

IDENTIFICAÇÃO DE DIFERENTES ATIVIDADES EM MATERIAL BIOLÓGICO POR MEIO DO *BIO-SPECKLE* LASER E DECOMPOSIÇÃO EM FREQUÊNCIAS

ANDERSON GOMIDE COSTA¹, JUCIARA KEILA MARQUES²; ISIS CELENA AMARAL³,
RAFAEL RODRIGUES CARDOSO⁴, ROBERTO ALVES BRAGA JR.⁵

RESUMO

O *speckle* dinâmico, fenômeno óptico de interferência produzido pelo espalhamento de um feixe de luz coerente quando incidido sobre uma superfície rugosa, está sendo cada vez mais utilizado como técnica de medição de atividade biológica em diversas áreas do conhecimento. Nas aplicações em material biológico, o *speckle* dinâmico é batizado de *biospeckle*, sendo capaz de acessar, com grande sensibilidade, as mudanças na estrutura dos tecidos. Na consolidação do *biospeckle* como instrumento de prospecção de gradientes de atividade nas diversas estruturas que compõem um tecido, surgem alguns desafios, bem como a definição de alguns limites para a realização dessas análises. Um desses desafios é a possibilidade de identificar áreas de baixa atividade imersas em um tecido de alta atividade, classificando, por exemplo, uma porção sem vida em um tecido normal. O grande potencial de aplicação dessa capacidade de separação de tecidos em um mesmo material é um motivador para a aplicação de técnicas mais complexas de análise de sinais provenientes do *biospeckle* laser, como é o caso do processamento desses dados no domínio da frequência. O presente trabalho, procurou identificar diferentes níveis de atividade em camadas de um mesmo material, neste caso um biofilme produzido a partir do amido de milho comercial, utilizando a técnica do *biospeckle* associado com a decomposição em frequências. Os resultados demonstraram que a técnica do *biospeckle* é capaz de identificar e isolar em frequências fenômenos de baixa atividade inseridos em um meio de alta atividade relacionados a um mesmo material de origem.

Palavras-chaves: Biospeckle, Material biológico, Diferentes níveis de atividade, Decomposição em frequências

INTRODUÇÃO

Por apresentar características como coerência, direcionalidade, monocromaticidade e polarização, o laser adquiriu versatilidade no estudo de estruturas com medições sensíveis e com a compreensão de diversos fenômenos biológicos (Rabal e Braga 2008).. Funcionando como fonte de luz de características únicas, o laser possui propriedades especiais que o tornam um excelente instrumento de uso científico e tecnológico (Hecht, 1998). Neste contexto, o fenômeno conhecido como *speckle* dinâmico vem sendo cada vez mais utilizado como técnica de medição de atividade biológica em diversas aplicações na medicina e agropecuária. Nas aplicações em material biológico, o *speckle* dinâmico é batizado de *biospeckle*, sendo capaz de acessar, com grande sensibilidade, as mudanças na estrutura dos tecidos. O padrão do *speckle* muda no tempo quando a superfície iluminada apresenta uma mudança de posição dos seus dispersores de luz, o que faz o ferverilhamento no padrão de interferência originalmente formado ao se incidir uma luz coerente em uma superfície (Rabal e Braga, 2008). A análise de atividades de material biológico por meio da técnica do *biospeckle* tem

¹ Mestrando em Engenharia Agrícola, DEG/ UFLA, andersongc@posgrad.ufla.br

² Mestre em Engenharia Agrícola, DEG/UFLA, juciarakeila@hotmail.com

³ Mestranda em Engenharia de Sistemas, DEG/UFLA, isis_amaral@hotmail.com

⁴ Mestrando em Engenharia Agrícola, DEG/UFLA, rafaelrc.ufla@hotmail.com

⁵ Professor Associado, DEG/UFLA robbraga@gmail.com

sido extensamente estudada e tem sido propostas muitas formas de análise, assim como diversas aplicações como em DAINTY(1970); OULAMARA *et al*(1989), RABELO *et al* (2000); PALUEJO *et al.*(2003); NOBRE *et al.* (2009) e BRAGA *et al.* (2009).

Entre os métodos de rotina para analisar graficamente o biospeckle podemos destacar a abordagem Fujii. O método de Fujii baseia-se no cálculo da visibilidade (FUJII *et al* ,1985) entre os pixels de imagens gravadas ao longo do tempo. A partir da equação que relaciona a intensidade e posição dos pixels, uma nova imagem é construída. Nessa imagem, os pixels assumem no mapa final um valor próximo de zero na escala de tons de cinza em regiões onde não houve alterações de intensidade ao longo do tempo, e valores mais altos, próximos de 255, em zonas em que os pixels sofreram grandes alterações. Dessa maneira, nas zonas de grande atividade a imagem resultante apresenta pontos claros e naquelas áreas de baixa atividade os pixels apresentam pontos escuros.

A análise do padrão do speckle no domínio da frequência nos permite uma série de aplicações dentre elas a marcação espectral e a supressão de sinais e ruídos. Dentre as ferramentas que nos permitem trabalhar no domínio da frequência está a Transformada de Wavelets.

O presente trabalho procurou identificar diferentes níveis de atividade em camadas de um biofilme produzido a partir de amido de milho comercial utilizando a técnica do biospeckle associado com a decomposição em frequências.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção do biofilme

Os biofilmes usados no experimento foram produzidos no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras. As imagens analisadas e o processamento dos dados foram realizados no Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária- CEDIA da Universidade Federal de Lavras. O material utilizado para a produção do biofilme foi o amido de milho comercial, obtido no comércio da cidade de Lavras. Para a produção do biofilme foram utilizados 3g de amido de milho para 100ml de água e aquecidos por meio de uma chapa de aquecimento e agitação da solução. A temperatura de gelatinização foi de 95°C fornecida por meio da análise de RVA (Rapid Visco analysis) (CARVALHO, 2007), sendo mantida constante essa temperatura por mais 5 minutos. Após o processo de produção, a solução em gel do biofilme foi distribuída nas placas de Petri de 48 mm de diâmetro e resfriadas por 24 horas, deixando a amostra mais seca, com baixa atividade de água. A camada com alta atividade de água usada na complementação da amostra total foi produzida seguindo os mesmos critérios já descritos, porém não foram resfriadas, sendo levadas imediatamente para a iluminação e aquisição das imagens.

Segue abaixo um croqui da disposição das camadas de maior e menor atividade de água nas amostras utilizadas na iluminação.



Figura 1: Disposição das camadas de biofilme na constituição da amostra iluminada.

A partir da produção de camadas com distintas atividades de água foram produzidas as seguintes amostras para análise: camadas divididas por um material plástico e camadas sem a divisão pelo plástico. As amostras foram analisadas em um intervalo de 2 dias.

A utilização do plástico entre as camadas teve como objetivo minimizar o efeito da absorção de água da camada mais ativa para a camada menos ativa.

A iluminação e processamento do biospeckle

A configuração experimental de iluminação, de captura e de análise do experimento foi composta de um laser de hélio neônio, uma câmera CCD para captura das imagens, uma lente macro para foco e um computador no qual foram processadas as imagens. As imagens foram capturadas a uma taxa de 0,08s, perfazendo um conjunto de 128 amostras em cada experimento.

As imagens capturadas foram analisadas pelos métodos Fujii antes da filtragem e novamente analisadas pelos mesmos métodos após a filtragem promovida pela transformada de wavelets. Foram obtidas 25 faixas de frequência que estavam dispostas de 0 a 6,25 Hz. As reconstruções se deram por cada faixa, ou seja, apenas a faixa de interesse foi reconstruída, sendo filtradas as demais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o biospeckle associado à técnica Fujii é uma ferramenta capaz de identificar camadas de biofilme de diferentes atividades de água produzido a partir de um mesmo material. Essa diferenciação das camadas se torna mais evidente quando utilizamos algum tipo de aparato que permita que as camadas não entrem em contato direto, evitando uma influência da absorção de água. Por meio da decomposição em frequência da Transformada de Wavelets foi possível isolar fenômenos de alta e baixa atividade no material, sendo caracterizada de forma mais contundente as amostras analisadas no segundo dia, já que estas apresentavam maior diferença de atividade entre as camadas de maior e menor atividade. A Figura 2 e a Figura 3 apresentam os resultados para os lotes analisados no segundo dia sendo que nas amostras da Figura 2, as camadas estavam em contato direto. Na Figura 3 as camadas foram divididas com plástico, evitando a influência da absorção de água. A região central das imagens é caracterizada pelas camadas de baixa atividade, em ambas as figuras, e são identificadas nas bandas de frequências mais baixas. Também foram analisadas duas variações de configuração experimental, back scattering (a imagem analisada é a produzida pelo retorno dos feixes de luz incididos na amostra) e a forward –scattering (a imagem analisada é a produzida a partir dos feixes de luz que passam pela amostra). Ambas as configurações se mostraram eficientes na caracterização e identificação de fenômenos de distintas atividades sendo necessária uma maior análise da melhor alternativa, que deve levar em conta também o tipo de aplicação.

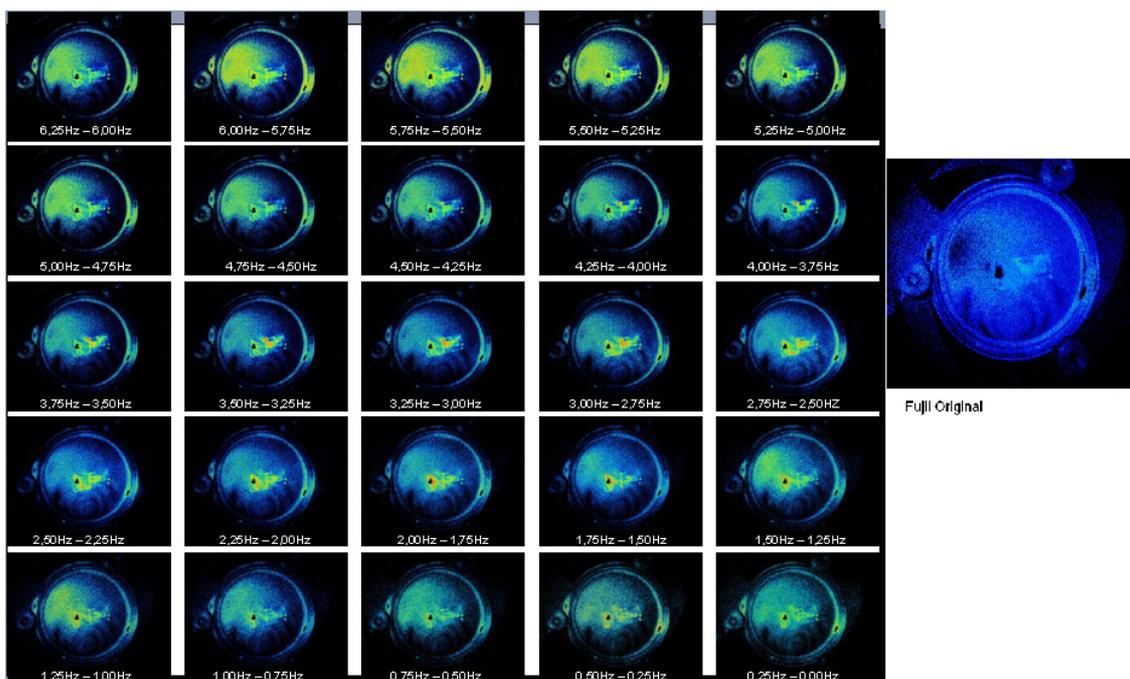


Figura 2: Amostras de Biofilme sem plástico separador entre as camadas. A câmera foi posicionada acima da amostra e assim como o laser, caracterizando a configuração back – scattering.

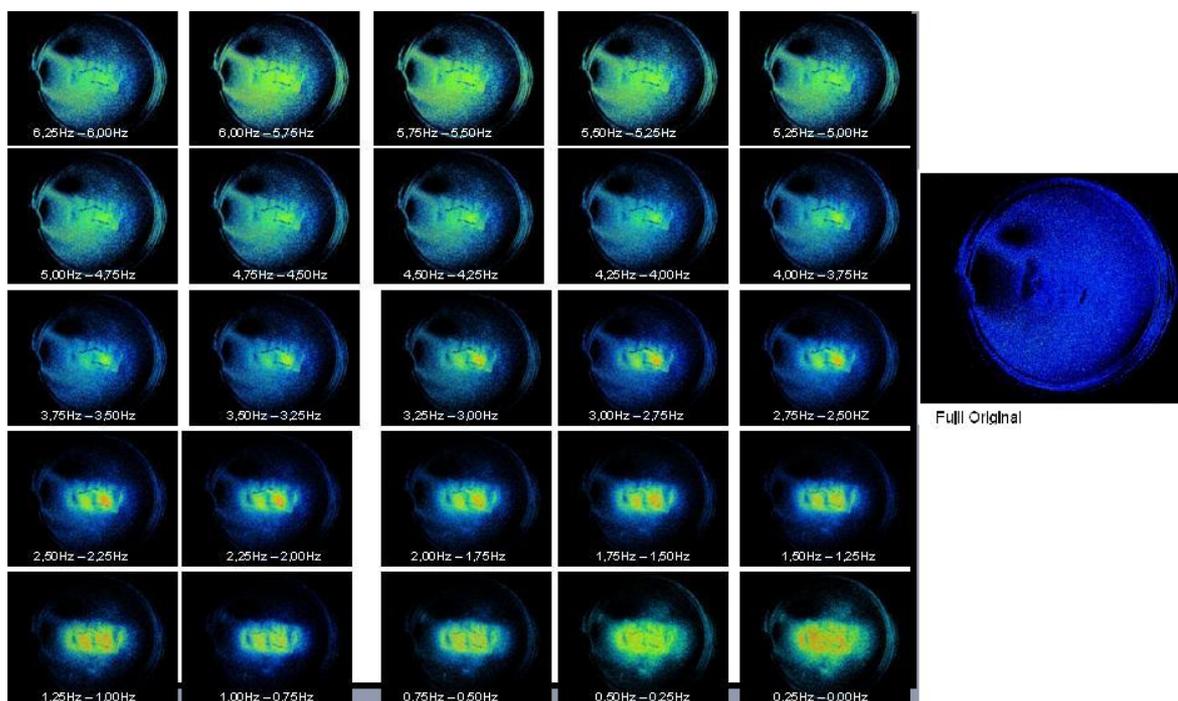


Figura 3: Amostras de Biofilme com plástico separador entre as camadas. A câmera foi posicionada abaixo da amostra e o laser acima, caracterizando a configuração forward - scattering.

CONCLUSÃO

Foi possível identificar diferentes níveis de atividade em camadas de um mesmo material (biofilme produzido a partir de amido de milho comercial) utilizando a técnica do biospeckle associado com a decomposição em frequências. A assinatura em frequências ficou mais evidente nas amostras avaliadas no segundo dia de análise já que as camadas mais ativas e menos ativas apresentavam maior diferença de atividade entre si.

Quanto as configurações experimentais utilizadas, ambas se mostraram eficientes na identificação das camadas de diferentes níveis de atividade.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e ao CNPq

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

BRAGA, R. A. *et al.* Live biospeckle laser imaging of root tissues. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters [S.I.]**, v. 38, n. 5, p. 679-686, 2009.

CARVALHO, C.W.P.; ONWULATA, C.I. ; TOMASULA, P.M. Rheological proprieties of starch and whey protein isolate gels. **Food Science and Technology International** . p 207-216. 2007.

DAINTY, J. C. Laser speckle and related phenomena. **Topics in Applied Physics**, v. 9, 1975.

FUJII, H. *et. al.*, Blood flow observed by time-varying laser speckle. **Opt. Lett.**, 1985.

HECHT, E. **Optics**, 2^a Ed., Adison Wesley Publishing Co., Inc.USA, 676 p , 1987.

NOBRE, C. M. B. *et al.* Biospeckle laser spectral analysis under Inertia Moment, Entropy and Cross-Spectrum methods. **Optics Communications [S.I.]**, v. 282, n. 11, p. 2236-2242, 2009.

OULOMARA, G. TRIBILLON, J. DUVERNOY, Biological activity measurements on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle, **J. Mod. Opt.** **36**, p.136-179, 1989.

PALUEJO, M. *et al.* Biospeckle assessment of bruising fruits. **Optics and Lasers in Engineering**, p.13-24, 2003.

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

RABELO, G.F. **Avaliação da Aplicação do Speckle Dinâmico no Monitoramento da Qualidade de Laranja**. Tese de Doutorado. Feagri Unicamp, Brasil, 149p, 2000.