

**IDENTIFICAÇÃO DE DIFERENTES
ATIVIDADES EM BIOFILMES POR MEIO
DO *BIOSPECKLE* E DA TRANSFORMADA
DE *WAVELETS***

JUCIARA KEILA MARQUES

2009

JUCIARA KEILA MARQUES

**IDENTIFICAÇÃO DE DIFERENTES
ATIVIDADES EM BIOFILMES POR MEIO
DO *BIOSPECKLE* E DA TRANSFORMADA
DE *WAVELETS***

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

Orientador

Prof. Roberto Alves Braga Júnior

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Marques, Juciara Keila

Identificação de diferentes atividades em biofilmes por meio do
biospeckle e da transformada de *wavelets* / Juciara Keila Marques. -
Lavras : UFLA, 2009.

61p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Roberto Alves Braga Júnior.

Bibliografia.

1. *Biospeckle*. 2. Laser. 3. *Wavelets*. 4. Biofilmes. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 621.366

JUCIARA KEILA MARQUES

**IDENTIFICAÇÃO DE DIFERENTES
ATIVIDADES EM BIOFILMES POR MEIO
DO *BIOSPECKLE* E DA TRANSFORMADA
DE *WAVELETS***

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

APROVADA em 17 de dezembro de 2009

Prof. Bruno Henrique Groenner Barbosa UFLA

Prof. Giovani Francisco Rabelo UFLA

Profa. Thelma Sáfyadi UFLA

Prof. Roberto Alves Braga Júnior
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

"O Senhor é quem dá sabedoria, de sua boca procedem o conhecimento e discernimento".

Provérbios 2:6

Aos meus pais, Geraldo e Maria
Aos meus irmãos
pelo incentivo e confiança

Ofereço.

Ao meu noivo pelo amor, apoio e compreensão,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, pelo amor incondicional e por tudo que me tem concedido.

Aos meus pais, agradeço por tudo que fazem na minha vida e por terem me dado força para que meu sonho se tornasse realidade. Amo vocês!

Ao meu noivo Sebastião, o grande amor da minha vida, por compartilhar comigo momentos felizes, momentos de tristeza e dificuldades. Amo você!

Aos meus irmãos, pelo apoio e presença constante em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Roberto Alves Braga Júnior, sou muito grata pela excelente orientação, amizade, paciência, compreensão, incentivo, valorizando minhas pequenas conquistas, no desafio de fazer acreditar na possibilidade deste trabalho ser viabilizado e também pela experiência e disponibilidade a mim dispensadas em vários momentos. Obrigada por tudo!!

A minha co-orientadora, Profa. Joelma Pereira, pelas sugestões, atenção, contribuição e principalmente pela amizade.

À Universidade Federal de Lavras, ao departamento de Engenharia Agrícola e ao departamento de Ciências dos Alimentos pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio de bolsa.

Aos professores, Bruno, Giovani e Thelma, por aceitarem o convite de compor a banca examinadora e também pelas sugestões apresentadas para redação final deste trabalho.

Aos colegas, Anderson Gomide e Kleber, pela amizade e, principalmente, Rafael Cardoso e Janyelle pelas sugestões.

Ao funcionário Antônio, pela convivência e amizade.

À secretária de Pós-graduação, Greice, pela amizade, paciência e dedicação.

A todos que colaboraram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 O Laser	18
3.1.1 Speckle Dinâmico	18
3.2 Métodos de Análise do speckle Dinâmico	20
3.2.1 Método Fujii	20
3.2.2 Método de diferenças generalizadas	21
3.2.3 Introdução a transformada de Wavelets	21
3.2.4 Reconstrução	23
3.3 Identificação de áreas de atividades	24
3.4 Biofilmes	29
3.5 Matérias-primas	29
3.5.1 Fécula de batata	29
3.5.2 Amido de milho	30
3.5.3 Gelatinização do amido	30
3.5.4 Retrogradação do amido	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Considerações iniciais	33
4.2 Locais de realização do experimento	33
4.3 Materiais	33
4.4 Elaboração dos biofilmes	33
4.5 Atividade de água	34
4.6 Identificação das amostras de biofilmes	34
4.7 Configuração experimental de iluminação	40
4.8 Processamento das imagens	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Análises das amostras sem filtragem	42
5.2 Análise com filtragem - mesmo material	43
5.3 Análise com filtragem - materiais distintos	45

5.4 Análise da influência do fundo branco e preto	46
5.5 Análise de profundidade com filtragem	47
5.6 Análise de sensibilidade	48
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Speckle de um biofilme	19
FIGURA 2	Parte real da função ondeleta de Morlet	24
FIGURA 3	Resultado do processamento da área iluminada pelo laser	25
FIGURA 4	Semente de feijão avaliada segundo o Método de DG	25
FIGURA 5	Lado interno e externo de semente depois de iluminação através de DG e Fujii	26
FIGURA 6	Formato circular centrado na região do bruise com diferentes atividades	27
FIGURA 7	Backscatering	28
FIGURA 8	Imagem de cérebro de rato com regiões com fluxo de sangue alto	28
FIGURA 9	Fotomicrografia de grânulos de fécula de batata	30
FIGURA 10	Fotomicrografia do amido de milho nativo	31
FIGURA 11	Placa de petri com a fécula de batata líquida em cinza e da parte de fécula de batata em gel, cor cinza-claro, com fundo branco	34
FIGURA 12	Placa de petri com a fécula de batata líquida em cinza e parte de fécula de batata em gel, cor cinza-claro, com fundo preto	35
FIGURA 13	Placa de petri com amido de milho em estado líquido em preto e parte de fécula de batata em gel, cor cinza-claro, com fundo branco	35
FIGURA 14	Placa de petri com amido de milho em estado líquido em preto e parte de fécula de batata em gel, cor cinza-claro, com fundo preto	36

FIGURA 15	Placa de petri com a fécula de batata em estado líquido em cinza e pedaço de amido de milho seco, cor verde, com fundo branco	36
FIGURA 16	Placa de petri com a fécula de batata em estado líquido em cinza e parte de amido de milho seco, em verde, com fundo preto	37
FIGURA 17	Placa de petri com a fécula de batata em estado líquido, em cinza, pedaço de amido de milho seco posicionado no centro da placa sobre a camada líquida em verde e fécula de batata em estado líquido sobre a parte seco, em cinza, com fundo branco	37
FIGURA 18	Placa de petri com a fécula de batata em estado líquido, em cinza, da parte de amido de milho seco posicionado no centro da placa sobre a camada líquida, em verde e da fécula de batata em estado líquido sobre a parte seco, em cinza, com fundo preto	38
FIGURA 19	Placa de petri com a fécula da batata em gel com um corte no centro da placa, em cinza-escuro e uma camada de fécula de batata em estado líquido, em cinza-claro, com fundo branco	38
FIGURA 20	Placa de petri com a fécula da batata em gel com um corte no centro da placa, em cinza-escuro e uma camada de fécula de batata em estado líquido, em cinza-claro, com fundo preto	39
FIGURA 21	Biofilme de fécula de batata em estado líquido e uma parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da placa. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel branco	39
FIGURA 22	Biofilme de fécula de batata em estado líquido e uma parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da placa. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel preto	40
FIGURA 23	Configuração experimental de iluminação, de captura e processamento das imagens	40

FIGURA 24	Amostra 1: Parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de fécula de batata líquido sobre papel branco	42
FIGURA 25	Amostra 3: Parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de amido líquido sobre papel branco .	43
FIGURA 26	Amostra 1: Análise da filtragem de parte de filme de batata em gel, posicionado no centro da amostra de filme de batata líquido e, em baixo, papel branco (Fujii)	43
FIGURA 27	Linhas centrais das imagens filtradas e analisadas por (a) Fujii e (b) DG nas escalas de 1 a 25	44
FIGURA 28	Linhas centrais das imagens filtradas e analisadas por (a) Fujii e (b) DG nas escalas de 1 a 25	45
FIGURA 29	Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência da amostra 3, (a) fundo branco e (b) fundo preto	46
FIGURA 30	Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência da amostra 1, (a) fundo branco e (b) fundo preto	47
FIGURA 31	Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência da amostra 5, (a) fundo branco e (b) fundo preto	47
FIGURA 32	Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência da amostra 7, (a) fundo branco e (b) fundo preto	48
FIGURA 33	Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência com (a) fundo branco e (b) fundo preto	49
FIGURA 34	Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência com (a) fundo branco e (b) fundo preto	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Faixas de temperatura para gelatinização dos amidos da batata, milho e outros cereais	31
----------	---	----

RESUMO

MARQUES, Juciara Keila. **Identificação de diferentes atividades em biofilmes por meio do *biospeckle* e da transformada de *wavelets***. 2009. 61 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O *speckle* dinâmico, ou *biospeckle*, tem sido utilizado para analisar a atividade de material biológico, ou não, por meio de diversas técnicas de processamento de imagens. Todavia, um desafio que se apresenta para essa técnica é a capacidade de identificar, em um mesmo material, uma área de baixa atividade (baixa umidade), imerso em um meio de maior atividade (maior umidade). Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar distintas atividades em um biofilme elaborado com fécula de batata e amido de milho, utilizando o *biospeckle* e a transformada de *wavelets* como ferramentas de análise. As técnicas em questão foram aplicadas a fim de se identificar distintas atividades no biofilme com variações da configuração experimental relacionadas ao efeito de fundo preto e fundo branco abaixo das amostras. As técnicas utilizadas para a análise das imagens foram as de diferenças generalizadas e de Fujii antes e após a filtragem promovida pela transformada de *wavelets*. Os resultados das análises permitiram a visualização de diferentes atividades do biofilme com diferentes faixas de frequências. Em determinadas frequências, a baixa atividade ou a alta atividade podem ser apresentadas com maior nitidez em relação aos procedimentos tradicionais sem filtragem. Foi também observado que o maior contraste entre as áreas de distintas atividades foi promovido por materiais de diferentes composições e que existiu, em alguns casos, a relação entre a frequência e a profundidade da parte ativa e inativa do biofilme.

Comitê Orientador: Roberto Alves Braga Júnior-UFLA (Orientador), Joelma Pereira-UFLA

ABSTRACT

MARQUES, Juciara Keila. **Identification of different activities in biofilms through the biospeckle and the wavelets transform.** 2009. 61 p. Dissertation (Master in Agricultural Engineering) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The dynamic *speckle* or *biospeckle* has been used to analyze the activity of biological and non-biological material by means of various techniques of image processing. However, a challenge that presents itself to this technique is the ability to identify, in the same material, an area of low activity immersed in an environment of higher activity. This work was carried out to evaluate the spectral approach as an alternative to identify distinct activities areas in the same material. Biofilm samples were prepared with potato starch and corn starch with different levels of moisture and were analyzed using the *biospeckle* and the wavelets transform. Such techniques have been applied to identify Biofilm different activities areas in a variety of experimental configurations related to the effect of a black or white back ground below the samples. The image analysis was conducted using generalized difference and Fujii techniques before and after the implementation of the Biofilm wavelets transform. The analysis results allowed the visualization of the Biofilm different activities areas in different frequency bands. At certain frequencies, the low activity or high activity can be presented more clearly in relation to traditional procedures without filtering. It was also noted that the greatest contrast between areas of different activities were promoted by materials of different compositions and that there was, in some cases, the relationship between the frequency and depth of the active and inactive Biofilm. The influence of the color of the background was also noticed in the results without a clear definition the better approach.

Guidance Committee: Roberto Alves Braga Júnior-UFLA (Supervisor), Joelma Pereira-UFLA

1 INTRODUÇÃO

A imagem observada, quando um feixe laser é direcionado para uma superfície rugosa, apresenta um padrão com pequenas áreas claras e escuras em forma de grãos, formando um salpicado ou granulado, que é denominado de *speckle* na língua inglesa e adotado como termo técnico para denominação desta interferência. Quando a superfície do material iluminado muda a posição dos elementos dispersores da luz, observa-se um processo dinâmico nos grãos da imagem de interferência que apresentam um aspecto ferverilhante, que é denominado de *speckle* laser dinâmico.

Os primeiros estudos sobre o *speckle* se deram por Exner em 1877, que descreveu a estrutura fibrosa vista quando a luz de uma lâmpada de mercúrio atravessava uma placa de vidro a qual condensava vapor de sua respiração. Várias décadas depois a teoria *speckle* pode ser melhor entendida a partir da contribuição de Laue e Haas por volta de 1920. Laue e Haas relacionaram a estrutura fibrosa a não monocromaticidade da radiação incidente. (Rabal & Braga Júnior, 2008).

O *speckle* dinâmico é um fenômeno que vem sendo utilizado como técnica de medição de atividade biológica em diversas aplicações como na área de alimentos para a determinação da mobilidade celular em biscoitos, ou na área de veterinária para o monitoramento de atividade biológica de sêmen animal. Na medicina, o *speckle* tem sido aplicado de forma prioritária para a determinação de microcirculação, denominada de perfusão sanguínea. Na agropecuária, várias aplicações são relatadas, como a de análise de sementes, a de identificação de fungos em sementes, bem como o monitoramento do crescimento de raízes em cultura de tecidos. Nas aplicações em material biológico, o *speckle* dinâmico, que é conhecido como *biospeckle*, é capaz de acessar, com grande sensibilidade, as mudanças na estrutura dos tecidos, todavia muitas vezes sem a distinção clara da contribuição de cada fenômeno no interior dos tecidos na formação da figura dinâmica de interferência.

Na consolidação do *biospeckle* como instrumento de prospecção de gradientes de atividade nas diversas estruturas que compõem um tecido, surgem alguns desafios, bem como a definição de alguns limites para a realização dessas análises. Um desses desafios é a possibilidade de identificar áreas de baixa atividade imersas em um tecido de alta atividade.

O grande potencial de aplicação dessa capacidade de separação de tecidos em um mesmo material é um motivador para a solução das limitações apresentadas, incentivando a aplicação de técnicas mais complexas de análise de sinais provenientes do *biospeckle* laser. Um exemplo é o pré-processamento desses sinais por ferramentas de filtragem, pela

Transformada de *Wavelets*, aproveitando a sua capacidade de decompor as funções tanto no domínio da frequência como no domínio do tempo.

Este trabalho buscou criar variações com porções ativas e inativas em um material controlado. Nesse caso, o biofilme, para a análise deste pelo *biospeckle* laser. A avaliação da associação de biofilmes e a análise dos dados no domínio da frequência foram as bases para os trabalhos realizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a formação do *biospeckle* em biofilmes, através de diversas técnicas para a identificação de diferentes atividades.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar o efeito da baixa atividade inserida em diversos pontos em um meio de alta atividade.
- Analisar os dados produzidos por essas atividades, utilizando a técnica de transformada de wavelets.
- Analisar o efeito de fundo escuro ou claro abaixo do objeto para a melhor identificação do material em análise.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O laser

O laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) por ser visto como um instrumento muito útil e complexo vem sendo adaptado nas mais diversas áreas, passando a ser comercialmente desenvolvido em diversas aplicações desde a mais simples como a caneta laser, para servir de apontadora em palestras, passando para as mais complexas, como na medicina, na indústria, nas telecomunicações por fibra óptica, até a área militar.

As principais características que estimularam o uso do laser são (Braga Júnior, 2000):

- alta direcionalidade do feixe;
- alta intensidade do feixe;
- capacidade de controle da cor e intensidade;
- o tamanho pode ser reduzido;
- coerência e monocromaticidade;
- a potência pode ser de MW até alguns MW.

Essas características proporcionam condições viáveis a inúmeras aplicações. O importante, nesse caso, é observar que, apesar das características favoráveis, citadas anteriormente, a manipulação do *laser* exige certos cuidados que, dependendo da aplicação, pode comprometer os resultados esperados. Além disso, a pesquisa nessa área é muito dinâmica, tanto na área de desenvolvimento de novos tipos de *laser* (menores, maiores, mais potentes, etc) como também nas aplicações.

3.1.1 *Speckle* dinâmico

A aplicação do *speckle* dinâmico na área biológica tem sido de grande importância, no entanto nem todas as utilizações foram desenvolvidas totalmente, bem como ainda não se conseguiu analisar todas as reais viabilidades (Rabal, 1998).

Quando um feixe de luz coerente, definido como o resultado da conjugação de fatores que tornam uma fonte mais ou menos coerente, sendo dividida em duas: coerência espacial (intervalo de uma fase de uma onda luminosa em um dado ponto do espaço) e coerência temporal (área em que a luz é capaz de se manter coerente ao incidir em um objeto) (Hecht, 2001), ilumina uma superfície rugosa, um padrão de interferência granular

típico nomeado *speckle* é observado (Dainty, 1975; Sirohi, 1993; Goodman, 2007). Esse nome foi dado na década de 60 ao padrão de intensidade produzido por qualquer objeto iluminado por um feixe de luz altamente coerente.

O *speckle* é conhecido como granulado uma vez que são observados pontos ou grãos claros e escuros salpicados na imagem (Figura 1). Esses grãos do padrão de *speckle* mudam seu tamanho de acordo com a distância de observação e do diâmetro da área iluminada. (Rabal et al., 2008).

De acordo com Braga Júnior (2000), o *speckle* é um fenômeno que inicialmente era considerado como um ruído que atrapalhava os trabalhos de óptica. Esse fenômeno ocorre somente pelo fato de a luz ser coerente, e que quando ilumina um objeto, observa-se a interferência eletromagnética produzida pela parcela da luz que mudou sua fase em função dos diversos caminhos percorridos durante a interação com esse objeto.

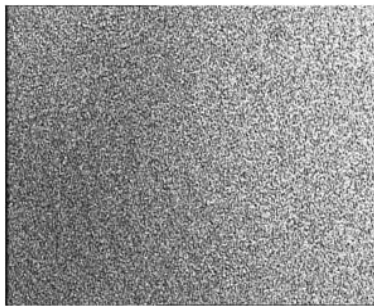


FIGURA 1 *Speckle* de um biofilme

O *speckle* dinâmico, também conhecido como biospeckle quando proveniente do material biológico, baseia-se no tratamento de imagens do material iluminado pelo laser com a finalidade de identificar áreas com diferentes interações dessa luz com o objeto iluminado, que podem caracterizar, por exemplo, níveis de atividade em material biológico. Esse fenômeno é bem conhecido em estudos de óptica e ocorre quando o laser se dispersa em uma superfície, a qual exibe algum tipo de atividade.

A aparência visual do fenômeno é similar a um líquido em ebulição, sendo que o termo na língua portuguesa que mais poderia traduzir esse fenômeno é o fervilhamento, não se apresentando como uma alternativa para o uso no meio científico. (Rabelo, 2000).

O *biospeckle*, por ser dinâmico, deve ser analisado com técnicas de processamento de imagens e tratamento estatístico uma vez que a observação visual possibilita apenas a identificação da existência desse fenômeno, mas não permite quantificá-lo (Arizaga et al., 1999).

Para acompanhar a mudança de direção das dispersões, a taxa de aquisição de imagens deverá ser maior, requerendo assim, um equipamento de aquisição adequado a cada aplicação.

Na seção 3.2 serão apresentados os métodos relacionados à análise do speckle dinâmico.

3.2 Métodos de análise do *speckle* dinâmico

Quando se deseja obter informações de níveis de atividade diferentes em um material iluminado pelo laser, uma ferramenta útil é a construção de um THSP "*Time History Speckle Pattern*", que representa uma figura que indica em tons de cinza os níveis de atividade, através de seus valores em pixels. Quando a informação requerida é uma quantificação numérica da mudança do padrão de speckle formado durante uma observação, um dos métodos mais utilizados é o Momento de Inércia (análise das informações retiradas do Spatial Temporal *Speckle* (STS). Por outro lado, quando se deseja mapear áreas de atividade em um tecido, os métodos que podem ser adotados são os de Fujii e o de diferenças generalizadas - DG (Arizaga et al., 2002). A seguir serão citados os métodos de análise envolvendo o pré-processamento das imagens (Método DG e Fujii) para tratamento das imagens e posterior filtragem (transformada de *Wavelets*) para a análise do biofilme.

3.2.1 Método Fujii

O método de Fujii foi proposto para processar um registro de uma coleção de imagens de padrões de speckle no tempo (Fujii et al., 1987). O procedimento para a construção do método de Fujii é descrito pela Equação (1):

$$I(x, y) = \sum \left| \frac{I_k(x, y) - I_{k+1}(x, y)}{I_k(x, y) + I_{k+1}(x, y)} \right| \quad (1)$$

Em que, $I_k(x, y)$ é o valor de intensidade na posição (x, y) da imagem k .

A partir da Equação (1) é construída uma nova imagem $I(x, y)$ na qual os pixels, expressos em 8 bits, assumem valor nulo no mapa final em regiões nas quais não houve alterações de intensidade ao longo do tempo, e valores mais altos em zonas em que os pixels sofreram grandes alterações. Dessa maneira, nas zonas de grande atividade, a imagem resultante apresenta pontos claros e naquelas de baixa atividade pontos escuros. Nesse método é importante ressaltar a influência do denominador da equação que promove uma ponderação das diferenças obtidas no numerador. Essa ponderação amplifica as diferenças resultantes de áreas mais escuras da imagem. O resultado dessa ponderação pode não ser

útil, pois as mudanças ocorridas nas áreas mais escuras podem não ser desejadas na imagem final, abrindo espaço para métodos como o das Diferenças Generalizadas.

3.2.2 Método de diferenças generalizadas

O método de diferenças generalizadas - DG é uma técnica em que um mapa é construído a partir das diferenças entre os pixels das imagens gravadas durante o monitoramento.

De acordo com Arizaga et al. (2002), o Método de DG realiza a soma das diferenças de intensidade entre uma imagem e suas subseqüentes. O resultado apresentado pela Equação 2 é uma nova imagem, na qual observa-se um clareamento dos pixels que ocorreram as maiores mudanças nos níveis de cinza.

$$I(x, y) = \sum_k \sum_l |I_k(x, y) - I_{k+l}(x, y)| \quad (2)$$

sendo k e l as imagens.

As diferenças básicas entre o método de Fujii e Diferenças Generalizadas estão na ausência da ponderação no método DG e na realização de comparação de cada imagem com todas as seguintes promovidas no método DG enquanto que no método de Fujii a comparação é apenas realizada com a imagem seguinte. Essa última característica torna o método de DG mais exigente em uso de máquina, tornando-o mais demorado. Todavia, este é um método muito útil quando se deseja eliminar por completo as áreas mais escuras das imagens com baixa variação das intensidades dos pixels.

3.2.3 Introdução a transformada de *Wavelets*

A transformada de *Wavelets* tem sido aplicada em várias áreas do conhecimento, tais como: estatística, matemática, processamento de sinais, músicas, oceanografia, codificação, compressão de imagens, remoção de ruído ou filtragem, entre outras, como uma ferramenta para lidar com sinais, sem perda de qualquer informação (Graps, 1995).

A análise de *Wavelets* (baseada em escala) pode ser definida como uma evolução da análise de Fourier (baseada em frequências), pois a verificação de sinais, utilizando variação de escala, demonstrou ser menos sensível a ruídos, bem como capaz de identificar variações das frequências em um mesmo sinal. Segundo Misiti et al. (2005), a análise de *Wavelets* permite a utilização de intervalos longos de tempo para encontrar as informações de baixa frequência e intervalos curtos de tempo nos quais estão localizadas

as informações de alta frequência.

A transformada *Wavelets* é capaz de fornecer informações sobre como a frequência muda ao longo do tempo, sendo um recurso matemático elaborado para analisar sinais com picos e descontinuidades que outros métodos não conseguem analisar.

Uma das características da Transformada de *Wavelets* é sua capacidade de abrir o sinal nas diversas frequências que o compõem em relação ao domínio do tempo e permitir a reconstrução deste de forma integral, ou sem as faixas de frequências que se deseja filtrar. Essa característica torna a Transformada de *Wavelets* uma flexível ferramenta para filtragem.

A Transformada de *Wavelets* é uma técnica que decompõe sinais em termos de diferentes tipos de funções base com a utilização de uma largura de janela variável de acordo com uma escala pré-especificada em vários níveis. Assim sendo, esta estuda cada componente com uma resolução combinada a sua escala. Pode-se dizer também que a Transformada de *Wavelets* é capaz de solucionar os problemas da Transformada de *Fourier* na obtenção de precisões solicitadas tanto no domínio do tempo quanto no domínio da frequência, constituindo uma ferramenta para decompor e analisar funções com ênfase na localização tempo-frequência (Daubechies & Gilbert, 1998; Kaiser, 1994; Gomes et al., 1997; Mallat, 1999).

A Transformada de *Wavelets* analisa um sinal contínuo $f(t)$, utilizando o parâmetro a , que representa a escala (resolução) e o parâmetro b , que representa o deslocamento (translação) no tempo. A função $\psi_{a,b}$ é chamada onda mãe e representa a janela de observação da função $f(t)$ apresentada na Equação 3.

$$F(a, b) = \int f(t)\psi_{a,b}(t)dt \tag{3}$$

A Equação 4 apresenta um exemplo de onda mãe, que nesse caso representa a função Morlet, que é muito utilizada nas análises da Transformada de *Wavelets*.

$$\psi_{a,b} = \frac{1}{\sqrt{a}}\psi\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad (4)$$

onde $a, b \in \mathbb{R}$ que são respectivamente a escala e localização dos parâmetros no tempo.

A Transformada de *Wavelets* foi apresentada como uma ferramenta para análise do padrão de STS, usando entropia Passoni et al. (2004, 2005) e por Braga et al. (2007) em materiais como sêmen animal e sementes, utilizando-a como ferramenta de filtragem por meio da reconstrução.

3.2.4 Reconstrução

Para Torrence & Compo (1998), na Transformada de *Wavelets*, a reconstrução do sinal pode ser realizada com a filtragem da informação não desejada no sinal, ou seja, a reconstrução do sinal original é baseada no somatório dos coeficientes reais sobre todas as escalas conforme a equação abaixo.

$$f(t) = K \sum_j \frac{\Re\{W(j)\}}{2\delta t 2^{j\delta j}} \quad (5)$$

Sendo :

K representando uma constante que é relacionada com a menor unidade no tempo δt , frequência δj , e também com a função de *wavelet*, para obter o sinal $f(t)$ dos coeficientes de *wavelet* $W(j)$ a cada valor de escala j .

Na figura 2, tem-se a forma de onda da *wavelets* de Morlet:

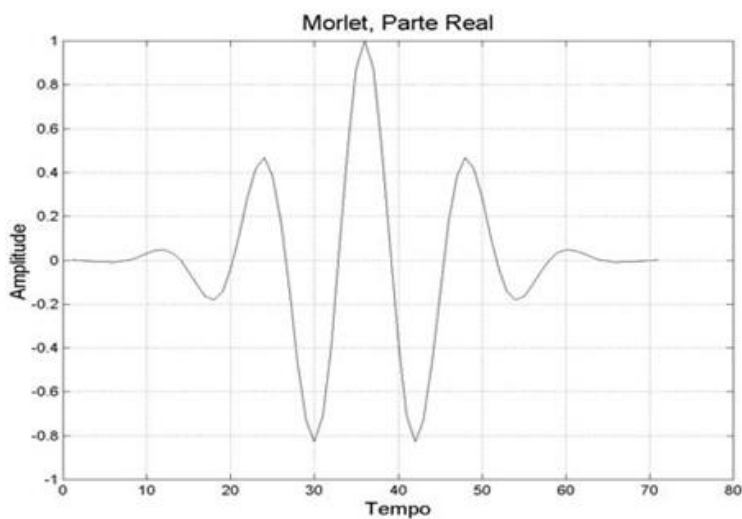


FIGURA 2 Parte real da função ondaleta de Morlet (Bolzan, 2006)

3.3 Identificação de áreas de atividades

A movimentação interna, proveniente da atividade metabólica, pode ser maior ou menor em áreas restritas, dependendo do processo de maturação, crescimento ou deterioração do material biológico e também da temperatura e iluminação, apresentando algumas características peulieres. A penetração da luz laser no tecido biológico tem sido muito utilizada na medição de atividade biológica Bergvist (1997). A fim de ilustrar essa aplicação, a seguir serão citados alguns exemplos em que o *biospeckle* permite identificar a separação das áreas claras de maior atividade das áreas escuras de baixa atividade:

A) Braga Júnior (2000) utilizou semente de milho para separar o embrião do endosperma, identificando áreas internas que apresentassem uma constituição bem distinta, como é o caso de tecido vivo e morto, ou seja, o embrião apresenta vida e o endosperma não.

Em um exemplo no processamento das imagens de milho, observou-se um padrão de cinza mais claro na área com tecido embrionário (vivo), e cinza mais escuro na área do endosperma (morto), e também a presença de pequenas áreas mais escuras no centro, indicando a presença de material inerte colocado com a intenção de mostrar mais um nível de atividade.

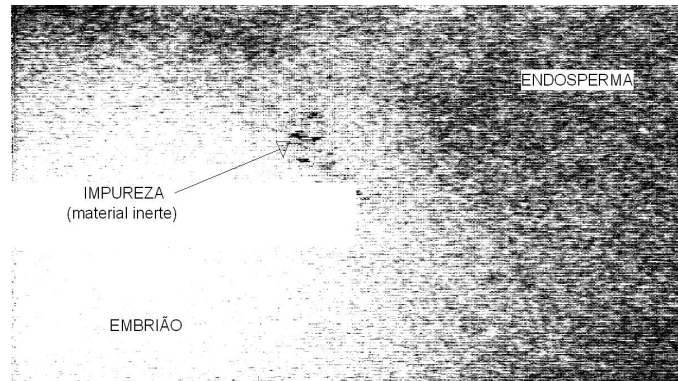


FIGURA 3 Resultado do processamento pelo método de diferenças generalizadas da área iluminada pelo laser (Braga Júnior, 2000)

B) Na Figura 4, pode ser observado através do Método de Diferenças Generalizadas um pequeno escurecimento na região do dano, mas ainda com pouca definição, de acordo com a afirmação de Braga Júnior (2000), a qual confirma que em sementes de feijão o dano que fica nas camadas mais superficiais do cotilédone sofre interferência das partes internas da semente e até mesmo das laterais.

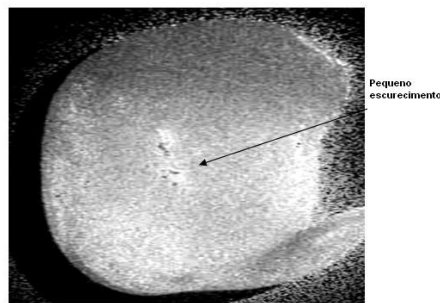


FIGURA 4 Semente de feijão avaliada segundo o Método de Diferenças com pequeno escurecimento na região do dano (Braga Júnior, 2000)

C) Segundo Braga et al. (2005), a aplicação da técnica do biospeckle foi capaz de detectar a presença de fungos em sementes de feijão. Algumas espécies de fungos foram cultivadas e inoculadas nos feijões e o laser iluminou essas espécies. Na Figura 4, os métodos de Diferenças Generalizadas e Fujii foram utilizados para obter informações, relatando atividade biológica nos tipos de fungos, nos quais as áreas vermelhas mostram alta atividade ou então a presença de fungos enquanto regiões de baixa atividade aparecem em azul.

Esse experimento é uma indicação de que a técnica do biospeckle pode ser usada como metodologia para avaliar a presença de espécies de fungos em sementes, mostrando diferentes atividades, sendo capaz de mapear áreas em um material biológico.

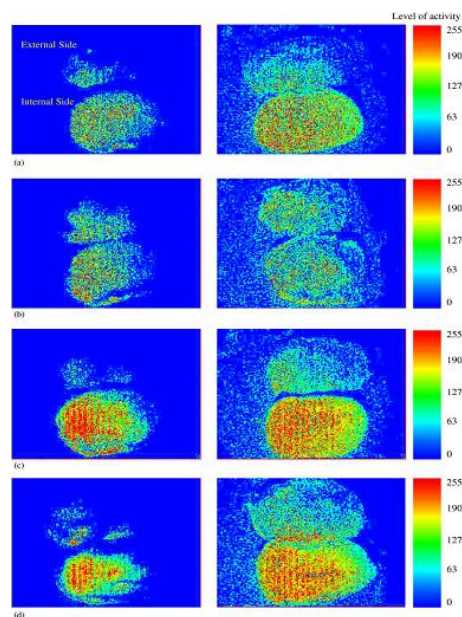


FIGURA 5 Mostrando o lado interno e externo de semente depois de iluminação através de diferenças generalizadas (esquerda) e através de métodos de Fujii (direito): (a) controle de semente (b) *Sclerotinia*; (c) *Aspergillus*; (d) *Colletotrium*; nas imagens, do meio superior corresponde a parte externa das sementes e do meio inferior corresponde a parte interna das sementes, com imagens pseudo coloridas representando o nível de atividade. De acordo com o faixa 0 (baixo) para 255 (alto)(Braga et al., 2005).

D) Pajuelo et al. (2003) sugeriram utilizar a técnica do *biospeckle* para estudar o

impacto na maçã e analisar o *bruise*, que é um dano mecânico causado por uma bola de aço ao cair na polpa da fruta, podendo ser visível ou não.

Neste trabalho, foi testado o dano em maçãs através de várias técnicas do *speckle* dinâmico, apresentando resultados consistentes.

A Figura 6 mostra a imagem de uma região do *bruise*, obtida após o impacto, com diferente atividade, utilizando o método de Diferenças Generalizadas. Os resultados deste trabalho mostram a habilidade do *biospeckle* em separar áreas de atividades em um mesmo tecido.

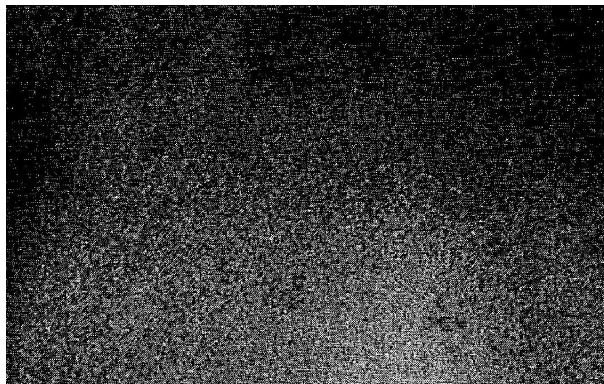


FIGURA 6 Formato circular centrado na região do *bruise* com diferentes atividades (Pajuelo et al., 2003)

E) Segundo Gonik et al. (2002), uma outra aplicação do *speckle* dinâmico é na visualização dos parâmetros de microcirculação em tecidos humanos, nos quais se pode obter a leitura de atividade biológica e visualizar os fenômenos internos nos tecidos da seguinte forma: z representa a profundidade que se deseja obter as informações; d , a distância entre o receptor de luz e o emissor; 1, a fibra que recebe a luz; 2, a fibra que emite a luz; 3 é a região em forma de "banana"; 4, a heterogeneidade dinâmica.

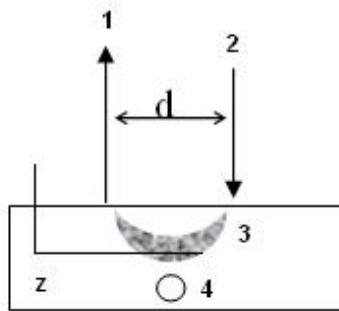


FIGURA 7 Backscatering (Gonik et al., 2002)

F) Segundo Briers et al. (1996), uma outra técnica utilizada para monitorar o fluxo do sangue capilar pode ser conseguida por meio do método de LASCA.

Essa técnica é baseada no contraste de um objeto recoberto com *speckle* laser no qual são verificadas as zonas de atividades. Nas regiões de maior velocidade das partículas, o valor do contraste é mais baixo e as imagens aparecem mais escuras, por outro lado, em locais de menor circulação, o contraste é maior e essas imagens aparecem mais claras. Ver Figura 8. Do ponto de vista clínico, a simples visualização qualitativa da distribuição espacial do fluxo sanguíneo constitui-se uma ferramenta de grande interesse para diagnóstico.

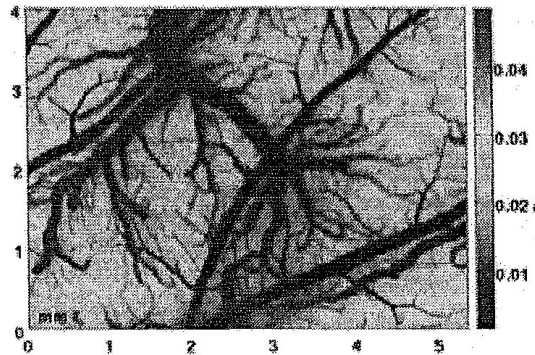


FIGURA 8 Imagem de cérebro de rato com regiões com fluxo de sangue alto claramente distinguíveis, apresentando-se mais escuras. (Briers, 1996)

3.4 Biofilmes

Os biofilmes são películas finas confeccionadas a partir de polímeros, como proteínas, polissacarídeos, lipídeos e derivados. São denominados também de filmes biodegradáveis por serem capazes de se decompor naturalmente pela ação de microorganismos apesar de atuarem como barreira a elementos externos, protegendo produtos, como frutas, durante certo período, podendo ser comestíveis (Silva, 2005).

O uso do amido na obtenção de materiais biodegradáveis tem sido bem empregado no processo de formação de filmes, obtendo-se materiais com boas propriedades de barreira (Rindlaw-Westling et al., 1998).

O amido é um dos biopolímeros mais utilizados para compor materiais biodegradáveis devido ao seu custo e disponibilidade. Os tipos de amido utilizados para esse fim podem ser os naturais, obtidos de diversas fontes vegetais, ou os modificados (Henrique et al., 2008).

3.5 Matérias primas

No Brasil, o produto extraído das partes aéreas dos vegetais é denominado amido e a fécula, o produto das partes subterrâneas das plantas. As principais fontes de amido comercial são: arroz, trigo, milho, mandioca e batata.

Os biofilmes podem ser produzidos a partir de diversas fontes amiláceas, sendo as féculas de batata e de mandioca e o amido de milho, as fontes mais comuns.

3.5.1 Fécula de batata

As propriedades da fécula de batata apresentam grande viscosidade, baixa estabilidade, temperatura de pasta (64,8°C) e tendência à retrogradação (Leonel, 2001)

Os grânulos de amido possuem diferentes formas e tamanhos de acordo com a espécie vegetal. A fécula de batata possui grânulos com tamanhos de 15 – 100 μ m (Vilela & Ferreira, 1987).

Os amidos de batata e de milho são fontes que têm sido pesquisadas na obtenção de filmes biodegradáveis e comestíveis (Bengtsson et al., 2003; Thiré et al., 2003; Jansson & Thuvander, 2004).

Segundo Bengtsson et al. (2003), o amido de batata tem sido bem empregado no processo de formação dos filmes, exibindo boas propriedades de barreira ao oxigênio.

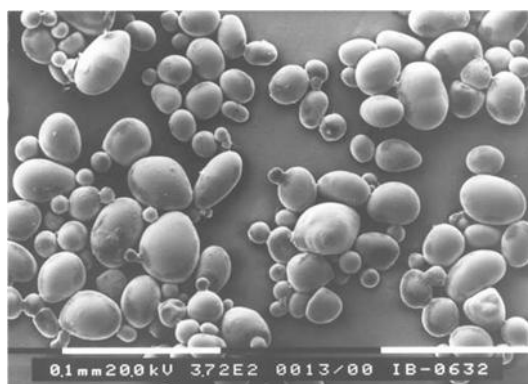


FIGURA 9 Fotomicrografia de grânulos de fécula de batata (Leonel, 2007)

3.5.2 Amido de milho

O milho botanicamente conhecido por *Zea mays* L pertence à família das gramíneas. Comercialmente é uma cultura em que se apresenta o maior número de produtos, como amido, extraído do grão. (Ciacco & Cruz, 1982).

De acordo com Mali et al. (2004), o uso do amido na produção de plásticos iniciou-se nos anos 70, sendo considerado um dos principais componentes da maioria dos vegetais.

Quimicamente o amido é sempre igual, independente da sua origem botânica (Cereda, 1996), porém a forma estrutural do amido é diferente, podendo ser formado de outros polímeros, em diferentes proporções. São vários os tipos de polímeros constituintes do amido, mas predominam a amilose e a amilopectina. Em amido de milho, o teor de amilose é 24% e de amilopectina 76% (Leach, 1965; Ciacco & Cruz, 1982).

O amido de milho possui grânulos com tamanho de 5 – 25 μm , o de (Vilela et al 1987).

As mudanças ocorridas nos grânulos de amido durante a gelatinização e a retrogradação são os principais determinantes do comportamento das pastas de amido.

3.5.3 Gelatinização do amido

Quando uma suspensão de água concentrada de amido é aquecida de acordo com uma determinada temperatura, seus grânulos gelatinizam individualmente e incham livremente até que atinjam potencialmente toda a capacidade de absorver água, entumecendo irreversivelmente, formando uma suspensão viscosa.

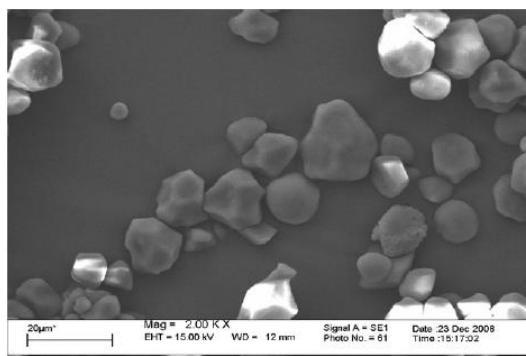


FIGURA 10 Fotomicrografia do amido de milho nativo (Alves, 2009)

Para cada tipo de amido há uma faixa de temperatura de gelatinização (Ciacco & Cruz, 1982). Os amidos de mandioca e batata possuem menores temperaturas de gelatinização, diferentemente dos cereais, devido à existência de ligações internas mais fracas (Vilela & Ferreira, 1987).

Fonte	Temperatura (°C)
Batata	56 - 66
Mandioca	58 - 70
Milho	62 - 72
Trigo	52 - 63
Arroz	61 - 77

TABELA 1 Faixas de temperatura para gelatinização dos amidos da batata, milho e outros cereais (Ciacco & Cruz, 1982).

3.5.4 Retrogradação do amido

A retrogradação consiste basicamente em transformações ocorridas durante o armazenamento e o resfriamento dos géis de amido que passaram pelo processo de gelatinização.

Thiré et al. (2003) relatam que a retrogradação do amido apresenta-se como uma recristalização da amilose e amilopectina durante o armazenamento de pastas de amido geleificado, filmes de amido e materiais termoplásticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações iniciais

As observações de um meio de baixa atividade imerso em um meio de alta atividade e vice-versa foram realizadas por meio de amostras de biofilmes de féculas de batata e amido de milho em distintas situações de atividade de água.

As análises no domínio do tempo foram realizadas pelas técnicas de DG e Fujii, e a técnica de análise no domínio da frequência utilizou a filtragem dos dados por meio da transformada de *wavelets*.

A identificação da influência da cor do fundo foi realizada por meio da colocação de papel branco e preto abaixo das placas de Petri, nas quais ficaram as amostras.

4.2 Locais de realização do experimento

O experimento foi realizado nos laboratórios de Grãos Raízes e Tubérculos e de Análise de Estruturas do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), no Laboratório de Laser e Óptica do Departamento de Engenharia (DEG) e no Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada à Agropecuária (CEDIA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

4.3 Materiais

O amido de milho (maizena) e a fécula de batata (Yoki) foram adquiridos no comércio da cidade de Lavras, MG.

4.4 Elaboração dos biofilmes

As amostras de biofilmes foram preparadas, no laboratório de Grãos Raízes e Tubérculos do Departamento de Ciência dos Alimentos, a partir da adição de 3g de fécula de batata ou de amido de milho, completando-se o volume com 100 ml de água destilada em béquero.

As soluções foram agitadas em um agitador magnético com controle de temperatura até atingir a temperatura de gelatinização da fécula da batata, 65°C e do amido de milho, 62°C, mantendo nesta por quinze minutos. Os géis obtidos foram resfriados até atingirem a temperatura ambiente, o que levou cerca de 40 minutos. Após o resfriamento, os géis foram despejados em uma proveta de 10 ml e colocados nas placas de poliestireno de 48 mm de diâmetro, para secagem em câmara climatizada, à temperatura de 25°C e umidade relativa de 50%, de maneira que toda a superfície interna da placa fosse coberta uniformemente com o gel. Após 17 horas de secagem, alguns biofilmes foram retirados

facilmente das placas, enquanto outros estavam gelatinosos.

4.5 Atividade de água

Foi utilizado o medidor de atividade de água Aqualab para as análises de atividade de água (A_w) da fécula de batata e do amido de milho.

4.6 Identificação das amostras de biofilmes

No preparo das amostras de biofilmes, planejadas de acordo com a atividade dos materiais, ou seja, materiais de baixa atividade como os biofilmes, por serem mais secos e os materiais de alta atividade como o gel por serem mais líquidos. Estes receberam as seguintes identificações:

- amostra 1: biofilme de fécula de batata em estado líquido e parte de biofilme de fécula de batata gelatinoso posicionado no centro da placa sobre a parte líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel branco, Figura 11;

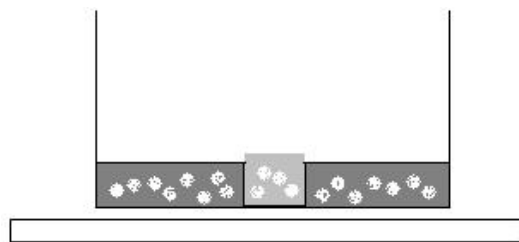


FIGURA 11 Placa de Petri com a fécula de batata líquida em cinza e do pedaço de fécula de batata em gel, cor cinza-claro, com fundo branco.

- amostra 2: biofilme de fécula de batata em estado líquido e parte de biofilme de fécula de batata gelatinoso posicionado no centro da placa sobre a parte líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel preto, Figura 12;



FIGURA 12 Placa de Petri com a fécula de batata líquida em cinza e pedaço de fécula de batata em gel, cor cinza-claro, com fundo preto.

- amostra 3: biofilme de amido de milho em estado líquido parte de biofilme de fécula de batata gelatinoso posicionado no centro da placa sobre a parte líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel branco, Figura 13;

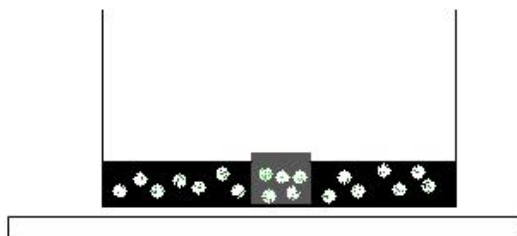


FIGURA 13 Placa de Petri com amido de milho em estado líquido em preto e pedaço de fécula de batata em gel, cor cinza-claro, com fundo branco.

- amostra 4: biofilme de amido de milho em estado líquido e parte de biofilme de fécula de batata gelatinoso posicionado no centro da placa sobre a parte líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel preto, Figura 14;

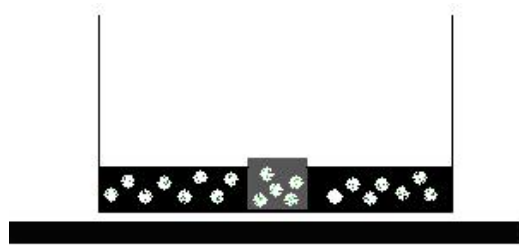


FIGURA 14 Placa de Petri com amido de milho em estado líquido em preto e pedaço de fécula de batata em gel, cor cinza-claro, com fundo preto.

- amostra 5: biofilme de fécula de batata em estado líquido e parte de biofilme de amido de milho seco posicionado no centro da placa sobre a camada líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel branco, Figura 15;

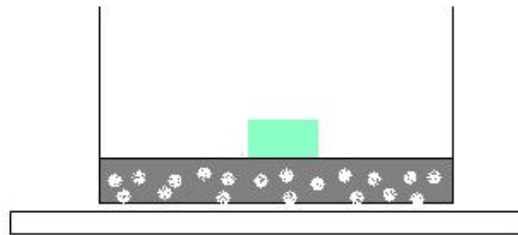


FIGURA 15 Placa de Petri com a fécula de batata em estado líquido em cinza e pedaço de amido de milho seco, cor verde, com fundo branco.

- amostra 6: biofilme de fécula de batata em estado líquido e parte de biofilme de amido de milho seco posicionado no centro da placa sobre a camada líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel preto, Figura 16;

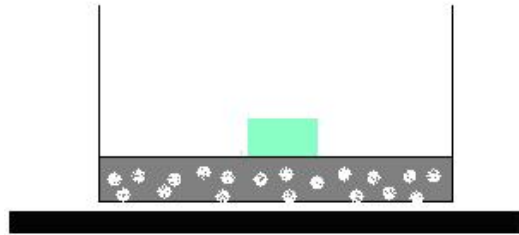


FIGURA 16 Placa de Petri com a fécula de batata em estado líquido em cinza e pedaço de amido de milho seco, em verde, com fundo preto.

- amostra 7: biofilme de fécula de batata em estado líquido, parte de biofilme de amido de milho seco posicionado no centro da placa e biofilme de fécula de batata em estado líquido. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel branco, Figura 17;

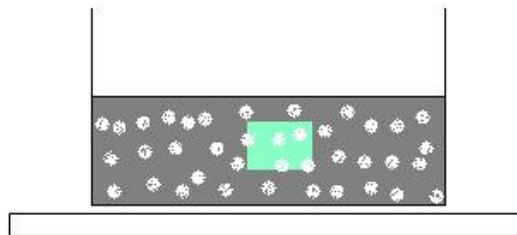


FIGURA 17 Placa de Petri com a fécula de batata em estado líquido, em cinza, pedaço de amido de milho seco posicionado no centro da placa sobre a camada líquida em verde e fécula de batata em estado líquido sobre a parte seco, em cinza, com fundo branco.

- amostra 8: biofilme de fécula de batata em estado líquido, parte de biofilme de amido de milho seco posicionado no centro da placa e biofilme de fécula de batata em estado líquido. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel preto, Figura 18;

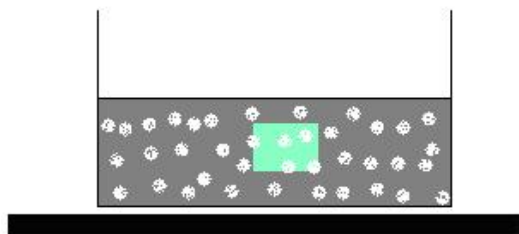


FIGURA 18 Placa de Petri com a fécula de batata em estado líquido, em cinza, da parte de amido de milho seco posicionado no centro da placa sobre a camada líquida, em verde e da fécula de batata em estado líquido sobre a parte seco, em cinza, com fundo preto.

Os experimentos a seguir foram realizados no intuito de identificar alta atividade em um meio de baixa atividade e baixa atividade em um meio de alta atividade. Os procedimentos utilizados na identificação das amostras estão resumidos nas Figuras 19 a 22. Nas Figuras 19 e 20, está representada a criação de uma depressão em um material menos ativo com um material mais ativo sobre este e, nas Figuras 21 e 22, está representada a colocação de um material menos ativo, com pequena espessura sobre o material mais ativo. Em ambos os casos, a proposta foi de apontar para os desafios relacionados à sensibilidade da técnica em relação a situações com menor diferença entre o estado dos materiais.

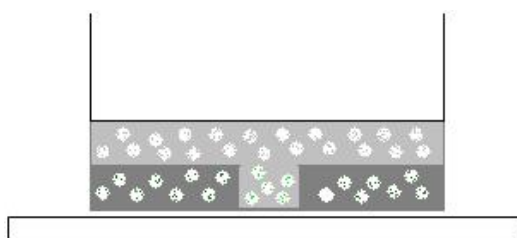


FIGURA 19 Placa de Petri com a fécula da batata em gel com um corte no centro da placa, em cinza-escuro e uma camada de fécula de batata em estado líquido, em cinza-claro, com fundo branco.

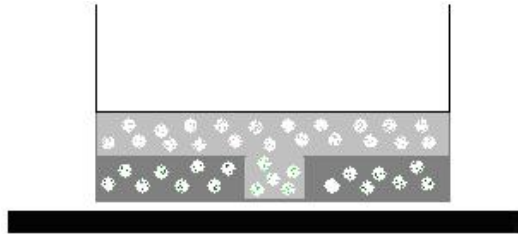


FIGURA 20 Placa de Petri com a fécula da batata em gel com um corte no centro da placa, em cinza-escuro e uma camada de fécula de batata em estado líquido, em cinza-claro, com fundo preto.

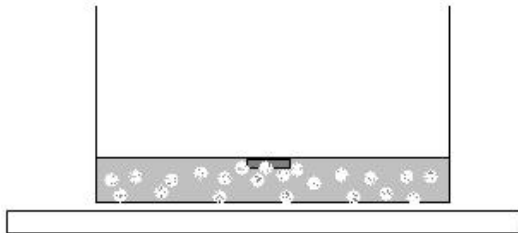


FIGURA 21 Biofilme de fécula de batata em estado líquido e parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da placa sobre a camada líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel branco.



FIGURA 22 Biofilme de fécula de batata em estado líquido e um pedaço de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da placa sobre a camada líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado um pedaço de papel preto.

4.7 Configuração experimental de iluminação

A configuração experimental de iluminação, de captura e de análise do experimento foi composta de um laser de hélio neônio, uma câmera CCD para captura das imagens, uma lente macro para foco e um computador, no qual foram processadas as imagens (Figura 23). As imagens foram capturadas a uma taxa de 0,08s, perfazendo um conjunto de 128 amostras em cada experimento.

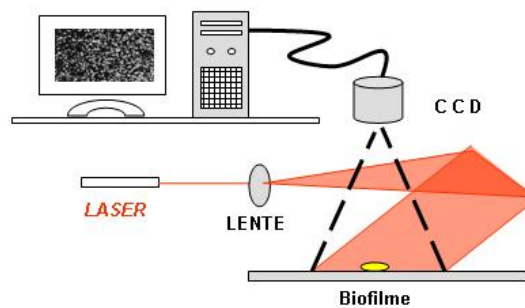


FIGURA 23 Configuração experimental de iluminação, de captura e de processamento das imagens (Braga et al., 2001).

4.8 Processamento das imagens

As imagens capturadas foram analisadas pelos métodos Fujii e DG antes da filtragem e novamente analisadas pelos mesmos métodos após a filtragem promovida pela transformada de *wavelets*. Foram obtidas 25 faixas de frequências que estavam dispostas dentro da faixa total de 0 a 12,5 Hz. As reconstruções se deram por cada faixa, ou seja,

apenas a faixa de interesse foi reconstruída, sendo filtradas as demais.

Para melhor confronto das faixas, foi construída uma nova imagem a partir dos resultados após as filtrações, através de um programa desenvolvido em Matlab, que recupera as linhas centrais de cada imagem lado a lado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados de forma agrupada, de acordo com a lógica escolhida para análise das hipóteses. Inicialmente buscou-se mostrar os resultados sem filtragem, os resultados filtrados com um mesmo material para a parte mais e menos ativa e os resultados filtrados com materiais distintos. A influência do fundo preto é apresentada a seguir, tendo os resultados até então sido somente com o fundo branco. Por fim, algumas análises complementares encerram os resultados, seguidos de uma discussão de fechamento.

5.1 Análises das amostras sem filtragem

Na Figura 24 é apresentado o resultado do processamento do método de Fujii e DG na configuração da amostra 1, em que o material de baixa atividade se encontra por cima do material de alta atividade. A atividade é apresentada graficamente por pseudocores, estando as altas atividades mais próximas do vermelho e a baixa atividade em cores mais próximas do azul.

O resultado de Fujii apresentou, ao centro da imagem, uma área mais escura, que poderia ser entendida como o material menos ativo, enquanto o método de DG apresentou resultado inverso, comprovando a dificuldade de se identificar com nitidez um material pouco ativo em um meio mais ativo. Essa dificuldade é relativa ao fato de um material pouco ativo inserido em um meio muito ativo não conseguir apresentar sua baixa atividade, muitas vezes ofuscada pela alta atividade ao redor e abaixo do material. (Rabal & Braga Júnior, 2008).



FIGURA 24 Amostra 1: Parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de fécula de batata líquido sobre papel branco.

A identificação é melhorada quando materiais distintos (amido milho e fécula de batata) são colocados para análise. Na Figura 25 é possível observar um material ativo, representado pelo filme líquido de amido de milho e um material menos ativo, representado pelo gel de fécula de batata (amostra 3) após processamento pelos métodos de Fujii e DG, respectivamente.

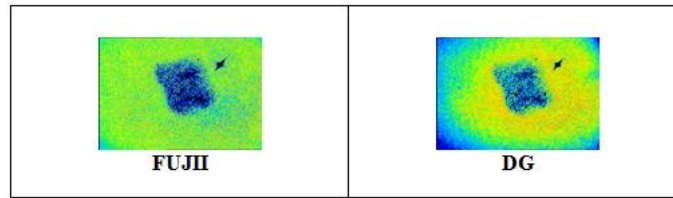


FIGURA 25 Amostra 3: Parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de amido líquido sobre papel branco.

5.2 Análise com filtragem - mesmo material

Na Figura 26 observa-se um conjunto de imagens, em que cada uma é relativa a uma escala (faixa de frequência) após o processamento por Fujii ou DG. A imagem isolada à direita de cada conjunto representa o resultado do processamento por Fujii antes da filtragem. Os números abaixo das imagens identificam as faixas de frequências, sendo as primeiras relativas às altas frequências em direção às baixas frequências.

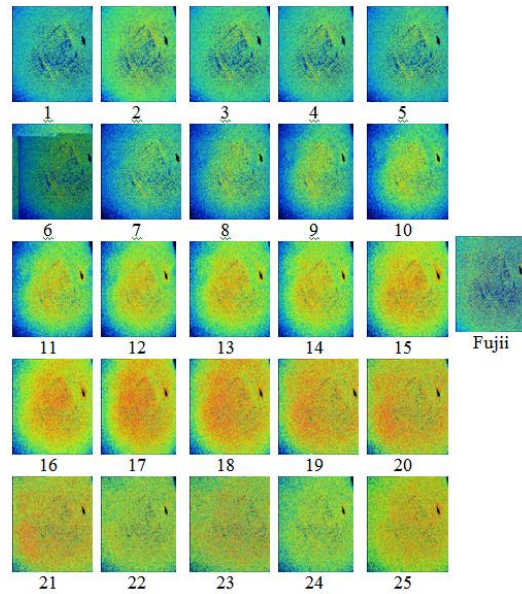


FIGURA 26 Amostra 1: Análise da filtragem de parte de filme de batata em gel, posicionado no centro da amostra de filme de batata líquido e, em baixo, papel branco (Fujii).

Nesse caso, é possível observar que, nas primeiras escalas de frequência (relativas às altas frequências), o material com baixa atividade não é identificado. Todavia, quando se vai em direção às baixas frequências, já é possível observar maior atividade em torno desse material. Fica, então, evidenciada a capacidade da técnica de filtragem em apresentar em destaque apenas o material de baixa atividade em uma determinada faixa de frequência.

O mesmo resultado foi avaliado pela técnica de DG (Anexo I), mas a filtragem não resultou o efeito apresentado pela técnica de Fujii.

Na Figura 27 observa-se o resultado por meio da montagem das linhas centrais das 25 escalas, formando assim uma nova figura, que permite avaliar como as escalas (frequências) se comportaram em uma mesma região, nesse caso com os dois níveis de atividade.

O resultado é referente à amostra 1, em que um filme de fécula de batata em gel está posicionado no centro da placa sobre a parte de filme de batata líquido.

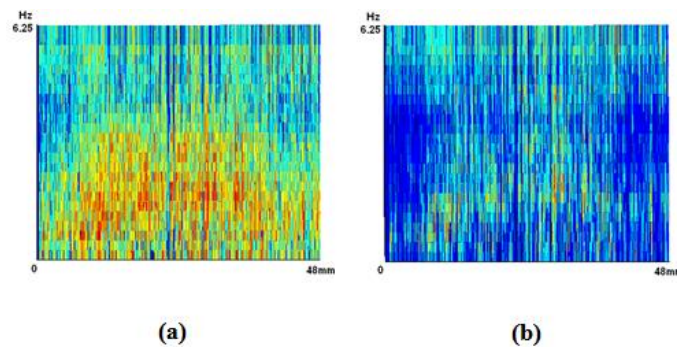


FIGURA 27 27 Linhas centrais das imagens filtradas e analisadas por (a) Fujii e (b) DG, nas escalas de 1 a 25 Hz. Amostra 1.

O resultado apresenta a diferença entre os métodos de Fujii e DG, porém, deixa claro, que é observável a presença de intermediária frequência na região, na qual se encontra o filme menos ativo, ficando clara a definição da área de menor atividade com a área de mais baixa frequência.

Como uma característica da metodologia de Fujii, foi aumentado o resultado da baixa atividade em relação à alta, limitado à parte central de cada linha, que era onde se encontrava o material em gel.

5.3 Análise com filtragem - materiais distintos

Na Figura 28 é possível observar o resultado do processamento dos métodos de Fujii e DG na amostra 3, em que o material de baixa atividade está acima do material de alta atividade. A diferença para os casos anteriores é que esses materiais foram preparados com fécula de batata (menos ativo) e amido de milho (mais ativo).

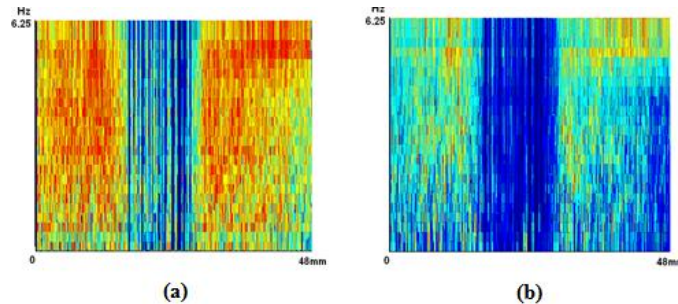


FIGURA 28 Linhas centrais das imagens filtradas e analisadas por (a) Fujii e (b) DG, nas escalas de 1 a 25 Hz. Amostra 3.

Os resultados completos sem o agrupamento das linhas centrais se encontram nos Anexos I e II.

As amostras analisadas permitem a avaliação de casos extremos, em que a identificação de materiais com composições distintas é mais clara, mesmo sem o artifício das filtragens, como se observa na Figura 23, para os processamentos de Fujii e DG. Nesses casos, a identificação foi tão clara que ocupou praticamente todas as frequências, o que leva a questionar a diferença para o caso com os mesmos materiais (Amostra 1).

Uma primeira avaliação é em função do comportamento do amido de milho em estado líquido no domínio da frequência. Esse comportamento pode ser observado em detalhes no Anexo III, em que nas altas frequências existe maior atividade, com redução desta à medida em que se observa em baixas frequências.

A impossibilidade de se observar claramente alguma atividade em baixa frequência é o resultado que mais merece atenção, em particular para o fundo branco abaixo da amostra. Nesse caso, a única hipótese considerada é a da interferência negativa produzida pelos sinais dos dois materiais.

Esse efeito foi distinto quando o fundo da placa de Petri estava com um anteparo preto, como será visto a seguir.

5.4 Análise da influência do fundo branco e preto

Para a análise da influência do fundo no resultado, recorre-se novamente à figura montada com a linha central de cada imagem que representava a faixa de frequência isolada.

Nesse caso, ao analisar os pares de amostras com fundo branco e preto, pode-se concluir que o fundo preto permitiu a observação do material de baixa atividade nas baixas e altas frequências, o que não foi possível com tanta intensidade em relação ao fundo branco. Na Figura 29 é possível observar o resultado desses pares e a explicação para essa maior visualização é a redução da influência dos feixes refletidos vindos do fundo. Assim, quanto menor a reflexão no fundo, menor a influência de luz proveniente de dispersores de alta atividade se somando ao retorno da luz proveniente de dispersores de baixa atividade. E essa situação se acentua para o caso do filme líquido de amido de milho, cuja constituição apresenta maior atividade que a do filme de fécula de batata, que tem uma constituição mais gelatinosa.

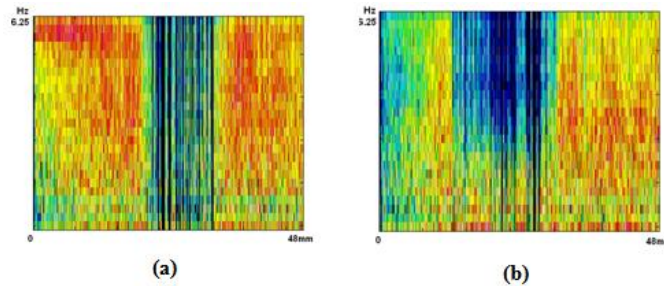


FIGURA 29 Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência da amostra 3, (a) fundo branco e (b) fundo preto.

Pela análise da Figura 30, relativa ao gel de batata em estado mais liquefeito e o gel de batata em estado mais firme, verifica-se que o fundo preto colocado embaixo da amostra permitiu a observação do material de baixa atividade nas baixas frequências, o que não foi possível com tanta intensidade quando o fundo era branco. Nesse caso, com o fundo preto, foi possível, como observado na análise anterior, distinguir o material de baixa atividade nas altas frequências. O papel branco, ao refletir mais a luz no fundo do material, permite que os sinais sejam espalhados para as outras partes do material, reduzindo a definição das áreas de distintas atividades.

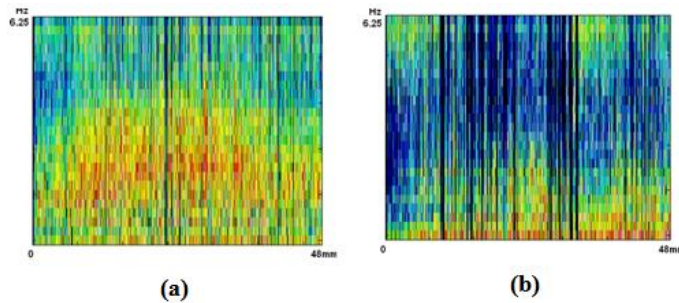


FIGURA 30 Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência da amostra 1, (a) fundo branco e (b) fundo preto.

5.5 Análises de profundidade com filtragem

As amostras de 5 a 8 apresentaram também resultados que permitem ratificar as teses defendidas para os casos das amostras anteriores, bem como resultados que abrem espaço para novas análises, no que diz respeito à possibilidade de relacionar a frequência com a profundidade da amostra. Este é o caso das amostras de números 5 a 8, nas quais disposições intermediárias de filme foram colocadas e os resultados provenientes das figuras das linhas das imagens para as frequências isoladas apresentaram interpretações que podem levar à relação entre profundidade e frequência. Todavia, como estes são resultados preliminares e como os resultados anteriores não demonstraram essa relação, fica o apontamento para novas investigações.

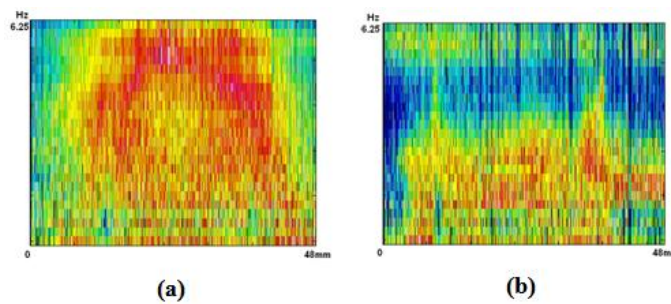


FIGURA 31 Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência com (a) fundo branco e (b) fundo preto.

As imagens A e B apresentam resultados distintos, sendo que com o fundo preto o resultado fica mais significativo já que se esperava uma maior atividade em frequência

mais baixas relacionadas ao amido seco. A observação de atividades maiores em faixas intermediárias se deve à interação do amido seco com o gel. Nesse caso, a frequência e posição do amido seco não foram relacionadas.

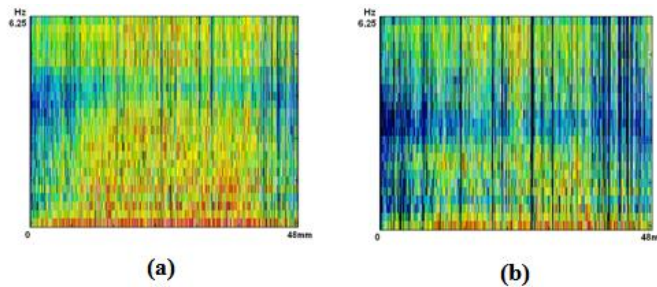


FIGURA 32 Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência com (a) fundo branco e (b) fundo preto.

Por outro lado, na Figura 30, a camada de amido seco colocada no interior do filme de batata líquido (material ativo) apresentou resposta de atenuação nas frequências intermediárias. Da mesma forma, como o experimento é preliminar, fica mais um apontamento para trabalhos futuros, evidenciando a complexidade na análise dos resultados no domínio da frequência.

5.6 Análise de Sensibilidade

Na Figura 33 observa-se o resultado visto por meio da montagem das linhas centrais das 25 escalas filtradas e analisadas por Fujii, formando assim uma nova figura, em que o material de alta atividade se encontra acima do material de baixa atividade. Verifica-se que o fundo branco colocado embaixo da amostra permitiu a observação do material de alta atividade, o que não foi possível de forma clara com o fundo preto.

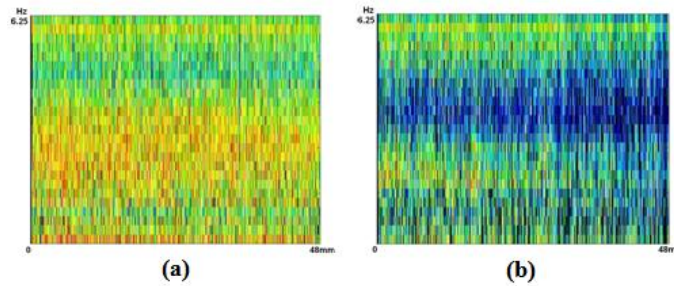


FIGURA 33 Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência com (a) fundo branco e (b) fundo preto.

Na análise da Figura 34 observa-se o resultado das imagens processadas pelo método de Fujii, em que a baixa atividade está acima de um meio de alta atividade. Pode-se observar que para o papel preto, bem como para o papel branco, colocado em baixo da placa, não foi possível evidenciar a baixa atividade em um meio de maior atividade. Isso ocorre pelo fato do gel, que representa a baixa atividade, apresentar atividade de água (muito ativo) acima daquelas realizadas nos experimentos iniciais (ou seja, não muito seco) e também por ter uma espessura muito fina. No anexo IV, esse detalhe pode ser melhor observado, evidenciando a complexidade dessas análises e, nesse momento, um limite de sensibilidade.

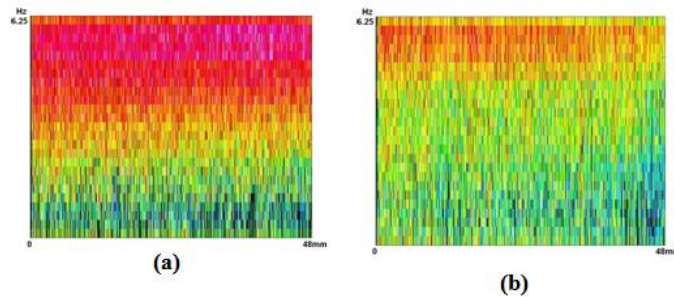


FIGURA 34 Vista das linhas centrais das diversas faixas de frequência com (a) fundo branco e (b) fundo preto.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram desenvolvidos os experimentos, pode-se concluir que:

- as amostras de biofilme elaborado com mesmo material, no qual a baixa atividade se encontra em um meio de alta atividade após a filtragem pela transformada de *wavelets*, usando o método Fujii e DG, apresentam resultados mais significativos em determinadas faixas de frequências com o nível de atividade do material, independente da ordem de disposição das amostras;
- as amostras de biofilme elaboradas com materiais diferentes, em que a baixa atividade se encontra em um meio de alta atividade, são melhor identificadas, utilizando o mesmo processamento de filtragem;
- a utilização dos fundos preto e branco embaixo das amostras de biofilme mostra resultados diferentes em função da composição das amostras e do tipo de material. Em especial, o fundo preto auxilia, em alguns casos, a melhor identificação para materiais diferentes, enquanto o fundo branco permite resultados de melhor interpretação em amostras com o mesmo material. Assim, o fundo interfere nos resultados quanto ao método aplicado;
- com o método Fuji foi possível uma melhor visualização do que o método DG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, J. S. **Elaboração e caracterização de filmes finos de amido de milho e parafina**. 2009. 136 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ARIZAGA, R.; CAP, N. L.; RABAL, H.; TRIVI, M. Display of the local activity using dynamical speckle patterns. **Optical Engineering**, Redondo Beach, v. 41, n. 2, p. 287-294, 2002.
- ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. **Optics and Laser Technology**, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.
- BENGTSSON, M.; KOCH, K.; GATENHOLM, P. Surface octanoylation of high-amylose potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 54, n. 1, p. 1-11, Oct. 2003.
- BERGKVIST, A. **Biospeckle-based study of the line profile of light scattered in strawberries**. 1997. 60 p. Dissertation (Master of Science) - Faculty of Technology at Lund University, Lund.
- BOLZAN, M. J. A. Transformada em ondeleta: uma necessidade. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 563-567, 2006.
- BRAGA JÚNIOR, R. A. **Bio-speckle**: desenvolvimento de uma tecnologia aplicada a análise de sementes. 2000. 17 p. Dissertação (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- BRAGA, R. A.; HORGAN, G. W.; MIRON, D.; RABALO, G. F.; BARRETO FILHO, J. B. Biological feature isolation by wavelets in biospeckle laser images. **Computers and Electronics in Agriculture**, New York, v. 58, n. 2, p. 123-132, Sept. 2007.
- BRAGA, R. A.; RABELO, G. F.; SANTOS, E. F.; MACHADO, J. C.; ARIZAGA, R.; RABAL, H. J.; TRIVI, M. Assessment of seed viability by laser speckle techniques. **Biosystems Engineering**, London, v. 4, p. 465-469, 2005.
- BRAGA, R. A.; SOUZA, A.; VIEIRA, M. das G.; PINHO, G. C.; ÈDILA, V. R. V.; RABAL, H. J.; FABBRO, DAL, I. M. Potencial do bio-speckle laser para avaliação da viabilidade de sementes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 645-649, maio/jun. 2001.

BRIERS, J. D.; WEBSTER, S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non scanning full field technique for monitoring capillary blood flow. **Journal of Biomedical Optics**, Irvine, v. 1, n. 2, p. 174-179, 1996.

CEREDA, M. P. Amidos modificados. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 28-30, jan./jun. 1996.

CIACCO, C. F.; CRUZ, R. **Fabricação do amido e sua utilização**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. 152 p.

DAINTY, J. C. **Laser speckle and related phenomena**. Berlin: Springer Verlag, 1975.

DAUBECHIES, C. I.; GILBERT, C. A. **"Harmonic analysis, wavelets, and applications."** Providence: American Mathematical Society, 1998.

FUJII, H.; NOHIRA, K.; YAMAMOTO, Y.; IKAWA, H.; OHURA, T. Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing, part 1. **Applied Optics**, New York, v. 26, n. 24, p. 5321-5325, Dec. 1987.

GOMES, J.; VELHO, L.; GOLDENSTEIN, S. Wavelets: teoria, software e aplicações. In: COLÓQUIO BRASILEIRO DE MATEMÁTICA, 21., 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: IMPA, 1997.

GONIK, M. M.; MISHIN, A. B.; ZIMNYAKOV, D. A. Visualization of the blood microcirculation parameters in human tissues by using the time- integrated dynamic speckle analysis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 972, p. 325-330, Oct. 2002.

GOODMAN, J. W. Speckle phenomena in optics: theory and applications. **Journal of Statistical Physics**, Englewood, v. 130, n. 2, p. 413-414, 2007.

GRAPS, A. An introduction to wavelets. **IEEE Computational Science and Engineering**, Los Alamitos, v. 2, n. 2, p. 1-18, 1995.

HECHT, E. **Optics**. 4. ed. Massachusetts: A. Wesley, 2001. 680 p.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 66-77, jan./mar. 2008.

JANSSON, A.; THUVANDER, F. Influence of thickness on the mechanical properties for starch films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 56, n. 4, p. 499-503, July 2004.

KAISER, G. **A friendly guide to wavelets**. Berlin: Birkhäuser Boston, 1994.

LEACH, H. W. Gelatinization of starch. In: WHISTLER, R. L.; PASCHALL, E. F. (Ed.). **Starch: chemistry and technology**. New York: Academic, 1965. v. 1, p. 289-307.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Botucatu, v. 27, n. 3, p. 579-588, set. 2007.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 56, n. 4, p. 129-135, July 2004.

MALLAT, S. G. **A wavelet tour of signal processem**. San Diego: Academic, 1999.

MISITI, M.; MISITI, Y.; OPPENHEIM, G.; POGGI, J-M. **Wavelet toolbox: for use Matlab - user guide version 3**. Natick: The MathWorks, 2005.

PAJUELO, M.; BALDWINA, G.; RABAL, H.; CAP, N.; ARIZAGA, R.; TRIVI, M. Bio-speckle assessment of bruising in fruits. **Optics and Lasers in Engineering**, London, v. 40, n. 1/2, p. 13-24, July/Aug. 2003.

PASSONI, L. I.; DAI PRA, A.; RABAL, H.; TRIVI, M.; ARIZAGA, R. Dynamic speckle processing using wavelets base entropy. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 246, n. 1/3, p. 219-228, Feb. 2005.

PASSONI, L. I.; RABAL, H.; ARIZMENDI, C. M. Characterizing dynamic speckle time series with the Hurst coefficient concept. **Fractals**, London, v. 12, n. 3, p. 319-30, 2004.

RABAL, H. J. Laser na agricultura, energia, automação e instrumentação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 27., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Lavras: SBEA, 1998. p. 151-183.

RABAL, H. J.; BRAGA JÚNIOR, R. A. **Dynamic laser speckle and applications**. New York: Taylor and Francis, 2008. 304 p.

RABELO, G. F. **Avaliação da aplicação do speckle dinâmico no monitoramento da qualidade da laranja**. 2000. 153 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RINDLAV-WESTLING, A.; STANDING, M.; HERMANSSON, A.; GATENHOLM, P. Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amilopectin films.

Carbohydrate Polymers, Barking, v. 36, n. 2/3, p. 217-224, July 1998.

SILVA, W. A. **Elaboração e caracterização de biofilmes obtidos de diferentes fontes de amido**. 2005. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SIROHI, R. S. **Speckle metrology**. New York: CRC, 1993.

THIRÉ, R. M. S. M.; SIMÃO, R. A.; ANDRADE, C. T. High resolution imaging of the microstructure of maize starch films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 54, n. 2, p. 149-158, Nov. 2003.

TORRENCE, C.; COMPO, G. P. A practical guide to wavelet analysis. **Bulletin of the American Meteorological Society**, Boston, v. 79, n. 1, p. 61-78, Jan. 1998.

VILELA, E. R.; FERREIRA, M. E. Tecnologia de produção e utilização do amido de mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 69-73, jan. 1987.

ANEXOS

ANEXO		Página
FIGURA 1	Parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de fécula de batata líquido sobre papel branco (Método DG)	56
FIGURA 2	Parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de amido líquido sobre papel branco (Método DG)	57
FIGURA 3	Parte de biofilme de fécula de bata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de amido líquido sobre papel branco	58
FIGURA 4	Biofilme de amido líquido sobre papel branco (Método Fujii)	59
FIGURA 5	Biofilme de fécula de batata em estado líquido e parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da placa sobre a camada líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel branco ..	60
FIGURA 6	Biofilme de fécula de batata em estado líquido e parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da placa sobre a camada líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel preto (Método Fujii)	61

ANEXOS

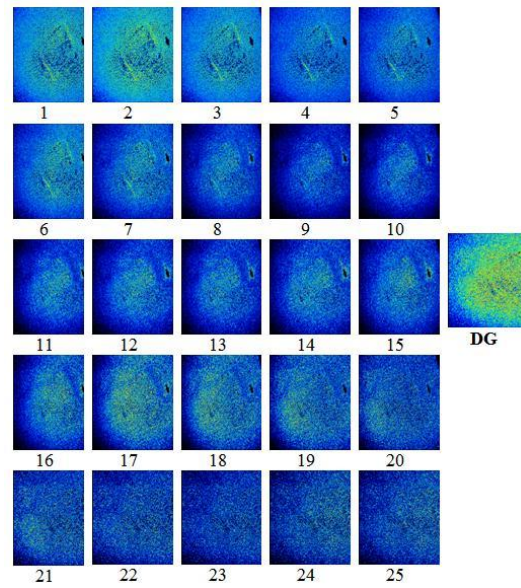


FIGURA 1 Parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de fécula de batata líquido sobre papel branco (Método DG).

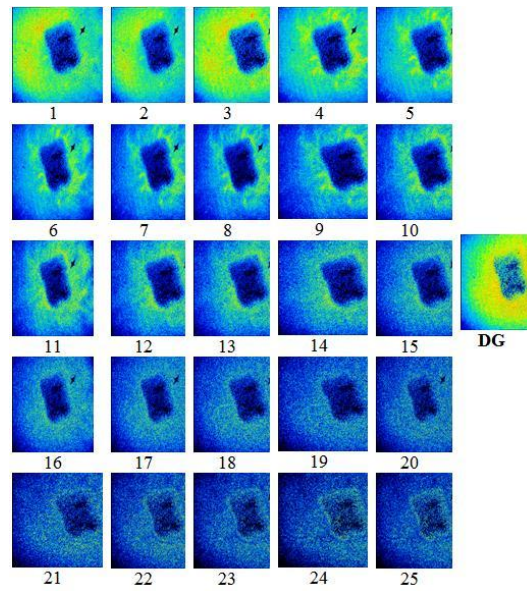


FIGURA 2 Parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de amido líquido sobre papel branco (Método DG).

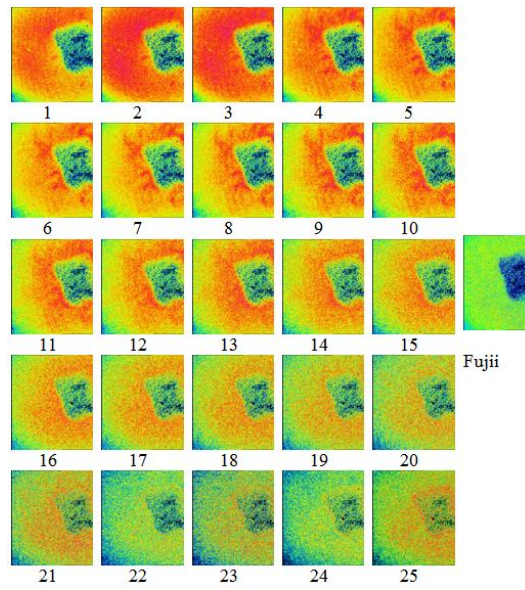


FIGURA 3 Parte de biofilme de fécula de bata em gel posicionado no centro da amostra de biofilme de amido líquido sobre papel branco (Método Fujii).

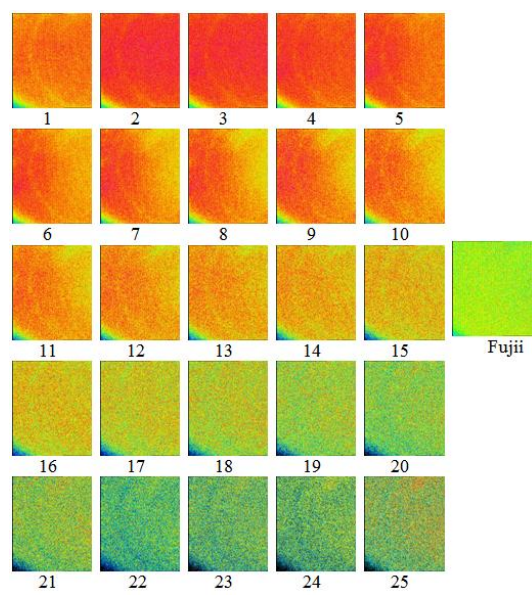


FIGURA 4 Biofilme de amido líquido sobre papel branco (Método Fujii).

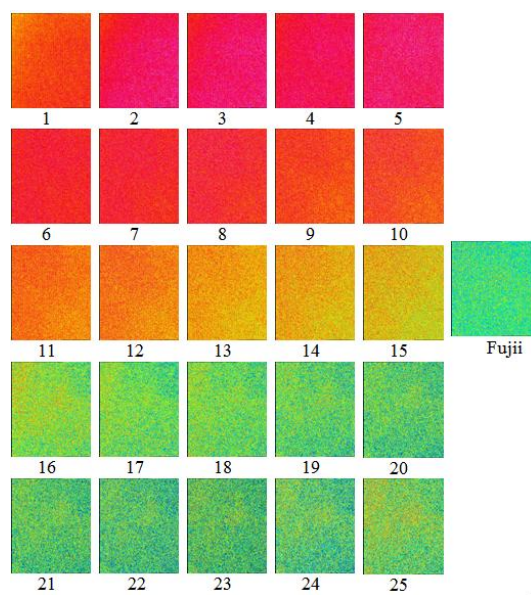


FIGURA 5 Biofilme de fécula de batata em estado líquido e parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da placa sobre a camada líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel branco (Método Fujii).

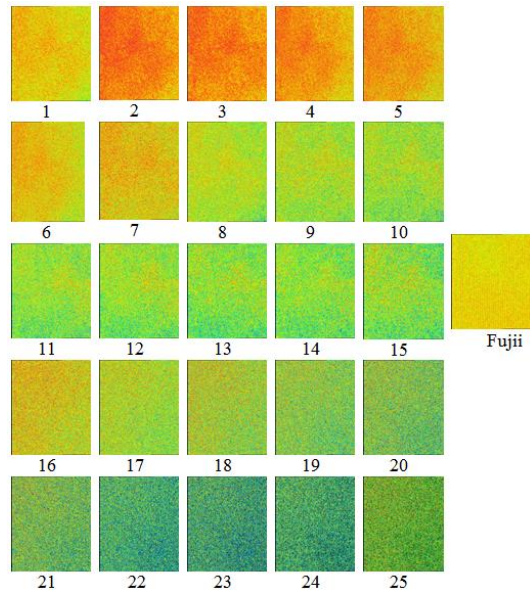


FIGURA 6 Biofilme de fécula de batata em estado líquido e parte de biofilme de fécula de batata em gel posicionado no centro da placa sobre a camada líquida. Abaixo da amostra de biofilme foi colocado papel preto (Método Fujii).