. Como consequência deste fato, quaisquer erros ou distorções aqui presentes refletem nas demais etapas. Isto acarreta resultados não desejados ao final do processo que podem contribuir de forma negativa para a eficiência de todo o processamento.

Deve ser ressaltado que não existe um modelo formal para a segmentação de imagens. Este é um processo empírico e adaptativo, procurando sempre se adequar

às características particulares de cada tipo de imagem e ao objetivo que se pretende alcançar. Existe uma grande diversidade de técnicas de segmentação de imagens e uma delas é o watershed apresentado anteriormente (ALBUQUERQUE, 2004).

MATERIAIS E MÉTODOS

As partículas de magnetita medidas foram obtidas como a seguir:

- SPION (nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas) - obtidas pelo método químico de coprecipitação (CHASTELLAIN, 2004);
- Cristais de magnetita em cadeia presentes no citoplasma de bactérias magnetotáticas da Lagoa Rodrigo de Freitas (Rio de Janeiro) - biossíntese (BAZYLINSKI, 2004);
- Partículas de magnetita presentes no pigmento de tintas comerciais para pintura de quadros (Grumbacher Pre-Tested® P-134, Mars Black) - método físico por moagem (COSTA RIBEIRO, 2007).

Para se obter as imagens digitais para processamento, utilizou-se a microscopia eletrônica (MET). As soluções contendo as partículas acima descritas foram gotejadas sobre grades de cobre para microscopia eletrônica recobertas com um filme de carbono com espessura de 20 a 30 nm (Carbon Film 200 Mesh, Cu). O Microscópio Eletrônico de escolha foi o Morgagni™ TEM, FEI™, que opera a 80 kV, de propriedade do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As Figuras 1 a 3 são exemplos das micrografias utilizadas nas medidas com o ImageJ .

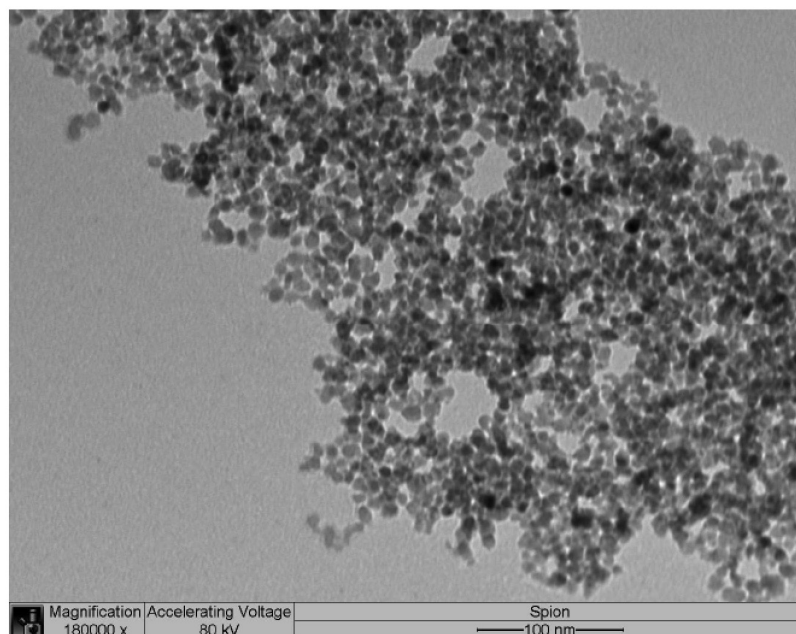


Figura 1 – Micrografia de uma região de uma amostra de SPION.

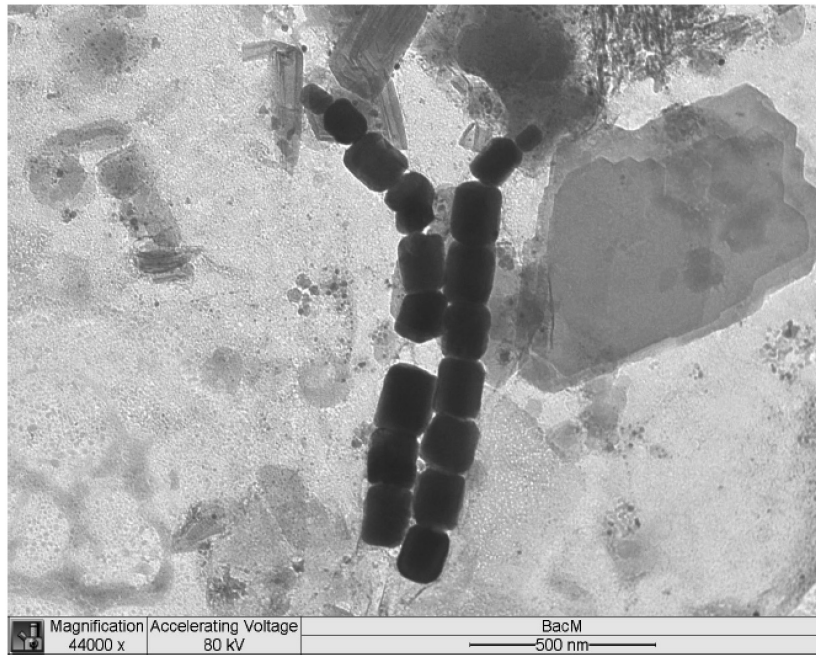


Figura 2 – Nanocristais de magnetita de bactéria espalhados na amostra.

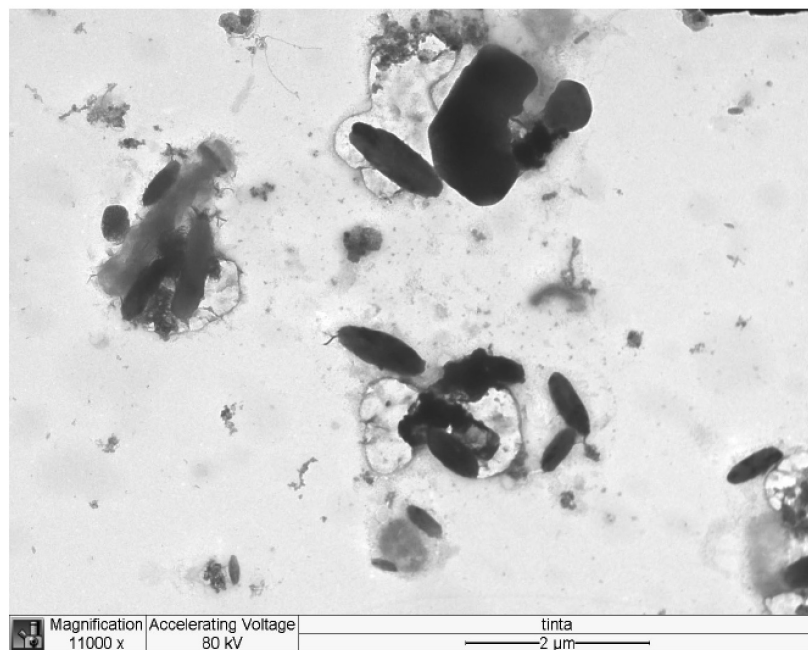


Figura 3 – Micrografia de uma região de uma amostra de tinta comercial.

A Figura 4 mostra os recursos do software ImageJ e a FIG. 5 apresenta os passos para medida da área das partículas estudadas como explicado a seguir: se a imagem original for de 16 ou 32 bits, será necessário sua transformação para 8 bits (níveis de cinza entre 0-255, necessário para o calculo da transformação watershed) (a), para então se obter a imagem binária (b). Em função de diversas características da imagem analisada (como diferenças de tonalidades dos níveis de cinza, agrupamento dos objetos ou ainda ruídos provocados pelas técnicas de processamento utilizadas) os contornos resultantes podem não ficar bem delineados, sendo nestes casos necessário apagar ou redesenhar manualmente alguns contornos ou preenchimentos. Estes procedimentos são feitos sempre tendo como base a imagem original. Tal alternativa pode ser realizada sem comprometimento da qualidade da análise, desde que os contornos originais sejam realçados. (DIAS, 2008).

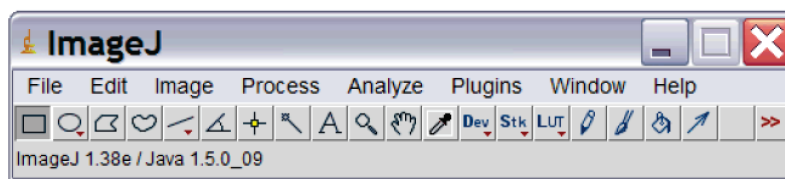


Figura 4 – Recursos do software Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

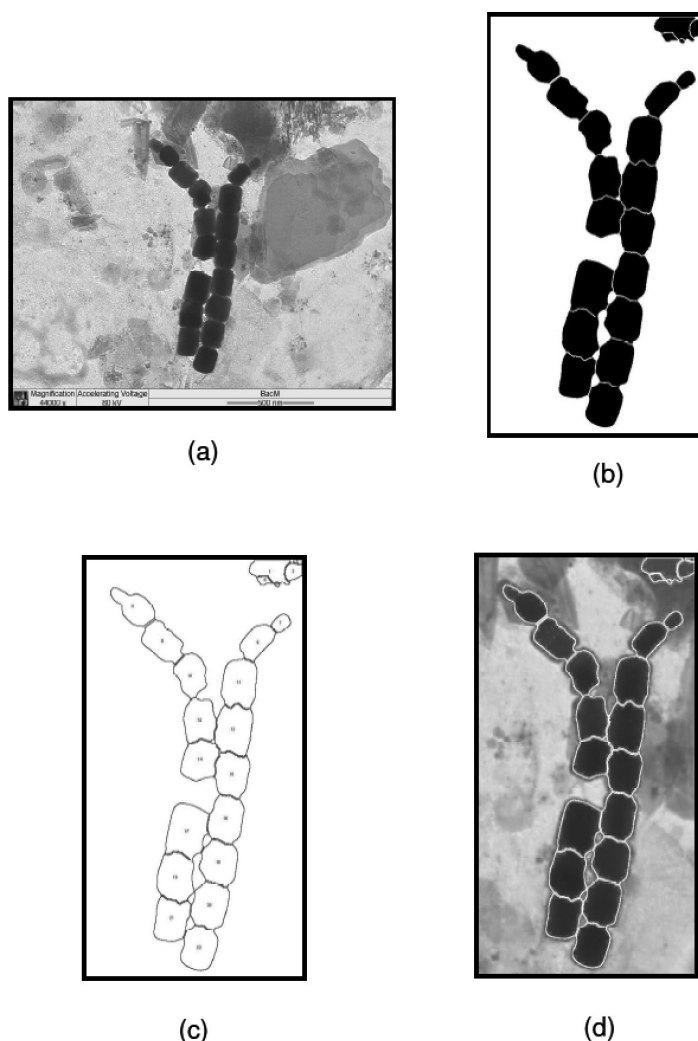


Figura 5 – Imagem original em 8-bit (a); imagem binária obtida através do watershed (b), desenho das partículas (c); sobreposição da imagem binária e do desenho das partículas (d).

Com a imagem binária obtida, o próximo passo é selecionar a função Analyze Particles. O resultado será um desenho onde cada partícula está identificada com um número. Aquelas que não estiverem correspondendo à imagem original podem ser descartadas do resultado final. Diversos atributos podem ser obtidos de cada uma das partículas (área, centro de gravidade, orientação, nível de cinza médio, elipse de melhor ajuste à região, etc). Neste trabalho estamos interessados na área de cada uma das partículas, nesta etapa fornecido pela contagem dos pixels em cada uma das regiões identificadas.

Como pode ser notado, cada resultado é correspondente a uma partícula do desenho originado. O próximo passo é a conversão dos resultados em pixels, para unidade de medida que deverá ser utilizada. Como a imagem original possui uma barra de escala, através de uma ferramenta do próprio software, realizamos a medida deste comprimento em pixels e sua conversão, que neste caso foi para nm^2 e μm^2 .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com as medidas acima foi possível obter-se a distribuição de tamanho dos três tipos de partículas de magnetita nas amostras.

As Tabelas 1 a 3 indicam as classes da medida das áreas das partículas, a frequência simples absoluta (f_j), frequência simples relativa (fr_j), a frequência absoluta acumulada (F_j) e a frequência relativa acumulada (Fr_j) das partículas medidas (S, T e B). Com estes dados foi possível a obtenção dos gráficos ilustrados nas Figuras 7 a 9.

A Tabelas 1 e a Figuras 7 referem-se às nanopartículas SPION. Através da análise do gráfico, é possível notar que a maior parte das nanopartículas medidas nesta a mostragem possui uma área de mancha na faixa entre 51 e 85 nm^2 . Nota-se também uma larga distribuição de tamanho. Este resultado concorda com as análises em MET, que revelou partículas com poucos nanômetros de diâmetro.

Tabela 1 – Distribuição da área em nm² de 230 partículas SPION

Área	fj	Fjr (%)	Fj	Frj (%)
0 - 17	1	0,4	1	0,4
17 - 34	14	5,9	15	6,3
34 - 51	42	17,6	57	23,8
51 - 68	49	20,5	106	44,4
68 - 85	50	20,9	156	65,3
85 - 102	34	14,2	190	79,5
102 - 119	26	10,9	216	90,4
119 - 135	9	3,8	225	94,1
135 - 152	9	3,8	234	97,9
152 - 169	2	0,8	236	98,7
169 - 186	2	0,8	238	99,6
186 - 203	1	0,4	239	100,0
	239	100		

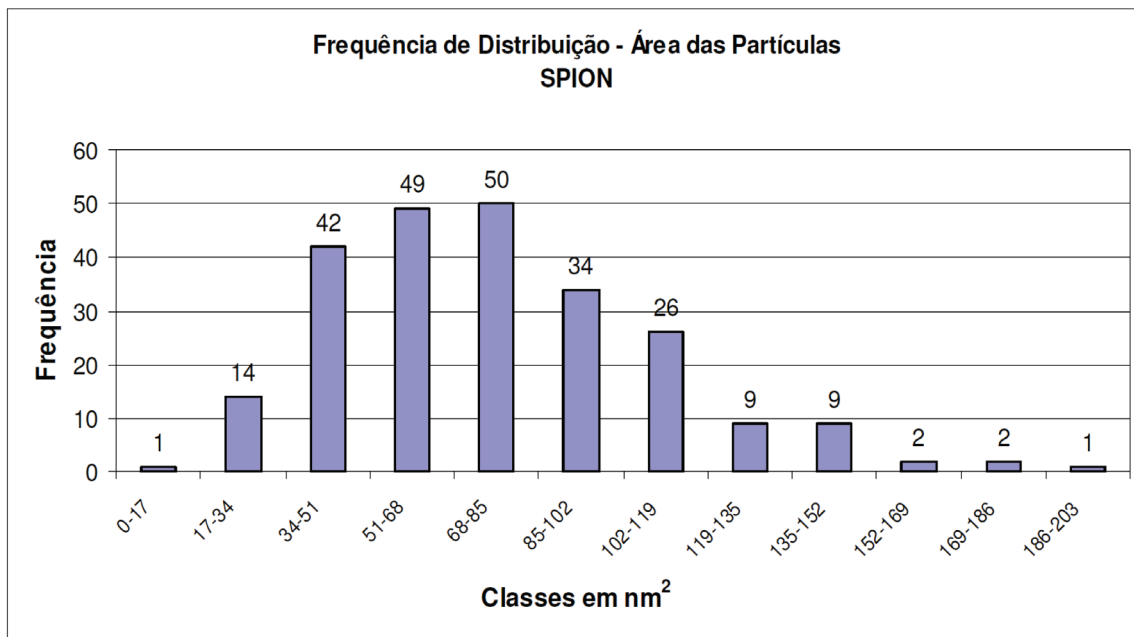


Figura -7 Distribuição do tamanho das partículas por área em nm²

A Tabela 2 indica as classes de medidas da área de 101 partículas de óxido de ferro encontradas no pigmento de tinta comercial. Através da análise da Figura 8 percebe-se que a maior parte das partículas medidas possui uma área da mancha entre 0,07 e 0,15 μm^2 .

Tabela 2 – Distribuição da área em μm^2 de 101 partículas de Tinta Comercial

Área	fj	fjr (%)	Fj	Frj (%)
0 – 0,071	42	41,6	42	41,6
0,071 – 0,142	39	38,6	81	80,2
0,142 – 0,213	9	8,9	90	89,1
0,213 – 0,284	4	4,0	94	93,1
0,284 – 0,355	3	3,0	97	96,0
0,355 – 0,426	0	0,0	97	96,0
0,426 – 0,497	1	1,0	98	97,0
0,497 – 0,568	0	0,0	98	97,0
0,568 – 0,640	0	0,0	98	97,0
0,640 – 0,711	1	1,0	99	98,0
0,711 – 0,82	2	2,0	101	100,0
	101	100,0		

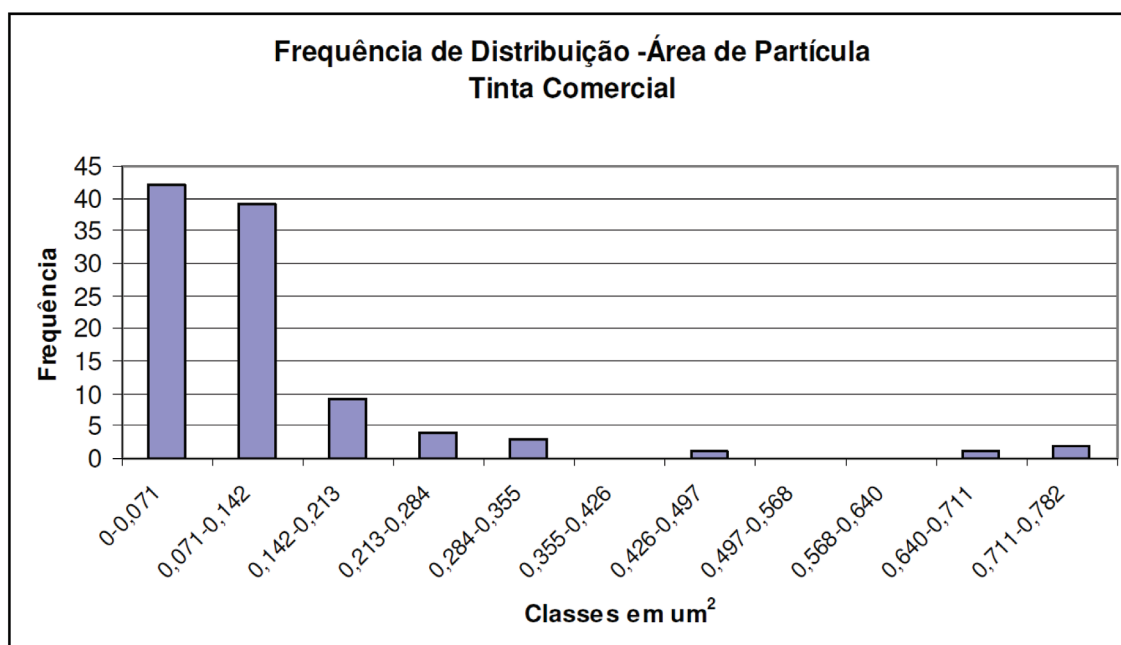


Figura 8 – Distribuição do tamanho das partículas por área em μm^2 .

A Tabela 3 mostra as classes de medidas da área de 170 partículas de óxido de ferro de bactérias magnetotáticas observadas. Com a Figura 9, observa-se que as partículas possuem uma área da mancha, em sua maioria, com tamanhos que variam entre 9600 e 16800 nm².

Tabela 3 – Distribuição da área em nm² de 170 partículas do magnetossoma

Área	fj	fjr (%)	Fj	Frj (%)
0 → 2400	12	7,1	12	7,1
2400 → 4800	10	5,9	22	12,9
4800 → 7200	13	7,6	35	20,6
7200 → 9600	12	7,1	47	27,6
9600 → 12000	30	17,6	77	45,3
12000 → 14400	24	14,1	101	59,4
14400 → 16800	35	20,6	136	80,0
16800 → 19200	16	9,4	152	89,4
19200 → 21600	11	6,5	163	95,9
21600 → 24000	5	2,9	168	98,8
24000 → 26400	2	1,2	170	100,0
	170	100,0		

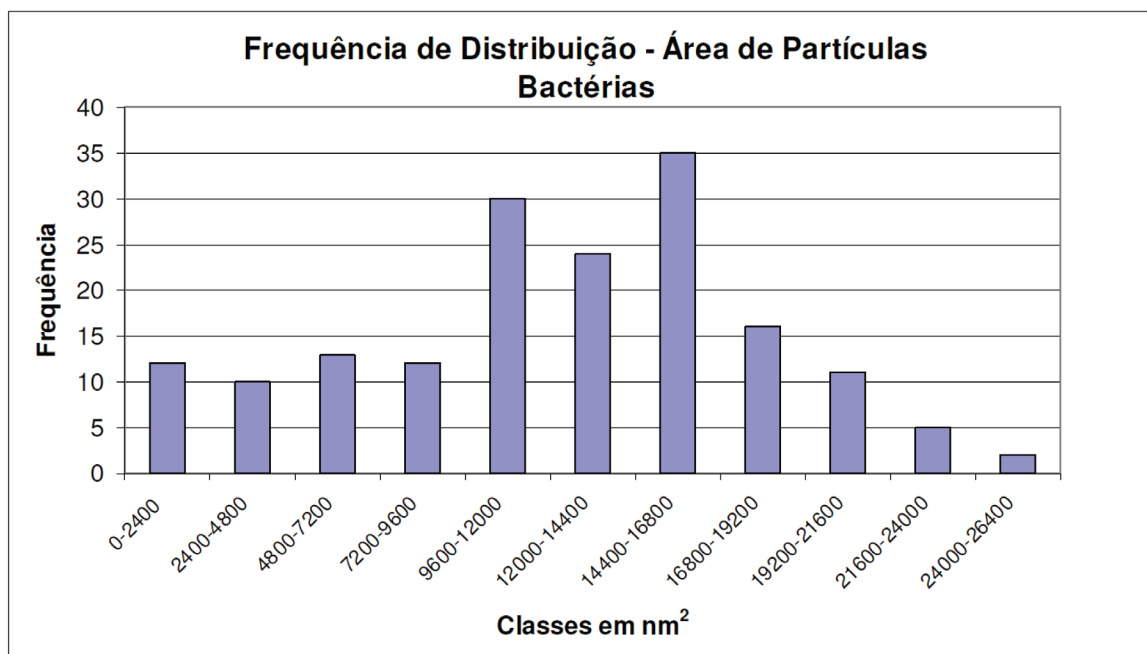


Figura 9 – Distribuição do tamanho das partículas por área em nm².

Tendo todas as medidas tomadas, foi calculado o desvio padrão das mesmas adotando-se o mesmo procedimento de medição utilizado para todas as partículas. Escolheu-se uma partícula de cada tipo (SPION, tinta e bactéria) e mediu-se trinta vezes cada uma. Os resultados estão indicados na Tabela 4.

Tabela 4 – Desvio Padrão da Média Aritmética (Área das Partículas)

Partículas	Observações	Média Aritmética das Medidas	Desvio Padrão
SPION	30	$(5,37 \pm 0,02) \times 10 \text{ nm}^2$	1,35
BACTÉRIA	30	$(1,75 \pm 0,05) \times 10^4 \mu\text{m}^2$	21,82
TINTA	30	$(3,8 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ nm}^2$	$3,8 \times 10^{-3}$

Com os resultados acima, conclui-se que o método adotado para medição das partículas mostrou-se confiável.

CONCLUSÃO

O software ImageJ mostrou-se uma ferramenta de fácil utilização e eficaz na obtenção de medidas das diferentes partículas estudadas. Este software tem a vantagem de ser simples, de código aberto e com uma quantidade significativa de módulos plugins que permitem estender sua potencialidade. Ademais, como foi desenvolvido na linguagem Java, ele também está disponível para várias plataformas computacionais e permite integrar códigos dos usuários em linguagem Macro ou mesmo em Java.

Os tamanhos das partículas encontrados neste estudo, mostraram-se compatíveis com aqueles obtidos em trabalhos anteriores, cujos métodos adotados para medição das mesmas foram diversos (CHASTELLAIN, 2004). Com estas medidas, foi possível obter os gráficos com a distribuição das partículas nas diferentes amostras e concluir que as nanopartículas SPION apresentaram tamanho bastante regular e muito pequeno; a tinta comercial, apresentou partículas com tamanhos largamente distribuídos; a bactéria, por sua vez, apresentou as partículas mais uniformes não só na forma, mas também em tamanho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, M.P., *Rotulação e Labelização*, Livro da "V Escola do CBPF", Rio de Janeiro, **2004**.
- BAZYLINSKI, D.A., FRANKEL R.B., *Magnetosome formation in prokaryotes*. *Nature Reviews Microbiology*, vol.2, 217-230, **2004**.
- CHASTELLAIN, A., PETRI, A., HOFMANN, H., *Particle size investigation of multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles*. *Journal of Colloid and Interface Science* 278: 353-360, **2004**.
- COSTA RIBEIRO, P. et al., *Imagens Magnéticas de Pinturas Acrílicas e Imagens Sacras*. *Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação*, vol.1, N°.2, pp. 056-059, 2007.
- DIAS, F.C., *Uso do Software ImageJ para Análise Quantitativa de Imagens de Microestruturas de Materiais*, Dissertação de Mestrado, INPE, **2008**.
- KLAVA, B., *Segmentação interativa de imagens via transformação watershed*, Dissertação de Mestrado, IME-USP, **2009**.
- RASBAND, W., *ImageJ documentation*. Disponível em: www.rsb.info.nih.gov, acesso em 01/04/2011.
- SAGE, D., *Watershed Segmentation*; École Polytechnique Fédérale de Lausanne Disponível em: <http://bigwww.epfl.ch/soft/watershed/index.html>, acesso em 02/04/2011.