



**RENAN OLIVEIRA REIS**

**INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO LASER  
NOS MAPAS DE ATIVIDADE DO *BIOSPECKLE***

**LAVRAS – MG**

**2015**

**RENAN OLIVEIRA REIS**

**INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO LASER NOS MAPAS DE  
ATIVIDADE DO *BIO*SPECKLE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Sistemas e Automação, área de concentração em Engenharia de Sistemas e Automação, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Roberto Alves Braga Júnior

Coorientador

Dr. Hector Jorge Rabal

**LAVRAS – MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Reis, Renan Oliveira.

Influência da intensidade do laser nos mapas de atividade do  
*biospeckle* / Renan Oliveira Reis. – Lavras : UFLA, 2015.  
123 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador: Roberto Alves Braga Júnior.

Bibliografia.

1. *Speckle* laser dinâmico. 2. Material biológico. 3. Secagem  
de tinta. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**RENAN OLIVEIRA REIS**

**INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO LASER NOS MAPAS DE  
ATIVIDADE DO *BIOSPECKLE***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Sistemas e Automação, área de concentração em Engenharia de Sistemas e Automação, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 03 de agosto de 2015.

Dr. Fernando Pujaico Rivera                      UFLA

Dra. Katiúcia Dias Fernandes                      UNIFEI

Dr. Roberto Alves Braga Júnior  
Orientador

Dr. Hector Jorge Rabal  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

*Dedico os méritos deste trabalho aos meus pais.*

*Á minha mãe Mardene, pelo apoio, amor incondicional e por sempre estar ao meu lado na luta pelos meus sonhos.*

*Ao meu pai, Joaquim, por seu amor, confiança, amizade e pelo apoio nas minhas decisões.*

***DEDICO.***

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus, por me encher de energias nos momentos de desânimo, por ser meu porto seguro nos meus momentos de inseguranças. À Mãe Rainha e ao Santo Expedito, que sempre intercedem e passam na frente por mim.

À minha família, alicerce da minha vida, fonte de segurança e amor, com a qual divido meus sonhos e ambições. Aos meus pais, Joaquim Divino dos Reis e Mardene Oliveira dos Reis, que sempre lutaram pelo bem e prosperidade de nossa família, pela dedicação, amor, compreensão e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos Larissa Oliveira dos Reis e Diogo Alves de Faria Reis pela disposição em me ajudar e sempre acreditarem em mim.

Agradeço a minha esposa Elisângela de Fátima Machado, pela paciência de me aguentar nas horas de dificuldades e de falta de tempo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelos recursos oferecidos por meio do Centro de Instrumentação Aplicada a Agropecuária (CEDIA), em forma de estrutura física, computacional e docente.

Ao Departamento de Engenharia (DEG), pela oportunidade e a estrutura disponibilizada na realização deste trabalho e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Sistemas e Automação, que me deu a oportunidade de realizar o Mestrado.

Agradeço o apoio dado pelo Grant PICT 2008-1430 da Agencia Nacional de Promoción en Ciencia y Tecnología (ANPCyT), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) e Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina.

Agradeço também à Universidade Federal de Lavras, ao CNPq, Fapemig, Capes e Finep que financiaram parte deste projeto.

Agradeço, em especial, ao meu orientador, professor Dr. Roberto Alves Braga Júnior, pela contribuição, pela paciência, e por me oferecer a oportunidade de trabalhar ao seu lado. Também agradeço pelos seus ensinamentos, dedicação, disponibilidade e responsabilidade com que orienta.

Agradeço ao meu coorientador Hector Jorge Rabal, por ter me ajudado na solução de problemas e por ter me recebido muito bem em La Plata, na Argentina.

Aos demais membros da banca examinadora, Katiúcia Dias Fernandes, Fernando Pujairo Rivera e à professora Joyce Dória Rodrigues Soares, pelas sugestões e contribuições, as quais enriqueceram significativamente este trabalho.

Aos colegas do grupo de trabalho, Ellem Waleska Nascimento da Fonseca Contado, Diego Eduardo Coelho e ao amabilíssimo Roberto Luiz de Azevedo, que compartilharam conhecimentos e proporcionaram momentos de descontração e amizade verdadeira.

Àqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desta etapa árdua e importante na minha vida, o meu sincero agradecimento pela participação de cada um nesta conquista. Obrigado!

## RESUMO

O *speckle* laser dinâmico é uma técnica ótica que utiliza padrões de interferência gerados pela iluminação de uma superfície por um laser para obter o nível de mudança desse padrão, quando a superfície modifica-se ao longo do tempo. Assim, os grãos de *speckle* modificam-se de forma e de intensidade, de acordo com as alterações de posição dos dispersores da luz que estão presentes na amostra iluminada. Para quantificar a atividade do material iluminado por meio da mudança dos padrões de *speckle* uma série de ferramentas computacionais que utilizam análises estatísticas dos históricos temporais dos padrões *speckle* são utilizadas e apresentam saídas gráficas e numéricas. Na obtenção dos padrões de *speckle* a intensidade do laser está relacionada à quantidade de informação trazida das camadas próximas à superfície e às irregularidades dos materiais biológicos. O que torna a técnica do *biospeckle* laser sensível e dependente de detalhes para uma análise de qualidade. A intensidade de luz é um fator relevante para a formação dos padrões de *speckle*, visando a contribuições para a técnica, o objetivo, neste trabalho, foi investigar a influência da iluminação nas imagens obtidas no *biospeckle* laser. Para a avaliação da iluminação, diversas intensidades do laser foram aplicadas em amostras de materiais biológicos. Os padrões de *speckle* foram analisados utilizando os métodos MI, AVD, SD, DG e Fujii. Visando à melhoria na independência da iluminação em uma amostra homogênea, uma nova normalização para os métodos MI e AVD foi proposta e testada, utilizando secagem de tinta. Os resultados mostraram que a variação da intensidade da luz é importante para os dados do *biospeckle* laser e a normalização proposta apresentou melhorias relacionadas a independência da intensidade do laser.

Palavras-chave: *Speckle* laser dinâmico. Material biológico. Secagem de tinta. Métodos numéricos. Iluminação.

## ABSTRACT

The dynamic speckle laser is an optical technique that uses interference patterns generated by laser illumination of a surface to obtain the modification level of this pattern over time. Thus, speckle grains present in the illuminated sample change their form and intensity according to the position of light scatters. In order to measure the activity of the illuminated material by means of modifications in speckle patterns, we use computer tools that present graphical and numerical output. To obtain the speckle patterns, laser intensity is set according to the amount of information obtained from the layers near the surface. The irregularities of biological materials cause the *biospeckle* laser technique to be sensitive and dependent on details in order to obtain a quality analysis. Light intensity is an important element for the formation of speckle patterns. To contribute for this technique, this study had the objective of investigating the influence of light over images obtained by laser biospeckle. For the evaluation of lighting, different laser intensity were applied to samples of biological material. The speckle patterns were analysed using the MI, AVD, SD, DG and Fujii methods. Other tests were performed to improve the independence of the lighting in a homogeneous sample. A new standardization for the MI and AVD methods has been proposed and tested using drying paint. The results showed that the variation of light intensity is important for *biospeckle* laser data, and the standardization proposal showed improvements concerning the independence of the laser intensity.

Keywords: Dynamic laser speckle, biologic material, drying paint, numeric methods, illumination.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação de uma onda eletromagnética .....	19
Figura 2	Tipos de Superfícies .....	20
Figura 3	Onda com difração .....	22
Figura 4	Imagem <i>speckle</i> .....	26
Figura 5	Matriz de Co-ocorrência .....	30
Figura 6	Configuração de experimento .....	36
Figura 7	Setup de experimento .....	37
Figura 8	Teste da transmitância .....	45
Figura 9	Disposição dos equipamentos experimentais para a captura de imagens da semente.....	46
Figura 10	Imagem com maior intensidade (a) e imagem com menor intensidade (b).....	47
Figura 11	Setup para raízes .....	48
Figura 12	Região de análise numérica .....	49
Figura 13	Iluminação da raiz com giro de 180 graus .....	50
Figura 14	Raiz rotacionada 180graus.....	50
Figura 15	Configuração experimental de aquisição de dados com um filtro de densidade neutra criando uma área escura no padrão de <i>speckle</i> com uma lâmina de com tinta secando .....	54
Figura 16	Criação de dois históricos de tempo dos padrões de <i>speckle</i> (THSP) utilizando uma coluna da área escura e uma coluna da área clara.....	55
Figura 17	Composição da imagem construída utilizando linhas do THSP de área escura e área clara.....	56
Figura 18	Imagem e histograma da imagem com maior intensidade (a) e imagem com menor intensidade (b) .....	58

Figura 19	Sobreposição dos histogramas das imagens de maior intensidade e menor intensidade .....	59
Figura 20	Saídas gráficas da imagem com maior intensidade Sd (a) Fujji (b) Fujii (MINZ; NIRALA, 2014) (c) DG(d). Saídas gráficas da imagem com menor intensidade Sd (e) Fujji (f) Fujii (MINZ; NIRALA, 2014) (g) DG(h) .....	61
Figura 21	Saídas numéricas da raiz próxima ao tubo (a) e raiz com giro de 180 graus (b).....	65
Figura 22	Comparação do (a) IM e (b) AVD com a normalização de linha local e normalização da imagem toda .....	73
Figura 23	Comparação das mudanças propostas no (a) IM e (b) AVD com a normalização de linha local e normalização da imagem toda.....	74
Figura 24	Comparação de (a) IM e (b) AVD.....	75
Figura 25	Comparação das mudanças propostas no (a) IM e (b) AVD.....	77
Figura 26	Comparação da tradicional (a) Normalização de linha local e (b)Normalização de toda imagem associada ao MI e AVD.....	79
Figura 27	Comparação da normalização proposta associada a (a) Normalização de linha local e (b) Normalização de toda imagem associada ao MI e AVD.....	80
Figura 28	Erro do IM e AVD com diferentes normalizações relatado para uma área clara do THSP da pintura no minuto zero com a inclusão de linhas provenientes da área escura .....	81
Figura 29	As análises dos erros (relação de um THSP de área clara por um THSP de área escura com n linha do THSP escuro) no minuto zero com incremento contínuo de linha escuras sobre as linhas claras no THSP .....	82

Figura 30	Erros do IM(a) e AVD(b) com diferentes normalizações relacionadas a uma área clara de THSP da tinta no minuto zero com a inclusão de linhas da área escura e elevado a 0,3.....	83
Figura 31	Análise de cada coluna de um THSP com uma área clara e uma escura utilizando MI e AVD com a Normalização de linha local e Normalização da imagem toda .....	84
Figura 32	Análise de cada coluna de um THSP com uma área clara e uma escura utilizando MI e AVD com a Normalização de linha local e Normalização da imagem toda associada a normalização proposta .....	85
Figura 33	Análise de cada coluna de um THSP com uma área clara e uma escura utilizando MI e AVD com a Normalização de linha local e Normalização da imagem toda utilizando potência 0,3.....	86
Figura 34	Análise de cada coluna de um THSP com uma área clara e uma escura utilizando MI e AVD com a Normalização de linha local e Normalização da imagem toda associada a normalização proposta e potência 0,3.....	87
Figura 35	Evolução da diferença de porcentagem em relação ao expoente em dois tempos de secagem (a) zero e (b) 30 minutos .....	90

## **ANEXO B**

Figura 1	Raiz próxima ao tubo (0 grau) .....	112
Figura 2	Raiz com giro de 180 graus .....	113

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Variação de intensidade com a raiz próxima a parede do tubo (0 grau) .....	63
Quadro 2	Variação de intensidade com a raiz próxima a parede do tubo (180 graus) .....	64
Quadro 3	Saturação da raiz próxima ao tubo (0 grau).....	66
Quadro 4	Saturação da raiz com giro de 180 graus.....	67
Quadro 5	Saídas gráficas dos métodos Fujii, Fujii (MINZ; NIRALA, 2014), DG, SD .....	68

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Resultados do teste de penetração da luz.....	57
Tabela 2	Resultados do MI e AVD.....	60
Tabela 3	Normalização de linha local. Normalização da imagem toda e normalização proposta com a porcentagem de diferença entre os resultados nos lados claros (esquerda) a escuro (direita) das colunas de transição 231-254 do THSP.....	88

## **ANEXOS B**

Tabela 1	Raiz próxima ao tubo.....	112
Tabela 2	Raiz com 180 graus .....	112

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
1.1	Objetivo .....	18
1.1.1	Objetivos específicos.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	Fenômenos ópticos.....	19
2.2	<i>Speckle</i> .....	26
2.2.1	<i>Speckle</i> laser dinâmico.....	26
2.2.1.1	Interação luz-matéria.....	27
2.3	Métodos de análise do <i>Biospeckle</i> .....	28
2.3.1	História temporal do padrão de <i>Speckle</i> .....	28
2.3.2	Matriz de Cocorrência (MOC).....	29
2.3.3	Momento de Inércia (MI).....	30
2.3.4	Diferença dos valores absolutos .....	31
2.3.5	Teste de qualidade .....	32
2.3.5.1	Saturação .....	32
2.3.5.2	Contraste .....	32
2.3.5.3	Homogeneidade .....	33
2.3.6	Desvio padrão .....	33
2.3.7	Diferenças Generalizadas (DG).....	33
2.3.8	Fujii.....	34
2.4	Aplicações e problemas do <i>biospeckle</i> laser .....	35
2.4.1	<i>Biospeckle</i> em sementes .....	36
2.4.2	Sementes de café .....	38
2.4.3	<i>Biospeckle</i> em raízes .....	38
2.5	Formação das imagens do <i>biospeckle</i> laser .....	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
3.1	Intensidade de luz para formação do <i>biospeckle</i> laser.....	44
3.1.1	Teste de transmitância .....	44
3.1.2	Variação de intensidade na semente de café.....	45
3.1.3	Variação de intensidade na raiz de milho .....	47
3.2	Influência da intensidade de luz em amostras homogêneas .....	51
3.2.1	Dados do <i>speckle</i> dinâmico provenientes de amostras de secagem de tinta.....	53
3.2.2	Análise do dado .....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
4.1	Resultado do teste de transmitância .....	57
4.2	Variação de intensidade na semente de café.....	58
4.3	Variação de intensidade na raiz de milho .....	62
4.4	Investigação da intensidade em método numérico .....	72

4.4.1	Resultados da secagem de tinta com duas faixas diferentes não conectadas no THSP.....	72
4.4.2	Resultados das áreas combinadas no THSP .....	74
4.4.3	Testes adicionais – inserindo linhas escuras em um THSP claro .....	80
4.4.4	Teste adicional – comparando cada coluna da amostra .....	83
5	CONCLUSÃO .....	91
	REFERÊNCIAS .....	92
	ANEXOS.....	97

## 1 INTRODUÇÃO

A curiosidade do ser humano em tentar conhecer o funcionamento dos fenômenos existentes impulsiona o desenvolvimento e criação de instrumentos que possam auxiliar na melhor compreensão do assunto de interesse. Um desses equipamentos é o computador, que tornou-se indispensável para o desenvolvimento da pesquisa e o com o melhoramento das tecnologias e métodos de processamento e análise de imagens foi possível a aplicação do computador em diversas áreas do conhecimento, como por exemplo, engenharias, biologia, agronomia e outras.

Aplicações na área da engenharia em conjunto com a biologia, tem-se utilizado o emprego de técnicas capazes de analisar o comportamento de tecidos biológicos com obtenção de resultados confiáveis. Uma das técnicas utiliza o laser, uma fonte de luz coerente e monocromática, como instrumento capaz de destacar mudanças de posição dos dispersores de luz presentes no material biológico. Tal técnica é denominada por *speckle* laser.

O *speckle* laser consiste no fenômeno óptico de interferência resultante da iluminação de uma amostra por meio de uma luz que possui ondas eletromagnéticas de mesma frequência (laser). Capturando a imagem da superfície que recebe a iluminação, obtém-se o padrão de *speckle*, que se torna dinâmico e proporcional à atividade dos dispersores de luz quando as imagens são adquiridas ao longo do tempo, gerando o termo *speckle* laser dinâmico, ou *biospeckle* laser (BSL).

Imagens obtidas dos padrões do *speckle* laser são passíveis à análise por meio do processamento digital de imagens e por tratamento estatístico dos dados permitindo análises gráficas e numéricas. As saídas gráficas são normalmente utilizadas em áreas heterogêneas cujo objetivo é criar um mapa de atividades representando regiões com diferentes níveis de mudança dos dispersores. Por

sua vez, as saídas numéricas são utilizadas quando a área observada é considerada homogênea, portanto sem mudanças significantes de atividade na região de interesse.

A análise dos padrões de *speckle* laser aplicadas a materiais biológicos é um desafio para o desenvolvimento da técnica. A interação entre a luz e o tecido biológico não é trivial e possui detalhes que podem influenciar a análise. Apesar da técnica possuir facilidade na utilização, apresenta alta sensibilidade e grande quantidade de variáveis que podem influenciar os resultados da formação dos padrões de *speckle*.

Na formação dos padrões de *speckle*, a intensidade da iluminação e sua relação com a quantidade de informação trazida das camadas próximas à superfície são fatores que tornam a técnica do *biospeckle* complexa e dependente dos detalhes para análises com qualidade. Assim, diversos efeitos físicos como reflexão, absorção, transmitância, mudança de meio da luz e intensidade do laser, podem influenciara formação dos padrões de *speckle*.

Há casos em que a intensidade da luz não é suficiente para produzir o padrão de *speckle*, ou seja, os feixes de luz refletidos para o observador não são capazes de ativar os sensores, da mesma forma, se uma superfície apresenta irregularidades que mudam a quantidade de luz que retorna para a análise. Com esse tipo de resultado, a análise é não trivial e a formação dos padrões de *speckle* com variação de intensidade do laser pode apresentar resultados diferentes.

A intensidade de luz para a formação dos padrões de *speckle* laser é importante e pode afetar a qualidade da formação desses padrões e, conseqüentemente, as análises, tornando desafio para o aprimoramento e melhoramento na técnica.

## **1.1 Objetivo**

O objetivo, neste trabalho, consistiu em investigar a influência da iluminação nas imagens utilizadas no *biospeckle*.

### **1.1.1 Objetivos específicos**

- a) Investigar se maior ou menor intensidade de luz interfere nos dados do *biospeckle*;
- b) Testar a influência da iluminação em padrões do *speckle* laser dinâmico obtidos a partir de uma amostra homogênea.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Visando ao melhor entendimento deste capítulo, optou-se por dividir o texto nos seguintes tópicos: Fenômenos ópticos, *Speckle*, Métodos de análise do *speckle*, Aplicações e problemas do *biospeckle* laser e Formação das imagens do *biospeckle* laser.

### 2.1 Fenômenos ópticos

As ondas eletromagnéticas são capazes de interagir com a matéria de diferentes formas. Quando uma onda é direcionada para uma superfície, a interação ocorre de modo que a energia existente no sistema possa ser absorvida, refratada ou refletida pela superfície (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2012). Na Figura 1, representa-se a interação de uma superfície com uma onda eletromagnética incidente.

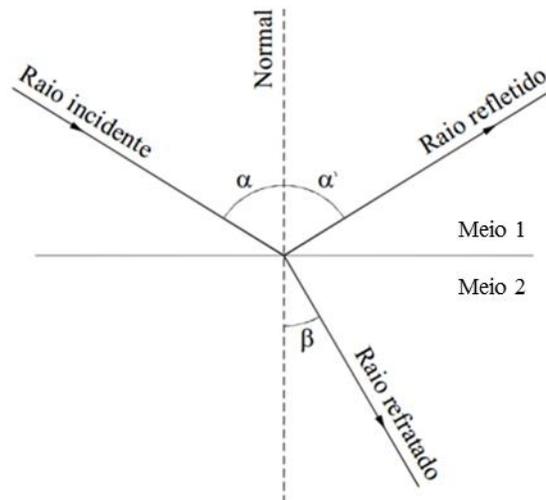


Figura 1 Representação de uma onda eletromagnética

Fonte: Adaptado de Halliday, Resnick e Walker (2012).

Quando uma onda incidente se depara com uma descontinuidade, parte da energia dessa onda sofre refração e é transmitida (SERWAY; JEWETT, 2007). As ondas podem se deslocar em todas as direções, no entanto, o tipo de superfície em que elas estão incidindo pode determinar o modo de como as ondas se dispersarão. Na Figura 2, apresentam-se as ondas sendo refletidas em superfícies diferentes.

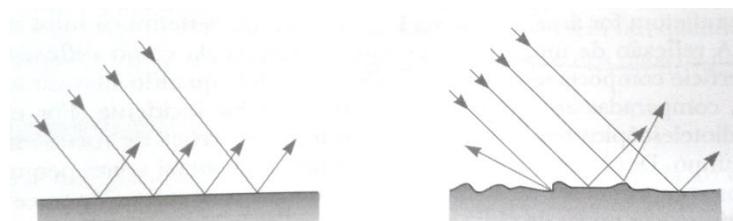


Figura 2 Tipos de Superfícies

Fonte: Serway e Jewett (2007).

Em superfícies perfeitamente polidas, as ondas são refletidas com o mesmo ângulo que incidem na superfície, esses tipos de ondas são paralelas. Caso a superfície seja rugosa, as ondas refletidas podem se dispersar em todas as direções. Em superfícies polidas a reflexão é denominada por reflexão especular. Em superfícies rugosas, a reflexão é denominada por reflexão difusa (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2012) (Figura 2).

A representação matemática de uma onda sobre reflexão está diretamente relacionada aos raios incidentes e refletidos. Na Figura 1, mostra-se que o ângulo de reflexão ( $\alpha$ ) é igual ao ângulo de incidência ( $\alpha'$ ) (SERWAY; JEWETT, 2007). Portanto, temos matematicamente (Equação 1) que:

$$\alpha = \alpha' \quad (1)$$

Em que,  $\alpha$  é o ângulo de incidência e  $\alpha'$  é o ângulo refletido.

Por convenção, os ângulos são medidos por meio da normal à superfície (SERWAY; JEWETT, 2007).

Outro fenômeno observado na interação da luz com a matéria é a refração, ou seja, por uma onda eletromagnética que se propaga através de meios diferentes. A luz penetra e sofre uma mudança quando altera de um meio para outro. Na Figura 1, a onda de refração é representada pelo “Raio refratado”. O raio incidente, refletido e refratado pertencem ao mesmo plano e o ângulo de refração  $\beta$  é dependente de características do meio e do ângulo em que a onda incide na superfície (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2012; SERWAY; JEWETT, 2007). Matematicamente, a refração é fundamentada na lei de Snell. A equação a seguir representa a refração.

$$\frac{\sin \beta}{\sin \alpha} = \frac{n_2}{n_1} \quad (2)$$

Em que,

$n_2$  é a velocidade da luz no meio 2.

$n_1$  é a velocidade da luz no meio 1.

$\beta$  é o ângulo de refração.

$\alpha$  é o ângulo de incidência.

Os fenômenos de refração e reflexão são importantes para possibilitar o acompanhamento do caminho da luz quando interage com um determinado material.

Outro fenômeno óptico é a interferência, que ocorre quando ondas idênticas provenientes de duas fontes sobrepõem-se em um determinado local do espaço e a intensidade resultante das ondas que se combinam neste local pode possuir menor ou maior intensidade do que cada uma das ondas. Quanto ao tipo, a interferência pode ser completamente ou parcialmente destrutiva ou

construtiva. É destrutiva quando a intensidade resultante é menor que a intensidade de cada onda. E construtiva em casos que a intensidade resultante é maior que a intensidade de cada onda (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2012).

As ondas eletromagnéticas também sofrem interferência. Isso ocorre, em razão da combinação dos campos eletromagnéticos (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2012). Na Figura 3, ilustra-se um objeto que possui dois orifícios estreitos e paralelos ( $S_1$  e  $S_2$ ). Uma fonte de onda incide sobre a superfície e quando as ondas atravessam os orifícios tem-se duas fontes de ondas coerentes. É notável que as ondas que saem das fendas podem se interferir e tal fenômeno cria franjas de interferência (Figura 3).

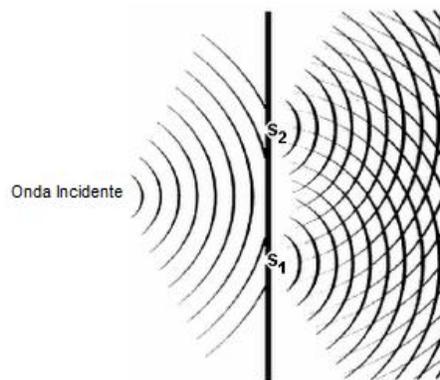


Figura 3 Onda com difração

Fonte: Adaptado Halliday, Resnick e Walker (2012).

O fenômeno da interferência torna-se importante para que amostras iluminadas por um laser não sejam influenciadas pela luz coerente, evitando alterações do material em análise (BOTEGA et al., 2009).

Os materiais biológicos são caracterizados por considerável dispersão de luz, contendo diversos centros de dispersão distribuídos aleatoriamente ao longo

de sua extensão. A Dispersão de Rayleigh o campo eletromagnético da luz induz uma polarização da molécula, que reirradia a luz com os comprimentos de onda mantidos (a luz azul do sol é dispersa sobre as moléculas no ar mais do que a luz vermelha, por isso, o céu é azul). Outro tipo de espalhamento é o de Mie, as partículas são maiores do que o comprimento de onda (a má visibilidade em nevoeiro, e o arco-íris nas nuvens podem ser exemplos desses fenômenos). Na dispersão inelástica há o Espalhamento de Raman, onde os elétrons são estimulados a cair de volta para o nível de energia diferente da que estavam antes de excitação. Por último, o Espalhamento de Brillouin ocorre quando um cristal é deformado por modos acústicos e o índice de refração do cristal muda em decorrência da tensão que é induzida pela vibração (RABAL; BRAGA JUNIOR, 2008).

Juntamente com o conceito de dispersão, a absorção é um dos fatores que caracterizam a interação da luz com os tecidos biológicos. Esse processo obedece à lei de Lambert-Beer (Equação 3) (RODRIGUEZ-MARIN et al., 2012):

$$A = \epsilon cL \quad (3)$$

Onde  $A$  é absorvância,  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar e  $L$  é o caminho óptico que a luz percorre.

Os diferentes átomos e moléculas em questão possuem uma vasta gama de possíveis níveis de energia em que podem ser excitados. Dependendo do tipo de átomos, após certo período, estes perdem energia com a produção de calor e contribuindo com reações fotoquímicas irradiando fótons em todos os sentidos.

Outro fenômeno da óptica é a transmitância, que implica na quantidade de luz que consegue atravessar determinada espessura de um material, sem ser absorvida. É medida em porcentagem, com parâmetros relacionados à

quantidade de energia e comprimento de onda (HECHT, 2002). Na Equação 4, define-se a transmitância:

$$T = I_f / I_0 \quad (4)$$

Em que,  $I_f$  é a intensidade da luz que incide no material e  $I_0$  é a intensidade de luz sem o material. Esse fenômeno está relacionado ao conceito de absorbância.

A absorbância expressa a capacidade do material em absorver ondas luminosas em determinada espessura de um material (BARNES; MENDHAM; DENNEY, 2008; HECHT, 2002; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). A Equação 5 ilustra essa definição:

$$A = -\log_{10} T \quad (5)$$

Em que,  $T$  é o valor da transmitância.

O estudo de Lambert apresentou a existência de uma relação entre a transmissão de luz e a espessura da camada do meio absorvente. Quando um feixe de luz monocromático atravessa um meio transparente homogêneo, cada camada desse meio absorvia igual a fração de luz que atravessava, independentemente da intensidade de luz. Lambert então propôs que: A intensidade da luz emitida decresce exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta (BARNES; MENDHAM; DENNEY, 2008; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Essa lei pode ser expressa por (Equação 6):

$$I = I_0 \times 10^{-xd} \quad (6)$$

Em que:

$I$  é a intensidade da luz transmitida.  $I_0$  é a intensidade de luz incidente.  $x$  é a constante denominada coeficiente de absorção e que depende do meio absorvente empregado e  $d$  é a espessura do meio absorvente.

Em seus estudos, Beer observou a relação existente entre a transmissão e a concentração do meio onde passa o feixe de luz. Certa solução absorve a luz proporcionalmente a concentração do soluto que nela se encontra. Isto é, a intensidade de um feixe de luz monocromático decresce exponencialmente à medida que a concentração da substância absorvente aumenta (BARNES; MENDHAM; DENNEY, 2008; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Expressa por:

$$I = I_0 \times 10^{-kc} \quad (7)$$

Em que:

$I$  é a intensidade da luz emitida.  $I_0$  é a intensidade de luz incidente;  $k$  é a constante denominada coeficiente de absorção e que depende do meio absorvente empregado e  $c$  é a concentração do meio absorvente.

A lei de Lambert-Beer é o fundamento da espectrofotometria. Elas são tratadas pelo processo no qual a quantidade de luz absorvida ou transmitida por uma determinada solução depende da concentração do soluto e da espessura da solução (BARNES; MENDHAM; DENNEY, 2008; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). A lei pode ser expressa por (Equação 8):

$$T = \exp(-cd) \quad (8)$$

Em que,  $T$  é a transmitância da luz,  $c$  é a constante que depende do material.  $d$  é a espessura da amostra.

## 2.2 *Speckle*

*Speckle* representa um padrão de interferência formado quando uma superfície é iluminada por uma luz coerente, como por exemplo, a de um laser. A imagem formada consiste em um conjunto de grãos tanto claros quanto escuros mostrando um efeito de granulado, denominado na língua inglesa por *speckle* (RABAL; BRAGA, 2008). Na Figura 4, a seguir, mostra uma imagem *speckle*.

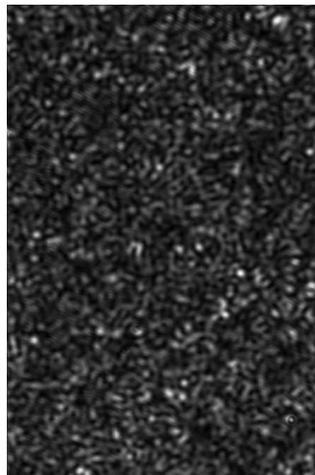


Figura 4 Imagem *speckle*

Fonte: Rabal e Braga (2008).

### 2.2.1 *Speckle* laser dinâmico

*Speckle* laser dinâmico ou *biospeckle* laser é o resultado temporal de um padrão de *speckle* proveniente de uma superfície que modifica a posição dos

dispersores de luz. O aspecto visual do *biospeckle* é semelhante a um líquido em ebulição e, por isso, o termo em inglês “boiling” é utilizado para definir o fenômeno. Esse efeito é ocasionado pelas variações da dispersão da luz produzida pelos movimentos das partículas na superfície do material. O *speckle* laser dinâmico proveniente de material biológico é aquele que se movimenta, deforma, desaparece e reaparece sem deslocamento significativo de sua posição. Esse último tipo é característico de tecidos vivos (RABAL; BRAGA, 2008).

Os fenômenos ópticos relacionados ao *speckle* laser dinâmico ocorrem no momento em que o laser se dispersa sobre uma determinada superfície, e esta, por sua vez, apresenta uma determinada atividade. Ao atingir uma superfície que possui estruturas que se movimentam, os dispersores de luz, ocorre a reflexão da luz de forma difusa. Na superfície e próximo da superfície de materiais biológicos os feixes de luz são refletidos aleatoriamente e os caminhos percorridos pelos raios refletidos são em todos os planos de observação (DAINTY, 1975).

O *speckle* laser dinâmico tem sido utilizado para auxiliar na medição de atividades biológicas em diversas áreas do conhecimento como na agricultura (ZDUNEK et al., 2014), na medicina (BRIERS et al., 2013; GONIK; MISHIN; ZIMNYAKOV, 2002; ZAKHAROV et al., 2009), em materiais não biológicos (ZDUNEK et al., 2014), vigor de sementes (FRACAROLLI et al., 2010) e outros.

### **2.2.1.1 Interação luz-matéria**

A luz possui a capacidade de interagir com a matéria podendo ser refletida, espalhada, absorvida e reirradiada. A interação da radiação laser com objetos biológicos pode ser útil em processos em que baixa intensidade não ativa

os mecanismos de adaptação de um biosistema e não afeta a sua homeostase (RABAL; BRAGA, 2008).

### **2.3 Métodos de análise do *Biospeckle***

A análise dos padrões de *speckle* laser baseia-se no processamento das imagens com a intenção de quantificar, seja numericamente ou graficamente, o nível de atividade da superfície.

Na análise numérica, o nível de movimentação dos dispersores de luz é quantificado e utilizado para materiais homogêneos, cujo nível de atividade é o mesmo ao longo do material. Entre os métodos de análise numérica, destacam-se o Momento de Inércia (MI), Diferença dos Valores Absolutos (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999; CARDOSO; BRAGA, 2014).

As análises gráficas apresentam como resultado imagens compostas pela distribuição da atividade na amostra. Esse tipo de análise é utilizado na avaliação de áreas heterogêneas, sendo que as principais técnicas utilizadas são Fujii (FUJII et al., 1985), Diferenças Generalizadas (DG) (ARIZAGA et al., 2002), Desvio Padrão (SD) (NOTHDURFT; YAO, 2005; WESTRUP; MCEVOY, 2013) e outros.

Quando os padrões de *speckle* são capturados, as análises da qualidade das imagens capturadas são avaliadas por meio dos métodos do Teste de qualidade, composto pelo método da saturação, homogeneidade e contraste (MOREIRA, 2013).

#### **2.3.1 História temporal do padrão de *Speckle***

A História Temporal do Padrão De *Speckle*, em inglês *Time History of Speckle Pattern* (THSP), ocorre quando um objeto é iluminado pela luz coerente

de um laser, sucessivas imagens do *speckle* são registradas por uma câmera ccd. Cada imagem é digitalizada para 8 bits em níveis de cinza, e somente uma coluna (a do meio) é utilizada para a criação de uma nova pseudoimagem que é composta pelo conjunto de todas as colunas lado a lado. A nova imagem fornece uma matriz com  $m \times n$  valores, em que  $m$  representa as linhas ou histórico do tempo de cada pixel da coluna  $n$  vindos de cada padrão do *speckle*. A nova imagem oferece informações da evolução no tempo do padrão *speckle* desejado ao longo de cada linha (RABAL; BRAGA, 2008).

### 2.3.2 Matriz de Coocorrência (MOC)

A matriz de coocorrência expressa o número de transições de cada pixel no THSP em relação ao seu vizinho imediato. É calculada pela Equação 9, compondo uma matriz de dimensões 256x256 pixels representando  $2^8$  níveis de cinza:

$$MOC = N_{ij} \quad (9)$$

Em que  $N_{ij}$  são os números de ocorrências de um determinado valor de intensidade do pixel  $i$ , que é imediatamente seguido por um valor de intensidade de pixel  $j$  sendo  $i$  seguido imediatamente por  $j$ . À medida que a amostra apresenta uma atividade, os valores de intensidade mudam com o tempo e o número  $N$  da matriz se distancia da diagonal principal deixando a matriz semelhante a uma nuvem. Quanto mais dispersos os pontos em relação a diagonal principal, maior é a atividade. Na Figura 5, a seguir, ilustra-se uma MOC (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999).

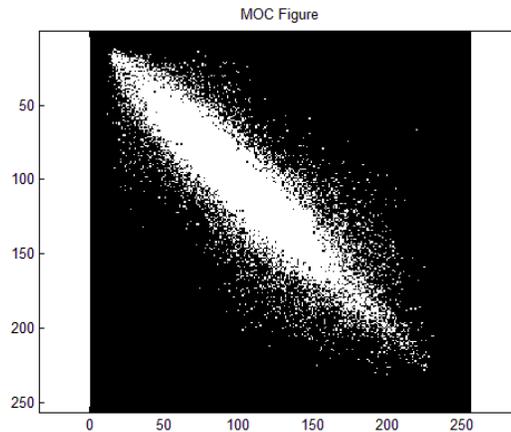


Figura 5 Matriz de Co-ocorrência

Fonte: Adaptado de Rabal e Braga (2008).

### 2.3.3 Momento de Inércia (MI)

Arizaga, Trivi e Rabal (1999) propuseram um método para quantificar a atividade biológica, denominado momento de inércia (MI), que indica com que intensidade ocorreram mudanças na matriz THSP e, geralmente, é utilizada para caracterizar numericamente os padrões de *speckle*. Esse parâmetro exibe altos valores quando a amostra apresentar alta atividade e baixos valores em situação contrária sem apresentar unidade. Na Equação 10, descreve-se, matematicamente, o momento de inércia.

$$MI = \sum_{ij} M_{ij} (i - j)^2 \quad (10)$$

Onde  $M_{ij}$  é a matriz de coocorrências.  $i$  e  $j$  são pixels subsequentes.

A medição desses níveis de atividade é importante como forma de aplicar um sistema de medição em que o julgamento deixa de ser subjetivo e visual e passa a ser representado por valores numéricos que podem ser utilizados como ferramentas de metrologia e análise (COSTA et al., 2010).

### 2.3.4 Diferença dos valores absolutos

A Diferença dos valores absolutos, em inglês *Absolute Value of the Differences* (AVD) é uma variação do MI onde o quadrado das diferenças é substituído pelo valor absoluto, evitando uma amplificação das diferenças (Braga et al., 2011). A equação 11 ilustra o método.

$$AVD = \sum \{M_{ij} \times |i - j|\} \quad (11)$$

Onde:

$M_{ij}$  é a matriz de coocorrência e  $i$  e  $j$  são os pixel subsequentes.

O valor do AVD é obtido de forma que as variações de baixa intensidade de pixel na MOC irão adicionar valores baixos para o resultado final, enquanto que variações elevadas contribuirão com valores maiores no resultado final. Por exemplo, se uma intensidade de um determinado pixel muda de 0 (preto) para 255 (branco), este irá adicionar  $|0 - 255| = |-255| = 255$  no valor final de AVD. No entanto, se a variação foi de 50 a 45, esta irá adicionar  $|50 - 45| = 5$  para o valor final de AVD. Dessa forma, se o fenômeno a ser observado muda seu estado de uma forma dinâmica, então este será registrado como uma variação na intensidade pixel. No entanto, se o fenômeno apresenta pequenas mudanças nos padrões de salpico, o AVD irá adicionar menos valor para quantificá-lo (BRAGA et al., 2011; RABAL; BRAGA, 2008).

Recentemente, no estudo de Cardoso e Braga (2014), sugeriu-se uma nova normalização e demonstrou-se que essa normalização apresentou melhores resultados relacionados às variações de intensidade nos padrões de *speckle*.

### **2.3.5 Teste de qualidade**

Consiste em um conjunto de testes que avaliam se a configuração experimental adotada apresenta uma iluminação adequada, uma captura de imagens compatível com a velocidade de mudança da amostra observada e se a amostra iluminada apresenta áreas homogêneas que permitam análises fora de regiões de transição (MOREIRA, 2013).

#### **2.3.5.1 Saturação**

O teste de saturação mostra se os pixels estão acima de um nível de intensidade determinado, ou seja, no caso de uma imagem de tons de cinza (pode assumir cores entre os valores 0-255). Quando um pixel atinge o nível 256, quer dizer que o pixel encontra-se saturado, sendo que é possível usar uma margem inferior a 256 para o julgamento de saturação (MOREIRA, 2013).

#### **2.3.5.2 Contraste**

O teste de contraste mostra quando uma área da imagem de um único *speckle* possui atividade acima da capacidade de capturar da câmera. As regiões em que ocorre um borrado na imagem podem resultar em perdas de informação (MOREIRA, 2013).

### 2.3.5.3 Homogeneidade

O teste de homogeneidade é utilizado para a homogeneidade de uma área da imagem *speckle* em relação às áreas vizinhas. Para calcular a homogeneidade, utiliza-se o valor do desvio padrão da atividade biológica das janelas de uma vizinhança (CARDOSO; BRAGA; RABAL, 2012).

### 2.3.6 Desvio padrão

O Desvio Padrão, em inglês *Standard Deviation* (SD), é um método de saída gráfica que apresenta uma comparação entre as imagens do conjunto. O método seleciona cada pixel da imagem e compara com seus correspondentes no conjunto e calcula o desvio padrão. Os valores utilizados são baseados na escala dos tons de cinzas, e os resultados apresentam uma nova imagem em bits com a distribuição da atividade biológica (NOTHDURFT; YAO, 2005; WESTRUP; MCEVOY, 2013).

### 2.3.7 Diferenças Generalizadas (DG)

O método de Diferenças Generalizadas apresenta uma saída gráfica e permite indicar áreas que apresentem diferentes níveis de atividades relacionadas à mudança do padrão do *speckle* observado aos moldes do Desvio Padrão (SD). Essa metodologia baseia-se em trabalhar a imagem obtida do corpo iluminado, identificando a intensidade luminosa de cada pixel que a compõe, sendo essa intensidade expressa por  $I(x,y)$ , em que  $(x,y)$  são as coordenadas do pixel. O que se faz, então, é realizar uma soma de diferenças de intensidade entre uma imagem com todas as subsequentes (ARIZAGA; TRIVI; RABAL,

1999). O resultado será uma nova imagem e um clareamento dos pixels que apresentarem mudanças de intensidade, representado pela Equação 12.

$$DG_{(x,y)} = \sum_k \sum_I |I_k(x,y) - I_{k+1}(x,y)| \quad (12)$$

Em que:

k- número da imagem

I – intensidade

x,y –pixels subsequentes.

### 2.3.8 Fujii

O método de Fujii é comumente utilizado para a análise gráfica do *speckle* laser dinâmico. O método de Fujii et al. (1985) baseia-se no cálculo da visibilidade entre os pixels de imagens obtidas ao longo do tempo. O procedimento para a construção do método de Fujii ocorre, segundo a Equação 13.

$$Fujii_{(x,y)} = \sum_{k=1}^N \left| \frac{I_k(x,y) - I_{k+1}(x,y)}{I_k(x,y) + I_{k+1}(x,y)} \right| \quad (13)$$

Onde N corresponde ao total de imagens gravadas e  $I_k(x,y)$ , ao valor da intensidade na posição (x,y) na imagem k.

A partir desse cálculo, uma nova imagem é construída, assim, os pixels de regiões onde não houve alterações de intensidade ao longo do tempo, assumem valor nulo no mapa final, enquanto, áreas em que os pixels sofreram grandes alterações assumem valores mais altos. Dessa maneira, a imagem

resultante apresenta pontos claros nas áreas de grande atividade e pontos escuros naquelas de baixa atividade.

A pesquisa para uma maior independência dos resultados do *biospeckle* laser relacionados ao nível da luz, foram estudados por Minz e Nirala (2014) modificando a equação de Fujii et al. (1985) (Equação 13), apresentando melhoria da equalização do contraste de diferentes áreas em uma imagem.

#### **2.4 Aplicações e problemas do *biospeckle* laser**

O *biospeckle* laser é uma técnica que produz resultados que permitem aplicação nas mais diversas áreas e também realiza testes não destrutivos. Esse tipo de técnica é sensível, com relação aos detalhes e relativamente simples de ser utilizada. Porém, a sensibilidade apesar de ser uma vantagem torna-se um problema que pode comprometer o uso da técnica e dificulta sua padronização quando a variação do nível de iluminação é algo comum.

As pesquisas na área do *biospeckle* apresentam uma diversificação elevada quando relacionadas aos tipos de materiais biológicos (XU et al., 2013). O estudo de Thilakarathne et al. (2014) foi utilizado como um método alternativo em tempo real para medir o crescimento de uma cultivar de arroz japonês como precisão de 0,1 nm através de sistemas ópticos. A luz que emerge a partir de um laser de He - Ne de comprimento de onda de 632 nm (GLG 5400, NEC Corporation, Japão), foi inicialmente passado através de um filtro de densidade neutro, seguido por um filtro de interferência e uma câmera CCD para capturar a imagem. A folha da planta é posicionada sobre uma superfície revestida de algodão para evitar danos. Na Figura 6, apresenta-se o esquemático proposto no experimento de Thilakarathne et al. (2014).

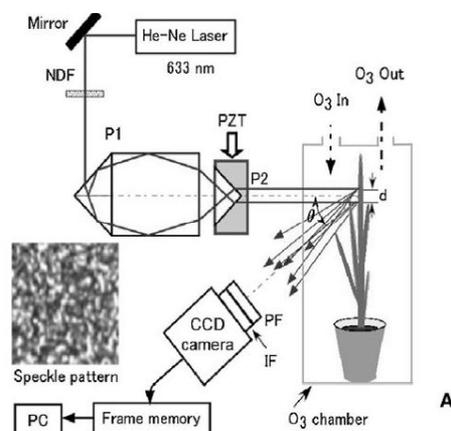


Figura 6 Configuração de experimento

Fonte: Thilakarathne et al. (2014).

#### 2.4.1 *Biospeckle* em sementes

Na literatura, encontram-se três linhas principais de estudos de aplicação do *biospeckle* em sementes, sendo elas relacionadas com avaliação de teor de água, diferenciação dos níveis de atividade e detecção de patógenos. Tais estudos trazem importantes informações de interação do fenômeno, contribuindo, assim, para o domínio da técnica do *biospeckle* laser como uma ferramenta para a análise de qualidade de sementes e avaliação de materiais biológicos.

Rodrigues (2007) utilizou o speckle dinâmico para avaliar a atividade metabólica de sementes, utilizando a técnica de entropia ao monitorar a atividade metabólica de sementes e observou que se a entropia final fosse maior que a entropia inicial, isso também seria visível através da imagem obtida do *biospeckle* do material. Já o estudo de Nascimento et al. (2007) propuseram métodos de simulação computacional para o fenômeno *biospeckle* laser simulando sua aplicação em sementes.

No estudo de Fracarolli et al. (2010), o *biospeckle* é utilizado para avaliar a capacidade de germinação de sementes da planta Ipê Roxo (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo). Para quantificar a atividade biológica das sementes, foi utilizado o cálculo do Momento de Inércia (MI). Os experimentos realizados verificaram danos ocasionados por calor, interferência do tegumento nos resultados da atividade biológica, diferenciação entre sementes germinadas e não germinadas, verificação da umidade das sementes com o intuito de encontrar a melhor meio de interação entre a semente e a luz laser e, por fim, avaliar a atividade das sementes através do envelhecimento acelerado. A disposição dos equipamentos é descrita na Figura 7. O ângulo incidente do laser possuiu o valor de 45 graus e a câmera foi posicionada de forma perpendicular em relação à semente.

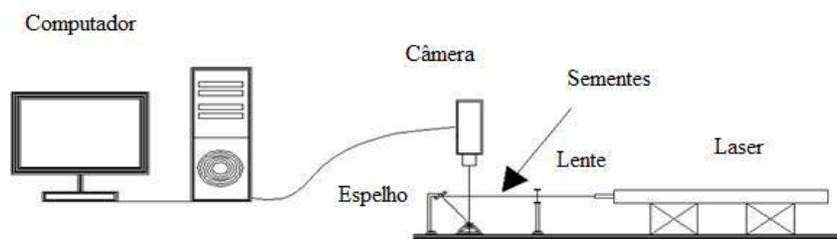


Figura 7 Setup de experimento

Fonte: Fracarolli et al. (2010).

No experimento referente à interferência do tegumento, Fracarolli et al. (2010) retiraram o tegumento da semente e aplicou-se o *biospeckle*, variando o nível de umidade das sementes. Os valores de atividade biológica obtidos foram a partir do cálculo MI. Continuando seus experimentos, Fracarolli et al. (2010) identificaram a faixa de umidade das sementes em que ocorre a melhor interação entre o laser e a semente para obter o *biospeckle*. Tal experimento ocorreu

através da iluminação de um conjunto de sementes em que cada grupo de semente possuía um determinado nível de umidade.

O estudo de Braga et al. (2012) mostra um protocolo para separar diferentes tecidos no mesmo material utilizando imagens do *biospeckle*. A eficácia do protocolo foi verificada em aplicação a sementes de milho, nas quais embrião e endosperma foram separados.

O estudo de Cardoso et al. (2011) identificou mapas de frequência para materiais biológicos, a partir de sementes de milho e feijão. Seus experimentos comprovaram que a atividade biológica presente em sementes mortas pode ser a atividade da água.

#### **2.4.2 Sementes de café**

As sementes de café possuem em seu interior diversos tipos de tecidos. Essas camadas biológicas são constituídas por um embrião, endosperma e um envoltório. Possui o formato plano convexo, elíptico e possui um sulco no sentido longitudinal na face plana (RENA; MAESTRI, 1986). Dentre os tecidos que compõem a semente de café, o endosperma se destaca, pois representa a maior parte dos tecidos (RENI et al., 2010). Segundo Shimizu e Mazzafera (1999), o endosperma é o tecido responsável por armazenar os nutrientes necessários ao embrião e representa 95% da massa seca da semente. É composto por proteínas (10 a 14%) e aminoácidos (0,5 a 2%).

#### **2.4.3 *Biospeckle* em raízes**

O cultivo de raízes voltado para estudos e pesquisas, utilizam-se meios nutritivos capazes de suprir a necessidade de nutrientes da planta. A composição do meio que nutre a planta precisa abranger todos os minerais essenciais para a

nutrição vegetal. Existem diversos meios de cultura, dentre eles, o meio em que a consistência pode ser ajustada com agentes gelificantes, por exemplo, Ágar-Ágar, Phytigel®, amido e outros (XU et al., 2013).

O Ágar-Ágar é um hidrocolóide obtido através de determinadas espécies de algas marinhas vermelhas, formado por um gel não absorvível, não fermentável e com importante característica de ser atóxico e transparente. Geralmente é empregado, na microbiologia, com o intuito de culturas sólidas de bactérias e também aplicado ao cultivo de raízes. Da mesma maneira, o Phytigel® é um gelificante e não pode ser absorvido pela planta (MORAIS et al., 2012).

Tanto o Ágar-Ágar quanto o Phytigel®, por serem materiais transparentes, possibilitam a aplicação de técnicas ópticas, dentre elas o *biospeckle*. No estudo de Ribeiro et al. (2014), foram desenvolvidos métodos para investigar a atividade *biospeckle* em raízes e para caracterizar a distribuição de sua intensidade em relação à resposta ao fenômeno *thigmostimuli*. No experimento, as raízes foram cultivadas em gel de Ágar-Ágar mole inseridas em tubos, sendo utilizadas aquelas que se encontravam mais próximas à parede do tubo.

Em abordagem semelhante, o estudo de Braga et al. (2009) investigou o *biospeckle* como forma de avaliar tecidos vegetais de raízes cultivadas em gel, utilizando raízes de *Coffea arabica* e *Eucalyptus grandis*. Destacando que a iluminação foi aplicada de modo a evitar reflexos especulares do tubo de vidro. Os resultados experimentais obtidos mostraram que é possível utilizar o *biospeckle* para fornecer informações da atividade biológica de tecido vivo em meio de cultura em substrato de gel.

## 2.5 Formação das imagens do *biospeckle* laser

O estudo de Zdunek et al. (2014) mostra que a técnica do *biospeckle* laser tem sido aplicada em matérias biológicas, avaliando a qualidade de cultivos agrícolas, como o crescimento, transporte e ciclose. Também verificando o envelhecimento e maturação, desenvolvimento das plantas e detecção de defeitos e doenças em frutos. Tal estudo evidencia a robustez da técnica para diversos tipos de tecidos biológicos e para a análise de fenômenos variados.

A aplicação do *biospeckle* laser em tecidos biológicos cultivados em material imerso, foi estudada por Braga et al. (2009), Rathnayake et al. (2008) e Ribeiro et al. (2014). Os estudos avaliam o comportamento raízes cultivadas em substrato gel transparente em cultura de tecidos e demonstra que é possível avaliar os movimentos das partículas dispersoras de luz, entretanto para obter as imagens do *speckle* laser dinâmico, passíveis a análises coerentes, é preciso levar em consideração problemas ocasionados pela absorção de luz e a quantidade de informação trazidas ao observador (sensor ccd).

Ao utilizar o *speckle* laser dinâmico para avaliar tecidos biológicos imersos, os estudos de Briers et al. (2013), Gonik, Mishin e Zimnyakov (2002) e Zakharov et al. (2009) demonstram que a técnica é capaz de monitorar microcirculação sanguínea, movimentação do fluxo sanguíneo e a movimentação das estruturas celulares presentes no sangue e também a avaliação do fluxo sanguíneo cerebral de roedores. Esses estudos mostram que por meio da técnica do *biospeckle* é possível estudar o comportamento da superfície do material analisado e também obter informações de estruturas celulares internas à superfície. No entanto, para a análise correta, os efeitos de reflexão da luz precisam ser amenizados de forma que a informação trazida tanto da superfície quanto das estruturas imersas possam representar corretamente a superfície observada.

Os estudos mencionados anteriormente mostram que o uso da técnica do *biospeckle* laser é capaz de ser aplicado a diversos tipos de tecidos biológicos, entretanto a reflexão, intensidade e quantidade de informações que a luz precisa transportar até o observador e os efeitos de reflexão e absorção da luz, influenciam nos resultados do *speckle* laser dinâmico e são assuntos de estudos.

Para avaliar a variação da intensidade de iluminação, o estudo de Xu, Joenathan e Khorana (1995) realizou a avaliação de padrões de *speckle* provenientes de materiais biológicos e materiais não biológicos. Nos experimentos, foram utilizados diferentes tipos de intensidade da iluminação do laser na obtenção de imagens do *biospeckle* laser, variação do tamanho dos grãos de *speckle* e avaliação da penetração de luz na superfície. Tais experimentos levaram à conclusão de que a imagem do *speckle*, formada pela interferência entre o feixe de luz e a superfície iluminada, é dependente da penetração da luz no material, mostrando que há uma relação entre a quantidade de informação trazida pela luz que penetra poucos milímetros no material e a quantidade de informação que o observador consegue capturar.

No trabalho de Moreira et al. (2002), foi investigada a transmissão da luz laser aplicadas em sementes de feijão com o intuito de conhecer a penetração da luz no material biológico. Para a realização do estudo, foram obtidas imagens do *biospeckle* com variação do teor de água e as observações levaram a compreender que a profundidade que a luz incidente percorre na semente está relacionada à quantidade de água existente no material, à medida que a quantidade de água aumenta, maior é a penetração do laser no material. A água torna-se um fator relevante na quantidade de informações trazidas pela luz ao percorrer um material. Mostrando que a luz, ao ser refletida no sentido do observador conterà mais informações.

A interação entre a luz e o material biológico é algo não trivial de interpretação, é preciso atentar aos detalhes que podem influenciar a análise

(ZDUNEK et al., 2014). Quando utilizados materiais imersos, por exemplo, raízes cultivadas *in vitro* (RIBEIRO et al., 2014) o reflexo produzido tanto pelo tubo transparente quanto pelo substrato gel do meio de cultura influenciam os resultados, o que evidencia que a intensidade de luz está relacionada com a qualidade da análise do *biospeckle* laser.

Esses estudos evidenciam que a técnica do *biospeckle* laser permite avaliar o comportamento de tecidos biológicos, no entanto a análise dos materiais é referente à camada superficial.

Quando a análise dos padrões de *speckle* laser é uma abordagem numérica, algumas aplicações do *speckle* laser dinâmico utilizam estatística de segunda ordem, tal como análises de autocorrelação (XU; JOENATHAN; KHORANA, 1995; ZDUNEK et al., 2014), ou o Momento de Inércia (MI) e sua variação da Diferença dos Valores Absolutos (AVD) (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999; BRAGA et al., 2011).

No MI e AVD, a análise dos dados tem sido feita por meio de matrizes de coocorrência obtidas do histórico do tempo dos padrões de *speckle* (OULAMARA; TRIBILLON; DUVERNOY, 1989). O uso da matriz de coocorrências foi proposto por Haralick, Shanmugam e Dinstein (1973), por meio de series de operações de avaliação de textura.

Os valores finais do MI e AVD são apresentados de acordo com a distribuição dos níveis de cinza dos pontos na matriz de coocorrência com relação a sua diagonal principal.

As ocorrências provenientes da diagonal principal são influenciadas pelo quadrado ou operações absolutas e as ocorrências na diagonal não são adicionadas no resultado, já que elas não representam mudanças entre quadros consecutivos no histórico de tempo.

Com isso pode ser visto que os resultados baseiam-se fortemente em medições de intensidade que são afetadas pelo meio de registro. As câmeras

digitais que utilizam dispositivo de carga acoplada (CCD) em forma matriz ou dispositivos para a imagem de cena (CMOS), são propensas às mesmas dificuldades. Embora a carga coletada por um elemento CCD seja proporcional à irradiância, muitas câmeras digitais aplicam um mapeamento não linear para as saídas do CCD, antes de serem escritas no meio de armazenamento. Esse mapeamento não linear é utilizado em vários caminhos para imitar a resposta característica do filme, antecipando respostas não lineares no display do dispositivo, e com frequência converte a saída 12bits para os conversores analógicos digitais dos CCDs para valores em 8bits comumente utilizados para armazenar as imagens. Como um filme, a não linearidade mais significativa na curva de resposta são os pontos de saturação, onde qualquer pixel com a irradiância acima de certo nível é mapeada para o mesmo valor máximo da imagem.

A pesquisa para uma maior independência dos resultados do *biospeckle* laser preocupa com o nível da luz nos exemplos conduzidos pela proposta de Minz e Nirala (2014) modificando a equação de Fujii et al. (1985), e a ideia de Zhong et al. (2013) que propuseram uma abordagem de pré-processamento da imagem, utilizando vetores normais. Ambos os trabalhos tratam da melhoria da equalização do contraste de diferentes áreas em uma imagem, entretanto eles não investigaram o resultado numérico.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos propostos, os itens a seguir foram divididos em intensidade de luz para formação do *biospeckle* laser e investigação da intensidade de amostras homogêneas utilizando métodos numéricos.

O desenvolvimento deste trabalho foi realizado no Centro de Desenvolvimento de Instrumentação aplicada à Agropecuária (CEDIA) em conjunto com os laboratórios de Cultura de tecidos e de Análise de Sementes no departamento de Agronomia da Universidade Federal de Lavras.

#### 3.1 Intensidade de luz para formação do *biospeckle* laser

Nesta etapa, foram estudadas a penetração da luz na semente, a variação da intensidade do laser em sementes e raízes.

##### 3.1.1 Teste de transmitância

Esta etapa consistiu em investigar a penetração e interação do laser em sementes de café para avaliar a capacidade da luzem trazer informações do embrião. Para esta etapa, as sementes de café utilizadas foram de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí vermelho. Todas as sementes foram colhidas no estágio cereja, em seguida despolpadas mecanicamente, desmuciladas (remoção do mesocarpo) por fermentação em água e, então, os endocarpos (pergaminhos) retirados manualmente.

As sementes foram colocadas para germinar de acordo com (CLEMENTE et al., 2011) de forma que o embrião aumentasse sua atividade e tornasse visível sem protuberar. Após avaliar as sementes uma vez por dia

durante uma semana, verificou-se que, em torno de 6 dias no germinador, as sementes poderiam ser analisadas como esperado.

Cerca de 10 sementes de café foram utilizadas para testar a penetração do laser na semente em nível de umidade de 23% b.u (MOREIRA et al., 2002).

As sementes foram seccionadas manualmente com o auxílio de uma lâmina, posicionadas em um anteparo plástico contendo um pequeno orifício, iluminadas por um laser. As sementes foram cortadas para que fosse possível conhecer a interação da luz com a camada de tegumento que cobre o embrião. Um foto-sensor foi utilizado para mensurar a quantidade de luz proveniente da passagem pela semente. O valor da intensidade da luz obtido foi convertido por um Multimetro Digital LCD MINIPA configurado na função de voltímetro. O esquema apresentado na Figura 8 ilustra o teste da transmitância.

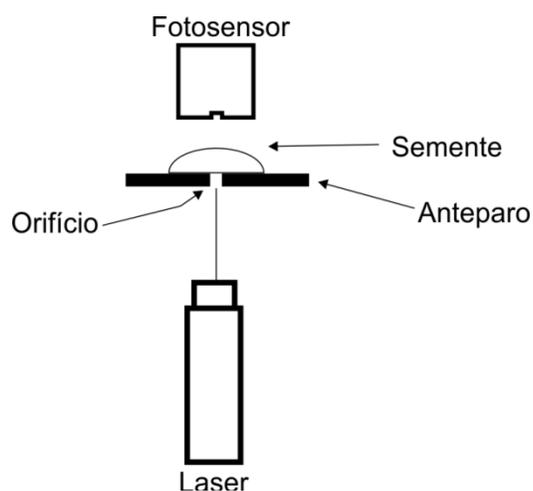


Figura 8 Teste da transmitância

### 3.1.2 Variação de intensidade na semente de café

Inicialmente, foi realizado um método de calibração para avaliar o melhor posicionamento e disposição dos equipamentos responsáveis por obter

imagens do *biospeckle* laser. Os equipamentos que compuseram o experimento foram: um laser HeNe vermelho (632 nm) de 10 mW de potência, uma mesa óptica com sistema antivibração, um sistema de aquisição de imagens, contendo uma câmera CCD (*charged coupled device*), montada em um minimicroscópio com ajuste de foco, um microcomputador, um filtro neutro com variação de intensidade ajustável manualmente e um fotossensor para medir a variação da intensidade do laser e espelhos ópticos.

Após vários testes realizados, o modelo esquemático para disposição dos equipamentos é ilustrado na Figura 9.

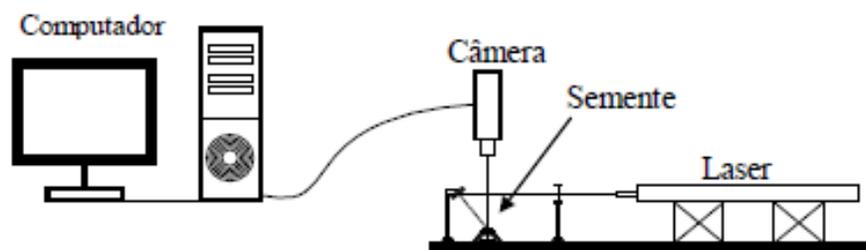


Figura 9 Disposição dos equipamentos experimentais para a captura de imagens da semente

Definida a configuração dos equipamentos, a variação da intensidade de luz foi realizada através de um filtro de densidade neutra. Tal filtro permite o ajuste manual da intensidade. O fotossensor acoplado ao Multímetro Digital LCD MINIPA foi posicionado ao lado da câmera para aferir a intensidade de luz refletida. A intensidade do laser refletida foi capturada pelo fotossensor e convertida em volts (V) por meio de um voltímetro. A calibração do fotossensor foi realizada em dois passos: 1) aferimento da intensidade de luz sem o uso do filtro neutro; 2) intensidade de luz mensurada utilizando o filtro neutro.

Inicialmente, as imagens dos padrões de *speckle* foram obtidas a uma taxa de 8 frames por segundo, totalizando 128 imagens. Em seguida, novas imagens do *biospeckle* foram capturadas reduzindo-se a intensidade do laser em 50%. As imagens dos padrões de *speckle* foram obtidas a uma taxa de 8 frames por segundo totalizando 128 imagens.

As imagens foram armazenadas e processadas posteriormente. Os métodos de processamento aplicados foram: DG, Fujii, Fujii com a variação apresentada por Minz e Nirala (2014), AVD (CARDOSO; BRAGA, 2014) e IM. A codificação das funções encontra-se no Anexo I.

A análise numérica (MI e AVD) foi realizada avaliando-se a variação da atividade no embrião da semente delimitado pelo retângulo de borda branca desenhado na Figura 10. A região de análise foi a mesma para as duas situações.

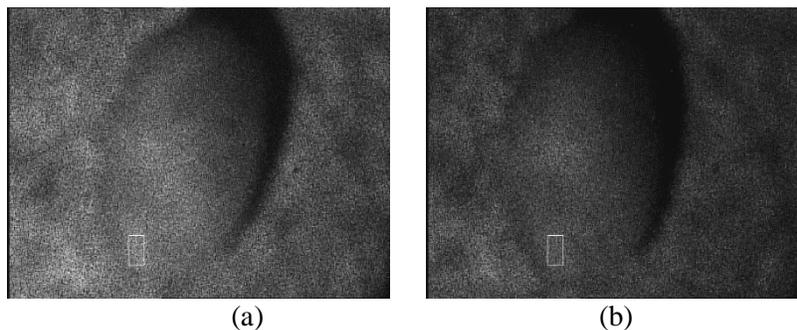


Figura 10 Imagem com maior intensidade (a) e imagem com menor intensidade (b)

### 3.1.3 Variação de intensidade na raiz de milho

Esta etapa deste trabalho visou investigar a relação entre o posicionamento da raiz com a atividade biológica e também se maior ou menor intensidade de luz contribui positivamente ou negativamente para a formação dos padrões do *biospeckle* laser.

Inicialmente, foram testadas várias disposições dos equipamentos e após vários testes, o melhor modelo esquemático para a configuração dos equipamentos é ilustrado na Figura 11, a seguir. Nessa configuração experimental, foram utilizados um tubo de ensaio contendo uma planta (milho - *Zea mays*) em solução de Agar 5, 5 g/L e Phytigel® 1, 8g/L, um laser de diodo de 660 nm, 50 mW de potência alimentado por uma fonte elétrica com regulação e leitura precisa da corrente de trabalho, uma lente côncava para expansão do laser, um sistema de aquisição de dados composto por um mini-microscópio DinoLite acoplado a um microcomputador. As imagens foram armazenadas e processadas posteriormente.

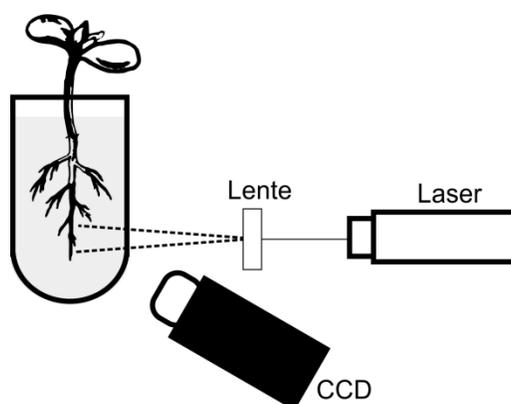


Figura 11 Setup para raízes

Os tubos contendo as raízes foram posicionados na configuração experimental apresentada na Figura 11. Em seguida, a escolha da raiz para a análise foi baseada no estudo de Ribeiro et al. (2014), selecionando uma raiz próxima a parede do tubo. Posteriormente, as imagens do *biospeckle* foram capturadas, variando-se a intensidade do laser, por meio de um potenciômetro com função de variar a corrente elétrica que alimenta o laser. Para esse experimento, foi utilizada a Fonte Digital PLD-1 para Diodos Laser.

Os testes aplicados à variação da intensidade do laser foram realizados utilizando os seguintes valores de corrente, em miliamperes (mA): 53,152; 54,208; 55,568; 56,776; 57,380; 58,136; 59,041; 60,249; 65,232; 70,570; 75,081; 80,181; 85,013; 90,272; 95,432; 100,86; 105,09. O valor inicial da corrente que alimenta o laser foi estabelecido por meio da ativação da câmera CCD. Para cada valor da corrente elétrica, os padrões de *speckle* foram obtidos a uma taxa de 8 frames por segundo, totalizando 128 imagens. Para o processamento dos padrões de *speckle* foram utilizados os métodos AVD e MI, selecionando uma região de interesse na amostra, de tamanho 50x62 pixels. Pixels aleatórios e interiores à região foram utilizados para a análise. Na Figura 12, ilustra-se a região em que os pixels foram selecionados.

Para gerar saídas gráficas, foram utilizados os métodos DG, SD, Fujii, Fujii com a variação apresentada por Minz e Nirala (2014) aplicados à imagem toda.

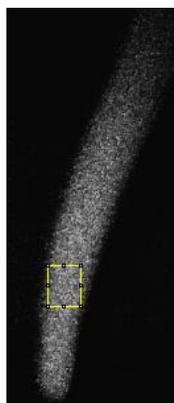


Figura 12 Região de análise numérica

Avaliando a mudança da posição da raiz no tubo, o mesmo foi girado em 180 graus e as imagens da mesma raiz foram capturadas seguindo o padrão da primeira iluminação. Na Figura 13, ilustra-se o experimento.

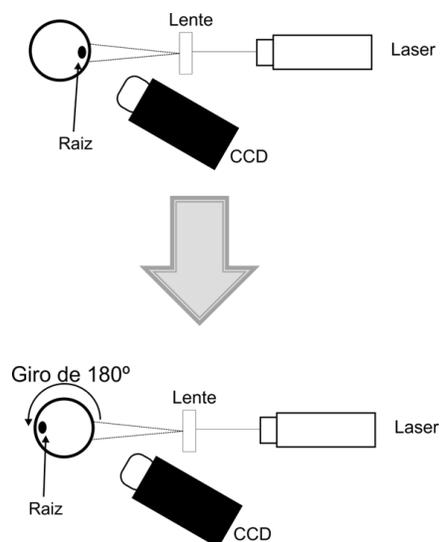


Figura 13 Iluminação da raiz com giro de 180 graus

As imagens foram processadas utilizando os métodos DG, Fujii, Fujii com a variação apresentada por Minz e Nirala (2014), AVD e IM. Na Figura 14, ilustra-se a região utilizada para a análise numérica. A codificação das funções encontra-se no Anexo A.



Figura 14 Raiz rotacionada 180graus.

### 3.2 Influência da intensidade de luz em amostras homogêneas

Este trabalho também testou a influência da iluminação homogênea nos padrões do *speckle* laser dinâmico, por meio de análises numéricas.

No MI e no AVD, a análise dos dados têm sido feitas por meio de matrizes de coocorrência obtidas do histórico do tempo dos padrões de *speckle* (OULAMARA; TRIBILLON; DUVERNOY, 1989). O uso da matriz de coocorrências foi proposto por Haralick, Shanmugam e Dinstein (1973) por meio de séries de operações de avaliação de textura.

Os valores finais do MI e do AVD são apresentados de acordo com a distribuição dos níveis de cinza dos pontos na matriz de coocorrência com relação a sua diagonal principal definidos pela Equação 14 e 15.

$$IM = \sum \sum \left( \frac{M_{ij}}{Norm} \right) (i - j)^2 \quad (14)$$

$$AVD = \sum \sum \left( \frac{M_{ij}}{Norm} \right) |i - j| \quad (15)$$

Em que, Norm é um constante de normalização do dado, que é a soma de cada linha do  $M_{ij}$  (proveniente da matriz de coocorrência). Então, o coeficiente do quadrado das diferenças pode ser interpretado como uma estimativa da probabilidade condicional da transição da intensidade de  $i \rightarrow j$  dado que a primeira ocorrência foi  $i$ . Por fim, o resultado da contribuição do cálculo que a linha para o MI é o principal valor da magnitude  $(i - j)^2$  dado que a primeira ocorrência foi  $i$ . A fim de comparar alternativas, essa normalização será chamada de **normalização de linhas locais**.

No AVD, a diferença é a substituição da operação de quadrado pelo valor absoluto da diferença entre  $i$  e  $j$ .

Braga et al. (2011) propuseram uma normalização diferente na ordem de enlace da robustez do procedimento, portanto reduzindo o efeito da variação da intensidade em algumas áreas da imagem, tal como, quando iluminado um objeto redondo ou mesmo um objeto irregular que precisa ter a mesma atividade em todas as partes da imagem. Vamos chamar essa normalização de **normalização em toda a imagem**. Por meio da divisão, de cada componente pelo número total de ocorrências, e esse fator peso entre uma estimativa da probabilidade da diferença  $(i - j)$  independente do valor de  $i$ . O MI e AVD definido com essa normalização é o principal valor de  $(i - j)^2$ , ou  $|i - j|$  respectivamente, isto é, a mudança da intensidade por qualquer valor da primeira intensidade  $i$ .

No MI, as ocorrências provenientes da diagonal principal são influenciadas pelo quadrado ou operação absoluta e ocorrências na diagonal principal não acrescentam ao resultado já que não representam mudanças entre consecutivos quadros no histórico de tempo.

A avaliação da intensidade de luz utilizando as abordagens tradicionais para análises numéricas do *speckle* laser dinâmico foi utilizado e também testado algumas novas variações em regiões diferenciando as condições de iluminação. Uma mudança local na iluminação deve ser consequência do resultado fornecido pela linearidade que o sensor CCD pode assumir.

As equações 16 e 17 apresentam o MI e AVD, utilizando o conceito adotado por Fujii et al. (1985), incluindo o denominador na diferença fornecendo o peso e pretendendo obter uma medida independente de cada unidade de iluminação.

$$NewIM = \sum \sum \left( \frac{M_{ij}}{Norm} \right) \frac{(i - j)^2}{(i + j)^2} \quad (16)$$

$$NewAVD = \sum \sum \left( \frac{M_{ij}}{Norm} \right) \frac{|i-j|}{i+j} \quad (17)$$

Utilizando essas expressões, os fatores de atenuação se anulam.

Uma mudança adicional, nas Equações 16 e 17, foi analisada e consiste em utilizar diferentes potências nos valores de  $i$  e  $j$  antes de serem utilizados na equação, ilustrados nas Equações 18 e 19.

$$NewIM = \sum \sum \left( \frac{M_{ij}}{Norm} \right) \frac{(i_p - j_p)^2}{(i_p + j_p)^2} \quad (18)$$

em que  $i_p$  é  $i$  elevado à potência 0,3. E  $j_p$  é  $j$  elevado à potência adotada (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1).

$$NewAVD = \sum \sum \left( \frac{M_{ij}}{Norm} \right) \frac{|i_p - j_p|}{i_p + j_p} \quad (19)$$

em que  $i_p$  é  $i$  elevado a potência 0,3. E  $j_p$  é  $j$  elevado a potência adotada (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1).

### 3.2.1 Dados do *speckle* dinâmico provenientes de amostras de secagem de tinta

Dados de secagem de tinta foram testados, onde a quantidade de luz iluminando a superfície foi diferente como é mostrado na Figura 15.

Uma placa de vidro coberta com tinta durante o processo de secagem foi iluminada por um laser e imagens *speckle* foram capturadas e processadas

posteriormente. Um filtro de densidade neutra ( $D=0.5$ ) foi introduzido para cobrir uma parte da região iluminada. Dessa maneira, ambas as partes, sofrem a mesma dinâmica do processo, devendo conduzir a medidas similares, mas sob diferentes iluminações. O histórico de padrões de *speckle* no tempo foi construído em 11 momentos de tempo de secagem (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 105, 120, 150 minutos).

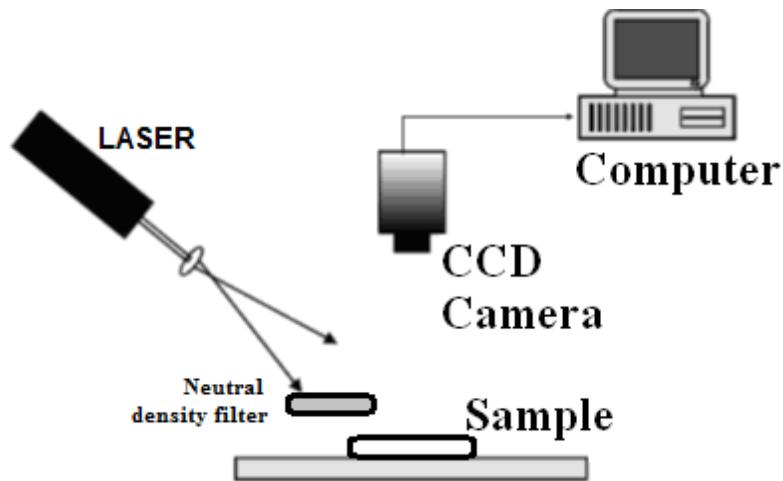


Figura 15 Configuração experimental de aquisição de dados com um filtro de densidade neutra criando uma área escura no padrão de *speckle* com uma lâmina de com tinta secando

### 3.2.2 Análise do dado

As áreas com a mesma atividade, mas com diferente iluminação, ilustradas na Figura 15, foram analisadas, separadamente, de forma combinada. As análises das áreas separadas consideraram o THSP construído, como ilustrado na Figura 16 de cada passo da secagem, e as saídas numéricas foram relatadas para diferentes normalizações. A normalização de linhas locais (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999) e a normalização da imagem toda (BRAGA et al., 2011) foram testadas com e sem as mudanças propostas pelas

Equações 16 e 17. O teste foi também realizado com a mudança proposta nas Equações 18 e 19, considerando a potência nos elementos associados para todas as normalizações testadas anteriormente.

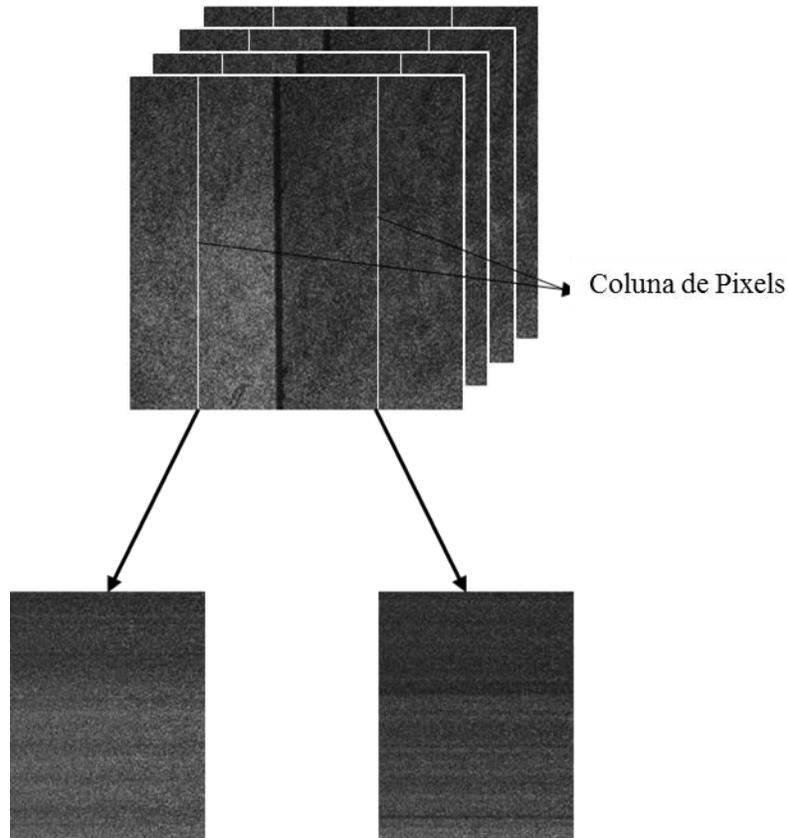


Figura 16 Criação de dois históricos de tempo dos padrões de *speckle* (THSP) utilizando uma coluna da área escura e uma coluna da área clara

As segundas abordagens com as combinações foram feitas escolhendo linhas provenientes da área escura e introduzindo-as na área clara (Figura 17), começando com uma linha até 100 linhas, e um índice de erro foi criado para comparar as abordagens. O erro é apresentado na Equação 20

$$erro = 1 - \frac{MI_{THSP \text{ claro}}}{MI_{THSP \text{ misturado}}} \quad (20)$$

em que o  $MI_{THSP \text{ claro}}$  o valor do MI aplicado ao THSP quando a luz não foi reduzida pelo filtro, e o  $MI_{THSP \text{ misturado}}$  valor do Momento de Inércia aplicado ao THSP linhas claras associadas ao acréscimo de linhas entre 1 e 100, similar a Figura 17.

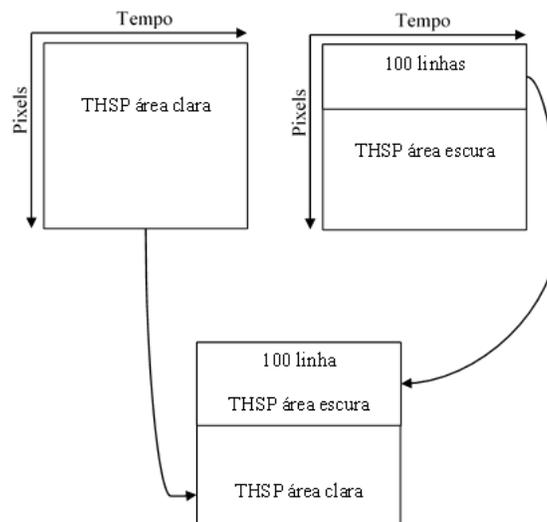


Figura 17 Composição da imagem construída utilizando linhas do THSP de área escura e área clara

Análises adicionais dos resultados foram conduzidas com o intuito de avaliação de cada coluna no tempo da Figura 17 e respostas para diferentes abordagens testadas neste trabalho. A análise e comparação foram realizadas nas áreas clara e escura, incluindo a região de transição com a média e desvio padrão para avaliar a diferença entre elas.

As funções utilizadas para o processamento das imagens THSP encontram-se no Anexo C.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultado do teste de transmitância

O teste de penetração da luz na semente de café, foi realizado avaliando a semente inteira e a semente seccionada ao meio. Os dados da Tabela 1 mostram que no caso em que a semente encontrava-se inteira, com espessura de 4,379 mm, o valor da intensidade de luz medido pela foto sensor foi de 0,956V. Quando as sementes foram cortadas ao meio (Figura 19 (b)), com espessura média de 2,237 mm, o valor da intensidade de luz medido foi de 7,079V. Esses dados demonstraram que a penetração da luz é não linear nas sementes de café, assim como Botega et al. (2009) apresentaram em seus estudos para sementes de feijão.

Tabela 1 Resultados do teste de penetração da luz

<i>Parâmetros</i>	<i>Semente de café inteira</i>		<i>Semente cortada ao meio</i>	
	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
Espessura do corte (mm)	4,379	0,222	2,237	0,197
Valor medido da intensidade de luz (V)	0,956	0,557	7,079	2,441

Para obter informações provenientes da superfície é preciso considerar o material biológico que está sobre a superfície a ser avaliada e considerar também a influência do meio na análise. Para avaliar o comportamento do embrião na semente de café, a fina camada de tegumento que recobre o embrião, precisa ser considerada ao se realizar a calibração da intensidade do laser. Para ser possível

ativar o sensor CCD e também ponderar para que o laser não influencie na amostra (BOTEGA et al., 2009; FRACAROLLI et al., 2010).

#### 4.2 Variação de intensidade na semente de café

A variação da intensidade do laser ao capturar as imagens do *biospeckle* utilizando como material de análise sementes de café, é vista na Figura 18, cujo histograma da imagem mais escura e a mais clara apresentam-se diferentes.

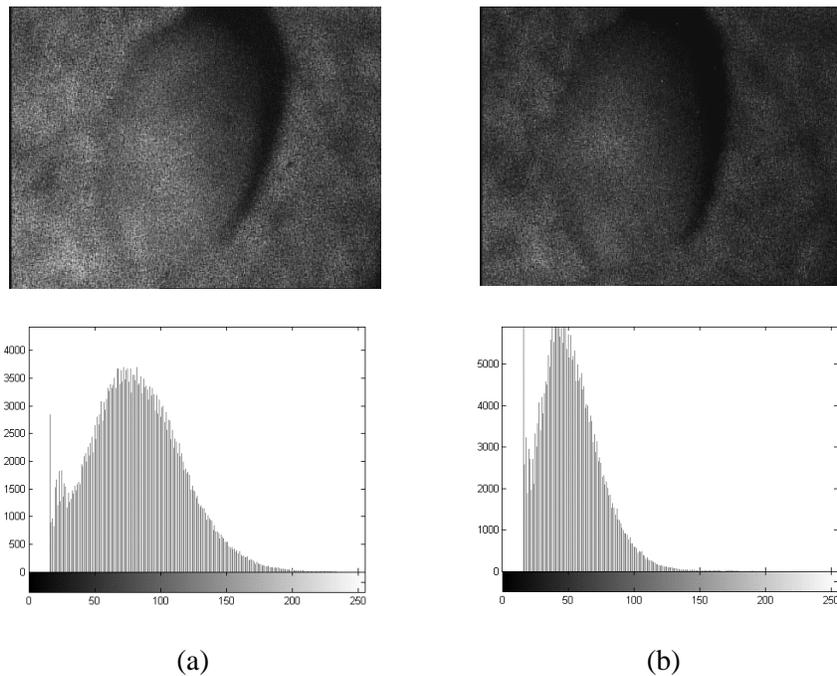


Figura 18 Imagem e histograma da imagem com maior intensidade (a) e imagem com menor intensidade (b)

A diferença entre o histograma de cada imagem revela que a Figura 18 (a) possui maior quantidade de pixel claros e a Figura 18 (b) apresenta o histograma com maior quantidade de pixel escuros. Na Figura 19, realiza-se a

sobreposição do histograma das duas imagens, possibilitando a melhor visualização da diferença do nível de intensidade entre a imagem mais clara e a mais escura.

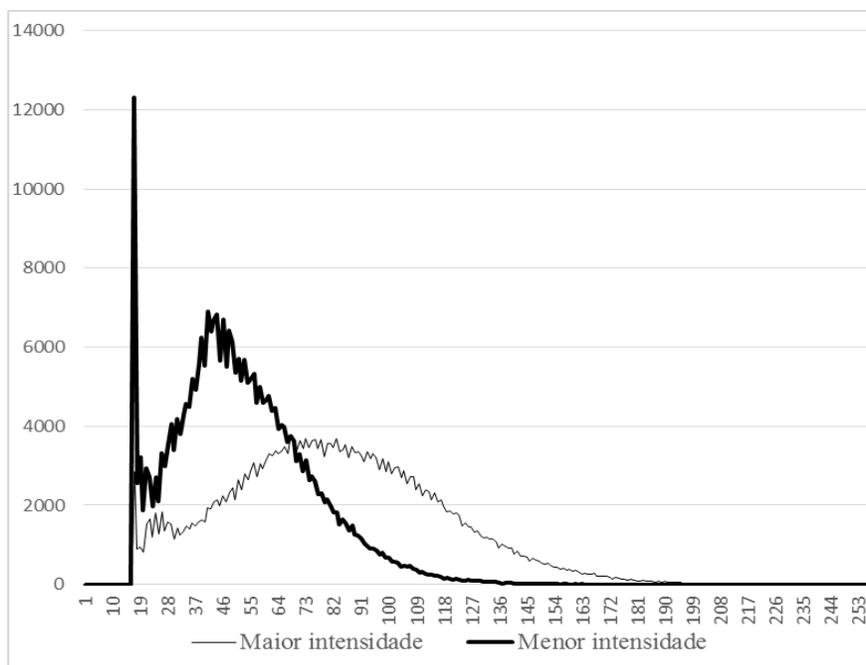


Figura 19 Sobreposição dos histogramas das imagens de maior intensidade e menor intensidade

Na Figura 19, definida anteriormente, permite compreender as diferentes intensidades do laser para a semente de café. O que torna possível avaliar o comportamento dos métodos gráficos e numéricos em situações adversas de iluminação.

Os valores numéricos do índice da atividade do embrião da semente, foram obtidos, por meio das técnicas MI e AVD e mostraram que houve redução do valor da atividade na semente que recebeu menor intensidade de luz, tal situação é ilustrada na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados do MI e AVD

<i>Parâmetros</i>	<i>Maior Intensidade do laser</i>	<i>Menor Intensidade do laser</i>	<i>Redução da atividade (%)</i>
MI Arizaga	403020	159580	60
MI Cardoso	933,4089	461,2268	51
AVD Arizaga	7367,9	4083,4	45
AVD Cardoso	24,0117	16,875	30
Intensidade medida	1,44V	0,74V	49

Na Tabela 2, é possível observar que a intensidade de luz medida reduziu 49%, sendo que intensidades de luz diferentes produziram saída numéricas diferentes para uma mesma amostra.

Observando as saídas gráficas, Figura 20, há uma região de maior concentração dos pixels vermelhos, área do embrião, retângulo de bordas brancas.

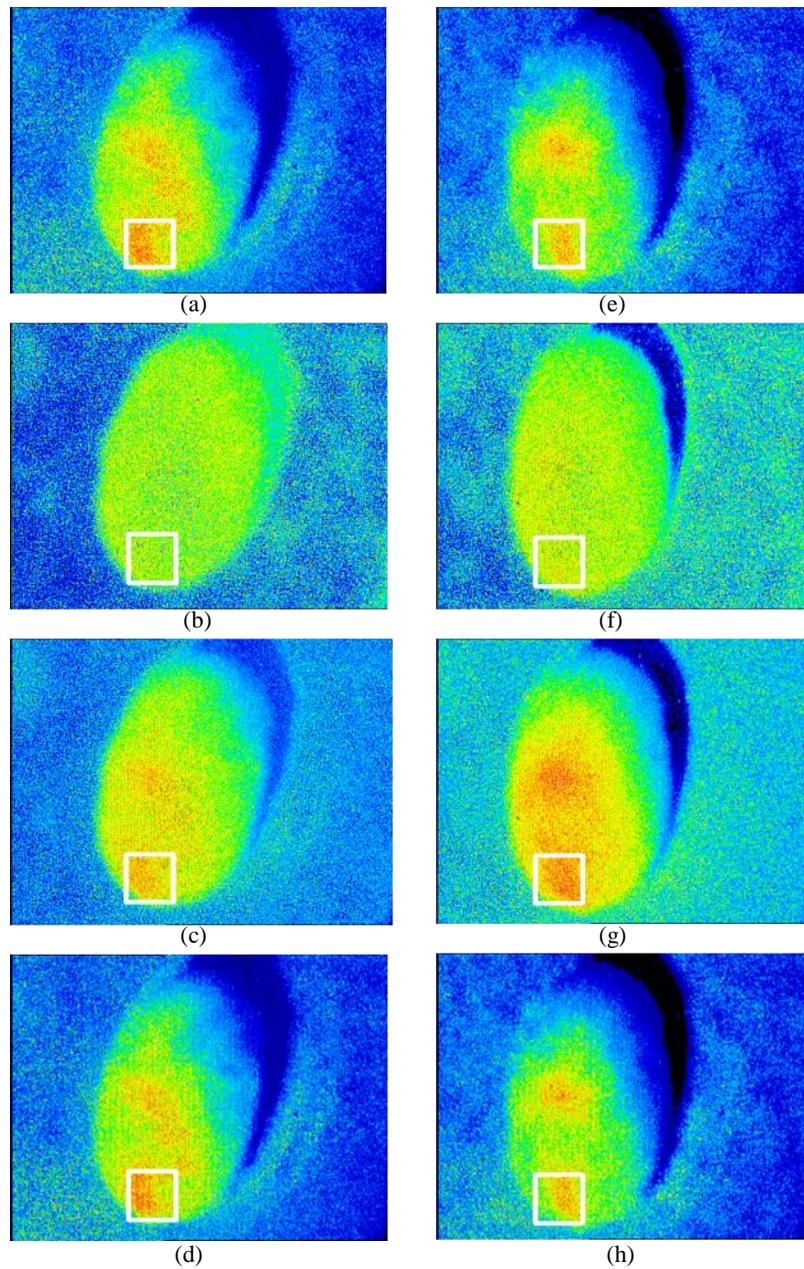


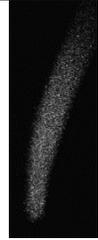
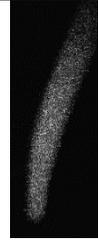
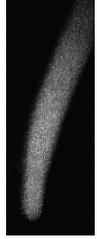
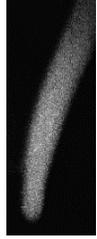
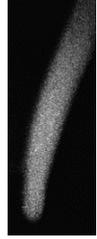
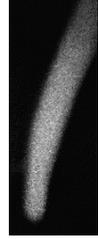
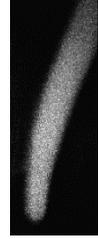
Figura 20 Saídas gráficas da imagem com maior intensidade  $S_d$  (a) Fujii (b) Fujii (MINZ; NIRALA, 2014) (c) DG(d). Saídas gráficas da imagem com menor intensidade  $S_d$  (e) Fujii (f) Fujii (MINZ; NIRALA, 2014) (g) DG(h)

Na Figura 23, a atividade biológica medida pelos métodos gráficos é mais intensa (pontos vermelhos) na região do embrião e também na imagem com maior intensidade. No caso do método Fujii (MINZ; NIRALA, 2014) (g), houve um aumento da atividade medida na imagem com intensidade menor. Tal fato é decorrente da capacidade do método utilizado por Minz e Nirala (2014) apresentar melhoria da equalização do contraste de diferentes áreas da imagem.

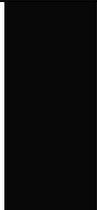
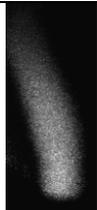
Em acordo com o estudo de Xu, Joenathan e Khorana (1995), os resultados da análise dos padrões de *speckle* são dependentes da quantidade de luz que penetra na amostra e retorna informações para o sensor CCD. À medida que se reduz a quantidade de luz menos informação é mostrada. (Tabela 2 e Figura 20).

### **4.3 Variação de intensidade na raiz de milho**

Nos Quadros 1 e 2, apresenta-se a faixa de variação da intensidade utilizando raízes cultivadas em Phytigel®. Resultados adicionais utilizando Ágar podem ser visualizados no ANEXO B.

					
53,152mA	54,208 mA	55,568 mA	56,776 mA	57,380 mA	58,136 mA
					
59,041 mA	60,097 mA	65,231 mA	70,219 mA	75,047 mA	80,181 mA
					
85,013 mA	90,139 mA	95,432 mA	100,26 mA	105,09 mA	

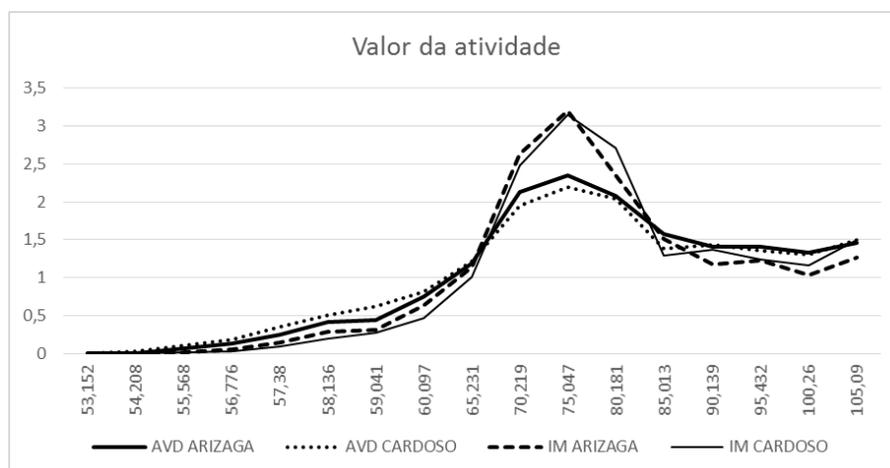
Quadro 1 Variação de intensidade com a raiz próxima a parede do tubo (0 grau)

					
53,152 mA	54,208 mA	55,568 mA	56,776 mA	57,380 mA	58,136 mA
					
59,041 mA	60,097 mA	65,231 mA	70,219 mA	75,047 mA	80,181 mA
					
85,013 mA	90,139 mA	95,432 mA	100,26 mA	105,09 mA	

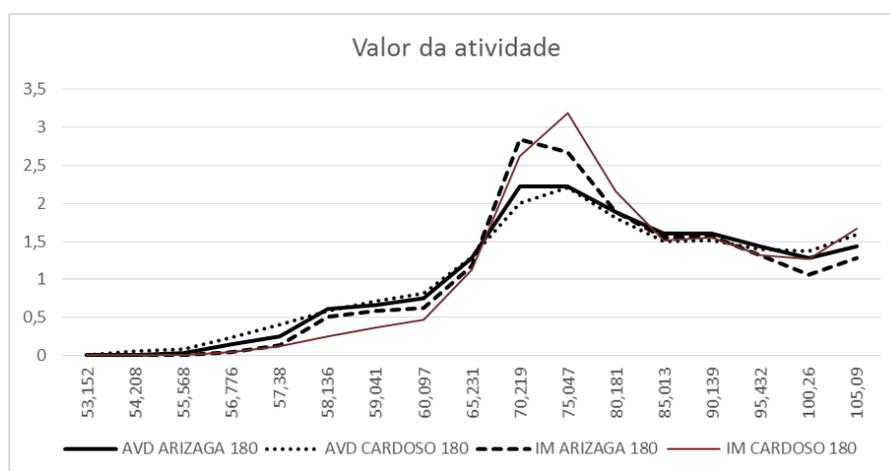
Quadro 2 Variação de intensidade com a raiz próxima a parede do tubo (180 graus)

Nos Quadros 1 e 2, os padrões de *speckle* são mostrados evidenciando a variação da intensidade do laser nas amostras. No Quadro 1, a raiz encontra-se próxima a parede do tubo e no Quadro 2 o tubo recebeu um giro de 180 graus (Figura 13).

Na Figura 21, ilustra-se o valor da atividade dos dispersores de luz obtidos pelos métodos numéricos, respeitando as regiões definidas pelas Figuras 12 e 14.



(a)



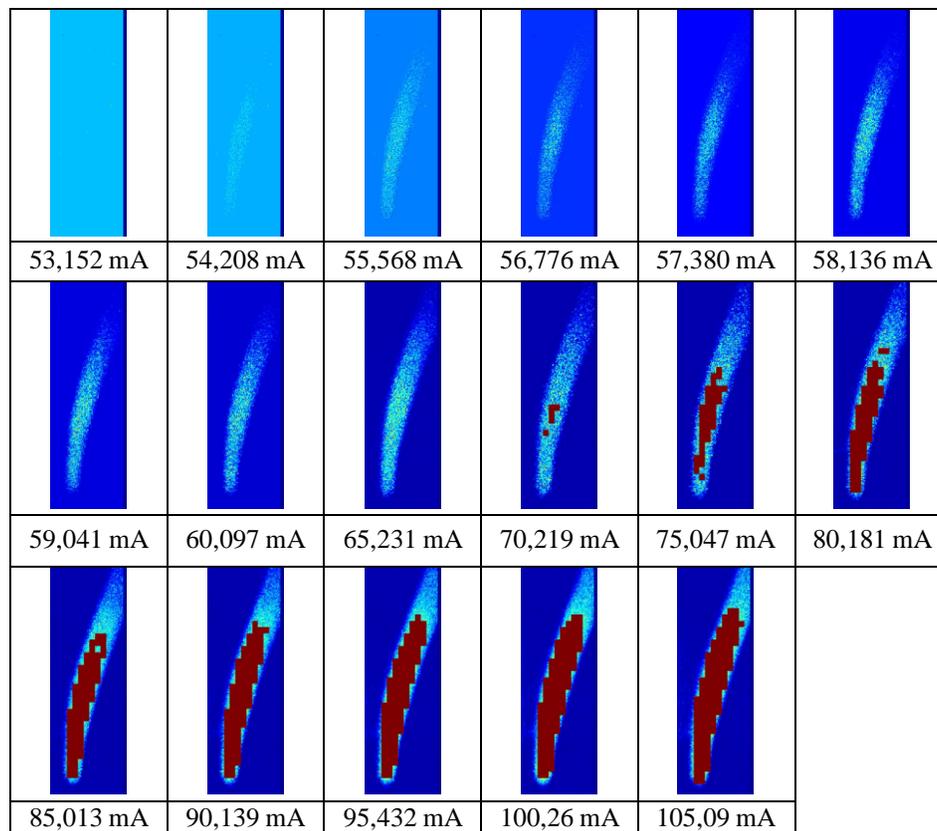
(b)

Figura 21 Saídas numéricas da raiz próxima ao tubo (a) e raiz com giro de 180graus (b)

Na Figura 21 (a), observa-se no momento em que a intensidade do laser é baixa, entre o intervalo 53,152 mA e 60,097mA, o valor da atividade também é baixo. No entanto, à medida que a mesma amostra recebe mais intensidade do laser o valor da atividade medida aumenta até chegar ao ponto máximo, tal fato

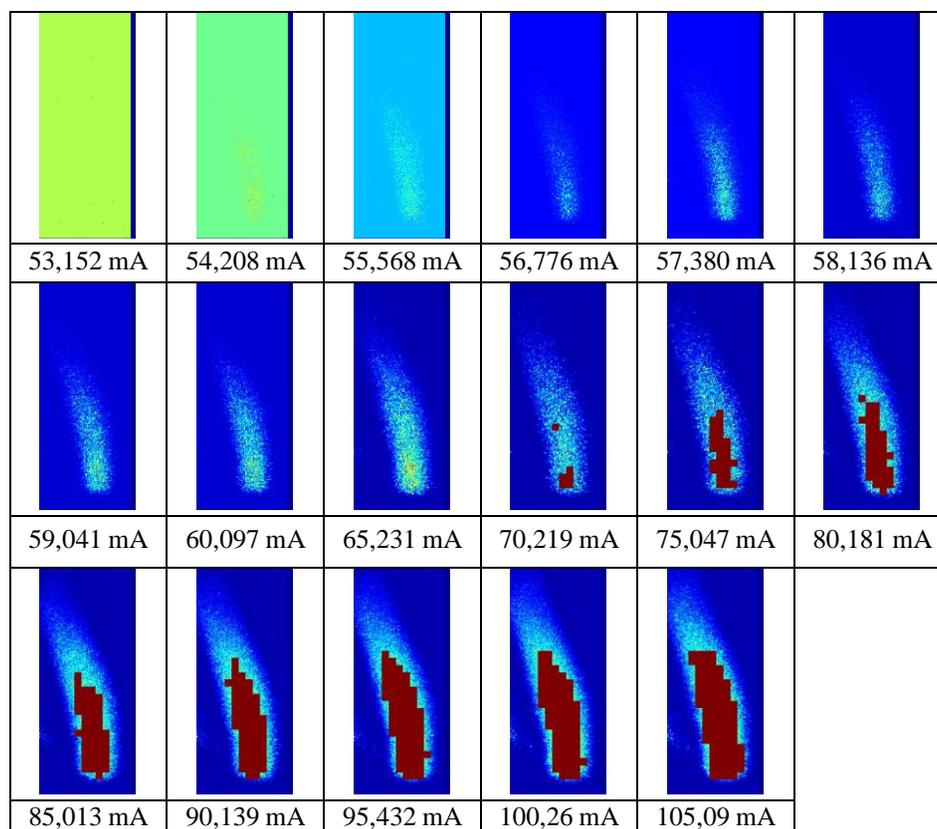
é observado entre os intervalos 60,097mA a 75,047mA. A partir de 80,181mA, os valores de atividade começam a diminuir e entre o intervalo de 85,013 a 105,09, o valor da atividade fica estável. Esta estabilidade pode ser explicada pelo fato do padrão de *speckle* ficar com a iluminação tão intensa a ponto de saturar o sensor CCD. Para a Figura 21 (b) os valores de atividade medidos pelo teste numérico seguem o mesmo padrão mostrado na Figura 21 (a), apresentando apenas ligeiro deslocamento para a esquerda, em razão de o vidro do tubo funcionar como uma lente cilíndrica, concentrando os raios de luz provenientes do laser.

No Quadro 3, ilustra-se o mapa de saturação dos padrões de *speckle*.



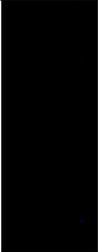
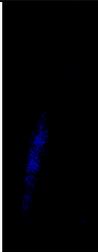
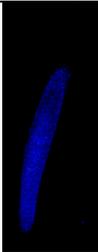
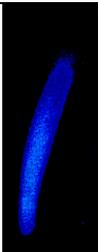
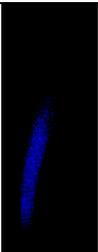
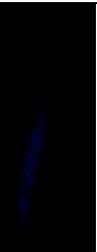
Quadro 3 Saturação da raiz próxima ao tubo (0 grau)

A partir da intensidade do laser com o valor de corrente 70,047mA o teste de saturação começa a indicar regiões de saturação (Quadro 3). O mesmo caso ocorre para a raiz cujo tubo foi rotacionado 180 graus (Quadro 4).



Quadro 4 Saturação da raiz com giro de 180 graus

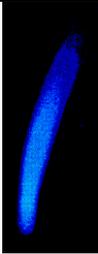
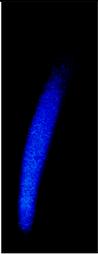
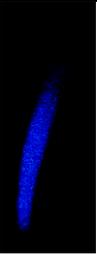
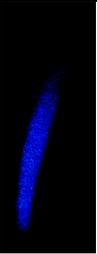
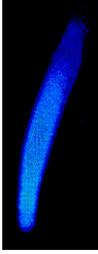
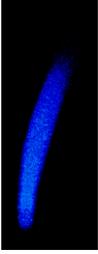
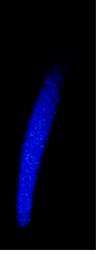
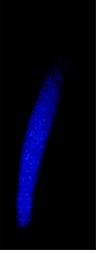
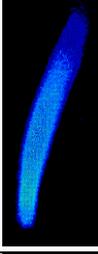
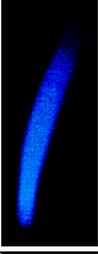
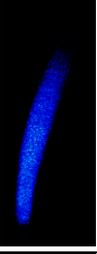
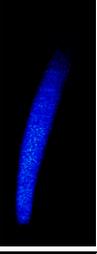
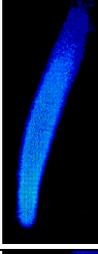
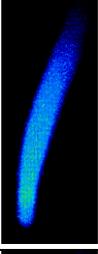
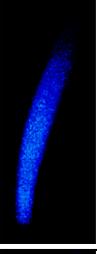
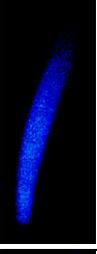
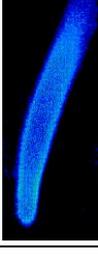
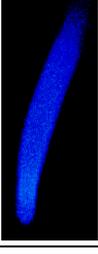
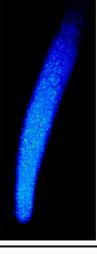
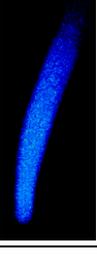
No Quadro 5, as saídas gráficas, provenientes da iluminação da raiz, são apresentadas. A primeira coluna apresenta a corrente elétrica utilizada para alimentar o laser. Os padrões de *speckle* foram analisados utilizando os métodos Fujii, Fujii (MINZ; NIRALA, 2014), DG e SD.

Valor da corrente (mA)	Fujii	Fujii Nirala	DG	SD
53,152				
54,208				
55,568				
56,776				

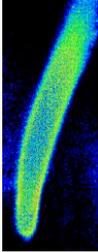
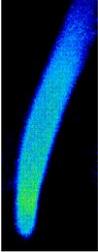
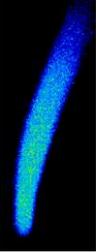
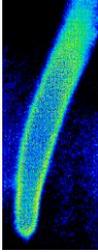
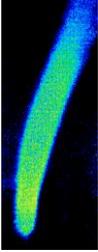
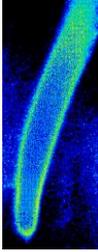
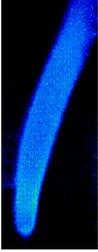
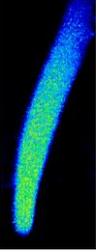
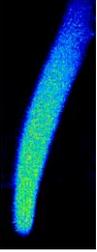
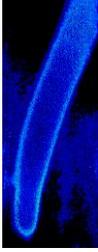
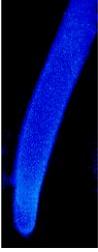
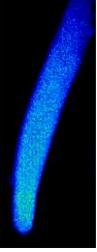
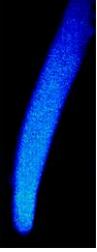
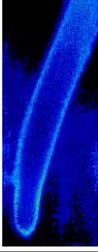
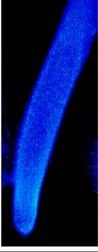
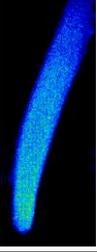
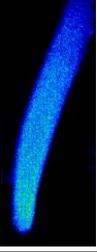
Quadro 5 Saídas gráficas dos métodos Fujii, Fujii (MINZ; NIRALA, 2014), DG, SD

(...continua...)

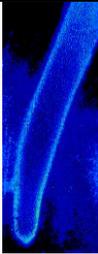
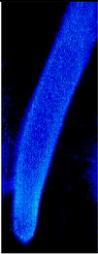
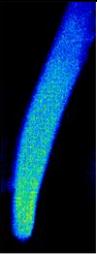
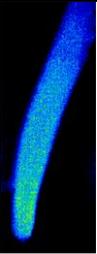
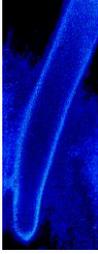
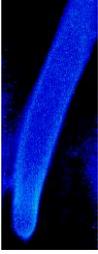
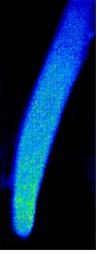
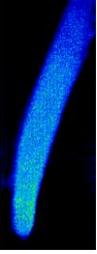
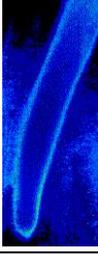
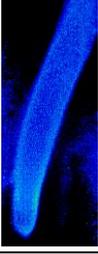
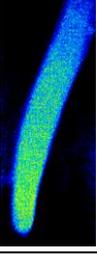
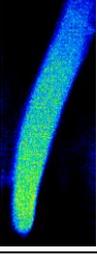
“Quadro 5, continuação”

57,380				
58,136				
59,041				
60,097				
65,231				

“Quadro 5, continuação”

70,219				
75,047				
80,181				
85,013				
90,139				

“Quadro 5, conclusão”

95,432				
100,26				
105,09				

No Quadro 5, a atividade dos dispersores de luz é visualizada através dos pontos vermelhos. Quanto maior a quantidade de pontos vermelhos maior será a atividade da amostra. Por outro lado, a cor azul indica que a movimentação dos dispersores é menor, conseqüentemente, sugerindo nível de atividade menor. Observando os resultados é possível notar que as saídas gráficas apresentam baixa atividade quando a iluminação é baixa e também quando a intensidade do laser está alta. Na região em que a corrente do laser foi posicionada entre 70,219mA e 75,047mA, os pontos com maior atividade (vermelho) podem ser observados.

#### 4.4 Investigação da intensidade em método numérico

Os resultados, a seguir, são referentes à investigação da variação de intensidade em relação a uma amostra contendo atividade homogênea em toda a superfície.

##### 4.4.1 Resultados da secagem de tinta com duas faixas diferentes não conectadas no THSP

Na Figura 22(a) e Figura 22(b) mostra-se que os resultados de diferentes normalizações (normalização de linhas locais e normalização na imagem toda) nos métodos AVD e IM aplicados em diferentes áreas da secagem de tinta separadamente (como obtida na Figura 17), onde o rótulo 1 significa a área clara e o rótulo 2 significa área escura. O resultado foi parametrizado para ajustá-los com a mesma escala, portanto o primeiro ponto, associado ao tempo zero, é sempre 1, portanto a variação entre eles é observada nos próximos pontos. O mesmo foi utilizado para a normalização proposta (Equações 18 e 19) e representados nas Figuras 23(a) e 23(b).

Uma vez que duas diferentes áreas foram analisadas sem alguma informação sobre a outra, o resultado parece razoável desde que é difícil criar um procedimento completamente independente do nível de iluminação sem qualquer referência. Um estado de referência da iluminação para calibração é assim requerido e deve ser o foco de novas pesquisas.

A utilização da normalização proposta (Equações 18 e 19) representam o fenômeno com o mesmo comportamento onde uma clara melhora nas saídas não são observadas. O melhoramento esperado seria a redução do *offset* entre as saídas, isto é, a linha pontilhada próxima a linha tracejada, e a linha contínua próxima à linha contínua em negrito. No entanto, pode-se concluir que a adição

do esforço proporcionado pelas Equações 18 e 19 não são necessárias à primeira vista.

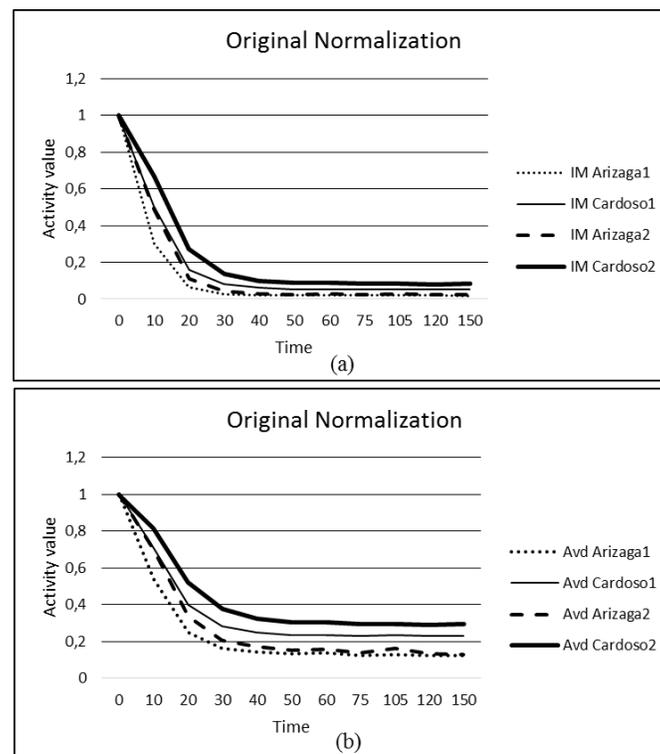


Figura 22 Comparação do (a) IM e (b) AVD com a normalização de linha local e normalização da imagem toda

Na Figura 22, os pontos e linha tracejada - (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999) representam IM e AVD com a normalização de linha local e normalização da imagem toda é representada por linhas contínuas (BRAGA et al., 2011) em áreas 1 e 2 separadamente, respectivamente representando a clara - pontos e linhas contínuas - e escura - tracejada e linha contínua em negrito - porção de uma iluminação de secagem de tinta pelo laser.

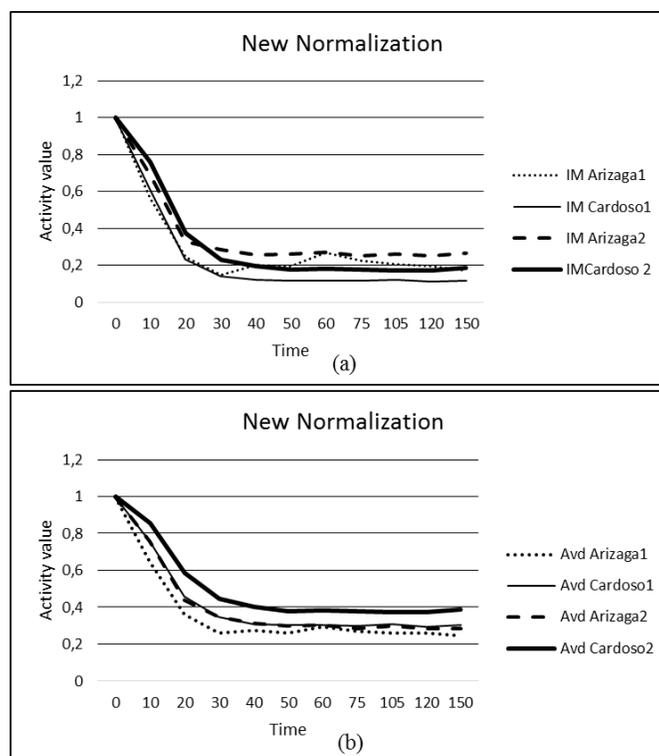


Figura 23 Comparação das mudanças propostas no (a) IM e (b) AVD com a normalização de linha local e normalização da imagem toda

Na Figura 23, pontos e as linhas tracejadas representam a normalização de linha local (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999) e normalização da imagem toda é representada por linhas contínuas (BRAGA et al., 2011) em áreas 1 e 2 separadamente, respectivamente representando regiões clara e escura de uma iluminação de secagem de tinta pelo laser.

#### 4.4.2 Resultados das áreas combinadas no THSP

O IM e AVD em áreas conectadas, que significa a inserção de linhas escuras no THSP claro (Figura 16) são apresentados nas Figuras 24 e 25 com a adoção da normalização tradicional (Linha local e normalização da imagem

todo) e da normalização proposta (Equações 18 e 19). Foram inseridas 100 linhas escuras em cima das 100 primeiras linhas do THSP 512 linhas. Enquanto que a análise de áreas separadas (escura e clara) observadas nas Figuras 22 e 23 são relevantes para garantir o mesmo resultado sobre iluminações distintas do mesmo material, o resultado representado nas Figuras 24 e 25 são mais comuns em amostras onde a luz é não homogênea.

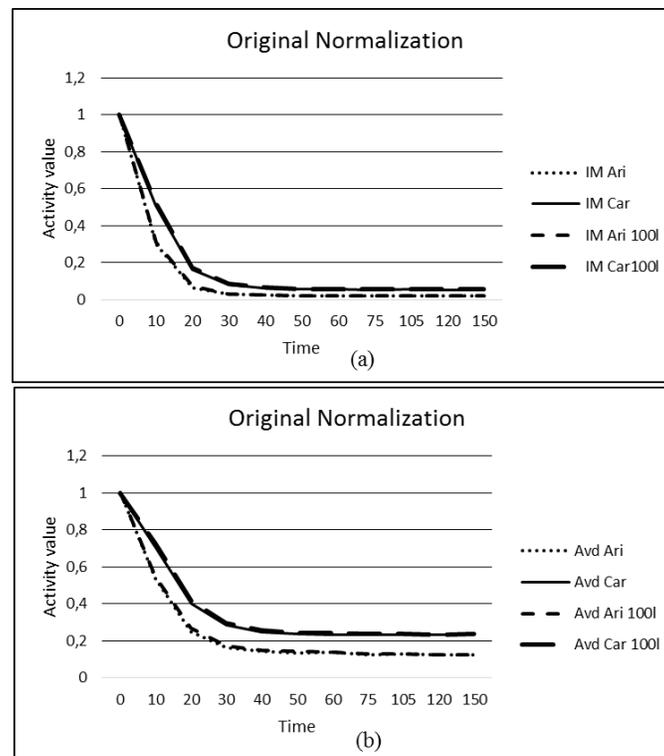


Figura 24 Comparação de (a) IM e (b) AVD

Na Figura 24, IM e AVD com a normalização de linha local - pontos e linha tracejada - (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999) e normalização da imagem toda - linhas contínuas (BRAGA et al., 2011) no THSP combinado, onde o THSP claro sem nenhuma combinação foi representado pelo pontos e linhas contínuas e a combinação de 100 linhas escuras sobre as 100 primeiras

linhas do THSP claro foi representado pela linha tracejada e linha contínua em negrito da secagem de tinta iluminada pelo laser.

Na Figura 24, é possível observar que a faixa com 100 linhas escuras inseridas no THSP claro não apresenta diferenças visíveis quando IM e AVD são aplicados utilizando as normalizações conhecidas (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999; BRAGA et al., 2011). Esse foi um importante resultado, já que as aplicações do *speckle* laser dinâmico em amostras homogêneas (isto é, elas deveriam ter a mesma atividade) apresentaram o mesmo resultado comparando um THSP com ou sem área escura. Essa ocorrência é comum em muitas aplicações de material biológico como sementes, frutos, kefir, raízes, etc e elas são relacionadas à grande irregularidade da superfície ou seu formato esférico.

A normalização proposta foi também testada em áreas combinadas e os resultados são apresentados na Figura 25. A resposta da normalização proposta mostrou-se capaz de seguir o fenômeno, entretanto com mais ondulações, principalmente quando a Normalização de linha local (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999) foi adotada.

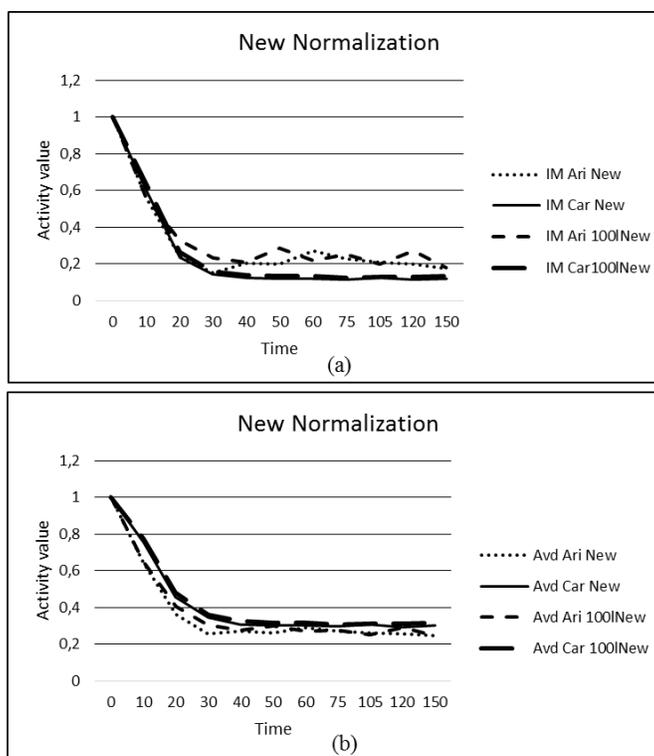


Figura 25 Comparação das mudanças propostas no (a) IM e (b) AVD

Na Figura 25, MI e AVD com a normalização de linha local - pontos e linha tracejada - (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999) e normalização da imagem toda – linhas contínuas (BRAGA et al., 2011) no THSP combinado, onde o THSP claro sem nenhuma combinação foi representado pelo pontos e linhas contínuas e a combinação de 100 linhas escuras sobre as 100 primeiras linhas do THSP claro foi representado pela linha tracejada e linha contínua em negrito da secagem de tinta iluminada pelo laser.

O resultado utilizando a potência de 0,3 (Equações 18 e 19) são apresentados nas Figuras 26 e 27, com as mesmas saídas observadas nas abordagens anteriores. A abordagem utilizando MI e AVD com a normalização de linha local baseada na normalização proposta associada à potência 0,3

apresentou-se com mais ondulações que as demais. A ondulação ocorre quando a atividade é estável, por conseguinte, a normalização proposta (Figura 23 (a) e (b) e a Figura 25 (a) e (b)) é mais sensível ao ruído apresentando nas regiões já estabilizadas, o que não pode ser considerado uma desvantagem da técnica proposta, uma vez que as principais aplicações estão preocupadas com a transição de um estado de atividade para outro. Assim, desde o tempo zero até 30 minutos, quando o processo de secagem de pintura mostrou-se estável a normalização proposta, bem como a potência introduzida nas equações poderia seguir o fenômeno da mesma forma que os métodos tradicionais.

Testes adicionais foram realizadas a fim de avaliar em detalhe o efeito de variação da luz nos resultados do *speckle* laser dinâmico, em relação ao deslocamento observado bem como as variações ao longo do tempo. Os testes adicionais foram realizados de duas formas: criando um índice de erro em relação à inserção de linhas, entre 1 a 100, escuras em um THSP claro e comparando cada linha da Figura 17 analisados pelos métodos testados.

Outras potências foram testadas de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1, no entanto a potência 0,3 pode ser considerada um bom exemplo utilizando essa alternativa. Mais comparações entre as potências serão apresentadas como uma alternativa.

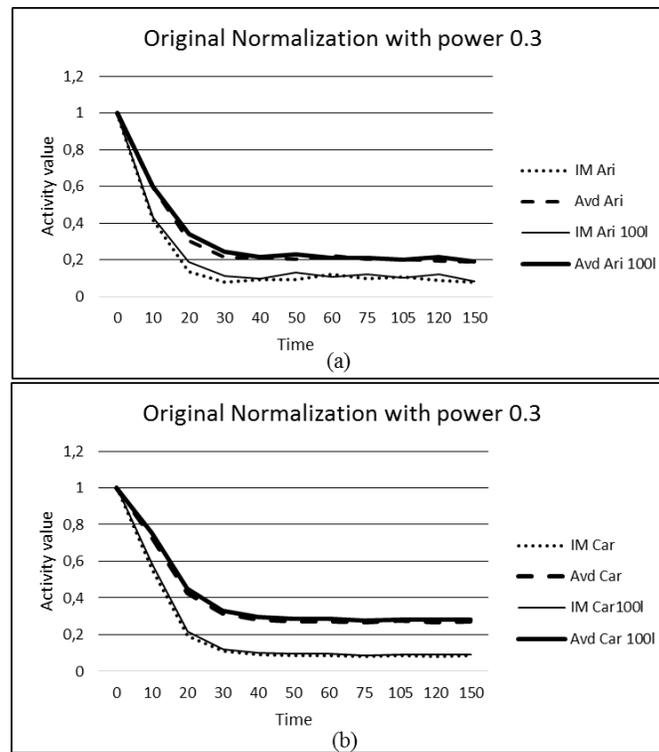


Figura 26 Comparação da tradicional (a) Normalização de linha local e (b) Normalização de toda imagem associada ao MI e AVD

Na Figura 26, o THSP com (a) apenas linhas claras – pontos e linhas tracejadas – e com a combinação de 100 linhas escuras introduzidas no THSP claro – linhas contínuas – de uma secagem de tinta iluminada pelo laser

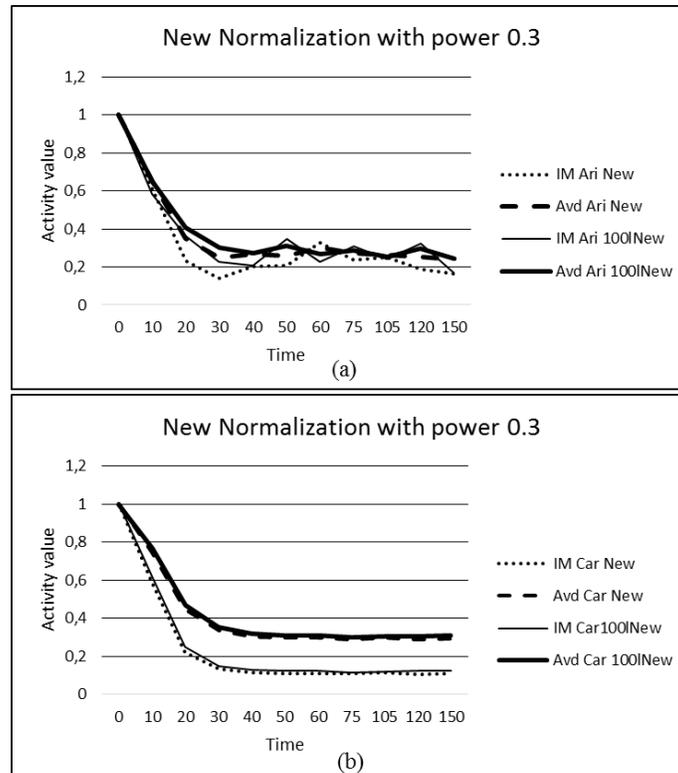


Figura 27 Comparação da normalização proposta associada a (a) Normalização de linha local e (b) Normalização de toda imagem associada ao MI e AVD

Na Figura 27, o THSP com apenas linhas claras – pontos e linhas tracejadas – e com a combinação de 100 linhas escuras introduzidas no THSP claro – linhas contínuas – de uma secagem de tinta iluminada pelo laser.

#### 4.4.3 Testes adicionais – inserindo linhas escuras em um THSP claro

Na Figura 28, apresentam-se os erros (Equação 20) relacionado à inclusão gradual de linhas escuras parte superior do THSP com linhas claras, ambos relacionados com o mesmo fenômeno do *speckle* laser dinâmico de secagem de tinta.

Os erros foram divulgados primeiro para a normalização de linha local adotada para IM e AVD. Os erros eram pequenos, não mais do que 2,5%, e aumentaram em relação ao número de linhas inserido, além disso, é possível observar alguns saltos na tendência, que devem ser analisadas em detalhes.

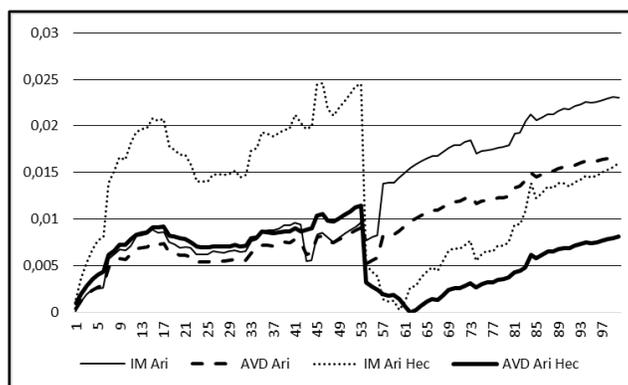


Figura 28 Erro do IM e AVD com diferentes normalizações relatado para uma área clara do THSP da pintura no minuto zero com a inclusão de linhas provenientes da área escura

Uma explicação para os saltos está ligada à Normalização de linha local que pode variar de acordo com a maneira em que as matrizes de coocorrência são formadas (CARDOSO; BRAGA, 2014). Pode ser provado pela estabilidade observada na Figura 34 quando a Normalização da imagem toda foi adotada.

Na Figura 29, apresentam-se os erros relatados da inclusão gradual de linhas escuras no THSP com linhas claras, ambos relatados com o mesmo fenômeno do *speckle* laser dinâmico, nesse caso, utilizando a normalização na imagem toda (CARDOSO; BRAGA, 2014). Em contraste com a normalização de linha local (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999), a Normalização da imagem toda associada às mudanças propostas neste trabalho apresentaram melhores resultados (linha em negrito). Os erros se comportaram da mesma maneira em outros instantes da secagem de tinta.

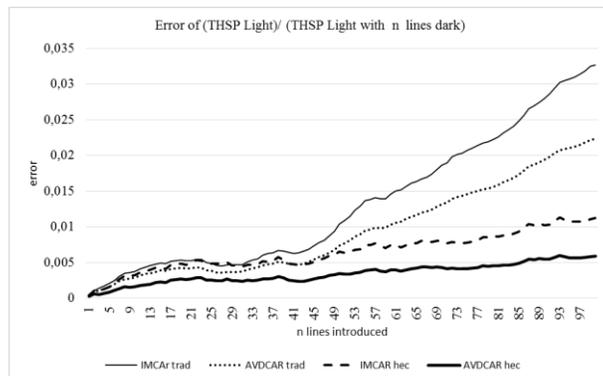


Figura 29 As análises dos erros (relação de um THSP de área clara por um THSP de área escura com n linha do THSP escuro) no minuto zero com incremento contínuo de linha escuras sobre as linhas claras no THSP

Os erros, considerando a inserção de linhas como nos resultados das Figuras 28 e 29 quando a potência 0,3 foi utilizada (Equações 18 e 19), apresentaram as mesmas saídas. Na Figura 30, apresentam-se os erros quando a potência é incluída nas normalizações tradicionais e na proposta.

Podemos observar que os métodos tradicionais são relativamente independentes da iluminação não homogênea nas superfícies analisadas pelo *speckle* laser dinâmico, entretanto, a independência pode ser melhorada, por meio de alguns ajustes como o uso de um denominador nas equações tradicionais.

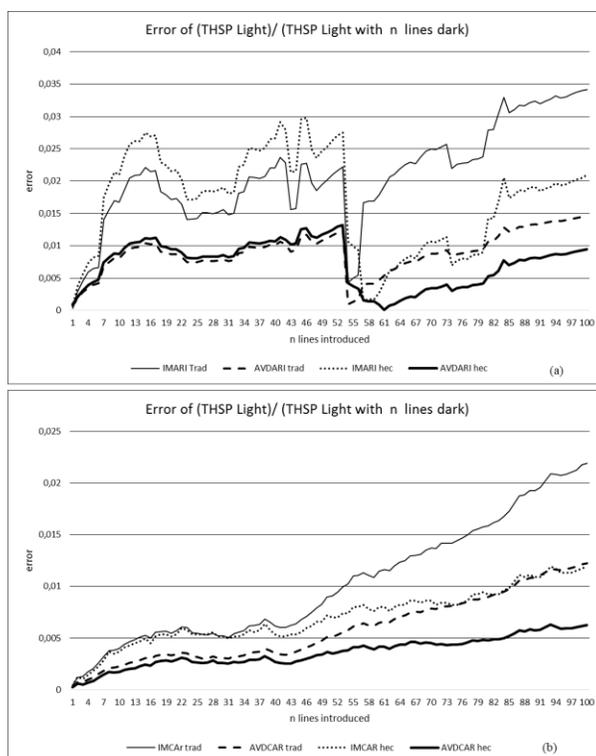


Figura 30 Erros do IM(a) e AVD(b) com diferentes normalizações relacionadas a uma área clara de THSP da tinta no minuto zero com a inclusão de linhas da área escura e elevado a 0,3

#### 4.4.4 Teste adicional – comparando cada coluna da amostra

Na Figura 31, o MI e AVD do THSPs, formados por cada coluna dos padrões de *speckle* (Figura 16), são apresentados, e são mostradas as saídas na área clara e escura de um THSP ao longo do tempo. Na Figura 31, os métodos tradicionais AVD e MI utilizando a Normalização de linhas locais e a Normalização da imagem toda é mostrada e é claro que o nível de iluminação direciona os resultados com os valores médios da porção escura diferente da região clara. Cada ponto no gráfico representa um valor de MI e AVD para uma coluna expressada pelo eixo x, no tempo e seu respectivo nível de atividade no

eixo y. A maior variação da normalização de linha local foi esperada e confirma o aprimoramento proporcionado pela normalização da linha toda (CARDOSO; BRAGA, 2014) apesar do *offset* observado.

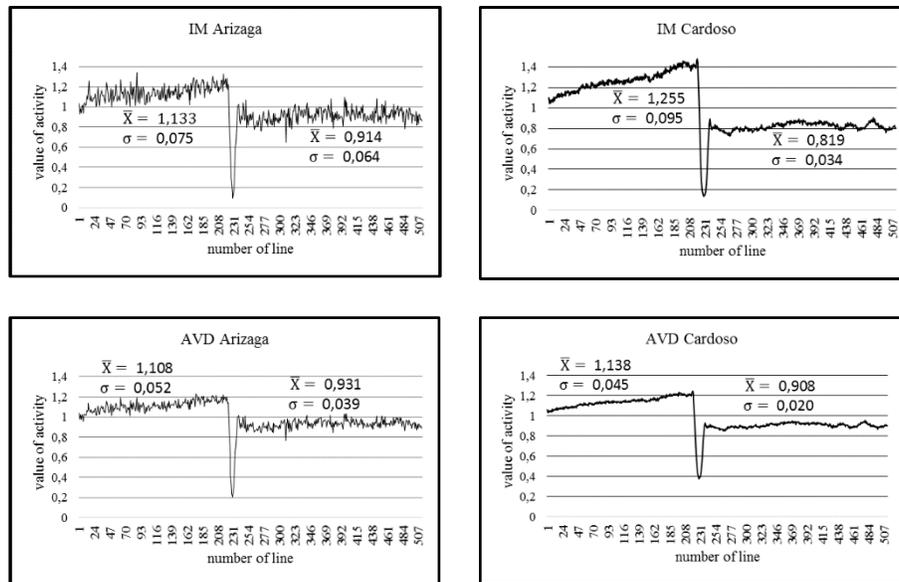


Figura 31 Análise de cada coluna de um THSP com uma área clara e uma escura utilizando MI e AVD com a Normalização de linha local e Normalização da imagem toda

Na Figura 32, observa-se a redução das diferenças entre os valores médios medidos pelos métodos MI e AVD, tanto do lado esquerdo (THSP claro) quanto do lado direito (THSP escuro). Neste caso, foi utilizada a normalização proposta (Equações 16 e 17). Com a nova normalização é possível observar menor diferença entre regiões que receberam diferentes intensidades de luz.

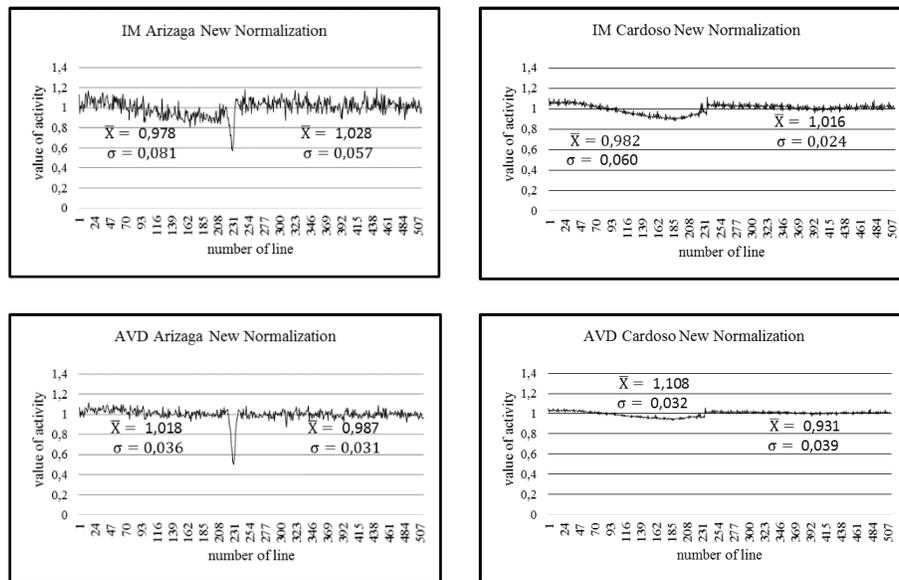


Figura 32 Análise de cada coluna de um THSP com uma área clara e uma escura utilizando MI e AVD com a Normalização de linha local e Normalização da imagem toda associada a normalização proposta

Na Figura 32, os valores médios das áreas escura (direita) e clara (esquerda) considerando as colunas 231 a 254 (transição) e o desvio padrão é apresentado separadamente

A mesma comparação do MI e AVD com variações foram conduzidas utilizando a potência 0,3 (Equações 18 e 19), no instante zero são apresentadas na Figura 33.

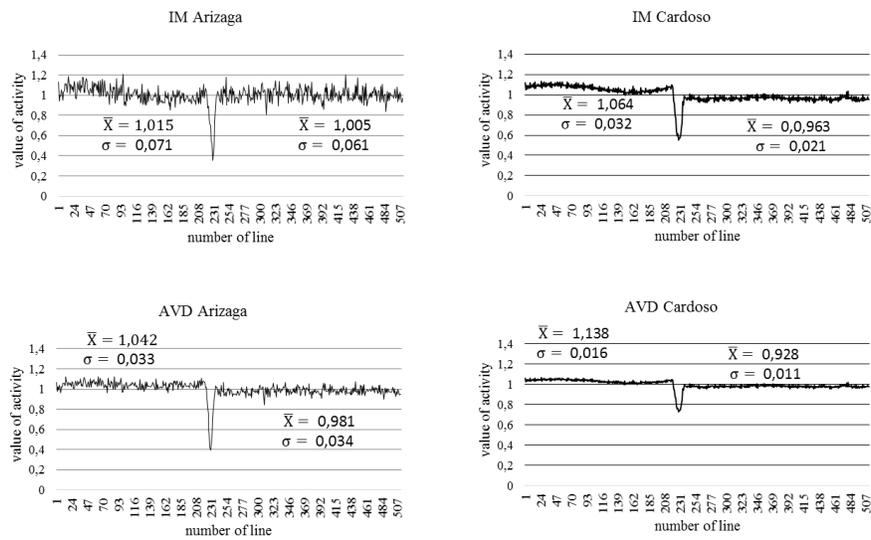


Figura 33 Análise de cada coluna de um THSP com uma área clara e uma escura utilizando MI e AVD com a Normalização de linha local e Normalização da imagem toda utilizando potência 0,3

Na Figura 33, os valores médios da área escura (direita) e clara (esquerda) considerando as colunas 231 a 254 (transição) e o desvio padrão é apresentado separadamente.

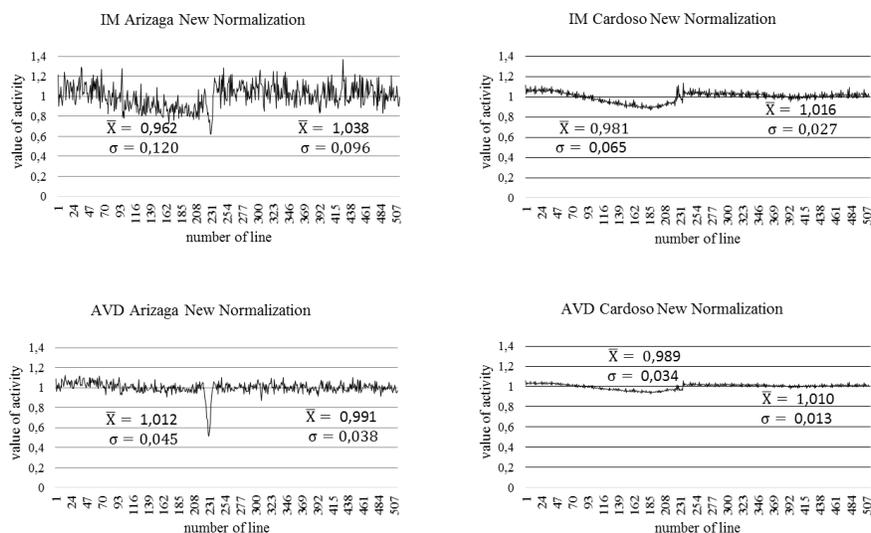


Figura 34 Análise de cada coluna de um THSP com uma área clara e uma escura utilizando MI e AVD com a Normalização de linha local e Normalização da imagem toda associada a normalização proposta e potência 0,3

Análise de cada coluna de um THSP com uma área clara e uma escura utilizando MI e AVD com a Normalização de linha local e Normalização da imagem toda associada a normalização proposta e potência 0,3.

Nas Figuras entre 31 e 34, apresenta-se o valor médio do MI e AVD, utilizando todas as abordagens testadas, bem como o desvio padrão dos valores em cada lado do ponto de transição (colunas 231 – 254). É claro que os passos apresentados pelos métodos tradicionais (Figura 34) são predominantes. Também é observado que a adoção da Normalização na imagem toda apresenta saídas com menos variação como esperado (CARDOSO; BRAGA, 2014).

Na Tabela 3, é possível ver a porcentagem da diferença entre os valores médios de cada lado do ponto de transição (coluna 231 - 254), usando os métodos em cada coluna com e sem o expoente, neste caso, o expoente 0,3.

Tabela 3 Normalização de linha local. Normalização da imagem toda e normalização proposta com a porcentagem de diferença entre os resultados nos lados claros (esquerda) a escuro (direita) das colunas de transição 231-254 do THSP

<b>Porcentagem da diferença entre o resultado nos lados claro e escuro do THSP %</b>		
	<b>Normalização Tradicional</b>	<b>Normalização Proposta</b>
<b>MI normalização de linha local</b>	23.9	4.8
<b>AVD normalização de linha local</b>	19.0	3.1
<b>IM Normalização na imagem toda</b>	53.2	3.3
<b>AVD Normalização na imagem toda</b>	25.3	19

Os resultados apresentados, na Tabela 3, mostram as saídas relacionadas apenas no instante zero após a pintura e utilizando a potência igual a 1. Outros instantes e potências foram testadas e os resultados mostraram que a melhor abordagem é o AVD, utilizando a Normalização de linha local associada a normalização proposta e utilizar o expoente. Adicionalmente, a adoção de potências não melhora os resultados observados em potências iguais a 1, isto é, sem potência, particularmente quando o AVD foi utilizado associado à normalização proposta (introdução de um denominador).

A porcentagem da diferença entre os resultados nos lados claros e escuros utilizando a potência é apresentada na Figura 35(a), todos eles relataram zero no instante zero após a secagem. É possível observar que as abordagens relatadas para a normalização proposta mostraram os melhores resultados sem o uso da potência, apesar de testes adicionais utilizando as potências (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1) não comprometem os resultados. Embora, nos métodos tradicionais, quando utilizada a menor potência (0,1) os resultados mostraram melhorias, isto é, as diferenças entre os lados tendem a ser menores.

Na Figura 38(b), apresenta-se a evolução da diferença de porcentagem considerando as potências e o tempo de secagem igual a 30 minutos. Nesse

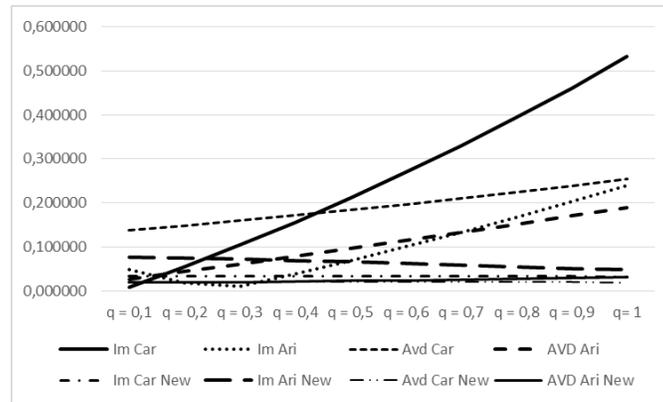
ponto, o processo de secagem apresentou estabilidade, visto nas Figuras 27 e 28, e os resultados são diferentes do instante zero. O melhor resultado pode ser atribuído utilizando o AVD com Normalização de linhas locais associado à potência 1 e com a normalização proposta, apesar de prover variação pela adoção da Normalização da imagem toda.

Portanto, podemos escolher o AVD utilizando a Normalização associada à potência 1, no entanto, se considerar apenas análises quando as atividades não estabilizaram, é possível também considerar o uso do AVD utilizando a normalização da imagem toda, desde que as saídas sejam mais estáveis e com variação reduzida.

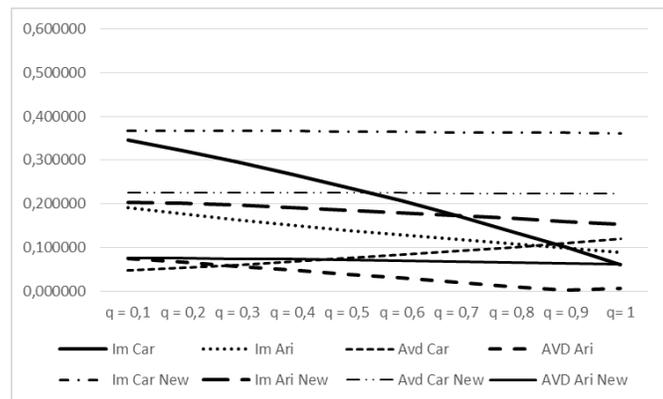
O melhor das potências poderia prover que a potência 1, isto é a ausência da potência como uma alternativa pode ser útil, no entanto, é possível associar o peso do denominador sem a adoção de potência, que certamente reduz o tempo de computação (MINZ; NIRALA, 2014).

O uso de mais de uma saída pode ser uma alternativa, apesar de os fenômenos biológicos serem muito complexos e possuem grande peculiaridade, assim oferecendo a oportunidade de uma ligação entre as saídas para um fenômeno particular.

No entanto, o mais importante é o passo na direção da independência de luz durante a análise do *speckle* laser dinâmico.



(a)



(b)

Figura 35 Evolução da diferença de porcentagem em relação ao expoente em dois tempos de secagem (a) zero e (b) 30 minutos

## 5 CONCLUSÃO

A intensidade do laser nas análises do *biospeckle* é importante, no sentido de influenciar tanto em saídas gráficas quanto em saídas numéricas. Os resultados obtidos, neste trabalho, demonstraram que a variação de intensidade da luz afeta diretamente os resultados provenientes do *biospeckle*, tanto nas análises da semente quanto nas análises da raiz. Portanto a quantidade luz na amostra precisa ser padronizada para estabelecer igualdade entre os resultados e permitir a comparação dos mesmos.

A análise dos padrões de *speckle* em raízes, cultivadas em meio a cultura transparente (Phytigel® e Ágar-Ágar), demonstrou que a posição da raiz dentro do tubo não afeta a análise, visto que, os resultados numéricos obtidos pelo método AVD, utilizando a normalização proposta por Cardoso e Braga (2014) foram próximos. Entretanto, a variação da intensidade do laser proporcionou resultados de atividade diferentes para cada valor de corrente elétrica da fonte que alimenta o laser, o que mostra a dependência da iluminação para se obter resultados padronizados do *speckle* laser dinâmico.

Nos testes dos métodos tradicionais, para analisar o *speckle* laser dinâmico, produzidos a partir de diferentes intensidades do laser, apresentaram consideráveis resultados, no entanto, quando observado em detalhes pode-se ver que os métodos propostos podem melhorar a independência em relação à iluminação. Particularmente, pode-se observar que o método AVD, utilizando a normalização local associada a um denominador no método tradicional (normalização proposta) apresentou melhores resultados.

## REFERÊNCIAS

ARIZAGA, R. et al. Display of the local activity using dynamical speckle patterns. **Optical Engineering**, Redondo Beach, v. 41, n. 2, p. 287-294, June 2002.

ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. J. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. **Optics and Laser Technology**, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.

BARNES, J. D.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 462 p.

BOTEGA, J. V. L. et al. Avaliação da interferência do laser no material biológico vivo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 4, p. 483-486, Aug. 2009.

BRAGA, R. A. et al. *Biospeckle* numerical values over spectral image maps of activity. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 285, n. 5, p. 553-561, 2012.

BRAGA, R. A. et al. Evaluation of activity through dynamic laser *speckle* using the absolute value of the differences. **Optics Communication**, Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 646-650, 2011.

BRAGA, R. A. et al. Live *biospeckle* laser imaging of root tissues. **European Biophysics Journal**, New York, v. 38, n. 5, p. 679-686, July 2009.

BRIERS, D. et al. Laser speckle contrast imaging: theoretical and practical limitations. **Journal of Biomedical Optics**, Bellingham, v. 18, n. 6, p. 66018:1-66018:9, June 2013.

CARDOSO, R. R.; BRAGA, R. A. Enhancement of the robustness on dynamic *speckle* laser numerical analysis. **Optics Laser in Engineering**, New York, v. 63, p. 19-24, Dec. 2014.

CARDOSO, R. R.; BRAGA, R. A.; RABAL, H. J. Alternative protocols on dynamic speckle laser analysis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SPECKLE METROLOGY, 5., 2012, Vigo. **Proceedings...** Vigo, 2012. p. 1-6.

CARDOSO, R. R. et al. Frequency signature of water activity by *biospeckle laser*. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 284, n. 8, p. 2131-2136, 2011.

CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, 2011.

COSTA, R. M. et al. Técnicas estatísticas aplicadas em imagens do speckle dinâmico. **Revista Brasileira de Biomedicina**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 27-39, 2010.

DAINTY, J. C. Statistics of normal and anomalous *speckle* patterns. **Journal of the Optical Society of America**, New York, v. 65, n. 10, p. 1190-1190, 1975.

FRACAROLLI, J. A. et al. Ipe (*Tabebuia impetiginosa*) seed quality evaluation by means of laser *biospeckle*. **Selskostopanska Tekhnika**, Sofia, v. 47, n. 2, p. 73-78, Jan. 2010.

FUJII, H. et al. Blood flow observed by time-varying laser speckle. **Optics Letters**, Washington, v. 10, p. 104-106, 1985.

GONIK, M. M.; MISHIN, A. B.; ZIMNYAKOV, D. A. Visualization of blood microcirculation parameters in human tissues by time-integrated dynamic speckles analysis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 972, n. 1, p. 1749-6632, Oct. 2002.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de física: óptica e física moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 420 p.

HARALICK, R. M.; SHANMUGAM, K.; DINSTEN, I. Textural features for image classification. **IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetic**, New York, v. 3, n. 6, p. 610-621, 1973.

HECHT, E. **Optics**. 4<sup>th</sup> ed. Longman: A. Wesley, 2002. 529 p.

MINZ, P. D.; NIRALA, A. K. Intensity based algorithms for *biospeckle* analysis. **Optik - International Journal for Light and Electron Optics**, Amsterdam, v. 125, n. 14, p. 3633-3636, July 2014.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Applications of Tissue Culture in Medicinal Plants**, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 110-121, Feb. 2012.

MOREIRA, J. **Desenvolvimento de uma ferramenta computacional de livre acesso para o processamento de imagens do *speckle* laser dinâmico**. 2013. 153 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MOREIRA, M. F. B. et al. Caracterização da transmissão da luz laser em semente de feijão (*Phaseolus Vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.2, p.119-125, dez. 2002.

NASCIMENTO, A. L. et al. Desenvolvimento de um modelo para o *biospeckle* na análise de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 456-461, mar./abr. 2007.

NOTHDURFT, R.; YAO, G. Imaging obscured subsurface inhomogeneity using laser speckle. **Optics Express**, Washington, v. 13, n. 25, p. 10034-10039, Dec. 2005.

OULAMARA, A.; TRIBILLON, G.; DUVERNOY, J. Biological activity measurement on botanical specimen surface using temporal decorrelation effect of laser *speckle*. **Journal of Modern Optics**, London, v. 36, n. 2, p. 165-179, 1989.

RABAL, H. J.; BRAGA JUNIOR, R. A. **Dynamic laser speckle and applications**. New York: CRC, 2008. 272 p.

RATHNAYAKEA, A. P. et al. A novel optical interference technique to measure minute root elongations of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Seibold & Zucc.) seedlings infected with ectomycorrhizal fungi. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 314-321, Dec. 2008.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: \_\_\_\_\_. **Cultura do cafeeiro-fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fostato, 1986. p. 13-85.

RENI, S. et al. Microscopia eletrônica de varredura do endosperma de café (*Coffea arabica* L.) durante o processo de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 196-203, jan./fev. 2010.

RIBEIRO, K. M. et al. Continuous, high-resolution *biospeckle* imaging reveals a discrete zone of activity at the root apex that responds to contact with obstacles. **Annals of Botany**, Oxford, v. 113, n. 3, p. 555-563, 2014.

RODRIGUES, S. **Efeito estocástico em Speckle dinâmico**. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RODRIGUEZ-MARIN, F. et al. A correction factor for ablation algorithms assuming deviations of Lambert-Beer's law with a Gaussian-profile beam. **Applied Physics Letters**, New York, v. 100, n. 17, p. 173-203, Apr. 2012.

SERWAY, R. A.; JEWETT, J. W. **Princípios de física**. São Paulo: Thomson Learning, 2007. 480 p.

SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Mudanças na composição de proteínas e aminoácidos durante a germinação de sementes de café. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 7, p. 150, 1999.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

THILAKARATHNE, B. L. S. et al. An optical interferometric technique for assessing ozone induced damage and recovery under cumulative exposures for a Japanese rice cultivar. **SpringerPlus**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 89-101, Feb. 2014.

WESTRUP, U.; MCEVOY, F. J. *Speckle* tracking echocardiography in mature Irish Wolfhound dogs: technical feasibility, measurement error and reference intervals. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 55, n. 1, p. 41-52, 2013.

XU, W. F. et al. An improved agar-plate method for studying root growth and response of *Arabidopsis thaliana*. **Scientific Reports**, London, v. 3, n. 1273, p. 1-7, Feb. 2013.

XU, Z.; JOENATHAN, C.; KHORANA, B. M. Temporal and spatial proprieties of the time-varying speckles of botanical specimens. **Optical Engineering**, Redondo Beach, v. 34, n. 5, p. 1487-1502, 1995.

ZAKHAROV, A.C. et al. Dynamic laser speckle imaging of cerebral blood flow. **Optics Express**, Washington, v. 17, n. 16, p. 13904-13917, Aug. 2009.

ZDUNEK, A. et al. The *biospeckle* method for the investigation of agricultural crops: a review. **Optics and Lasers in Engineering**, London, n. 52, p. 276-285, Jan. 2014.

ZHONG, X. et al. Dynamic laser *speckle* analysis via normal vector space statistics. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 305, p. 27-35, Sept. 2013.

## ANEXOS

### ANEXO A – FUNÇÕES MI, AVD, SD, DG, FUJII, FUJII (MINZ; NIRALA 2014)

#### AVD IM

```
function [AVD_IM] = avd_im_window (R,S,windows,x,y,h,w)
%
% Absolute Value of the Differences method - AVD
% In: BRAGA, R. A. et al. Evaluation of activity through dynamic laser
speckle using the absolute value of the differences. Optics Communication,
Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 646-650, 2011.
%
% Inertia Moment's - IM
% In: ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. J. Speckle time evolution
characterization by the co-occurrence matrix analysis. Optics and Laser
Technology, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.
%
% and: BRAGA, R. A. et al. Biospeckle numerical values over spectral image
maps of activity. Optics Communications, Amsterdam, v. 285, n. 5, p. 553-
561, 2012.
%
% Developed by: Junio Moreira / Roberto Alves Braga Junior
% Modified by: Renan Oliveira Reis
%
% BSLD (Library Speckle Laser Dynamic) version 1.01
% Date: july of 2015.
%
% To start the function just type:
% AVD_IM = avd_im(address,numImages,R,S,windows,x,y,h,w);
%
% Input:
% address is the location where the station stored set of images
% numImages is the number of images in the set
% R is the parameter of analysis:
% if R is equal 1, you choose the line of images to make THSP
% and if R is equal 2 you choose the columns of images to make THSP
% and if R is equal 3 you choose random thsp
% S is the line ou column used to make the time history speckle patterns
% windows is a variable to activate a sliding windows on the set of images
```

```

%
% Output:
% AVD_IM are the value of the Inertia Moment and AVD Moment.
% AVD_IM(1,1) is the value of the AVD Arizaga normalization
% AVD_IM(1,2) is the value of the AVD Cardoso normalization
% AVD_IM(1,3) is the value of the Inertia Moment without normalization
% AVD_IM(1,4) is the value of the Inertia Moment with Arizaga
normalization
% AVD_IM(1,5) is the value of the Inertia Moment with Cardoso
normalization
%
%
=====
=====
% Set directory

dire = pwd;
disp(pwd);
% Set imagens
type = {'*.bmp;*.fig;*.jpg;*.png;*.tif'};
title = 'Select images files';
[images,address] = uigetfile(type,title,'MultiSelect','on');
numImages = size(images,2);

% Set the directory of the Images
cd(address);

% Identification of the images -- see the format of the image with only numbers.
% j = imread ('1.bmp');
j = imread (char(images(1)));
k = size(j);
line = k(1,1);
column = k(1,2);

% Begin
clc();
disp('Processing start!');
disp('Wait...');

if windows == 0
    DATA = zeros(line,column,numImages);
for i = 1:numImages

```

```

local= char(images(i));
image = imread(local);
%      condition to use rgb images or gray images
if (isrgb(image))
DATA(:, :, i) = rgb2gray(image);
else
DATA(:, :, i) = image;
end
end
end
if windows == 1
    JANELA = zeros(line,column,numImages);
DATA = zeros(h,w,numImages);
for i = 1:numImages
local= char(images(i));
image = imread(local);
if (isrgb(image))
JANELA(:, :, i) = rgb2gray(image);
    DATA(:, :, i) = JANELA(y:h+y-1,x:w+x-1,i);
else
    JANELA(:, :, i) = image;
    DATA(:, :, i) = JANELA(y:h+y-1,x:w+x-1,i);
end
end
end
% -----
% Main Program
%

[THSP] = thsp(DATA,R,S);
[OCM] = moc(THSP);

clc();
disp('Start AVD and IM method...');

    a = size(OCM);
    AVD_IM = zeros(1,5);

for b = 1:a(1,1)
for c = 1:a(1,2)

norm = sum(OCM(b,:));

```

```

if norm == 0;
norm = 1;
end

AVD_IM(1,1) = ((OCM(b,c)*(abs(b-c)))/(norm)) + AVD_IM(1,1);

AVD_IM(1,2) = ((OCM(b,c)*(abs(b-c)))/(sum(sum(OCM)))) +
AVD_IM(1,2);

AVD_IM(1,3) = ((OCM(b,c)*((b-c)^2))/(256)) + AVD_IM(1,3);

AVD_IM(1,4) = ((OCM(b,c)*((b-c)^2))/(norm)) + AVD_IM(1,4);

AVD_IM(1,5) = ((OCM(b,c)*((b-c)^2))/(sum(sum(OCM)))) +
AVD_IM(1,5);

end
end

%Plotting results
disp('-----');
disp('Final Results Method AVD and IM:');
disp('-----');

disp('AVD Arizaga --> ');
disp(AVD_IM(1,1));
disp('AVD Cardoso --> ');
disp(AVD_IM(1,2));
disp('IM without normalitation --> ');
disp(AVD_IM(1,3));
disp('IM Arizaga --> ');
disp(AVD_IM(1,4));
disp('IM Cardoso --> ');
disp(AVD_IM(1,5));

% Recording results
gravar = [address '\avd_im_matlab.txt'];
dlmwrite(gravar,AVD_IM,' ');

% Set directory of function
cd(dire);

```

end

```

function [THSP] = thsp(DATA,R,S)
%
% Time History Speckle Patterns - THSP
% In: OULAMARA, A.; TRIBILLON, G.; DUVERNOY, J. Biological activity
% measurement on botanical specimen surface using temporal decorrelation effect
% of laser speckle. Journal of Modern Optics, London, v.36, n.2, p. 165-179,
% 1989.
%
% and: XU, Z.; JOENATHAN, C.; KHORANA, B. M. Temporal and spatial
% proprieties of the time-varying speckles of botanical specimens. Optical
% Engineering, Redondo Beach, v.34, n.5, p. 1487-1502, 1995.
%
%-----
% Begin
%
a = size(DATA);

if R == 1
THSP = zeros(a(1,2),a(1,3));
for b = 1:a(1,3)
THSP(:,b) = (DATA(S,:,b))';
end
elseif R == 2
    THSP = zeros(a(1,1),a(1,3));
for b = 1:a(1,3)
THSP(:,b) = DATA(:,S,b);
end
elseif R == 3
matriz_ists = zeros (2,a(1,2));
    THSP = zeros(S,a(1,3));
for b = 1:S
ists1 = randi(a(1,1));
ists2 = randi(a(1,2));
matriz_ists (1,b) = ists1;
matriz_ists (2,b) = ists2;
for c = 1:a(1,3)
THSP(b,c) = DATA(ists1,ists2,c);
end
end
else

```

```
error('Error in the THSP image')
end
```

```
%Plotting results
figure(1);
colormap gray;
imagesc(THSP);
axis equal;
title('THSP Figure');
return;
```

```
end
```

```
function [MOC] = moc(THSP)
```

```
%
% Cooccurrence Matrix Analysis - MOC
% In: ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. J. Speckle time evolution
characterization by the co-occurrence matrix analysis. Optics and Laser
Technology, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.
```

```
%
% -----
% Begin
%
    a = size(THSP);
```

```
MOC = zeros(256,256);
MOC1 = zeros(256,256);
for b = 1:a(1,1)
for c = 1:a(1,2)-1
    d = ((THSP(b,c))+1);
    e = ((THSP(b,c+1))+1);
```

```
if ((d >= 256) && (e >= 256))
d = 256;
e = 256;
end
```

```
    MOC(d,e) = MOC(d,e)+1;
    MOC1(d,e) = 1;
end
end
```

```

%Plotting results
figure(2);
colormap gray;
imagesc(MOC1);
axis equal;
title('MOC Figure');

```

```
return;
```

```
end
```

### FUJII

```

function [FUJII] = fujii_Windows(images,address)
%
% Fujii Technique
% In: FUJII, H. et al. Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing.
%   Applied Optics, New York, v. 26, n. 24, p. 5321-5325, 1987.
%
% Developed by: Junio Moreira / Roberto Alves Braga Junior
% Modified by: Renan Oliveira Reis
%
% BSLD (Library Speckle Laser Dynamic) version 1.01
% Date: july of 2015.
%
% To start the function just type:
% FUJII = fujii(address,numImages,R,S,windows,x,y,h,w);
%
% Input:
% DATA are the speckle data
%
% Output:
% FUJII is the Fujii image
%
%

```

```

=====
=====

```

```
windows=0;x=0;y=0;h=0;w=0;
```

```

% Set directory

dire = pwd;
disp(pwd);
% Set imagens
% type = {'*.bmp;*.fig;*.jpg;*.png;*.tif'};
% title = 'Select images files';
% [images,address] = uigetfile(type,title,'MultiSelect','on');
numImages = size(images,2);

% Set the directory of the Images
cd(address);

% Identification of the images -- see the format of the image with only numbers.
% j = imread ('1.bmp');
% j = imread (char(images(1)));
% k = size(j);
line = k(1,1);
column = k(1,2);

% Begin
clc();
disp('Processing start!');
disp('Wait...');

if windows == 0
    DATA = zeros(line,column,numImages);
for i = 1:numImages
local= char(images(i));
image = imread(local);
% condition to use rgb images or gray images
if (isrgb(image))
DATA(:, :, i) = rgb2gray(image);
else
DATA(:, :, i) = image;
end
end
end
if windows == 1
JANELA = zeros(line,column,numImages);

```

```

DATA = zeros(h,w,numImages);
for i = 1:numImages
local= char(images(i));
image = imread(local);
if (isrgb(image))
JANELA(:, :,i) = rgb2gray(image);
DATA(:, :,i) = JANELA(y:h+y-1,x:w+x-1,i);
else
JANELA(:, :,i) = image;
DATA(:, :,i) = JANELA(y:h+y-1,x:w+x-1,i);
end
end
end
% -----
% Main Program
%

a = size(DATA);
FUJII = zeros(a(1,1),a(1,2));

for b = 1:a(1,3)-1
% Y = ((abs(DATA(:, :,b) - DATA(:, :,b+1)))/(DATA(:, :,b) +
DATA(:, :,b+1)))+Y;
FUJII = ((abs(DATA(:, :,b) - DATA(:, :,b+1)))/(DATA(:, :,b) +
DATA(:, :,b+1) + 1)) + FUJII;
end

FUJII = FUJII / (max(max(FUJII)));

%Plotting results
disp('-----');
disp('Final Results Method FUJII:');
disp('-----');

figure(1);
%colormap gray;
colormap default;
imagesc(FUJII);
axis equal;
% title('FUJII Figure');

% Recording results

```

```

gravar = [address 'fujii_matlab.bmp'];
% Y = uint8(Y);
imwrite(FUJII,gravar);
    cd(dire);

```

```

%
=====
=====

```

### FUJII NIRALA

```

function [FUJII] = fujii_Nirala_Windows(images,address)

```

```

%
% Fujii Technique
% In: FUJII, H. et al. Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing.
%   Applied Optics, New York, v. 26, n. 24, p. 5321-5325, 1987.
%
% Developed by: Junio Moreira / Roberto Alves Braga Junior
% Modified by: Renan Oliveira Reis
%
% BSLD (Library Speckle Laser Dynamic) version 1.01
% Date: july of 2015.
%
% To start the function just type:
% FUJII = fujii(address,numImages,R,S,windows,x,y,h,w);
%
% Input:
% DATA are the speckle data
%
% Output:
% FUJII is the Fujii image
%
%

```

```

=====
=====
% % Set the directory of the Images
%   cd(address);
%
% % Identification of the images -- see the format of the image with only
numbers.

```

```

% j = imread ('1.bmp');
% k = size(j);
% line = k(1,1);
% column = k(1,2);

%
windows=0;x=0;y=0;h=0;w=0;

% Set directory

dire = pwd;
disp(pwd);
% Set imagens
% type = {'*.bmp;*.fig;*.jpg;*.png;*.tif'};
% title = 'Select images files';
% [images,address] = uigetfile(type,title,'MultiSelect','on');
numImages = size(images,2);

% Set the directory of the Images
cd(address);

% Identification of the images -- see the format of the image with only numbers.
% j = imread ('1.bmp');
% j = imread (char(images(1)));
% k = size(j);
line = k(1,1);
column = k(1,2);

% Begin
clc();
disp('Processing start!');
disp('Wait...');

if windows == 0
    DATA = zeros(line,column,numImages);
for i = 1:numImages
local= char(images(i));
image = imread(local);
% condition to use rgb images or gray images
if (isrgb(image))

```

```

DATA(:,:,i) = rgb2gray(image);
else
DATA(:,:,i) = image;
end
end
end
if windows == 1
    JANELA = zeros(line,column,numImages);
DATA = zeros(h,w,numImages);
for i = 1:numImages
local= char(images(i));
image = imread(local);
if (isrgb(image))
JANELA(:,:,i) = rgb2gray(image);
    DATA(:,:,i) = JANELA(y:h+y-1,x:w+x-1,i);
else
    JANELA(:,:,i) = image;
    DATA(:,:,i) = JANELA(y:h+y-1,x:w+x-1,i);
end
end
end
% -----
% Main Program
%
% expoente da raiz na formula Nirala
n = 2;

a = size(DATA);
FUJII = zeros(a(1,1),a(1,2));

for b = 1:a(1,3)-1
    % Y = ((abs(DATA(:,:,b) - DATA(:,:,b+1)))/(DATA(:,:,b) +
DATA(:,:,b+1)))+Y;
    FUJII = ((abs(DATA(:,:,b) - DATA(:,:,b+1)))/nthroot((DATA(:,:,b) +
DATA(:,:,b+1) + 1),n)) + FUJII;
end

FUJII = FUJII / (max(max(FUJII)));

%Plotting results
disp('-----');
disp('Final Results Method FUJII:');

```

```

disp('-----');

figure(1);
    %colormap gray;
colormap default;
imagesc(FUJII);
axis equal;
% title('FUJII Fig');

% Recording results
gravar = [address 'fujii_Nirala_matlab.bmp'];
    % Y = uint8(Y);
imwrite(FUJII,gravar);

% Set directory of function
cd(dire);
%
=====
=====

```

## GD

```

function [GD] = gd(address,numImages,windows,x,y,h,w)
%
% Generalized Difference Technique - GD
% In: ARIZAGA, R. et al. Display of the local activity using dynamical speckle
patterns. Optical Engineering, Redondo Beach, v. 41, n. 2, p. 287-294, June
2002.
%
% Developed by: Junio Moreira / Roberto Alves Braga Junior
%
% BSLD (Library Speckle Laser Dynamic) version 1.0
% Date: may of 2013.
% Review: august of 2013
% Review: november of 2013
%
% To start the function just type:
% GD = dg(DATA);
%
% Input:
% DATA are the speckle data
%

```

```

% Output:
% Y is the GD image
%
%
=====
=====

% Set the directory of the Images
cd(address);

% Identification of the images -- see the format of the image with only numbers.
j = imread ('1.bmp');
k = size(j);
line = k(1,1);
column = k(1,2);

% Begin
clc();
disp('Processing start!');
disp('Wait...');

if windows == 0
    DATA = zeros(line,column,numImages);
    for i = 1:numImages
        nome = [num2str(i),'.bmp'];
        DATA(:, :, i) = imread(nome, 'bmp');
    end

elseif windows == 1
    JANELA = zeros(line,column,numImages);
    DATA = zeros(h,w,numImages);

    for i = 1:numImages
        nome = [num2str(i),'.bmp'];
        JANELA(:, :, i) = imread(nome, 'bmp');
        DATA(:, :, i) = JANELA(y:h+y-1,x:w+x-1,i);
    end
end
end
% -----
% Main Program
%
```

```
a = size(DATA);
GD = zeros(a(1,1),a(1,2));

for b = 1:a(1,3)-1
for c = 1:a(1,3)-b
    GD = (abs(DATA(:,:,b) - DATA(:,:,b+c))) + GD;
end
end

    GD = GD / (max(max(GD)));

%Plotting results
disp('-----');
disp('Final Results Method GD:');
disp('-----');

figure(1);
colormap gray;
imagesc(GD);
axis equal;
title('GD Figure');

% Recording results
gravar = [address 'gd_matlab.bmp'];
% Y = uint8(Y);
imwrite(GD,gravar);
% =====
```

## ANEXO B – RESULTADOS UTILIZANDO ÁGAR

Tabela 1 Raiz próxima ao tubo

Corrente do laser(mA)	60,249	65,232	70,57	75,081	80,181	85,013	90,272	95,432	100,86	105,09
AVD	2746,7	3077,9	4050,8	5463,6	6342,7	3834,2	2157,7	2806	2351,3	2372,7
AVD Cardoso	10,461	11,925	12,444	12,291	10,636	3,695	1,339	1,863	1,197	0,786
IM Arizaga	73006	78484	133640	234510	319280	112160	42151	74285	56113	51468
IM Cardoso	207,7102	277,0304	354,3033	448,2523	431,8371	87,3978	20,8843	43,4893	27,0768	14,5185

Tabela 2 Raiz com 180 graus

Corrente do laser(mA)	60,249	65,232	70,570	75,081	80,181	85,013	90,272	95,432	100,86	105,09
AVD	2238,8	3569	4419,1	5616,1	2450,1	3021,8	2077,8	2729,8	2653,2	1830,8
AVD Cardoso	8,3361	11,2591	16,677	20,1949	9,0781	11,4835	8,9718	10,3378	9,1254	7,6969
IM Arizaga	62196	126950	161320	244680	78492	84650	46718	81455	68972	40287
IM Cardoso	126,951	237,995	502,7306	737,2801	155,0725	254,6843	157,5955	206,7291	160,875	115,2627

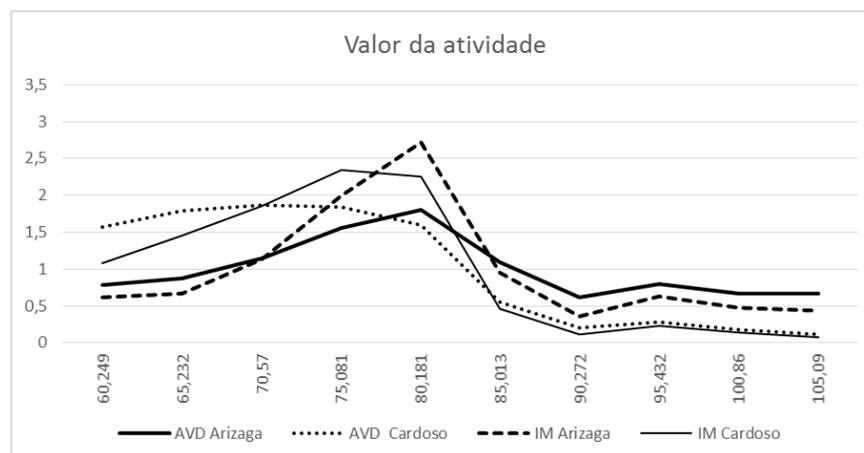


Figura 1 Raiz próxima ao tubo (0 grau)

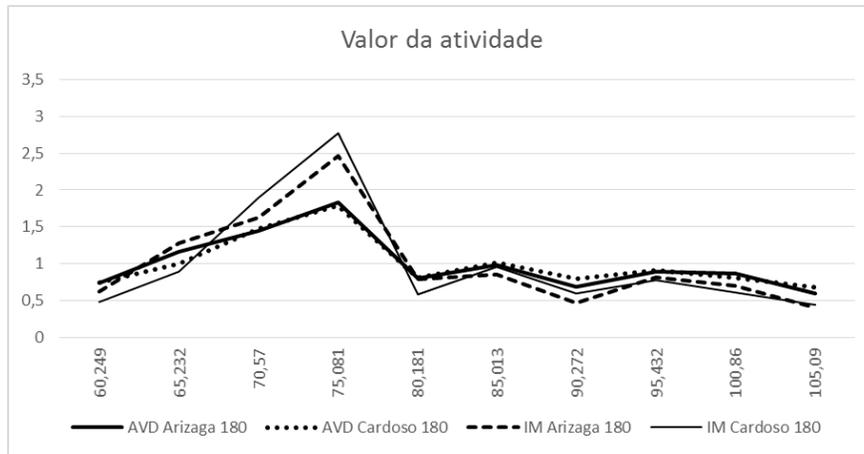


Figura 2 Raiz com giro de 180 graus

## ANEXO C – FUNÇÕES AVD E MI UTILIZANDO NORMALIZAÇÃO PROPOSTA

### Função MI e AVD tradicional

```

function [Y]=moc(DATA)
//
// Cooccurrence Matrix Analysis - MOC
// In: ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. J. Speckle time evolution
characterization by the co-occurrence matrix analysis. Optics and Laser
Technology, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.
//
// Input:
// DATA are the THSP data
//
// Output:
// Y is the Occurrence Matrix Construction
//
//
=====
=====
// Begin
//
a = size(DATA);

Y = zeros(256,256);
Y1 = zeros(256,256);
for b = 1:a(1,1)
for c = 1:a(1,2)-1
d = ((DATA(b,c))+1);
e = ((DATA(b,c+1))+1);

if ((d >= 256) & (e >= 256))
    d = 256;
e = 256;
end

Y(d,e) = Y(d,e)+1;
Y1(d,e) = 1;

```

```

end
end

//Plotting graphs
scf(0);
clf(0);
colormap gray;
imagesc(Y1);
axis equal;
title('MOC Figure');

endfunction
//
=====

function [Y]=avd_im_sts_normal(address, numThsp, q)
// q is the power
// Algorithm Absolute Value of the Differences (AVD)and Algorithm Inertia
// Moment's (IM) of THSP
// Developed by: Junio Moreira / Roberto Alves Braga Junior
//
// BSLD (Library Speckle Laser Dynamic) version 1.0
// Date: september of 2013
// Review: october of 2013
// Modified by: Renan Oliveira Reis - 2015
// Federal University of Lavras - UFLA
//
//
=====
=
// Main Program
//=====
===
//
// Inertia Moment's - IM and Absolute Value of the Differences - AVD
// In: ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. J. Speckle time evolution
// characterization by the co-occurrence matrix analysis. Optics and Laser
// Technology, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.
//

```

```

// and: BRAGA, R. A. et al. Biospeckle numerical values over spectral image
maps of activity. Optics Communications, Amsterdam, v. 285, n. 5, p. 553-
561, 2012.
//
// In: BRAGA, R. A. et al. Evaluation of activity through dynamic laser speckle
using the absolute value of the differences. Optics Communication,
Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 646-650, 2011.
//
// Output:
// Y are the value of the Inertia Moment.
// Y(1,1) is the value of the Inertia Moment without normalization
// Y(1,2) is the value of the Inertia Moment with Arizaga normalization
// Y(1,3) is the value of the Inertia Moment with Cardoso normalization
// Y(1,4) is the value of the AVD Arizaga normalization
// Y(1,5) is the value of the AVD Cardoso normalization
//
//-----//
//
// Clear memory
clc();
clear all;

// Set free the memory
stacksize('max');

// Start time count
initiationOfTheClock = getdate();

// Set the directory of the Images
cd(address);

// Identification of the images -- see the format of the image with only numbers.
j = imread ('1.bmp');
k = size(j);
line = k(1,1);
column = k(1,2);

DATA = zeros(line,column);
//-----//
//
// Processing

```

```

clc();
disp('Start AVD and IM method of thsp...');

avd_im = zeros(numThsp, 5);

for i = 1:numThsp
nome = [string(i)+'.bmp'];

    DATA(:,:) = imread(nome);

disp ('Calculo do ' + string(i) + ' valor de AVD and IM of THSP-> ');

    [ocm] = moc(DATA);

Y = zeros(1,5);
a = size(ocm);

// ===== Normal =====
=====

for b = 1:a(1,1)
for c = 1:a(1,2)

norm = sum(ocm(b,:));
if norm == 0;
norm = 1;
end

Y(1,1) = ((ocm(b,c)*(((b^q)-(c^q))^2))/(256) + Y(1,1);

Y(1,2) = ((ocm(b,c)*(((b^q)-(c^q))^2))/(norm) + Y(1,2);

Y(1,3) = ((ocm(b,c)*(((b^q)-(c^q))^2))/(sum(sum(ocm)))) + Y(1,3);

Y(1,4) = ((ocm(b,c)*(abs((b^q)-(c^q))))/(norm) + Y(1,4);

Y(1,5) = ((ocm(b,c)*(abs((b^q)-(c^q))))/(sum(sum(ocm)))) + Y(1,5);

end

end
end

```

```

//Plotting results
disp('Final Results:');
disp('IM without normalitation --> ');
disp(Y(1,1));
disp('IM Arizaga --> ');
disp(Y(1,2));
disp('IM Cardoso --> ');
disp(Y(1,3));
disp('AVD Arizaga --> ');
disp(Y(1,4));
disp('AVD Cardoso --> ');
disp(Y(1,5));
disp('-----');

    avd_im(i,:) = Y;

end// end for

// Recording results
gravar = address + '\avd_im_sts_scilab_' + string(q) + '.txt';
fprintfMat(gravar,avd_im);
Y = avd_im

// Training time
stopOfTheClock = getdate(); //stops the clock
etr = etime(stopOfTheClock,initiationOfTheClock); //calculates the time elapsed
disp("");
disp('Training time: ' + string(etr/60) + ' minutes. ');
disp('ENDED!!!');
sleep(5000);

//
=====
=====
endfunction

```

## MI e AVD – normalização proposta

```

function [Y]=moc(DATA)
//
// Cooccurrence Matrix Analysis - MOC
// In: ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. J. Speckle time evolution
characterization by the co-occurrence matrix analysis. Optics and Laser
Technology, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.
//
// Input:
// DATA are the THSP data
//
// Output:
// Y is the Occurrence Matrix Construction
//
//
=====
=====
// Begin
//
a = size(DATA);

Y = zeros(256,256);
Y1 = zeros(256,256);
for b = 1:a(1,1)
for c = 1:a(1,2)-1
d = ((DATA(b,c))+1);
e = ((DATA(b,c+1))+1);

if ((d >= 256) & (e >= 256))
    d = 256;
e = 256;
end

Y(d,e) = Y(d,e)+1;
Y1(d,e) = 1;

end
end

//Plotting graphs
scf(0);

```

```

clf(0);
colormap gray;
imagesc(Y1);
axis equal;
title('MOC Figure');

endfunction
//
=====
=====

function [Y]=avd_im_sts_hector(address, numThsp, q)
//q is the power
// Algorithm Absolute Value of the Differences (AVD)and Algorithm Inertia
// Moment's (IM) of THSP
// Developed by: Junio Moreira / Roberto Alves Braga Junior
//
// BSLD (Library Speckle Laser Dynamic) version 1.0
// Date: september of 2013
// Review: october of 2013
//Modified by: Renan Oliveira Reis
// Federal University of Lavras - UFLA
//
//
=====
=
// Main Program
//=====
===
//
// Inertia Moment's - IM and Absolute Value of the Differences - AVD
// In: ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. J. Speckle time evolution
// characterization by the co-occurrence matrix analysis. Optics and Laser
// Technology, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.
//
// and: BRAGA, R. A. et al. Biospeckle numerical values over spectral image
// maps of activity. Optics Communications, Amsterdam, v. 285, n. 5, p. 553-
// 561, 2012.
//
// In: BRAGA, R. A. et al. Evaluation of activity through dynamic laser speckle
// using the absolute value of the differences. Optics Communication,
// Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 646-650, 2011.

```

```

//
// Output:
// Y are the value of the Inertia Moment.
// Y(1,1) is the value of the Inertia Moment without normalization
// Y(1,2) is the value of the Inertia Moment with Arizaga normalization
// Y(1,3) is the value of the Inertia Moment with Cardoso normalization
// Y(1,4) is the value of the AVD Arizaga normalization
// Y(1,5) is the value of the AVD Cardoso normalization
//
//-----//
//
// Clear memory
clc();
clear all;

// Set free the memory
stacksize('max');

// Start time count
initiationOfTheClock = getdate();

// Set the directory of the Images
cd(address);

// Identification of the images -- see the format of the image with only numbers.
j = imread ('1.bmp');
k = size(j);
line = k(1,1);
column = k(1,2);

DATA = zeros(line,column);
//-----//
//
// Processing

clc();
disp('Start AVD and IM method of thsp...');

avd_im = zeros(numThsp, 5);

for i = 1:numThsp
nome = [string(i)+'.bmp'];

```

```

DATA(:,:) = imread(nome);

disp ('Calculo do ' + string(i) + ' valor de AVD and IM of THSP-> ');

[ocm] = moc(DATA);

Y = zeros(1,5);
a = size(ocm);
for b = 1:a(1,1)
for c = 1:a(1,2)

norm = sum(ocm(b,:));
if norm == 0;
norm = 1;
end

Y(1,1) = ((ocm(b,c)*(((bq)-(cq))2))/(256)) + Y(1,1);

Y(1,2) = ((ocm(b,c)*(((bq)-(cq))2)/(((bq)+(cq))2))/(norm)) + Y(1,2);

Y(1,3) = ((ocm(b,c)*(((bq)-(cq))2)/(((bq)+(cq))2))/(sum(sum(ocm)))) +
Y(1,3);

Y(1,4) = ((ocm(b,c)*(abs((bq)-(cq)))/((bq)+(cq)))/(norm)) + Y(1,4);

Y(1,5) = ((ocm(b,c)*(abs((bq)-(cq)))/((bq)+(cq)))/(sum(sum(ocm)))) +
Y(1,5);

end
end
//Plotting results
disp('Final Results:');
disp('IM without normalitation --> ');
disp(Y(1,1));
disp('IM Arizaga --> ');
disp(Y(1,2));
disp('IM Cardoso --> ');
disp(Y(1,3));
disp('AVD Arizaga --> ');
disp(Y(1,4));
disp('AVD Cardoso --> ');
disp(Y(1,5));

```

```
disp('-----');

avd_im(i,:) = Y;

end// end for
// Recording results
gravar = address + '\avd_im_sts_scilabHector_'+ string(q)+'.txt';
fprintfMat(gravar,avd_im);
Y = avd_im

// Training time
stopOfTheClock = getdate(); //stops the clock
etr = etime(stopOfTheClock,initiationOfTheClock); //calculates the time elapsed
disp("");
disp('Training time: ' + string(etr/60) + ' minutes. ');
disp('ENDED!!!');
sleep(5000);

//
=====
=====
endfunction
```