



KLEBER MARIANO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO
PARA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO
BIOSPECKLE EM CULTURA DE TECIDOS**

LAVRAS - MG

2011

KLEBER MARIANO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO
PARA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO
BIOSPECKLE EM CULTURA DE TECIDOS**

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

Orientador

Dr. Roberto Alves Braga Júnior

Coorientadores

Dr. Moacir Pasqual

Dr. Lionel Dupuy

LAVRAS - MG

2011

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

Ribeiro, Kleber Mariano.

Desenvolvimento de um protocolo para aplicação da técnica do biospeckle em cultura de tecidos / Kleber Mariano Ribeiro. –
Lavras: UFLA, 2011.

115 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Roberto Alves Braga Júnior.

Bibliografia.

1. Raízes. 2. Speckle dinâmico. 3. Análise espectral. 4. Meios de cultura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 621.367

KLEBER MARIANO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO
PARA APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO
BIOSPECKLE EM CULTURA DE TECIDOS**

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

APROVADA em 08 de fevereiro de 2011.

Dr. Moacir Pasqual UFLA

Dr. Evaristo Mauro de Castro UFLA

Dra. Thelma Sáfadi UFLA

Dr. Roberto Alves Braga Júnior
Orientador

LAVRAS - MG

2011

*A Luiz, meu pai, e à Ivone, minha mãe.
Pessoas maravilhosas e exemplos para mim.*

À Kátia e ao Kássio, meus irmãos, pelo companheirismo e carinho.

À Daniele, minha sobrinha, pelas brincadeiras e diversões.

*E à minha namorada, Ana Carolina, pelo incentivo
e companheirismo durante essa caminhada.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo o que sou e tudo o que tenho, por estar sempre presente em cada passo dessa caminhada.

Ao meu pai, Luiz Franz Ribeiro, pelo apoio, confiança, carinho, conselhos e também pelos puxões de orelha.

À minha mãe, Ivone Aparecida Ribeiro, pela dedicação, amor, pela compreensão e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Kátia Daniela Ribeiro e Kássio Mariano Ribeiro, pela convivência, apoio e amizade.

À minha companheira, Ana Carolina Lopes, que esteve sempre do meu lado, paciente, compreensiva, desejando o melhor para mim.

À minha sobrinha, Daniele Ribeiro Alves, pelas brincadeiras, momentos de descontração.

A todos os meus familiares pelo exemplo de luta e vida.

A todos os meus colegas de Carmo da Cachoeira pela amizade, convívio, prontidão, atenção, brincadeira.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Programa de Pós-Graduação, pela oportunidade de realização do curso e ao CNPq pela concessão da bolsa que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao professor Roberto Braga pela paciência, confiança, incentivo, amizade, apoio e ajuda, obrigado.

Aos professores Bruno Barbosa e Giovanni Rabelo pelas sugestões e ajuda no trabalho desenvolvido.

À Cássia Nobre e à professora Thelma Sáfadi pelos auxílios com as wavelets.

Aos professores Moacir Pasqual e Evaristo Mauro, pela ajuda, explicações e apoio ao longo de todo o mestrado.

Ao Vantuil pelas ideias de trabalho e pelo auxílio com os meios de cultura.

Ao Sr. Antônio, à Bianca, ao André, Márcio Canela, Robinho, Michel, José Nozela, Baiano, Tampico, Sr. Cardoso, Isis e demais amigos do curso de pós-graduação e graduação da UFLA pela ajuda nos trabalhos desenvolvidos, paciência, momentos de descontração, etc. Valeu!

À Greice, secretária da Pós-Graduação, pela ajuda e paciência.

Agradeço a todos os professores e técnicos do programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola que me proporcionaram conhecimento no decorrer desse período.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram de alguma forma para o cumprimento desta etapa da minha vida.

Obrigado!

RESUMO

As raízes são órgãos da planta responsáveis pela fixação dos vegetais no solo, absorção e condução de água e sais minerais. Entender o comportamento do sistema radicular é fundamental para o desenvolvimento de novas técnicas que melhorem a produção de alimentos, todavia a maioria das raízes é subterrânea, o que torna trabalhoso os estudos envolvendo esses órgãos. A técnica da cultura de tecidos permite o desenvolvimento de explantes em meios acondicionados, com os nutrientes necessários ao seu crescimento. Esse método pode ser utilizado em estudos envolvendo sistemas radiculares, acrescentando informações visuais importantes para descrever o comportamento desses órgãos e possibilitando a aplicação de técnicas ópticas. O biospeckle é um padrão de interferência formado quando um material biológico é iluminado por uma luz coerente, permitindo o acompanhamento da atividade biológica de tecidos vegetais e animais. O objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento do sistema radicular em meios de cultura durante o seu crescimento por meio da técnica óptica do biospeckle no domínio da frequência. Os padrões de interferência foram coletados em configurações experimentais distintas e processados pelas técnicas de Fujii e DG antes e após a filtragem das imagens com a transformada de wavelets. Foram analisadas as funções wavelets de Daubechies e Morlet na decomposição dos sinais. Os resultados mostraram que foi possível identificar regiões de atividades biológicas distintas no sistema radicular ao longo do seu crescimento. Observou-se também o comportamento das raízes quando estas identificam um bloqueio para o seu crescimento. Em alguns momentos, ocorreu uma paralisação da atividade biológica das raízes sendo observado também que as raízes se anteciparam aos obstáculos interpostos ao seu crescimento, mudando sua trajetória em busca de alternativas. As análises em frequência apresentaram um ganho de informações sobre a atividade biológica, em que as altas atividades se manifestaram nas altas frequências e baixas atividades nas baixas frequências. A adoção das wavelets Daubechies e Morlet, por meio de análises gráficas, revelou-se limitada, podendo induzir a interpretações errôneas e carecendo de análises numéricas.

Palavras-chave: Raízes. Speckle dinâmico. Análise espectral.

ABSTRACT

The plant roots are organs responsible for to fix the plant in the soil, as well as for to absorption and conduction of water and minerals. Understanding the behavior of the root system is important to the development of new techniques that upgrade food production, but most roots are underground, which makes laborious the studies involving these organs. The tissue culture technique allows the development of explants in pack means with the nutrients necessary for their growth. This method can be used in studies involving root systems, adding important visual information to describe the behavior of those tissues and allowing the application of optical techniques. The biospeckle is an interference pattern formed when a biological material is illuminated by coherent light, allowing the monitoring of the biological activity of plant and animal tissues. This study objectified to analyze roots in tissue culture during its growth through the biospeckle technique in the frequency domain. The interference patterns were collected in different experimental settings and processed by Fujii and DG techniques before and after filtering the images with the wavelet transform. It was analyzed the functions of Daubechies and Morlet wavelets in the decomposition of the signals. Results showed that it was possible to identify areas of distinct biological activities in root tissue during its development. It was also observed that the behavior of the roots when they identify a obstruction for their growth. In a few moments, there was a paralyzing of the biological activity of roots and it was also observed that the roots anticipated themselves to the obstacles interposed, changing its growth trajectory in search of alternatives. The frequency analysis showed a gain of information on biological activity, where high activities were manifested in the high frequencies and low activity at low frequencies. The adoption of the Daubechies and Morlet wavelets through graphical analysis proved to be limited, and they may lead to misinterpretations, and needing of numerical analysis.

Keywords: Roots. Dynamic speckle. Spectral analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Padrão Speckle formado por uma folha branca de papel iluminada com um laser.....	21
Figura 2	Meio de cultura com dois estratos	41
Figura 3	Janela de análise	44
Figura 4	Arranjo experimental para coleta dos dados.....	45
Figura 5	Imagem processada pelo método de Fujii na configuração back scattering.....	47
Figura 6	Imagem processada pelo método de Fujii na configuração forward scattering.....	48
Figura 7	Imagem Fujii, utilizando um polarizador na frente da objetiva da câmera na configuração back scattering	48
Figura 8	Imagem Fujii, utilizando um polarizador na frente da objetiva da câmera na configuração forward scattering	49
Figura 9	Imagens Fujii's com a variabilidade espacial da atividade biológica das raízes ao longo do seu crescimento	50
Figura 10	Imagens DG's com a variabilidade espacial da atividade biológica do sistema radicular durante seu crescimento.....	52
Figura 11	Imagens Fujii, ilustrando a paralisação da atividade biológica das raízes.....	55
Figura 12	Matriz 3S da atividade meristemática.....	58
Figura 13	Análise em frequência, utilizando a wavelet de Morlet.....	62
Figura 14	Análise em frequência, utilizando a wavelet Daubechies.....	63
Figura 15	Níveis de cinza ao selecionar uma linha de uma imagem Daubechies (esquerda) e uma imagem Morlet (direita).....	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Diagrama esquemático da transformada de wavelets	27
Gráfico 2 Ação do fator de escala sobre uma função wavelets. Baixa escala (a) e alta escala (b)	28
Gráfico 3 Translação de uma wavelets	29
Gráfico 4 Análise multirresolução da função Wavelets.....	32
Gráfico 5 Periodograma resultante da transformada discreta de wavelets	33
Gráfico 6 Gráfico da função mãe da wavelets Daubechies, 'dbN', em diferentes ordens.....	34
Gráfico 7 A função Wavelets de Morlet.....	36
Gráfico 8 Matriz 3S de um biofilme, utilizando o método de Fujii na análise gráfica	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores empíricos de algumas variáveis utilizadas no processo de reconstrução do sinal.....	31
Tabela 2	Concentração dos nutrientes para o preparo do meio de cultura “MS” - Murashige e Skoog (1962).....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Cultura de tecidos	17
3.2	Sistema radicular	18
3.3	O Laser	19
3.3.1	Considerações gerais.....	19
3.4	O Fenômeno do Speckle dinâmico	21
3.4.1	Speckle	21
3.4.2	Speckle dinâmico	22
3.5	Técnicas de processamento das imagens do Biospeckle laser	23
3.5.1	Método de Fujii	23
3.5.2	Método de diferenças generalizadas (DG).....	24
3.6	Wavelets.....	25
3.6.1	Considerações gerais.....	25
3.6.2	Transformada de Wavelets	27
3.6.2.1	Transformada contínua de Wavelets	29
3.6.2.2	Transformada discreta de Wavelets.....	31
3.6.3	Tipos de funções Wavelets	33
3.6.3.1	Wavelet de Daubechies	34
3.6.3.2	Wavelet de Morlet.....	35
3.6.4	Teorema da amostragem.....	36
3.6.5	Relação escalas-frequências	37
3.6.6	Matriz 3S – Space Spectral Speckle	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Meios de cultura.....	40
4.2	Obtenção dos dados	44
4.3	Análise e interpretação dos dados	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Configuração experimental.....	47
5.2	Atividade biológica do sistema radicular.....	49
5.3	Análise em frequência da atividade biológica do sistema radicular	57
5.4	Análise das wavelets Morlet e Daubechies aplicadas ao speckle dinâmico.....	61
6	CONCLUSÃO	66
6.1	Trabalhos futuros	67

REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	74

1 INTRODUÇÃO

A estimativa da população mundial em 2030 é de 8,3 bilhões de pessoas, apresentando um aumento de 21,16% nos próximos 20 anos, sendo que a demanda por alimentos e energia devem aumentar em 50% e a demanda por água potável deve aumentar em 30% (INTERNACIONAL UNITED STATES CENSUS BUREAU, 2010).

As previsões quanto à demanda por alimentos revelam a necessidade de aumentos significativos na produção, sem que seja necessária a abertura de novas áreas agricultáveis, em especial evitando a redução de biosistemas nativos. Esse desafio de aumento de produção sem aumento de área agricultável só pode ser conseguido com o aumento da produtividade, e dessa forma, um grande desafio é conhecer a arquitetura do sistema radicular, uma vez que o tamanho e a distribuição das raízes dentro do volume de terra são algumas características importantes para aumentar a eficiência das raízes no suporte das plantas e na captura de água e nutrientes do solo.

A maioria dos sistemas radiculares é subterrânea e esse fato torna trabalhosos os estudos desses órgãos, fazendo com que experiências para o estudo do crescimento de raízes utilizem técnicas destrutivas e invasivas.

O estudo do sistema radicular em meios de cultura tem sido uma importante ferramenta, pois possibilita o desenvolvimento de explantes em meios acondicionados em tubos de ensaio, e essa configuração permite o acompanhamento visual do crescimento da planta e de sua respectiva raiz, o que abre espaço para a adoção de técnicas ópticas e análise de imagens durante o monitoramento da amostra.

O speckle dinâmico, que também é conhecido como biospeckle quando aplicado em materiais biológicos, é uma técnica óptica que processa os padrões de interferência formados quando um material é iluminado por uma luz coerente.

É uma técnica não destrutiva e que vem sendo validada como um método de quantificação da atividade biológica em tecidos vegetais, sendo que, do ponto de vista do biospeckle, a atividade biológica é o resultado de movimentos moleculares e de estruturais do material biológico.

A análise do biospeckle se dá por técnicas de processamento de imagens e tratamento estatístico, e que pode ser uma análise gráfica da variação temporal dos padrões de interferência ou uma análise numérica. As técnicas gráficas são realizadas por meio do processamento de imagens que resultam em mapas, indicando a variabilidade espacial da atividade biológica. Além da classificação gráfica e numérica, a técnica do biospeckle pode ser também dividida quanto à análise no domínio do tempo ou no domínio da frequência. As análises no domínio da frequência de dados provenientes do biospeckle tem sido uma alternativa para muitas aplicações, permitindo a filtragem e contraste de imagens além da busca por marcação em frequências de fenômenos que contribuem para a formação dos padrões de interferência no tempo.

A seguir são descritas as metas deste trabalho, com os objetivos gerais e específicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo para analisar o comportamento do crescimento de raízes em meio de cultura, usando o biospeckle.

2.2 Objetivos específicos

- a) propor uma metodologia para monitorar e diferenciar áreas de maior e menor atividade biológica em uma ponta de raiz;
- b) analisar o comportamento do sistema radicular ao aproximar de uma camada de maior resistência à penetração;
- c) validar a metodologia para o acompanhamento global do crescimento das raízes;
- d) analisar diferentes técnicas de filtragens e definir marcadores de frequência;
- e) elaborar um vídeo ilustrando o comportamento dinâmico da atividade biológica no sistema radicular ao longo de seu crescimento.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grande aplicação na agricultura, na qual explantes são isolados de um organismo vegetal, desinfetados e cultivados assepticamente, por períodos indeterminados em um meio de cultura apropriado (ANDRADE, 2002).

Os explantes são segmentos de tecidos ou órgãos vegetais utilizados para iniciar uma cultura *in vitro*, podendo ser fragmentos de folhas, de raízes, de caule ou de qualquer tecido que responda às induções no meio de cultura com vista à regeneração *in vitro* (TORRES et al., 2000).

Esses pequenos fragmentos de tecidos vivos são inseridos em um meio contendo todos os nutrientes necessários ao crescimento da planta e que podem ser líquidos ou sólidos. Os meios líquidos possuem a vantagem de serem mais homogêneos, de fácil preparo e de menor custo que o meio sólido, entretanto, exige algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante. No caso do meio sólido, é necessária a utilização de meios solidificantes (como, por exemplo, o ágar) nos quais as concentrações ótimas de sais são superiores às concentrações ótimas para o crescimento em meio líquido (PASQUAL, 2001) e possibilita analisar o crescimento da planta em meios com diferentes resistências mecânicas a penetração.

O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com os nutrientes necessários ao crescimento, e convém registrar que para cada situação – explante, espécie, cultivar, objetivo – o meio mais adequado e eficiente é variável (PASQUAL, 2001).

A cultura de tecidos pode ser empregada no melhoramento e multiplicação de material genético, troca e avaliação do germoplasma e

produção de mudas livres de vírus (FERREIRA et al., 1998) e inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos nesse contexto, destacando a avaliação das brotações de videira “VR043-43” em diferentes meios de cultura (MACHADO et al., 2007); desenvolvimento de um protocolo de germinação e propagação *in vitro* para o porongo (*Lagenaria siceraria*) (BISOGNIN et al., 2008); estudo da produção de mudas de mamona (*Ricinus communis L.*) em tubetes de diferentes capacidades volumétricas (AVELAR et al., 2006); análise do comportamento da atividade biológica nos sistemas radiculares de mudas de café (*Coffea arabica*) e eucalipto (*Eucalyptus gradis*) por meio da técnica do biospeckle (BRAGA et al., 2009); avaliação de meios de cultura que melhor favorecessem a produção de conídios do fungo *Botryotinia ricini*, causador da doença mofo cinzento em mamoneiras (CHAGAS et al., 2009); e vários outros trabalhos.

Uma característica da técnica de tecidos de cultura é a possibilidade quase absoluta de controle do crescimento das plantas (PASQUAL, 2001) e essa peculiaridade a torna uma importante ferramenta em pesquisas envolvendo sistemas radiculares, com a vantagem de ser um método não invasivo e permitir informações visuais do órgão em estudo.

3.2 Sistema radicular

As raízes são os órgãos do corpo da planta responsáveis pela fixação da planta no substrato, absorção e condução da água e sais minerais (CUTTER, 1987). Em geral são subterrâneas, entretanto há sistemas radiculares aéreos.

Entender o que acontece abaixo da superfície do solo, principalmente com relação ao crescimento e à distribuição de raízes no perfil, é uma árdua tarefa (VASCONCELOS et al., 2003), entretanto esses estudos são de suma importância para a criação de uma agricultura mais eficiente e o biospeckle é

uma técnica que pode contribuir para maiores esclarecimentos sobre esses órgãos, com a vantagem de ser um método não invasivo.

Diversos trabalhos ressaltam a importância do sistema radicular como fator para uma agricultura mais eficiente. Bengough et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes tensões físicas do solo sobre o sistema radicular durante o processo de colheita e analisaram o crescimento e a dinâmica de resposta da raiz às mudanças das condições físicas de terra; Borges et al. (2008) analisaram a distribuição do sistema radicular da bananeira Prata-Anã em duas frequências (3 e 15 dias) de fertirrigação com uréia; Garcia et al. (2009) avaliaram o crescimento aéreo e radicular do arroz submetido a diferentes doses de fósforo na presença e ausência de bioestimulante, dentre outros.

3.3 O Laser

3.3.1 Considerações gerais

A palavra laser é uma sigla cujo significado é Light Amplification by the Stimulated Emission Radiation (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação), e consiste de uma fonte de luz com características únicas. O laser possui propriedades especiais que o tornam um excelente instrumento de uso científico e tecnológico (BAGNATO, 2001).

O laser sempre foi visto como uma ferramenta muito complexa e suas aplicações ficaram inicialmente restritas a pesquisas realizadas por físicos. Por se tratar de um instrumento muito útil, este foi se adaptando aos desenvolvimentos tecnológicos nas mais diversas áreas e passou a ser comercialmente desenvolvido para aplicações simples e complexas. O seu uso vai desde a caneta laser, para servir de apontadora em palestras, passando pelas

aplicações na medicina, na indústria, nas áreas de corte de chapas e de precisão, nas telecomunicações por fibra óptica, até a área militar (HECHT, 2001).

A alta direcionalidade, a alta intensidade do feixe de luz, a capacidade de controle da cor e da intensidade, a coerência e a quase-monocromaticidade são algumas das características que estimularam o uso do laser (BRAGA JÚNIOR, 2000).

A alta direcionalidade é resultado da propagação das ondas que constituem o feixe, em uma mesma direção e com o mínimo de dispersão e que é obtida durante a amplificação da luz pelas cavidades ressonantes de um laser (BAGNATO, 2001).

Por outro lado, a quasi-monocromaticidade do feixe de luz está relacionada com a emissão de fótons em uma faixa estreita do espectro, que segundo Bagnato (2001), é uma importante característica em espectroscopia e em outras áreas de pesquisa que requerem luz com uma energia determinada. De forma semelhante, a cor do feixe laser está relacionada a um comprimento de onda que é selecionado e amplificado pela óptica interna e pela natureza do material estimulado, conforme descrito por Hecht (2001).

A coerência é uma importante característica da luz emitida por um laser e que permite muitas aplicações. Uma luz coerente é uma luz formada por ondas de mesma frequência, fase e direção, e didaticamente são divididas em coerência espacial e coerência temporal. Segundo Hecht (2001), a coerência espacial está relacionada diretamente com a direção do feixe de luz e corresponde à área em que a luz do laser é capaz de se manter coerente, e a coerência temporal é um intervalo sobre o qual se pode prever a fase de uma onda luminosa em um dado ponto do espaço.

Na agricultura, a aplicação do laser vem ganhando espaço por meio da técnica denominada biospeckle, um método que vem sendo utilizado na

quantificação da atividade biológica em tecidos de plantas (RABAL; BRAGA, 2008).

3.4 O Fenômeno do Speckle dinâmico

3.4.1 Speckle

O speckle é um fenômeno óptico que ocorre quando um material é iluminado por luz coerente, como é o caso do laser, produzindo um fenômeno de interferência óptica (HECHT, 2001). Na Figura 1, é ilustrado o fenômeno do speckle formado em uma folha de papel branca iluminada com um laser HeNe de 632 nm.

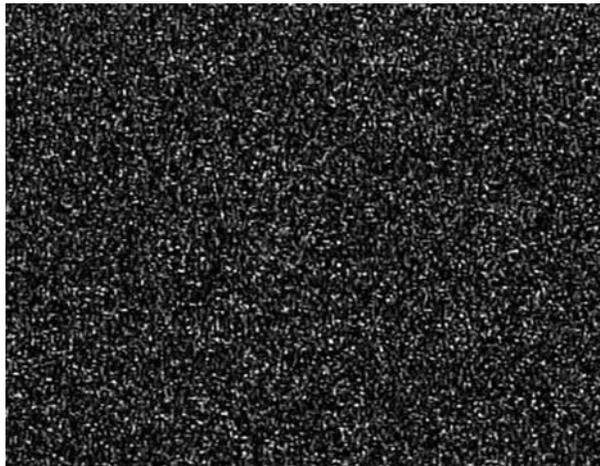


Figura 1 Padrão Speckle formado por uma folha branca de papel iluminada com um laser
Fonte Nobre (2008)

O speckle é um fenômeno que inicialmente era considerado como um ruído que atrapalhava os trabalhos de óptica (RABAL; BRAGA, 2008), entretanto sabe-se hoje que esse granulado pode ser usado para extrair informações sobre o movimento das estruturas do material iluminado, tornando-se uma interessante ferramenta.

3.4.2 Speckle dinâmico

Quando o speckle é aplicado a superfícies dinâmicas, observa-se que há uma contínua formação de novos e diferentes padrões de interferências do speckle. A esse padrão de interferência aleatório dinâmico denomina-se speckle dinâmico ou biospeckle, se a superfície em questão for de origem biológica, tornando possível analisar a atividade biológica da superfície (PAIXÃO, 2009) do objeto estudado.

Atividade biológica expressa na dinâmica do padrão do speckle não apresenta uma definição clara de qual fenômeno a está criando, porém pode ser entendida como uma série de processos ocorridos no tecido em análise, como o desenvolvimento e processos de divisão celular, movimentação de organelas, fluxos de citoplasmas ou reações bioquímicas, ou seja, a atividade biológica é o resultado de movimentos moleculares e de estruturais (BRAGA et al., 2009).

Na agropecuária, o biospeckle tem sido aplicado como técnica para identificar a presença de fungos e parasitos expostas a diferentes tipos de drogas (POMARICO et al., 2004); detectar fungos em sementes de feijão (BRAGA et al., 2005); analisar a qualidade de laranjas (RABELO et al., 2005); para medir alongamentos minuciosos de raízes de pinho (RATHNAYAKE et al., 2008) ou mesmo a atividade biológica de raízes em cultura de tecidos (BRAGA et al., 2009); na avaliação dos parâmetros de motilidade de sêmen congelado bovino (CARVALHO et al., 2009) e vários outros trabalhos.

3.5 Técnicas de processamento das imagens do Biospeckle laser

Por ser dinâmico, o biospeckle deve ser analisado com técnicas de processamento de imagem e tratamento estatístico, uma vez que a observação visual direta não permite quantificá-lo (RABAL; BRAGA, 2008). Assim, pode-se recorrer a uma análise de caráter gráfico, por meio do processamento de imagens que geram mapas indicando a variabilidade espacial da atividade biológica, ou uma interpretação numérica da variação temporal dos padrões formados.

Este trabalho utilizou os métodos gráficos de Fujii e Diferenças Generalizadas (DG).

3.5.1 Método de Fujii

Proposto por Fujii et al. (1985), esta metodologia baseia-se em trabalhar as imagens obtidas de um corpo iluminado, identificando a intensidade luminosa de cada pixel que a compõe, sendo que essa intensidade é expressa por $I(x,y)$, em que (x,y) são as coordenadas da imagem.

A técnica é baseada no somatório das diferenças de intensidades luminosas entre uma imagem e outra, sobre um fator de ponderação. A ponderação resume-se na soma das intensidades entre uma imagem e sua subsequente. A Equação 1 apresenta o método de Fujii.

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

em que $I_k(x,y)$ é a intensidade do pixel de coordenadas; (x,y) da $k^{ésima}$ imagem.

O resultado será uma nova imagem, na qual as regiões claras representam as altas atividades e as escuras baixas atividades (SILVA, 2007).

O método de Fujii amplifica movimentos em áreas mais escuras, resultando em imagens mais claras, de uma forma geral, quando comparadas com o método de Diferenças Generalizadas (BRAGA et al., 2009).

3.5.2 Método de diferenças generalizadas (DG)

Apresentado por Arizaga et al. (1999, 2002), as Diferenças Generalizadas (DG) são uma alternativa ao método de Fujii. O fator de ponderação foi eliminado e a diferença entre as intensidades dos pixels foi generalizada a todo o conjunto de imagens capturadas conforme descreve a Equação 2.

$$DG(x,y) = \sum_k \sum_l |I_k(x,y) - I_{k+1}(x,y)| \quad (2)$$

na qual $DG(x,y)$ é uma imagem, resultado da aplicação da técnica sobre um conjunto de imagens. $I(x,y)$, sendo que x e y são as coordenadas de cada imagem k .

As Diferenças Generalizadas exigem maior esforço computacional comparadas com o método de Fujii (BRAGA et al., 2009).

3.6 Wavelets

3.6.1 Considerações gerais

A decomposição de sinais a partir de funções de base, especialmente selecionadas, é uma poderosa ferramenta de análise e síntese de sinais (GUTIERREZ, 2002).

Segundo Lima (2003), as transformadas de wavelets podem ser definidas como mecanismos para decompor ou quebrar sinais nas suas partes constituintes, permitindo analisar os dados em diferentes faixas de frequência com a resolução de cada componente amarrada à sua escala.

A transformada de wavelets, que também é conhecida como miniondas ou ondaletas, pode ser entendida como uma evolução da transformada de Fourier para sinais (MORETTIN, 1999; NOBRE, 2008).

Na teoria de Fourier, as funções de base têm um escopo “global”, ou seja, estendem-se ao longo de todo o domínio de análise original (temporal). É essa característica que torna a análise de Fourier inadequada ao tratamento de sinais descontínuos e não estacionários. Segundo Daubechies (1990), a transformada de wavelets pode ser usada para analisar séries temporais não-estacionárias em diferentes frequências. Essa limitação motivou diversos pesquisadores, ao longo do século passado, a buscarem conjuntos de funções de base alternativas às de Fourier (GUTIERREZ, 2002).

Entende-se por séries estacionárias, séries cujos momentos estatísticos, como a média, variância e outros, não variam ao longo do tempo (MORETTIN, 1999).

O princípio mais geral na construção das wavelets é o uso de dilatações e translações. As wavelets mais usadas formam um sistema ortonormal de funções com suportes compactos e é esta a razão pela qual elas podem distinguir

as características locais de um sinal em diferentes escalas e, por translações, elas cobrem toda a região na qual o sinal é estudado. Na análise de sinais não-estacionários, a propriedade de localidade da transformada de wavelets nos conduz à sua maior vantagem sobre a transformada de Fourier (LIMA, 2003).

Um conjunto de funções reais $\phi_k(t)$, $k = 1, 2, 3, \dots$ definido no intervalo $[a, b] \in \mathbb{R}$, é dito ortogonal se nesse intervalo o produto interno entre elas for zero (SPIEGEL, 1976), satisfazendo as condições expressas na Equação 3.

$$\int_a^b \phi_m(t) \cdot \phi_n(t) \cdot dt = k \quad (3)$$

na qual k é uma constante igual a zeros se $m \neq n$ e diferente de zero se $m = n$. Caso o valor de k seja zero para todo $m \neq n$ e igual a unidade para $m = n$, diz-se que o conjunto de funções é ortonormal.

Uma wavelet com suporte compacto apresenta a maioria da sua energia restrita a um intervalo finito, ou seja, a função é exatamente zero fora desse intervalo (SOUZA et al., 2007).

A ortogonalidade é útil para processamento de sinais por fornecer uma representação mais compacta do sinal (TORRENCE; COMPO, 1998), com a reconstrução perfeita do sinal, utilizando apenas uma parte das bandas de frequência, e assegura que o erro no sinal de entrada não cresce com a transformada e a estabilidade numérica computacional é assegurada (GUTIERREZ, 2002).

A transformada de wavelets é utilizada em diversas áreas do conhecimento, tais como: turbulência atmosférica, processamento de sinais, sistemas hidrológicos, geofísica espacial, áreas de saúde, na solução de equações diferenciais, em reconhecimento de padrões, em compressão de imagens e de

sons, em processamento de geometria digital, engenharia nuclear, problemas de computação gráfica (BOLZAN, 2006; LIMA, 2003), dentre outros.

3.6.2 Transformada de Wavelets

O Gráfico 1 ilustra um sinal ao ser processado pela transformada de wavelets, resultando na abertura do sinal em um conjunto de componentes que podem variar tanto em tempo como em escala (frequência) (GUTIERREZ, 2002).



Gráfico 1 Diagrama esquemático da transformada de wavelets
Fonte Gutierrez (2002)

As wavelets são simplesmente ondas de curta duração com energia concentrada num intervalo de tempo curto, com certas peculiaridades (GRAPS, 1995).

As famílias de funções $\psi_{a,b}(t)$, são definidas escalonamentos e translações de uma única função $\psi(t)$, chamada wavelet mãe (GUTIERREZ, 2002). A Equação 4 ilustra a função wavelet mãe.

$$\psi_{a,b}(t) = |a|^{-0,5} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) \quad (4)$$

na qual $a, b \in \mathbb{R}$, $a \neq 0$. A variável a representa a escala, b corresponde a translação e o termo $|a|^{-0,50}$ serve para normalizar a função $\psi_{a,b}(t)$. Dessa forma, a Equação 5 apresenta modelo matemático da transformada.

$$\langle f, \psi_{a,b} \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) dt \quad (5)$$

O termo “função wavelets” é usado genericamente para se referir a wavelets ortogonais ou não-ortogonais. O termo “base wavelets” refere-se apenas ao conjunto de funções ortogonais. O uso de bases ortogonais implica no uso de transformadas de wavelets discretas, enquanto uma função de wavelets não-ortogonal pode ser usada tanto na discreta como na transformada contínua de wavelets (TORRENCE; COMPO, 1998).

A escala está diretamente relacionada à frequência, sendo que altas escalas equivalem a baixas frequências e baixas escalas equivalem a altas frequências (GUTIERREZ, 2002; NOBRE, 2008; ROCHA, 2008), como ilustrado pela Gráfico 2. Entende-se por escala a compressão ou dilatação de uma função.



(a)



(b)

Gráfico 2 Ação do fator de escala sobre uma função wavelets. Baixa escala (a) e alta escala (b)

A translação de uma wavelets simples significa o deslocamento no mesmo conjunto. Matematicamente, o deslocamento de uma função $\psi(t)$ por k , é representado por $\psi(t - k)$ (GUTIERREZ, 2002), de acordo com a Gráfico 3.



Gráfico 3 Translação de uma wavelets
Fonte Gutierrez (2002)

Há dois tipos de funções wavelets, as contínuas e as discretas, cada qual útil para determinadas aplicações (BOLZAN, 2006).

3.6.2.1 Transformada contínua de Wavelets

A wavelet contínua é comumente utilizada para visualizar, por meio do periodograma, a relação existente entre as componentes de diferentes frequências em função da escala temporal da série-temporal estudada, na qual esta relação é comumente categorizada como não-linear (GUTIERREZ, 2002).

Segundo Torrence e Compo (1998), a transformada contínua de wavelets é uma convolução do sinal x_n com a função mãe, em uma determinada escala e posição, como descrito na Equação 6.

$$W(a) = \sum_{n=0}^{N-1} x_n \times \psi^* \left[\frac{(n-b)\delta t}{a} \right] \quad (6)$$

na qual (*) representa o complexo conjugado, a corresponde ao fator de escala e b é a translação.

Os resultados da transformada contínua de wavelets são os coeficientes de wavelets, em função da escala e da posição. Multiplicando cada coeficiente com a wavelets escala e translação apropriadas, as ondas constituintes do sinal original são obtidas (NOBRE, 2008).

A wavelet mãe $\psi(t)$ tem que satisfazer a condição de admissibilidade apresentada na Equação 7.

$$C_{\psi} = \int \frac{|\Psi(w)|^2}{|w|} dw < \infty \quad (7)$$

na qual $\Psi(w)$ corresponde à transformada de Fourier de $\psi(t)$. Essa condição de admissibilidade resulta na Equação 8 (GUTIERREZ, 2002).

$$\int \psi(t) dt = \Psi(0) = 0 \quad (8)$$

Quando a condição de admissibilidade é satisfeita, $C_{\psi} < \infty$, é possível achar a transformada inversa contínua, assim uma função $f(t)$ de $L(\mathbb{R}^2)$ pode ser reconstruída de sua transformação wavelets (GUTIERREZ, 2002).

Na transformada contínua de wavelets, a reconstrução do sinal pode ser realizada pelo somatório da parte real da transformada de wavelets sobre todas as escalas (TORRENCE; COMPO, 1998). A Equação 9 representa matematicamente a reconstrução da série.

$$x_n = \frac{a_j^{2j+1}}{C_{\psi} \psi_0(0)} \times \sum_{j=0}^J \frac{R(W_n(a_j))}{a_j^{2j+1}} \quad (9)$$

na qual o fator a_j^{2j+1} converte a transformada de wavelets em uma densidade de energia e ψ_0 remove a energia da escala. A Tabela 1 apresenta os valores empíricos de algumas variáveis utilizadas no processo de reconstrução, para diferentes tipos de funções wavelets.

Tabela 1 Valores empíricos de algumas variáveis utilizadas no processo de reconstrução do sinal

Função	C_{δ}	λ	δ_{J_6}	$\psi_0(0)$
Morlet ($w_0 = 6$)	0,776	2,32	0,60	$\pi^{0,25}$
Paul ($m = 4$)	1,132	1,17	1,50	1,079
Chapéu Mexicano (DOG $m = 2$)	3,541	1,43	1,40	0,867
DOG ($m = 6$)	1,966	1,37	0,97	0,884

Fonte Torrence e Compo (1998)

3.6.2.2 Transformada discreta de Wavelets

Qualquer processamento de sinal realizado em um computador, utilizando dados coletados experimentalmente, deve ser executado como um sinal discreto na prática. Além disso, calcular coeficientes wavelet para um número muito grande de escalas é uma tarefa que gera um volume enorme de dados. Uma estratégia computacionalmente mais eficiente e atraente seria a escolha de apenas um subconjunto de escalas e posições específicas para as quais os coeficientes devem ser calculados. Adotando-se essa estratégia genérica, a transformada de wavelet deixa de ser contínua para ser discreta (GUTIERREZ, 2002).

As wavelets discretas são utilizadas para a decomposição e filtragem de qualquer série-temporal. A sua aplicabilidade neste aspecto advém do fato de que estas wavelets não provocam redundâncias de coeficientes entre escalas (BOLZAN, 2006).

Segundo Bolzan (2006), a decomposição ocorre da seguinte maneira:

- a) suponha uma série-temporal comum de comprimento de s . Colocaremos este número como potência de 2 tal que $s = 2^n$. Como exemplo, se $s = 1024$ pontos, então $1024 = 2^n \rightarrow n = 10$. Isso significa que teremos 10 escalas (ou frequências) que poderemos

“enxergar” pelas wavelets, de maneira em particular das wavelets chamadas discretas;

- b) logo, a primeira escala (ou frequência) em que a função wavelets irá atuar é na escala de $n - 1 = 9$, e isso implica que a série-temporal será dividida em duas partes iguais, cada uma com $n - 1 = 9 \rightarrow 2^9 = 512$ pontos;
- c) a função wavelets mãe será comprimida pela metade e aplicada na primeira metade da série-temporal. Em seguida, será transladada para a segunda parte da mesma série temporal;
- d) agora, para o próximo nível de resolução $n - 2 = 8$, teremos $2^8 = 256$ pontos. Isso equivale a dividir pela metade cada uma das duas séries anteriores. Com isso, a função wavelets deve também ser novamente comprimida pela metade de modo a caber dentro do primeiro segmento da série de 256 pontos para, em seguida, ser translada para os demais segmentos da série-temporal, como mostrado no Gráfico 5;
- e) esse processo será repetido até a última escala $n = 1 \rightarrow 2^1 = 2$ pontos.

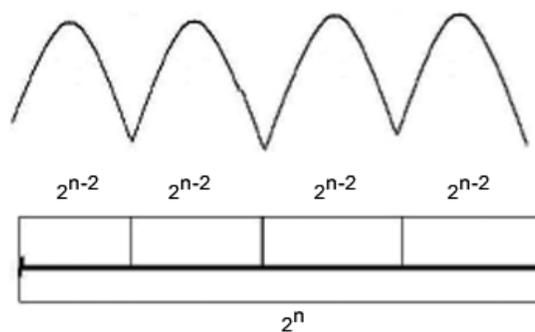


Gráfico 4 Análise multirresolução da função Wavelets
Fonte Bolzan (2006)

Isso nos proporcionará um diagrama conhecido como periodograma, como mostrado esquematicamente no Gráfico 5, contendo informações sobre frequência, tempo e amplitude.

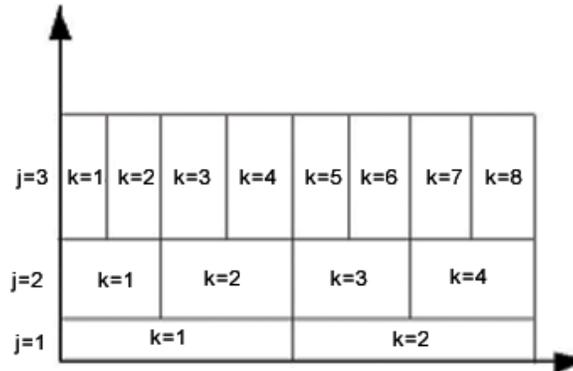


Gráfico 5 Periodograma resultante da transformada discreta de wavelets
Fonte Bolzan (2006)

3.6.3 Tipos de funções Wavelets

Existem diversos tipos de funções mãe, como por exemplo, Haar, Symlets, Coifman, Chapéu Mexicano, Meyer, Morlet, Daubechies, dentre outras, e cada qual com suas particularidades.

As famílias de funções são comumente representadas pela abreviação do nome do pesquisador que as desenvolveu (“coif” para Coifman ou “db” para Daubechies) e, em alguns casos, seguido por um número que costuma representar uma característica da função (GUTIERREZ, 2002).

Neste trabalho, serão utilizadas as wavelets de Daubechies de segunda ordem e a de Morlet. O interesse na wavelet de Daubechies é verificar se suas variações bruscas se assemelham às rápidas transformações do padrão biospeckle, e o uso da wavelet de Morlet deve-se ao fato de esta ser muito utilizada em trabalhos envolvendo wavelets.

3.6.3.1 Wavelet de Daubechies

A primeira menção das wavelets aconteceu em 1909, com A. Haar, e essas wavelets ficaram no anonimato durante anos, constituindo por um longo período a única base ortonormal de wavelets conhecida (LIMA, 2003). Entretanto, nos últimos anos, a técnica de wavelets sofreu grande impulso por meio dos trabalhos realizados por Mallat, Meyer, entre outros.

Em 1990, Ingrid Daubechies usou os trabalhos de Mallat e construiu um conjunto de bases ortonormais de wavelets suaves e com suportes compactos. Os trabalhos de Daubechies são os alicerces das aplicações atuais de wavelets (LIMA, 2003).

As Daubechies são geralmente representadas por “dbN”, porém há autores que designam por “db2N”, em que N é a ordem da Daubechies, que pode variar de 1 a 45. O Gráfico 6 ilustra graficamente a função mãe da wavelet Daubechies em diferentes ordens.

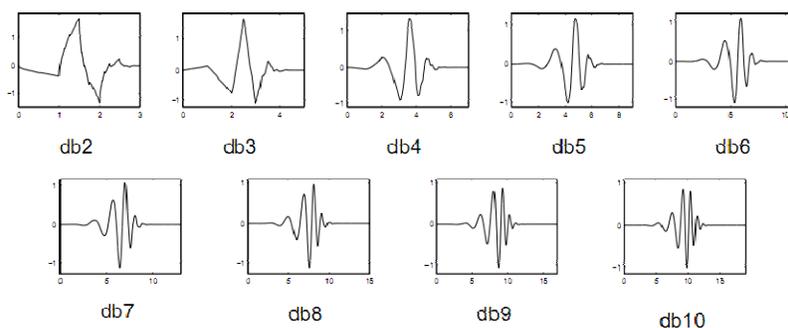


Gráfico 6 Gráfico da função mãe da wavelets Daubechies, 'dbN', em diferentes ordens

Fonte Gutierrez (2002)

A Wavelet Haar pode ser vista como um caso particular das wavelets de Daubechies quando $N = 1$ (LIMA, 2003). A regularidade aumenta à medida que se aumenta a ordem da Daubechies.

Em muitos casos, como por exemplo, para as wavelets de Daubechies, não existe uma fórmula analítica fechada para $\psi(x)$, exceto, para o caso trivial da wavelet Haar (LIMA, 2003).

Outras características das wavelets Daubechies são que estas são assimétricas, proporcionam exata reconstrução, têm suporte compacto (ortogonalidade) e são utilizadas em análises contínuas e discretas de Wavelets,

3.6.3.2 Wavelet de Morlet

Apresentada pelo francês Jean Morlet em 1984, após anos de estagnação nos estudos envolvendo Wavelets, essa função foi desenvolvida em conjunto com a equipe de pesquisadores de Alex Grossman, no Centro de Física Teórica de Marseille, na França.

Ao contrário da Wavelets Daubechies, a função proposta por Morlet apresenta uma fórmula analítica, esta é descrita na Equação 10. Fonte: Torrence e Compo (1998).

$$\psi_0(\eta) = \pi^{-0.25} \times e^{-i\eta w_0} \times e^{-\frac{\eta^2}{2}} \quad (10)$$

em que w_0 é frequência (adimensional) com um valor que satisfaça a condição de admissibilidade.

O Gráfico 7 ilustra graficamente a função mãe da Wavelet Morlet. Por ela pode-se perceber outras características da ondaleta, como a regularidade e simetria da função.

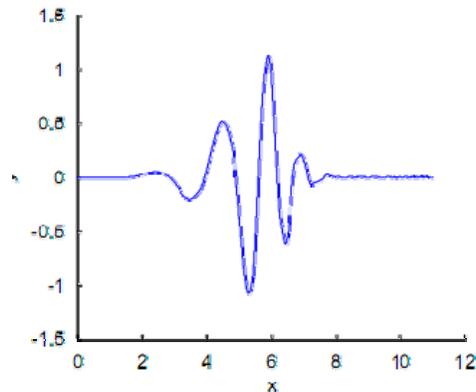


Gráfico 7 A função Wavelets de Morlet
Fonte Liu et al. (2010)

Outras peculiaridades da Wavelet Morlet estão que estas satisfazem as condições de admissibilidade (Equação 7), são indicadas para análises contínuas de wavelets e não são ortogonais.

3.6.4 Teorema da amostragem

Em 1928, o matemático Harry Nyquist estabeleceu uma relação entre a frequência de amostragem de um sinal e a máxima frequência de um sinal a ser reproduzido, conhecido como Teorema da Amostragem ou Teorema de Nyquist. Segundo o teorema, a quantidade de amostras por unidade de tempo de um sinal é chamada taxa ou frequência de amostragem, e a metade da frequência de amostragem corresponde à máxima de frequência do sinal que pode ser reproduzido integralmente sem erro de aliasing (LATHI, 2007).

O Teorema da Amostragem será utilizado neste trabalho para definir a maior frequência a ser analisada durante a decomposição dos sinais.

3.6.5 Relação escalas-frequências

Uma das grandes dificuldades na análise de sinais é a identificação do tipo de wavelet mais adequado para estudo do sinal. Uma wavelet menos adequada pode conduzir a um menor ajuste do sinal reconstruído (LIRA et al., 2003).

Escolhida a função wavelet, é necessário eleger o conjunto de escalas a usar na transformada de wavelet. Para uma wavelet ortogonal, há um limite e um conjunto discreto de escalas, como dado por Farge (1992). Para análise de wavelet não-ortogonal, pode-se usar um conjunto arbitrário de escalas para construir uma imagem mais completa (TORRENCE; COMPO, 1998).

A Equação 11 e a Equação 12 foram apresentadas por Torrence e Compo (1998), para o cálculo do intervalo de escalas a serem utilizadas.

$$s_j = s_0 \times 2^{j\delta_j} \quad j = 0, 1, 2, \dots, J \quad (11)$$

$$J = \delta_j^{-1} \times \log_2 \left(\frac{N \times \delta t}{s_0} \right) \quad (12)$$

em que s_0 é a menor resolução de escala e J determina a maior escala.

O s_0 deve ser escolhido de forma que o período de Fourier seja aproximadamente $2\delta t$. A escolha de um δ_j pequeno depende da largura espaço-espectral na função de wavelet. Para a wavelet Morlet, um δ_j de 0,5 é o maior valor que pode se adequar aos dados da escala, enquanto que para as outras funções de wavelet, pode ser usado um valor maior. Valores menores de δ_j fornecem melhor resolução (TORRENCE; COMPO, 1998).

3.6.6 Matriz 3S – Space Spectral Speckle

A análise desse conjunto de imagens por meio da transformada de wavelets resulta em novos conjuntos de imagens, no domínio da frequência, referentes às escalas utilizadas na análise.

A comparação dos resultados, principalmente quando provenientes de resultados gráficos, é dificultada pelo número de saídas relacionadas com as bandas de frequências provenientes da decomposição promovida pela transformada de wavelets. Dessa forma, uma alternativa para se conseguir avaliar um dado fenômeno no objeto em análise pelo biospeckle pode ser o uso de uma nova imagem conhecida como matriz 3S, que em inglês representa o padrão do speckle nas dimensões espaço (space) e frequência (spectral) (MARQUES, 2009).

Selecionadas uma coluna ou uma linha da região de interesse, em cada uma dessas imagens no domínio da frequência após a filtragem promovida pela transformada de wavelets, uma nova matriz será construída, a matriz 3S, com informações sobre o comportamento das escalas em uma mesma região (espaço) (MARQUES, 2009).

O Gráfico 8 apresenta de forma gráfica a matriz 3S de um biofilme de fécula de batata.

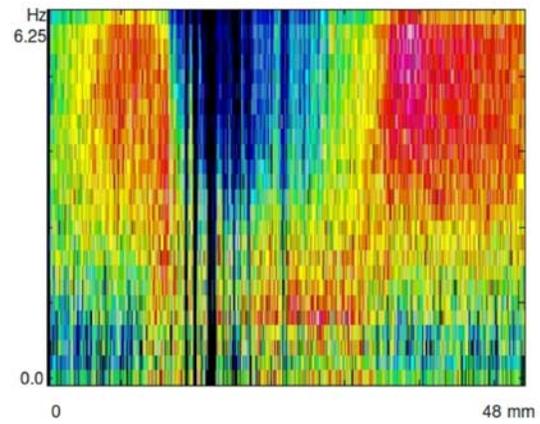


Gráfico 8 Matriz 3S de um biofilme, utilizando o método de Fujii na análise gráfica
Fonte Marques (2009)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A realização das diversas abordagens propostas como objetivo deste trabalho foi dividida em três etapas:

- a) preparo do meio de cultura e inoculação dos explantes do milho (*Zea mays*) nos tubos de ensaio;
- b) iluminação do tubo de ensaio com o laser e coleta dos padrões de interferência do biospeckle;
- c) análise e interpretação dos resultados.

4.1 Meios de cultura

O preparo dos meios de cultura foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Os frutos do milho (*Zea mays*) foram esterilizados durante 20 minutos em solução com 0,050 L de hipoclorito de sódio e 0,050 L de água destilada e em seguida enxaguados com água destilada. Posteriormente, os frutos foram agitados por 1 minuto em solução com álcool e água destilada.

O meio de cultura adotado foi o MS, proposto por Murashige e Skoog (1962), no estado semi-sólido. Nos tubos de ensaio foram inseridos dois meios de cultura distintos, sendo na parte inferior do tubo de ensaio um meio de maior resistência à penetração e na parte superior um estrato mais flácido.

A Figura 2 ilustra um tubo de ensaio com os dois meios. Na parte inferior encontra-se uma superfície mais coesa e a parte superior com uma menor resistência à penetração, visando a simular um solo com uma barreira física e um solo ideal para o crescimento do sistema radicular, respectivamente.

Todos os recipientes utilizados no preparo do meio de cultura foram previamente esterilizados. A concentração de cada nutriente seguiu a recomendação de Murashige e Skoog (1962), como detalhado na Tabela 2.

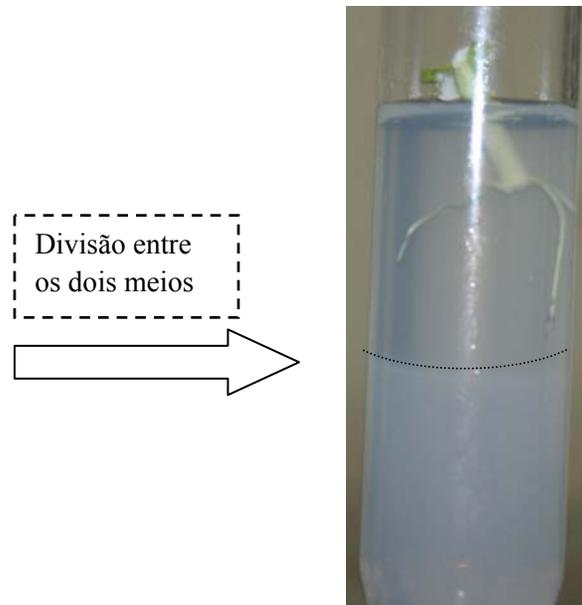


Figura 2 Meio de cultura com dois estratos

Dividida em duas seções, referentes aos dois meios utilizados, foram inseridos aos ingredientes $0,010 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ágar para preparo do meio inferior e $0,0055 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ para o meio superior.

O pH foi ajustado a 5,5 e as amostras foram aquecidas.

As amostras referentes ao meio inferior foram resfriadas em uma solução com gelo, enquanto que as amostras do meio superior foram resfriadas à temperatura ambiente e ambas unidas a seguir.

Os explantes foram inoculados nos tubos de ensaio em um ambiente controlado, sob temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminado 16 horas por dia (PPFD) = $36 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}$ e 8 horas no escuro.

Após cinco dias da inoculação dos explantes, os meios de cultura foram encaminhados para o Centro de Desenvolvimento à Instrumentação aplicada a Agropecuária (CEDIA), no Departamento de Engenharia da UFLA, para iluminação das amostras, coleta dos padrões de interferência e processamento dos dados.

Tabela 2 Concentração dos nutrientes para o preparo do meio de cultura “MS” - Murashige e Skoog (1962)

Solução estoque	Componentes	Concentração da solução estoque (mg.L ⁻¹)	Volume da solução estoque adicionando ao meio de cultura (mL.L ⁻¹)	Concentração final (mg.L ⁻¹)
A	NH ₄ HO ₃	82500	20	1650,000
B	KNO ₃	95000	20	1900,000
	H ₃ BO ₃	1240		6,200
	KH ₂ PO ₄	34000		170,000
C	KI	166	5	0,830
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50		0,250
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	5		0,025
D	CaCl ₂	8306	30,2	250,841
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74000		370,000
E	MnSO ₄ ·4H ₂ O	4460	5	22,300
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1720		8,600
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	5		0,025
F	Na ₂ EDTA	7450	5	37,250
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5570		27,850
	Mio-inositol	2000	50	100,000
	Tiamina HCl	50		0,500
Vitaminas	Piridoxina HCl	50	10	0,500
	Ácido Nicotínico	50		0,500
Aminoácido	Glicina	80	25	2,000
Sacarose			30 g.	30,000

Fonte Pasqual (2001)

4.2 Obtenção dos dados

Utilizando a técnica do biospeckle, o monitoramento da atividade biológica do sistema radicular foi realizado durante todo o seu crescimento, desde a emergência na janela de análise até sua proximidade ao estrato de maior resistência à penetração do meio de cultura.

A janela de análise, onde a câmera foi focalizada, consistiu de uma janela de 0,96 x 1,26 centímetros. A Figura 3 ilustra a janela de análise utilizada para a coleta dos padrões de interferência do biospeckle.

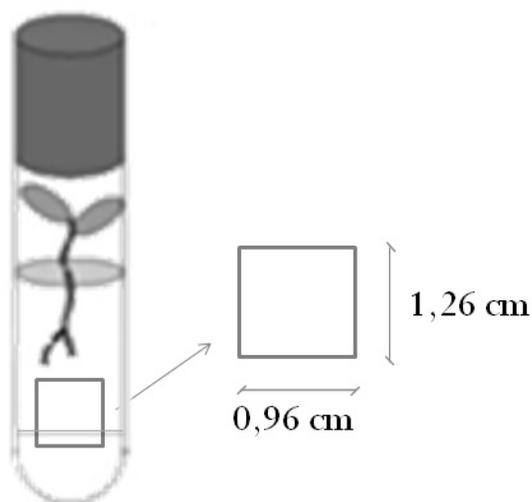


Figura 3 Janela de análise

Os dados do biospeckle foram coletados a cada 30 minutos, durante 21 horas ao longo do crescimento das raízes.

O tubo de ensaio foi iluminado por uma luz coerente e os padrões de interferência, formados pela interação da luz com o material estudado, foram capturados por um microscópio digital. O microscópio foi disposto em duas

posições distintas, na parte posterior e na anterior do tubo de ensaio, formando as configurações forward-scattering e back-scattering, respectivamente. A Figura 4 apresenta o arranjo experimental.

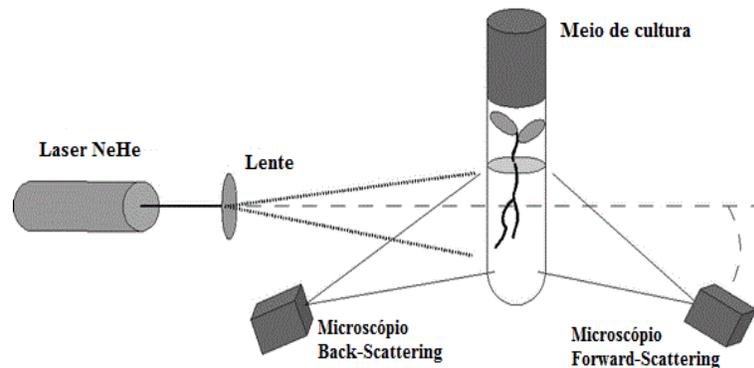


Figura 4 Arranjo experimental para coleta dos dados
Fonte Braga et al. (2009)

A luz coerente utilizada foi proveniente de um laser de HeNe da marca Coherent, modelo Visible Laser Module, com comprimento de onda de 632 nm e potência de 5 mW, ampliadas por um conjunto de lentes suficientes para cobrir toda a amostra. A distância entre a lente e a amostra foi de 0,75 metros (BARRETO et al., 2010).

Os padrões de interferência formados pela interação da luz com o material estudado foram coletados com um microscópio portátil digital da marca Dinolite, modelo AM 413zt. A distância entre o microscópio e a amostra foi de 0,073 metros e uma macro de 25 vezes foi utilizada para ampliar o nível de detalhes da amostra. O ângulo entre o microscópio e o prolongamento do segmento laser-amostra foi de 67° , conforme Barreto et al. (2010).

Em cada sessão de iluminação foi armazenado um conjunto de 128 imagens em níveis de cinza, com resolução de 1280 x 1024 pixels e intervalo de 0,080 segundos entre frames. Segundo o teorema da Amostragem, a maior

frequência que pode ser observada sem perdas de informações, utilizando essa metodologia, é de 6,25 Hz, divididas em 25 bandas espectrais, conforme descrito na Equação 12.

4.3 Análise e interpretação dos dados

A análise e interpretação dos dados iniciaram pelos resultados obtidos nas configurações back e forward scattering, buscando identificar as vantagens e desvantagens de cada um dos protocolos experimentais sugeridos, bem como discutir alternativas para contornar as limitações.

O banco de dados com os padrões de interferência do sistema radicular foi processado pelos métodos de Fujii e de DG, visando a conhecer a variabilidade da atividade biológica apresentada pela raiz na medida em que esta aproximava da superfície de maior resistência à penetração. Essas imagens também foram utilizadas para fazer um vídeo ilustrando o comportamento dinâmico do sistema radicular.

Para melhorar a qualidade da imagem final produzida, filtrar a influência de fenômenos externos e definir marcadores de frequências do material biológico estudado, o conjunto de imagens foi decomposto em frequência pela transformada de wavelets, e posteriormente aplicados os métodos de Fujii e DG. O resultado da análise e filtragem foi constituído de imagens referentes aos métodos de Fujii e DG e com informações sobre a atividade biológica das raízes em diferentes bandas de frequência.

A comparação entre as wavelets de Daubechies e Morlet aplicadas na análise de sinais do biospeckle foi realizada de forma gráfica. Nessas análises foram utilizados os dados do biospeckle em um fruto de milho apresentado por Braga Júnior (2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Configuração experimental

As Figuras 5 e 6 mostram o resultado do processamento pelo método de Fujii para as configurações back e forward scattering respectivamente. O arranjo experimental com a colocação da câmera, formando um forward scattering apresentou uma imagem com qualidade levemente superior comparada com a disposição back scattering.

O fenômeno observado na Figura 5 pode ser explicado pela reflexão da luz incidida no tubo de ensaio sobre a câmera, conforme discutido por Braga et al. (2009). Ao interagir com o tubo de ensaio, ocorre o espalhamento do feixe de luz e a componente refletida ofusca a visão do observador (saturação na câmera). O resultado é um efeito semelhante a uma película sobre a imagem, dificultando o reconhecimento de padrões na mesma.

Na configuração forward scattering o tubo de ensaio atua como um filtro, reduzindo a contribuição da reflexão na formação da imagem final. O resultado são imagens de melhor qualidade.

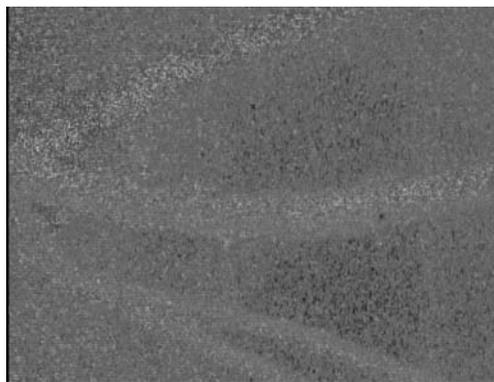


Figura 5 Imagem processada pelo método de Fujii na configuração back scattering

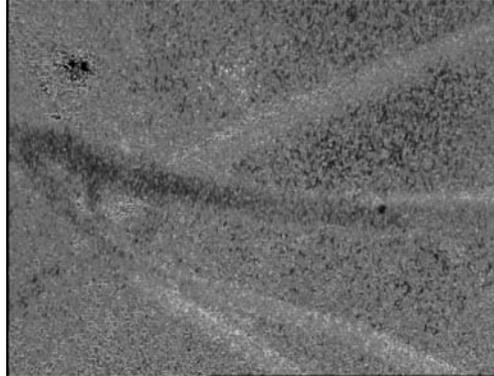


Figura 6 Imagem processada pelo método de Fujii na configuração forward scattering

O sinal que a câmera capta é a combinação das componentes refração e reflexão da luz que interage com o objeto de estudo. Cabe ressaltar que esse ruído pode ser minimizado com aplicação de técnicas de filtragem ou por meio de dispositivos ópticos no momento da coleta de dados, e com esse propósito foram realizados ensaios com polarizadores para as configurações back e forward scattering. Os respectivos resultados estão ilustrados nas Figuras 7 e 8.

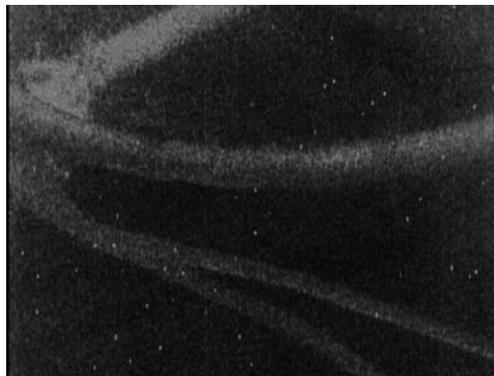


Figura 7 Imagem Fujii, utilizando um polarizador na frente da objetiva da câmera na configuração back scattering



Figura 8 Imagem Fujii, utilizando um polarizador na frente da objetiva da câmera na configuração forward scattering

No arranjo experimental back scattering, o polarizador conseguiu o minimizar o efeito da componente reflexão, melhorando a qualidade da imagem resultante. Como descrito por Sears, Zemansky e Young (1985), este é um caso típico da aplicação de polarizadores, para retirar reflexões indesejáveis e observar naturalmente a imagem.

Já a configuração forward scattering não propiciou melhora significativa na qualidade da imagem final. Tal fato pode ser explicado pela baixa componente reflexão que chega à objetiva da câmera, reduzindo o efeito do polarizador.

Esses resultados indicam aos usuários da técnica que a configuração de back scattering exige a adoção de polarizadores, enquanto que a configuração do forward scattering a dispensa, reduzindo a complexidade do experimento.

5.2 Atividade biológica do sistema radicular

Para acompanhar o crescimento da ponta de raiz foram coletados dados do biospeckle a cada 30 minutos durante 21 horas, resultando em 42 mapas com a atividade biológica do sistema radicular.

As Figuras 9 e 10 apresentam de forma gráfica as imagens processadas pelo método de Fujii e de DG respectivamente, com a variabilidade espacial da atividade biológica da ponta de raiz ao longo do seu crescimento. Os níveis de atividade biológica são representados da cor vermelha a cor azul.

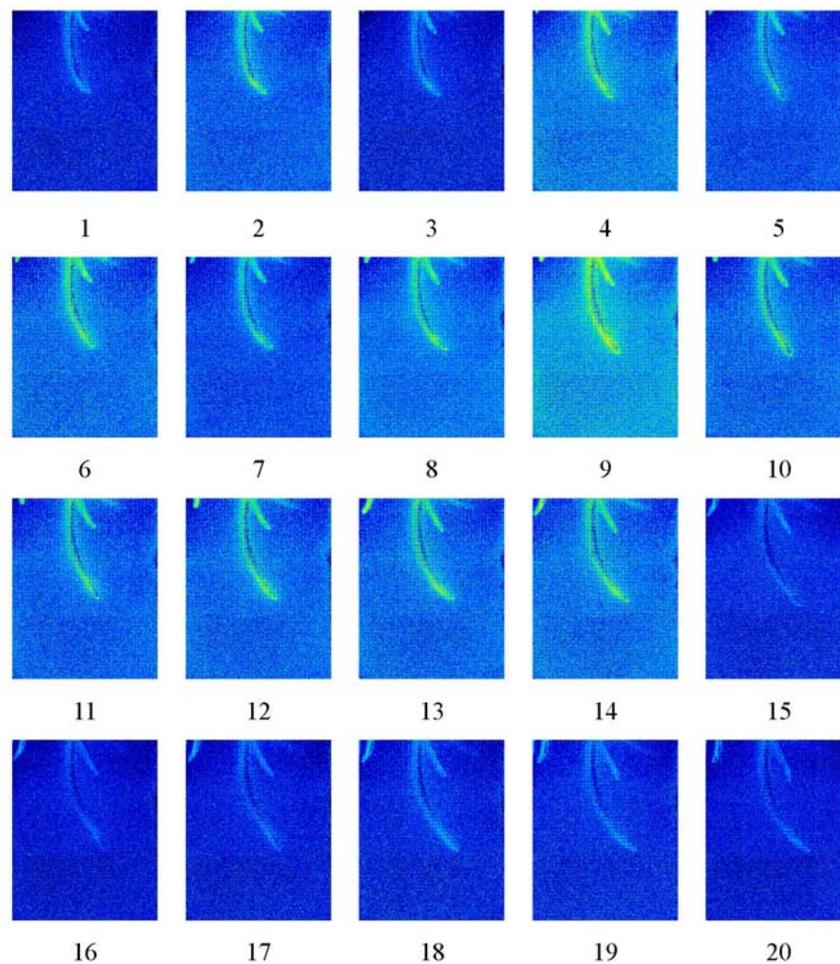
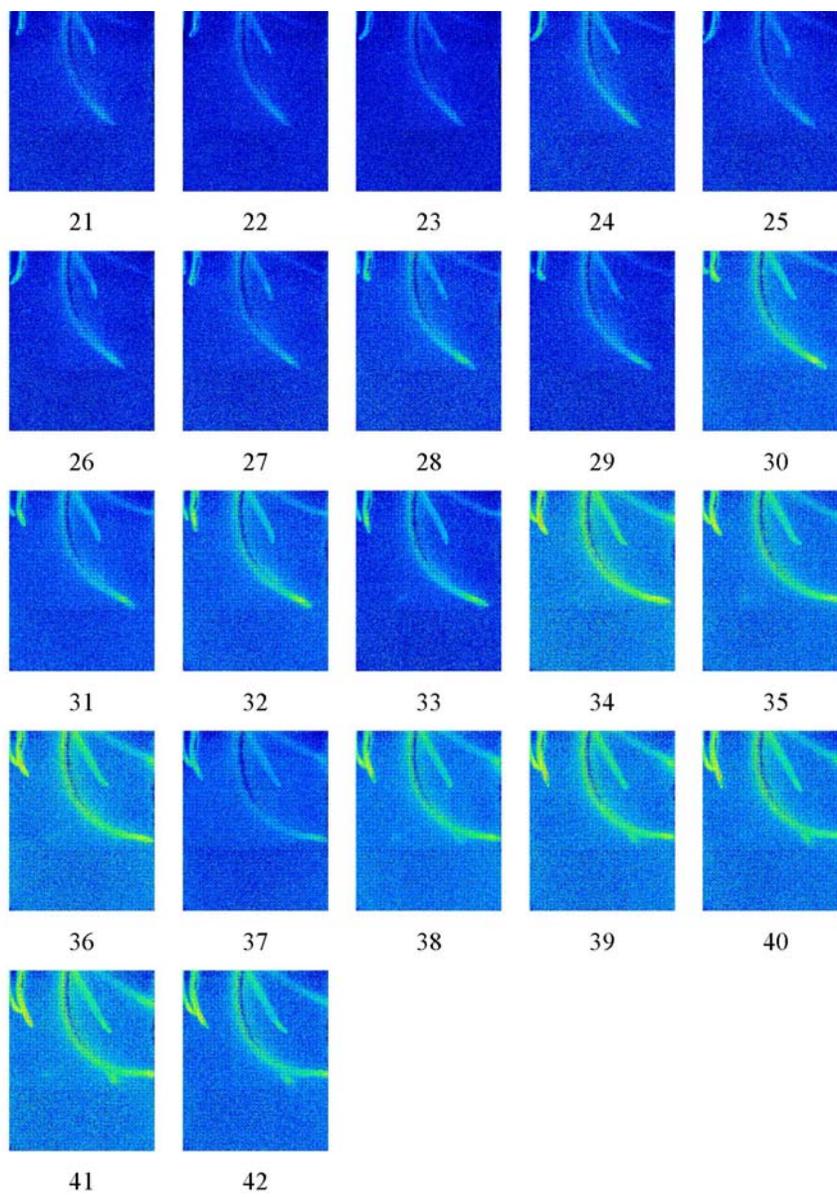


Figura 9 Imagens Fujii's com a variabilidade espacial da atividade biológica das raízes ao longo do seu crescimento

(...continua...)



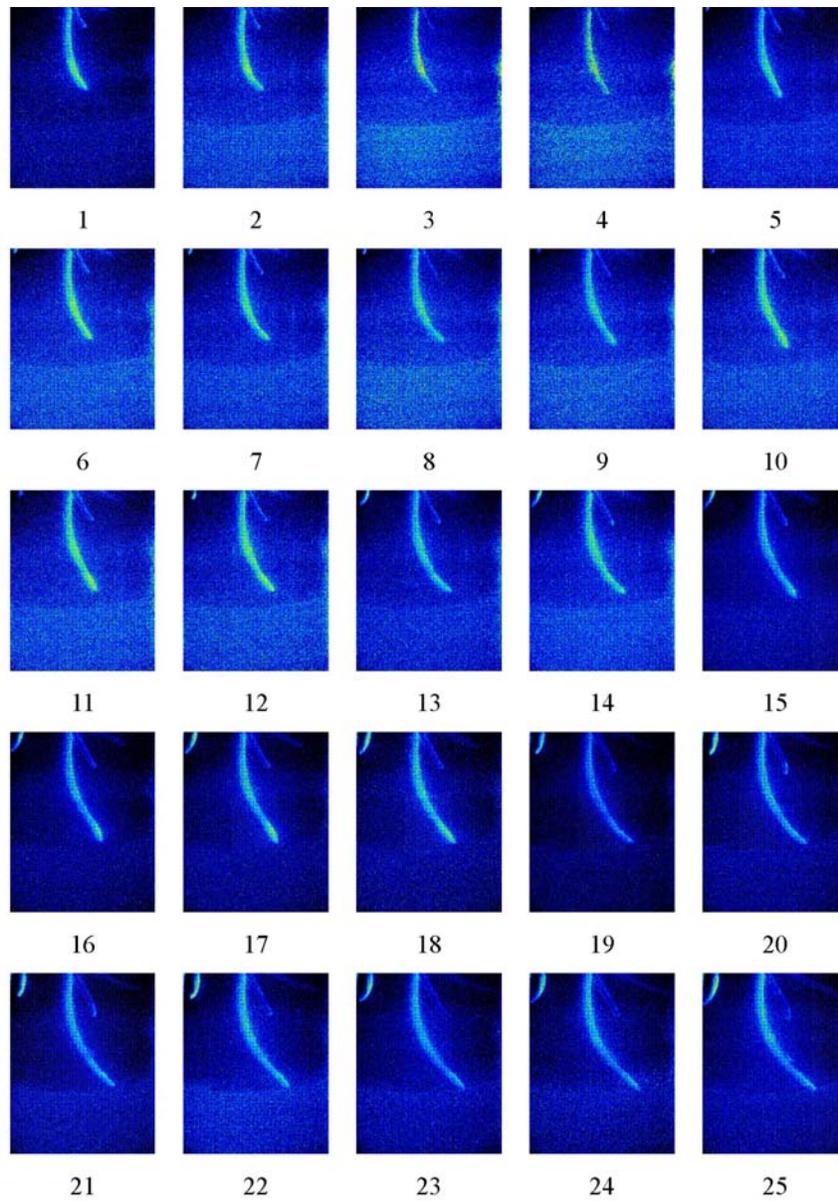
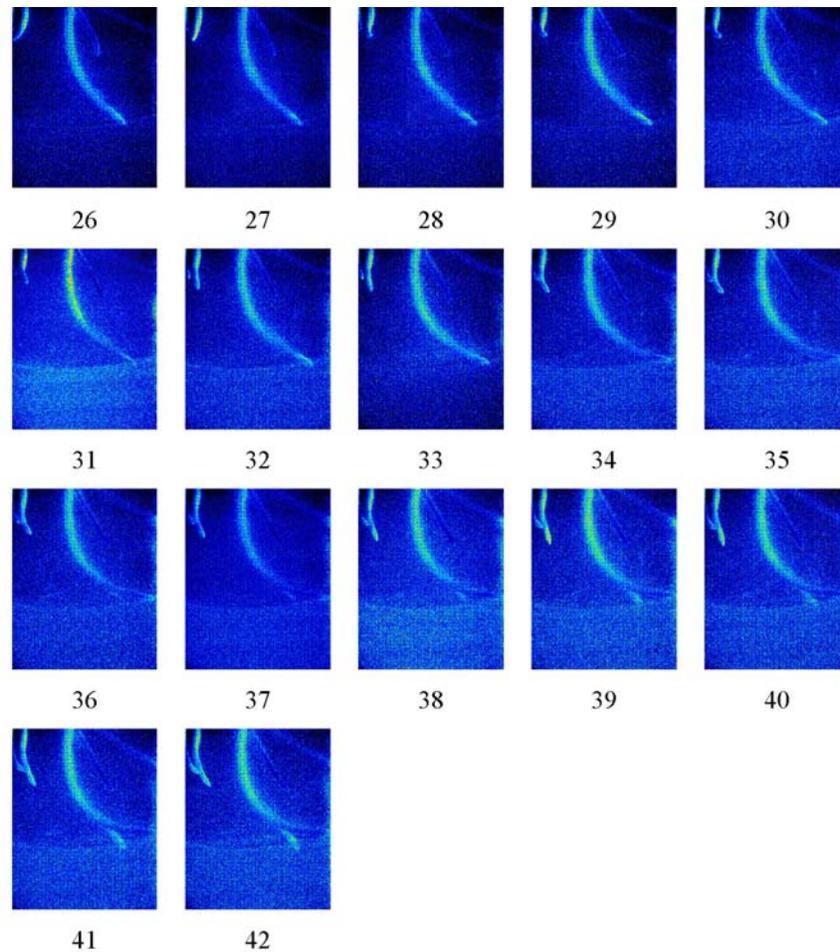


Figura 10 Imagens DG's com a variabilidade espacial da atividade biológica do sistema radicular durante seu crescimento

(...continua...)



O comportamento dos dados nas técnicas de Fujii e DG foram semelhantes, conseguindo distinguir informações das raízes de observações do gel e diferenciando áreas de atividade biológica.

O método de Fujii amplificou pequenos movimentos do material biológico e proporcionou imagens mais claras para identificação da atividade biológica. Esse resultado se opõe aos obtidos por Braga et al. (2009), que encontraram dificuldades para a aplicação da técnica de Fujii devido à luz difusa do tubo de ensaio. A janela de análise utilizada foi uma área de 1,21 cm²

centralizada no tubo, assim houve redução da luz difusa sobre a câmara, o que propiciou melhor resultado pelo método.

Já a técnica de DG conseguiu distinguir com nitidez o meio de menor resistência à penetração do meio mais resistente.

A atividade biológica foi mais ativa próxima à extremidade da raiz, região conhecida como zona meristemática e lisa. Todavia, acima dessa região é possível observar uma menor atividade do tecido biológico.

Conforme descrito por Castro, Pereira e Paiva (2009) e Cutter (1986), a zona lisa é aquela onde ocorre o alongamento celular e o início de diferenciação dos tecidos primário da raiz. Nessa região, as divisões celulares ainda são intensas e é iniciada a diferenciação de tecidos. Seguindo a partir da extremidade da raiz para a parte superior, encontra-se a zona pelífera, onde os tecidos completam sua maturação, e a zona de ramificação, onde se encontram os tecidos secundários. Essas informações justificam a variabilidade da atividade biológica no sistema radicular e que pode ser entendida como atividade meristemática por se encontrar na região do meristema apical, com altas atividades na zona lisa e à medida que os tecidos se diferenciam com uma gradativa redução dessa atividade biológica.

O comportamento do sistema radicular, ao aproximar do meio de cultura com maior resistência à penetração também foi um resultado importante. Antes de chegar ao meio inferior, a raiz começou a mudar sua trajetória, que a princípio era vertical, para a lateral do tubo de ensaio, continuando o seu crescimento. Essa experiência evidencia que a raiz reage a estímulos de forma sistêmica e busca meios alternativos para se desenvolver.

Em um instante específico, ao longo do crescimento do sistema radicular, a atividade meristemática caiu repentinamente em todas as raízes, como se pode observar nas imagens de 15 a 29 da Figura 9. Após um período com a atividade biológica estagnada, as raízes apresentaram um elevado

acrécimo em suas atividades meristemáticas. Essa característica se repetiu em outros ensaios, como pode ser observado na Figura 11.

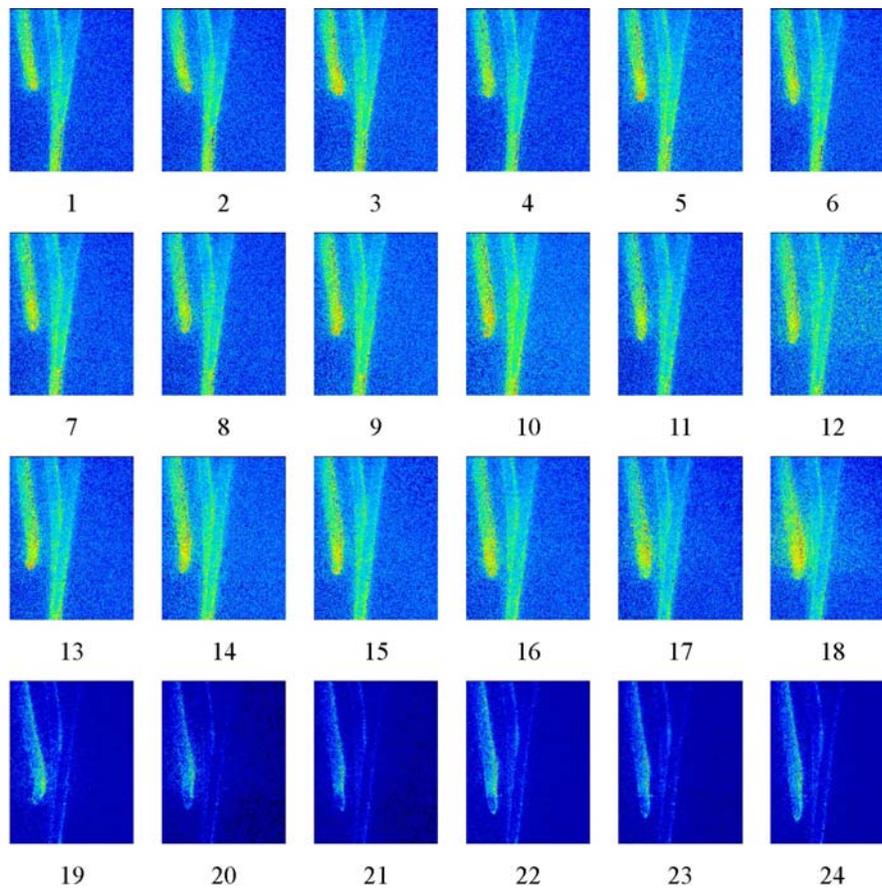
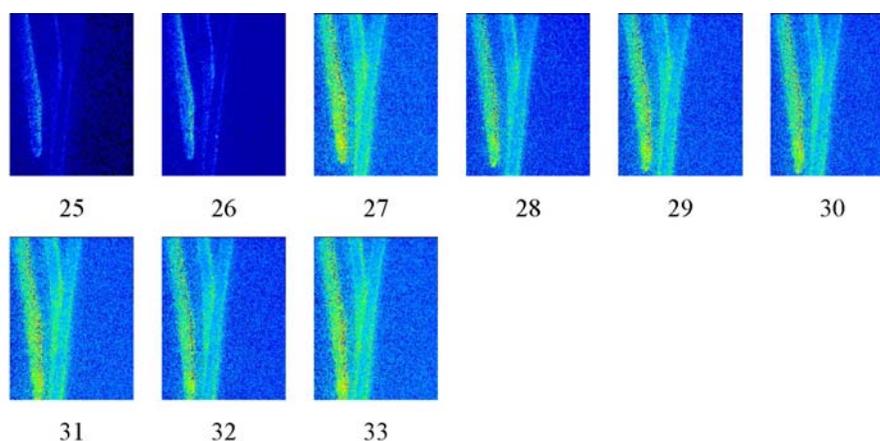


Figura 11 Imagens Fujii, ilustrando a paralisação da atividade biológica das raízes

(...continua...)



A Figura 11 descreve um ensaio com *Zea mays* (milho) onde está apresentado o crescimento de 3 raízes. As raízes situadas na região central e na direita se desenvolveram próximo à parede do tubo de ensaio, enquanto que a raiz localizada na parte esquerda das imagens cresceu no centro do tubo de ensaio.

Como descrito anteriormente, por alguns instantes, houve uma paralisação na atividade meristemática. Em ambos os casos, esse intervalo de tempo coincidiu com a aproximação da raiz da camada de maior resistência à penetração e, após romper essa camada de impedimento ou mudar a trajetória de crescimento, todas as raízes voltaram a apresentar elevada taxa de atividade na região meristemática.

Esse resultado leva à hipótese da ação sistêmica desses órgãos da planta ao deparar com um obstáculo e superá-lo. Esta é uma hipótese polêmica, pois apresenta um conceito que ainda não pode ser validado pela literatura.

Diante dessas imagens Fujii's e DG's, foram produzidos vídeos ilustrando a atividade na região meristemática ao longo de seu crescimento.

5.3 Análise em frequência da atividade biológica do sistema radicular

A Figura 20 apresenta por meio das matrizes 3S a análise em frequência, permitindo avaliar o comportamento da atividade biológica das raízes em diferentes bandas de frequência em uma mesma área do espaço.

O eixo das abscissas traz informações sobre o crescimento das raízes no espaço e o eixo das ordenadas descreve o comportamento em diferentes intervalos de frequências. A atividade meristemática está ilustrada em pseudocores, onde a cor vermelha representa alta atividade e cores próximas ao azul são as baixas atividades, conforme descrito por Marques (2009).

Verifica-se que o crescimento do sistema radicular promove o deslocamento da área mais ativa para o lado direito. No início, essa movimentação foi intensa e posteriormente houve uma gradativa redução.

O instante em que há a redução gradativa corresponde ao momento em que a raiz se aproximou do meio inferior e mudou sua trajetória, deixando de se deslocar na direção vertical e iniciando um movimento na horizontal.

A maior atividade meristemática se manifestou nas altas frequências e as informações de baixa atividade se sobressaíram nas baixas frequências, resultados que se assemelham aos encontrados por Cardoso, Costa e Braga (2010) no estudo de sementes de milho, e Cardoso (2010) na análise de tecidos cancerígenos de cães.

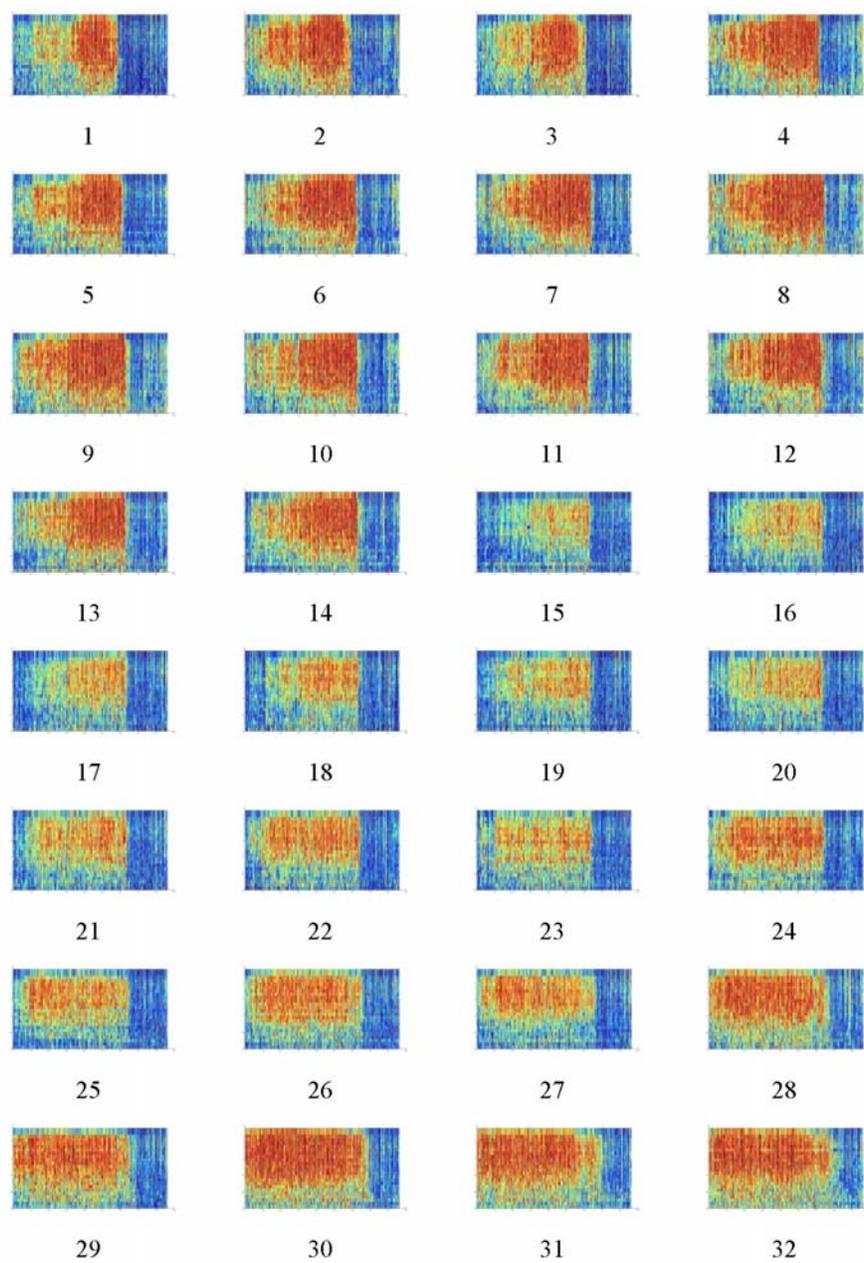
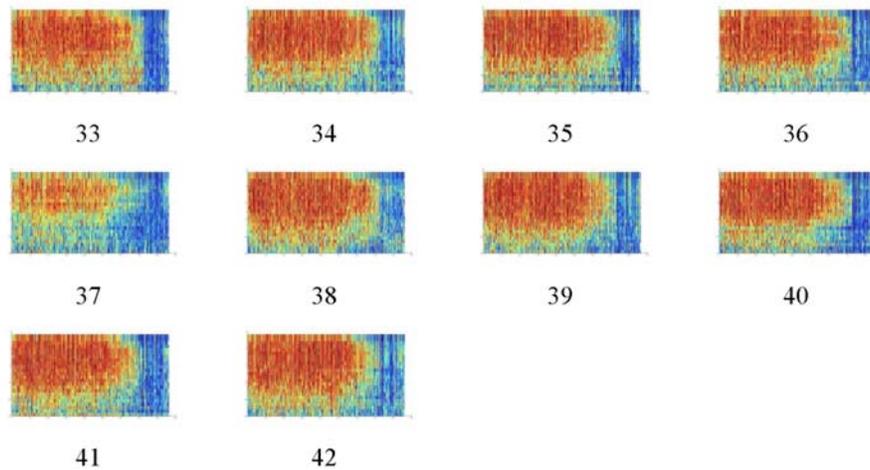


Figura 12 Matriz 3S da atividade meristemática

(...continua...)



Verifica-se, na Figura 12, que da imagem 15 à imagem 27 a atividade na região meristemática permaneceu em níveis mais baixos quando relacionados as demais imagens. Esse período coincide com a paralisação da atividade meristemática descrita anteriormente, podendo-se inferir que a análise em frequência, utilizando as wavelets, aqui representada pelas matrizes 3S, conseguiu perceber a descontinuidade no comportamento da atividade biológica do sistema radicular.

Da imagem 1 à imagem 14 da Figura 12, correspondente ao período anterior a paralisação, observa-se que a região correspondente à zona lisa e meristemática apresentou maior atividade, e que essas informações estão evidentes nas altas frequências. Seguindo para a esquerda dessas imagens (Figura 12), a atividade caiu gradativamente e em todas as bandas de frequências.

O resultado é semelhante ao descrito no item anterior. A atividade biológica, na região próxima à extremidade da raiz ou simplesmente atividade meristemática, deve-se a intensas divisões celulares e ao início dos processos de diferenciação dos tecidos que ocorre nessa região (zona lisa). A redução na

atividade meristemática ocorre ao se deslocar em direção à zona pelifera e à zona de maturação.

Já nas imagens de 28 a 42 da Figura 12, intervalo posterior ao blackout, ocorreram altas atividades em toda a ponta de raiz e os dados se manifestaram nas altas bandas de frequências.

Uma hipótese para tal resultado é o crescimento de raízes laterais. A emissão de raízes laterais é acompanhada pelo início da formação de novas células radiculares e o alongamento e multiplicação destas células da planta (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009), promovendo uma alta atividade biológica na região. Outra hipótese seria também relativa ao fortalecimento de todo o sistema radicular para enfrentar uma nova região com maior resistência à penetração, e como consequência o aumento da atividade em todo o sistema radicular para o aumento de seu tamanho transversal (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; QUEIROZ-VOLTAN; PRADO; MORETTI, 1998).

Os marcadores de frequência são, portanto, a definição de bandas de frequência onde um determinado fenômeno manifesta suas características de forma nítida, ou seja, o fenômeno apresentou suas principais características nesse intervalo de frequência.

A definição de marcadores de frequência para os dados do sistema radicular da planta mostrou-se complexa, com a difícil correlação das informações de frequência e fenômenos da planta. Os processos fisiológicos das raízes das plantas são harmoniosos e difíceis de serem isolados um do outro nas situações normais, todavia, em situações extremas, observou-se uma maior capacidade de associar marcadores ao comportamento das raízes. Vale ressaltar ainda que, no caso do crescimento das raízes o que se observou foi um tecido com uma constituição mais homogênea do que se observa, por exemplo, em frutos de milho (SENDRA et al., 2005).

5.4 Análise das wavelets Morlet e Daubechies aplicadas ao speckle dinâmico

Na Figura 13, observa-se a imagem Fujii de frutos de milho sem filtragem (referência) e a decomposição dessas imagens em frequência, utilizando a wavelet de Morlet, com posterior processamento pelo método de Fujii.

Como observado por Cardoso, Costa e Braga (2010), o embrião da semente se destaca nas altas frequências, enquanto que nas baixas frequências predominam as informações do endosperma.

Nas baixas frequências a distribuição da atividade biológica no endosperma se mostrou mais homogênea e destacada. Segundo Cardoso (2010), a atividade observada no endosperma pode ser atribuída à presença de água no tecido sem atividade biológica.

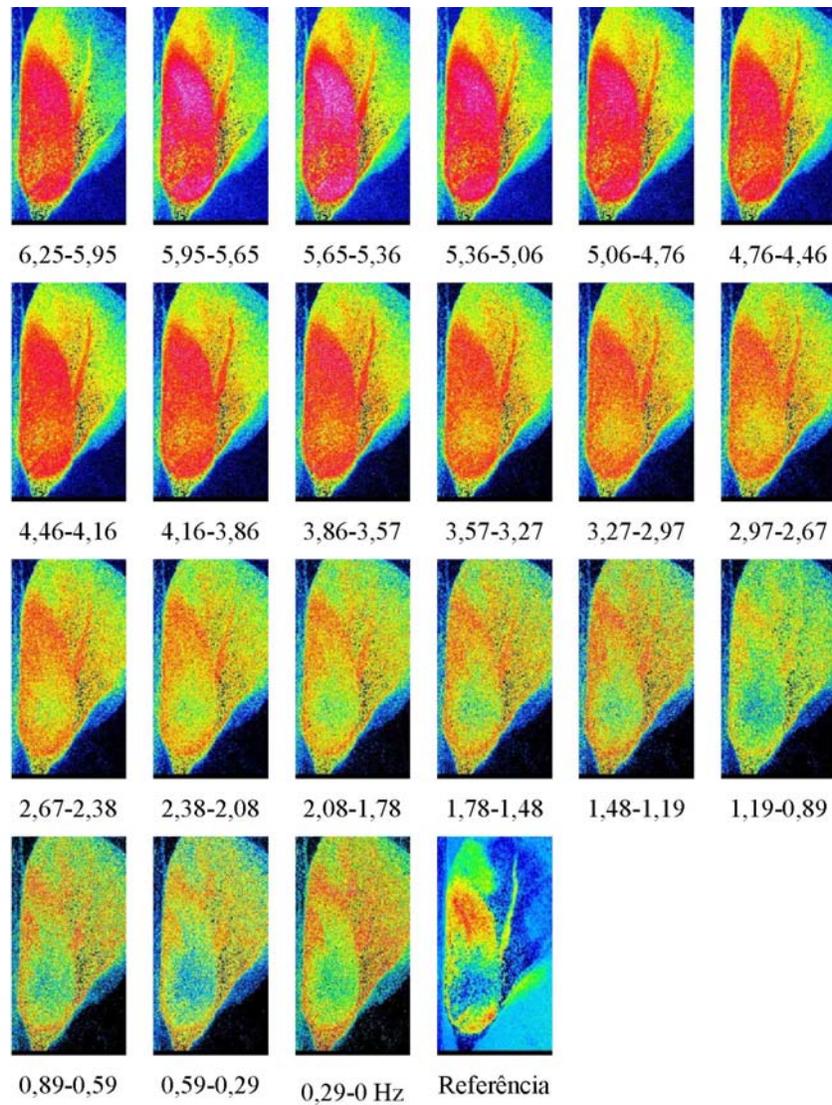


Figura 13 Análise em frequência, utilizando a wavelet de Morlet

O mesmo conjunto de imagens também foi processado, utilizando a wavelet de Daubechies e o resultado está ilustrado na Figura 14.

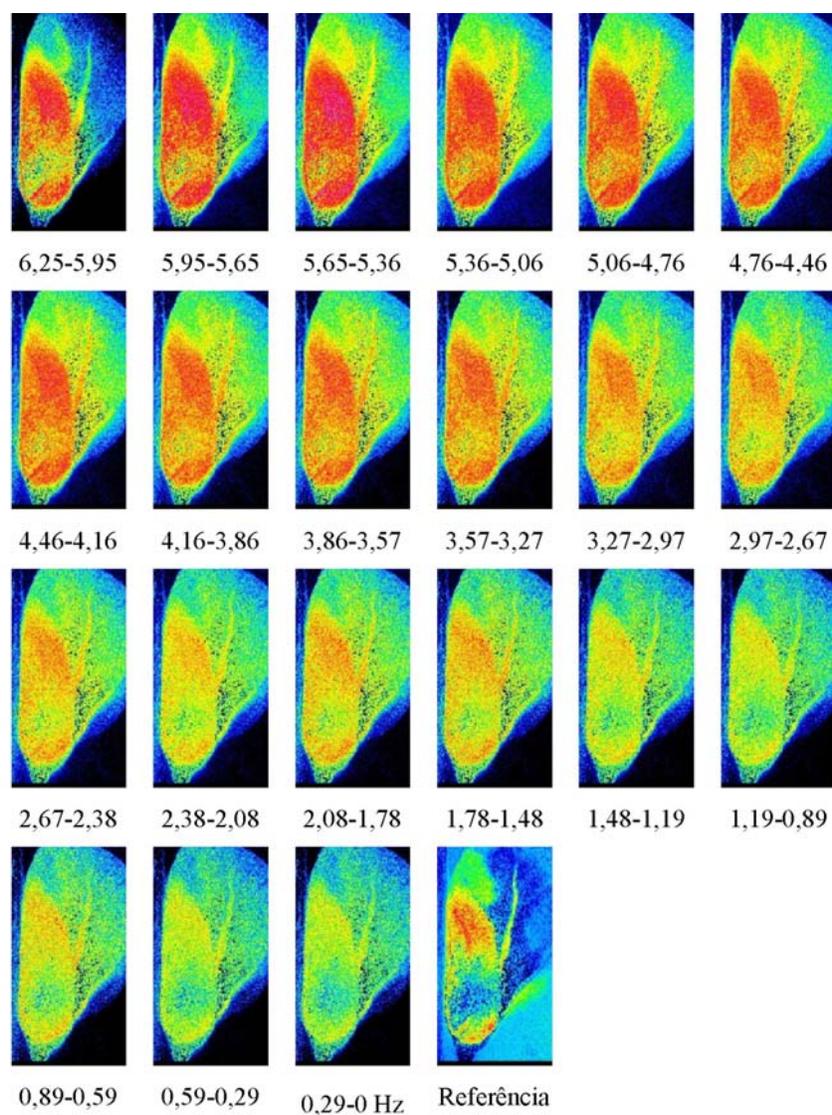


Figura 14 Análise em frequência, utilizando a wavelet Daubechies

O embrião apresentou comportamento semelhante aos dados analisados com a wavelet de Morlet, com altas atividades presentes nas altas frequências e uma redução dessa atividade à medida que se desloca na direção das baixas

frequências. A cor vermelha, pseudocor que corresponde às altas atividades, mostrou-se mais intensa na análise, utilizando a wavelet Morlet comparada com a Daubechies.

Com relação ao endosperma, ocorreu um acréscimo na atividade biológica ao se deslocar na direção das altas frequências, o que é oposto ao apresentado na abordagem por Morlet, e de forma simplista, também contrário ao senso comum, ou seja, no endosperma, o que se esperava era ausência de atividade nas altas frequências.

A Figura 15 apresenta o resultado da seleção de uma linha da imagem referente à banda de frequência 4,16 - 4,46 Hz, processada por Daubechies e outra por Morlet, que permite analisar por meio dos níveis de cinza, o comportamento do sinal do biospeckle analisado por ambas wavelets.

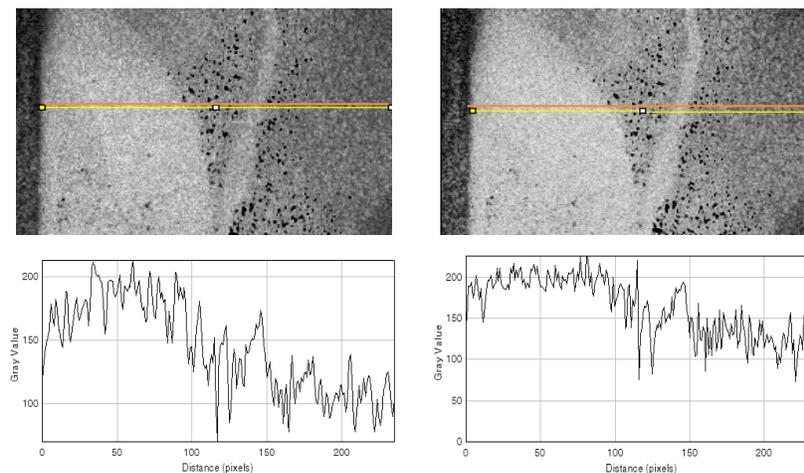


Figura 15 Níveis de cinza ao selecionar uma linha de uma imagem Daubechies (esquerda) e uma imagem Morlet (direita)

É possível observar que o comportamento dos dados processados com a wavelet Morlet é mais suave. Já as observações analisadas com a wavelet Daubechies, são mais oscilantes e sensíveis a variações bruscas do sinal do

speckle dinâmico, amplificando a atividade, ou seja, diferenciando mais o embrião do endosperma.

A diferenciação dos tecidos do fruto milho foi superior, utilizando a wavelet de Daubechies, onde foi possível distinguir o embrião do endosperma de forma clara em todo o espectro de frequência. Essa diferenciação pode ser positiva por um lado, mas não oferece a marcação em frequência obtida pela wavelet de Morlet, onde nas altas frequências se evidencia o embrião e nas baixas frequências se evidencia o endosperma. Para evitar adotar uma destas como a mais indicada nas análises do biospeckle, é necessário um maior domínio dos resultados, bem como a análise de histórias temporais conhecidas de forma numérica.

Segundo Rocha (2008), determinar qual a melhor função wavelets para um determinado sinal é um assunto que gera muita discussão, pois não há uma metodologia definida que possa fornecer de maneira robusta a resposta dessa pergunta, e a discussão se estende a sinais do biospeckle.

A diversidade dos materiais biológicos faz do sinal do biospeckle um sinal complexo. Dessa forma, cabe avaliar as características de cada uma das funções wavelets, realizar testes e de acordo com os objetivos do trabalho definir a função wavelet mais indicada.

6 CONCLUSÃO

Analisando os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a) o protocolo sugerido mostrou-se satisfatório, podendo ser validado para a aplicação do biospeckle na análise do crescimento das raízes em culturas de tecidos, já que ambas configurações experimentais (forward e back scattering) podem ser utilizadas;
- b) a técnica do biospeckle foi eficaz na diferenciação de áreas de maior e menor atividade biológica da região meristemática ao longo do seu crescimento;
- c) ao aproximar da camada de maior resistência à penetração observou-se uma mudança na trajetória da raiz, acompanhado de uma paralisação da atividade meristemática. Esses fenômenos evidenciam que a ação sistêmica do sistema radicular, ao longo do crescimento, e a busca de alternativa para o seu crescimento. Mais experimentos são necessários para confirmar essas hipóteses;
- d) a análise em frequência da atividade meristemática das raízes possibilitou um ganho de informações no estudo do sistema radicular, porém os marcadores de frequência mostraram-se complexos, necessitando de mais estudos para o desenvolvimento de um critério de identificação;
- e) a wavelet Daubechies mostrou-se mais sensível a variações dos padrões de interferência, enquanto que a Morlet apresentou maior robustez. Os dados provenientes da análise gráfica limitaram as comparações, e a complementação do estudo com análises numéricas pode enriquecer a discussão.

6.1 Trabalhos futuros

Como proposta de trabalhos futuros destaca-se:

- a) utilização de outros dispositivos ópticos, tal como o diafragma, para melhorar a qualidade das imagens provenientes do speckle dinâmico;
- b) a influência do laser sobre o tecido biológico, investigando se a luz laser excita, inibe ou é indiferente para determinadas organelas do tecido;
- c) aperfeiçoar os marcadores de frequência do biospeckle;
- d) implementar a análise numérica na aplicação das wavelets de Daubechies e Morlet no sinal do speckle dinâmico.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: EMBRAPA Cerrado, 2002. 16 p.

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.

_____. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. **Optics and Laser Technology**, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.

AVELAR, R. C. et al. Produção de mudas de mamona (*Ricinus communis* L.) em tubetes de diferentes tamanhos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEO, GORDURA E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Anais...** Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/ProducaoMudas14.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2010.

BAGNATO, V. S. Os fundamentos da luz laser. **Física na Escola**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 4-9, jul./dez. 2001.

BARRETO, B. B. et al. Protocolo para aplicação do biospeckle em cultura de tecidos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 10., 2010, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA, 2010. 1 CD-ROM.

BENGOUGH, A. G. et al. Root responses to soil physical conditions: growth dynamics from field to cell. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 437-447, Feb. 2006.

BISOGIN, D. A. et al. Germinação e propagação *in vitro* de porongo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 332-339, mar. 2008.

BOLZAN, M. J. A. Transformada em ondeleta: uma necessidade. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 563-567, abr. 2006.

BORGES, A. L. et al. Distribuição do sistema radicular da bananeira 'Prata-Anã' em duas frequências de fertirrigação com uréia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 259-262, mar. 2008.

BRAGA, R. A. et al. Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique. **Biosystems Engineering**, Amsterdam, v. 91, n. 4, p. 465-469, Aug. 2005.

_____. Live biospeckle laser imaging of root tissue. **Biosystems Engineering**, London, v. 38, n. 5, p. 679-686, May 2009.

BRAGA JÚNIOR, R. A. **Biospeckle**: uma contribuição para o desenvolvimento de uma técnica aplicada à análise de sementes. 2000. 150 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

CARDOSO, R. R. **Análise espectral do biospeckle laser em materiais biológicos**. 2010. 51 p. Monografia (Graduação em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

CARDOSO, R. R.; COSTA, A. G.; BRAGA, R. A. Análise espectral do biospeckle laser em materiais biológicos. In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 10., 2010, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA, 2010. 1 CD-ROM.

CARVALHO, P. H. A. et al. Motility parameters assessment of bovine frozen semen by biospeckle laser (BSL) system. **Biosystems Engineering**, London, v. 102, n. 1, p. 31-35, Jan. 2009.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CHAGAS, H. A. et al. Esporulação da *Botryotinia ricini* em diferentes meios de cultura. **Bioscience Journal**, Washington, v. 25, n. 5, p. 120-123, Sept./Oct. 2009.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**: parte II, órgãos, experimentos e interpretação. São Paulo: Roca, 1987. 340 p.

DAUBECHIES, I. The wavelet transform time-frequency localization and signal analysis. **IEEE Transaction on Information Theory**, New York, v. 36, n. 5, p. 961-1004, May 1990.

FARGE, M. Wavelet transforms and their applications to turbulence. **Annual Review of Fluid Mechanics**, Palo Alto, v. 24, p. 395-458, 1992.

FERREIRA, M. A.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 21-43.

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.

GARCIA, R. A. et al. Crescimento aéreo e radicular de arroz de terras altas em função da adubação fosfatada e bioestimulante. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 4, p. 65-72, 2009.

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

GUTIERREZ, C. E. C. **Eliminação do ruído por encolhimento de Wavelets**. 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

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

INTERNACIONAL UNITED STATES CENSUS BUREAU. **U.S. total midyear population for the world: 1950-2050**. Disponível em: <<http://www.census.gov/ipc/www/idb/worldpop.php>>. Acesso em: 2 dez. 2010.

LATHI, B. P. **Sinais e sistemas lineares**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 856 p.

LIMA, P. C. **Wavelets: uma introdução**. Belo Horizonte: UFMG, 2003. Disponível em: <<http://www.mat.ufmg.br/~lima/artigos/rmu33.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2010.

LIRA, M. M. S.; CARVALHO JÚNIOR, M. A.; OLIVEIRA, H. M. Compactação de sinais de distúrbios em sistemas elétricos de transmissão via wavelets. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PRODUÇÃO E TRANSMISSÃO DE ENERGIA ELÉTRICA, 1., 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2003. 1 CD-ROM.

- LIU, Y. et al. Daubechies wavelet-based method for elastic problems. **Engineering Analysis with Boundary Elements**, Southampton, v. 34, n. 2, p. 114-121, 2010.
- MACHADO, M. P. et al. Meios de cultura na micropropagação do porta-enxerto de videira "VR043-43" (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 277-280, jan./fev. 2007.
- MARQUES, J. K. **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, 2009.
- MORETTIN, P. A. **Ondas e ondeletas**. São Paulo: EDUSP, 1999. 276 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NOBRE, C. M. B. **Análise espectral do biospeckle laser através do momento de inércia, entropia e Cross-spectrum**. 2008. 179 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- PAIXÃO, C. A. **Desenvolvimento de um modelo dinâmico para o Biospeckle**. 2009. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.
- POMARICO, J. A. et al. Speckle interferometry applied to phamaco dynamic studies: evaluation of parasite motility. **European Biophysics Journal**, New York, v. 33, n. 8, p. 694-699, Dec. 2004.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; PRADO, H. do; MORETTI, F. C. Aspectos estruturais de raízes de cana-de-açúcar sob o efeito da compactação do solo. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 1, p. 49-55, 1998.
- RABAL, H. J.; BRAGA, R. A. **Dynamic laser speckle and applications**. Boca Raton: CRC, 2008. 304 p.

RABELO, G. F. et al. Laser speckle techniques in quality evaluation of orange fruits. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 4, p. 570-575, 2005.

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**, Elmsford, v. 64, n. 3, p. 314-321, Mar. 2008.

ROCHA, V. B. **Uma abordagem de wavelets aplicado à combinação de previsões**: uma análise teórica e experimental. 2008. 155 p. Dissertação (Mestrado em Métodos Numéricas em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SEARS, F.; ZEMANSKY, M. W.; YOUNG, H. D. **Física 4**: ondas eletromagnéticas, óptica, física atômica. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1985. 1016 p.

SENDRA, G. H. et al. Decomposition of biospeckle images in temporary spectral bands. **Optics Letters**, New York, v. 30, n. 13, p. 1641-1643, Dec. 2005.

SILVA, E. R. **Estudo das propriedades do biospeckle e suas aplicações**. 2007. 120 p. Dissertação (Mestrado em Física Geral) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SOUZA, E. M. de et al. Comparação das bases de Wavelets ortonormais e biortonormais: implementação, vantagens e desvantagens no posicionamento com GPS. **Tendências em Matemática Aplicada e Computacional**, São Carlos, v. 8, n. 1, p. 149-158, 2007.

SPIEGEL, M. R. **Análise de Fourier**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1976. 249 p.

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.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2000. 128 p.

VASCONCELOS, A. C. et al. Fertilidade do solo e nutrição de plantas: avaliação do sistema radicular. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 849-858, jul./ago. 2003.

ANEXOS

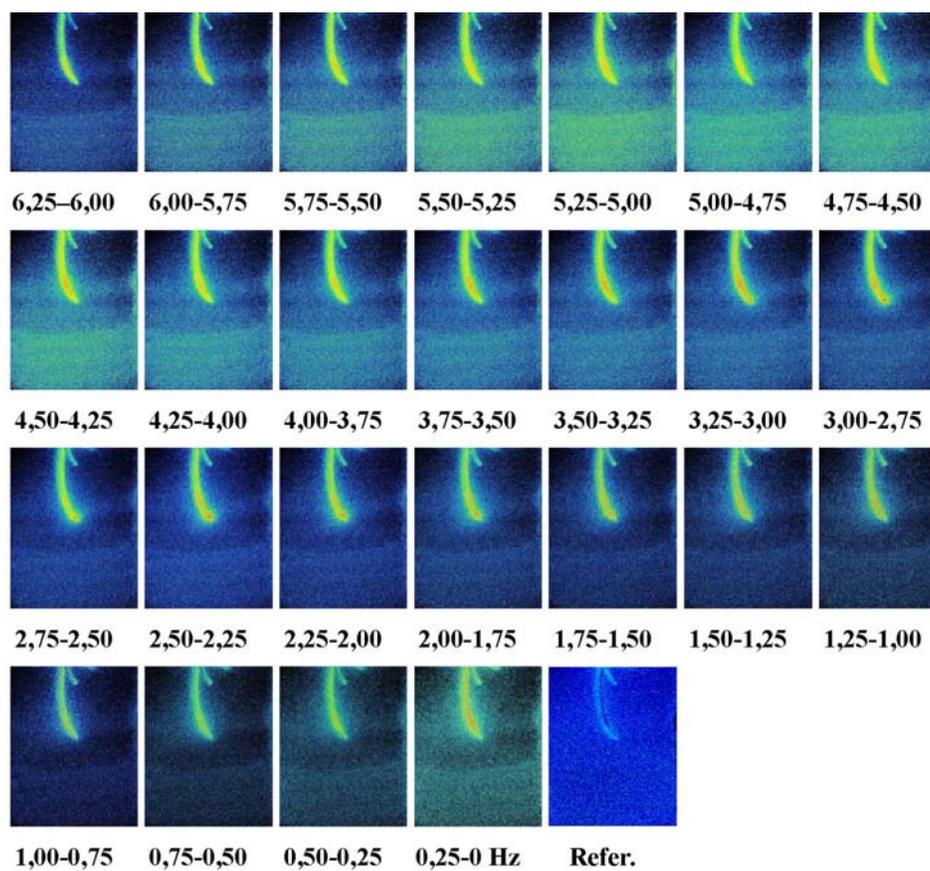


Figura 1 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 1

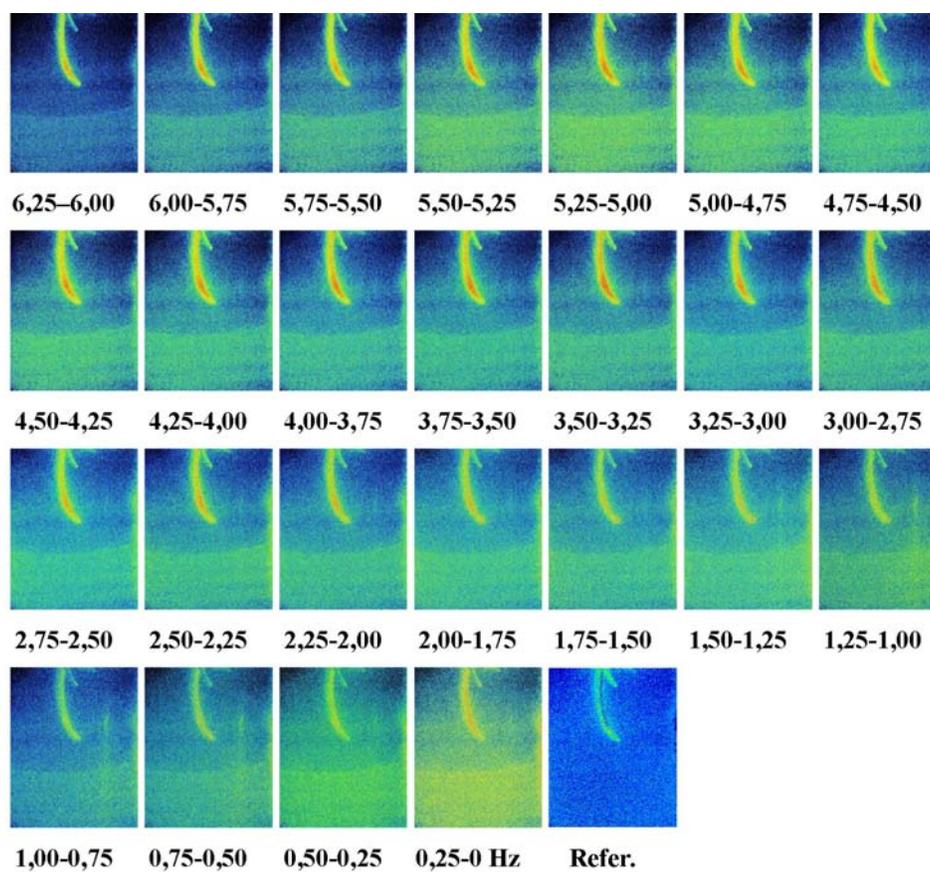


Figura 2 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 2

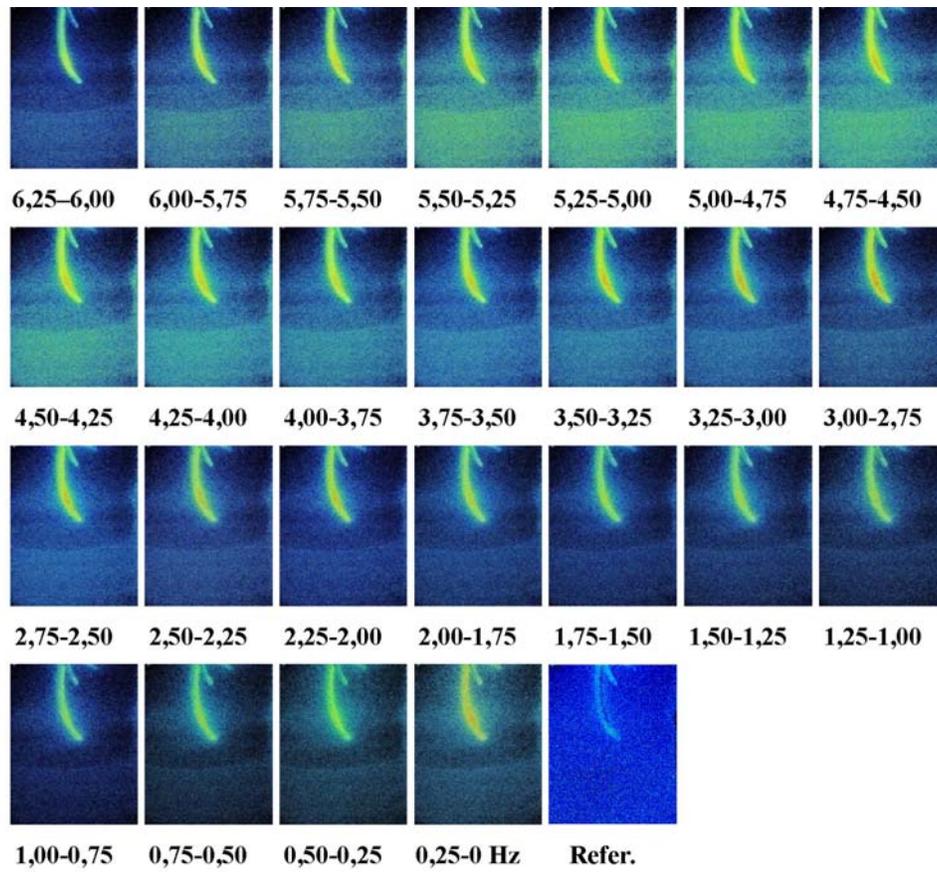


Figura 3 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 3

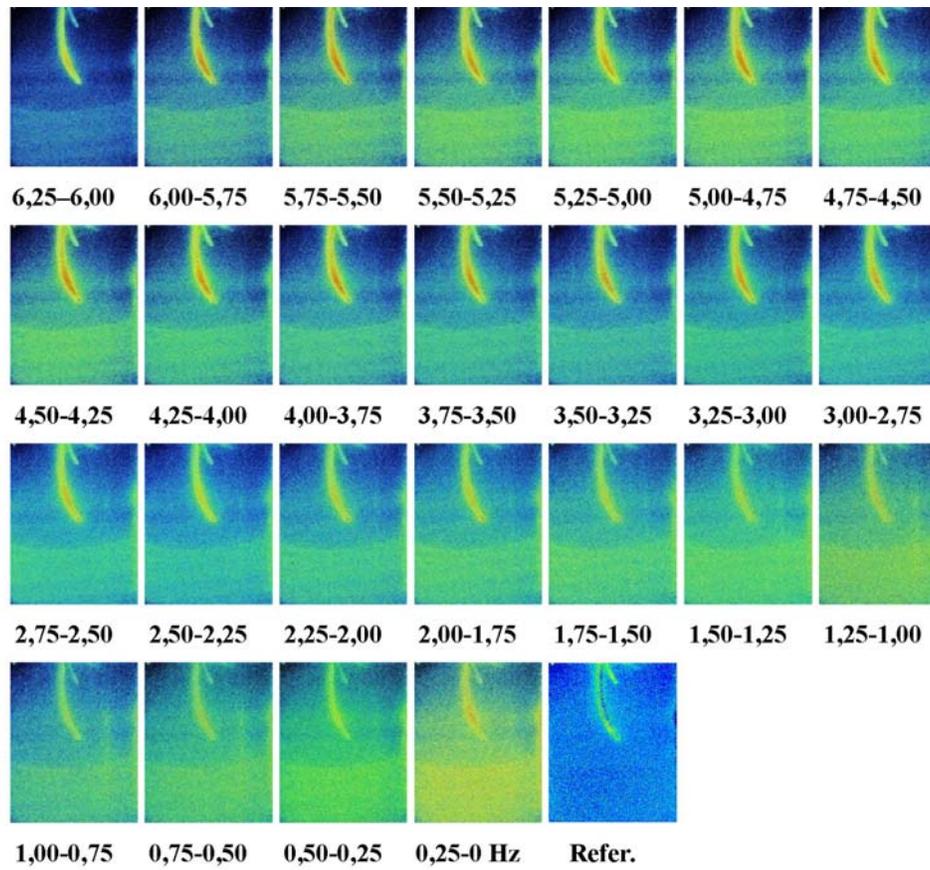


Figura 4 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 4

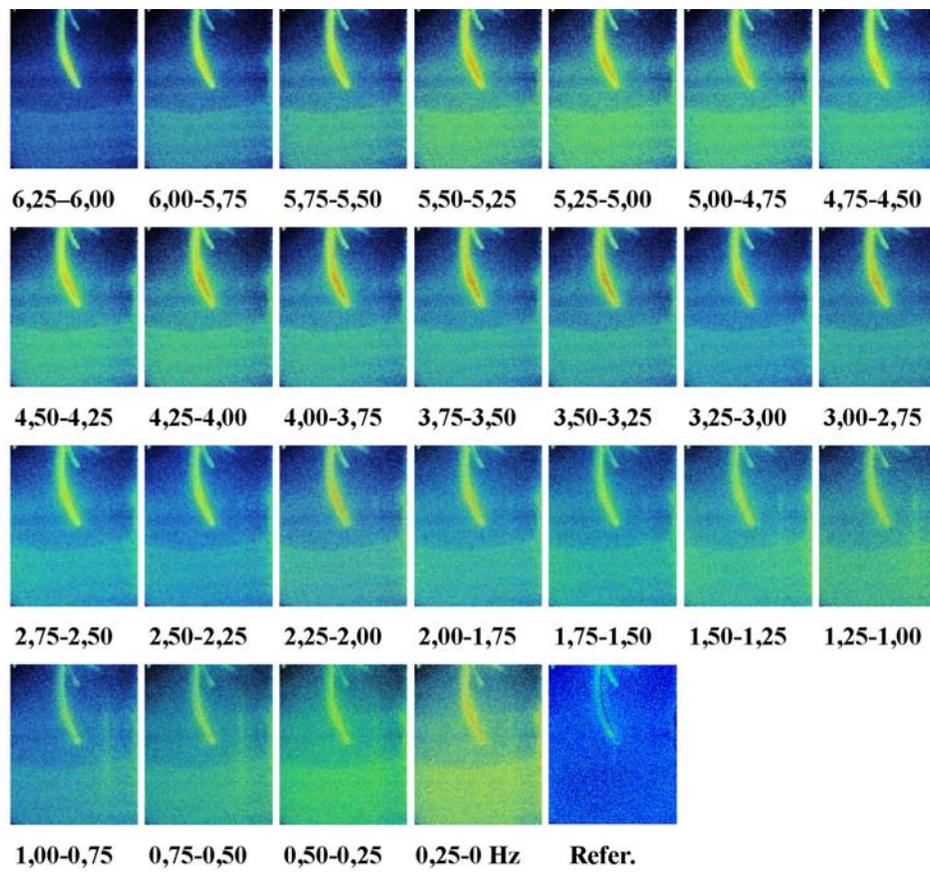


Figura 5 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 5

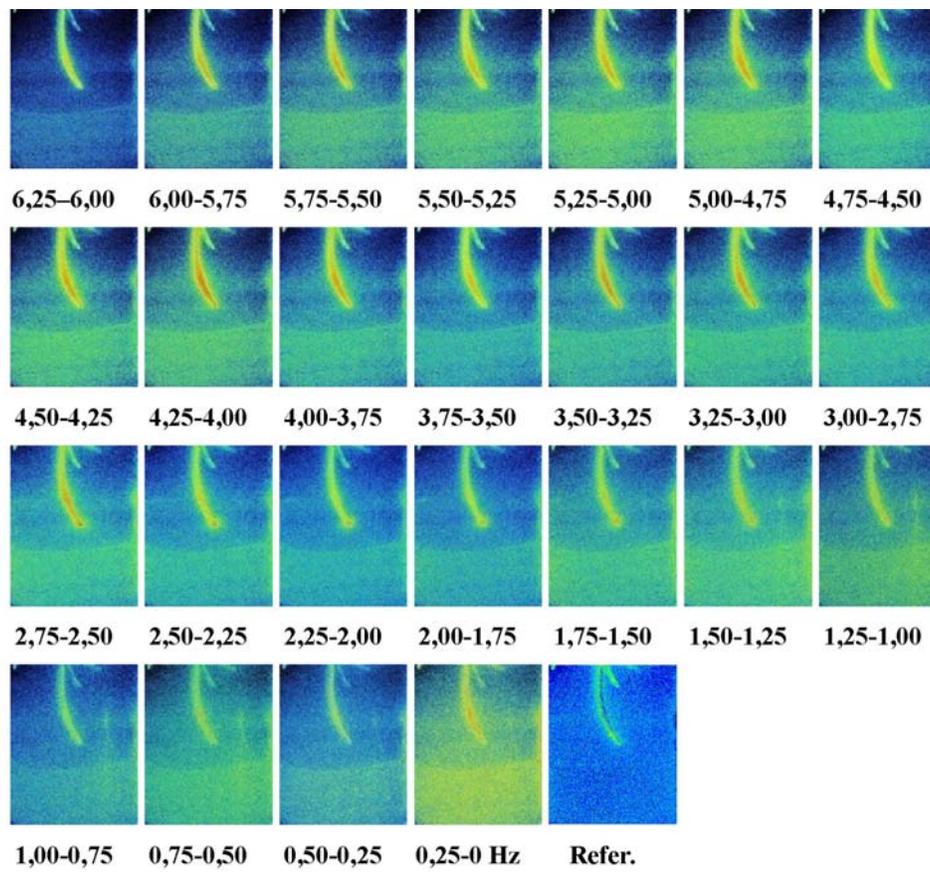


Figura 6 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 6

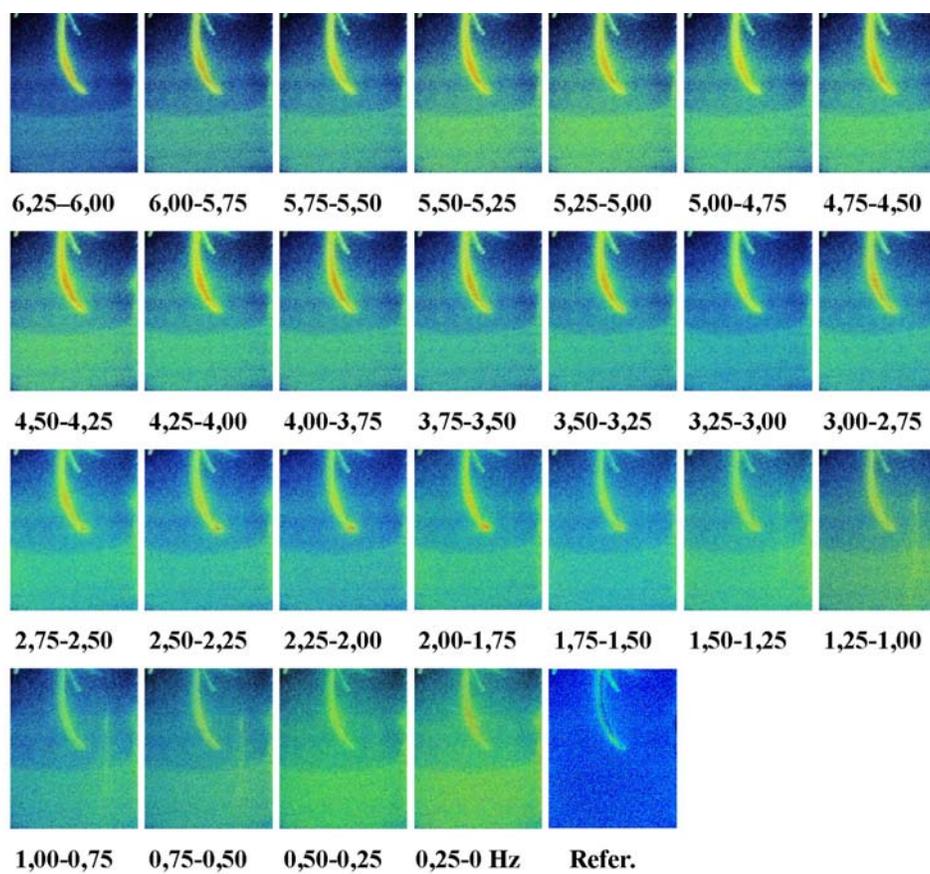


Figura 7 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 7

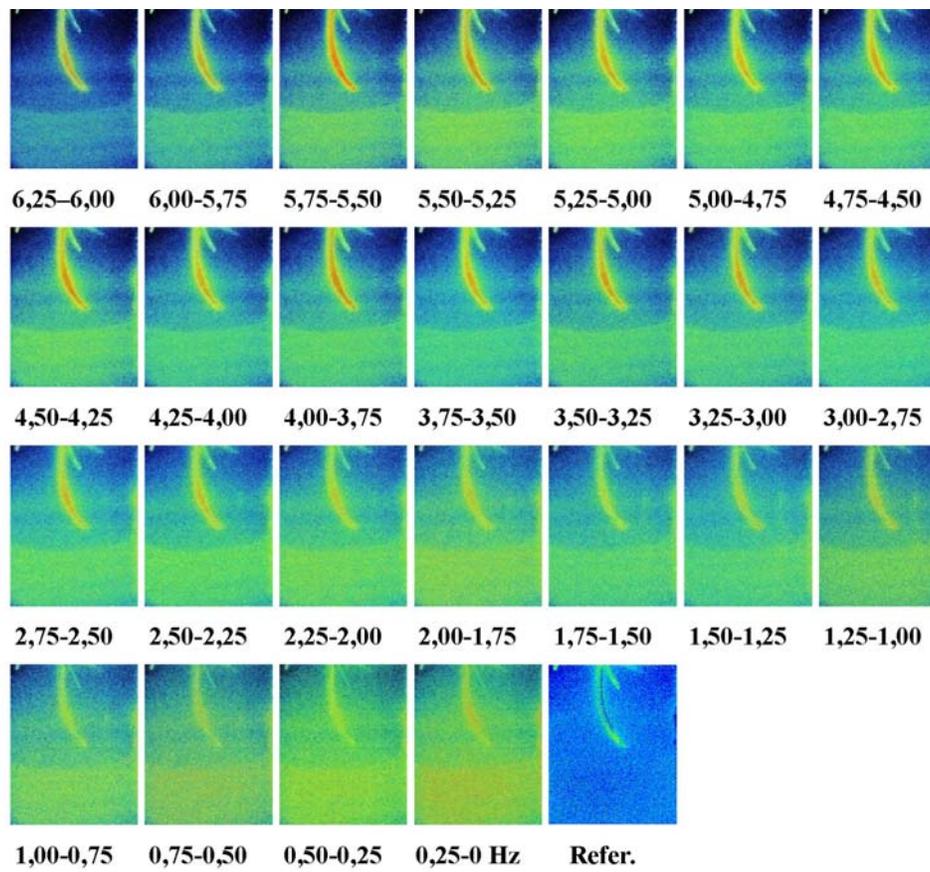


Figura 8 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 8

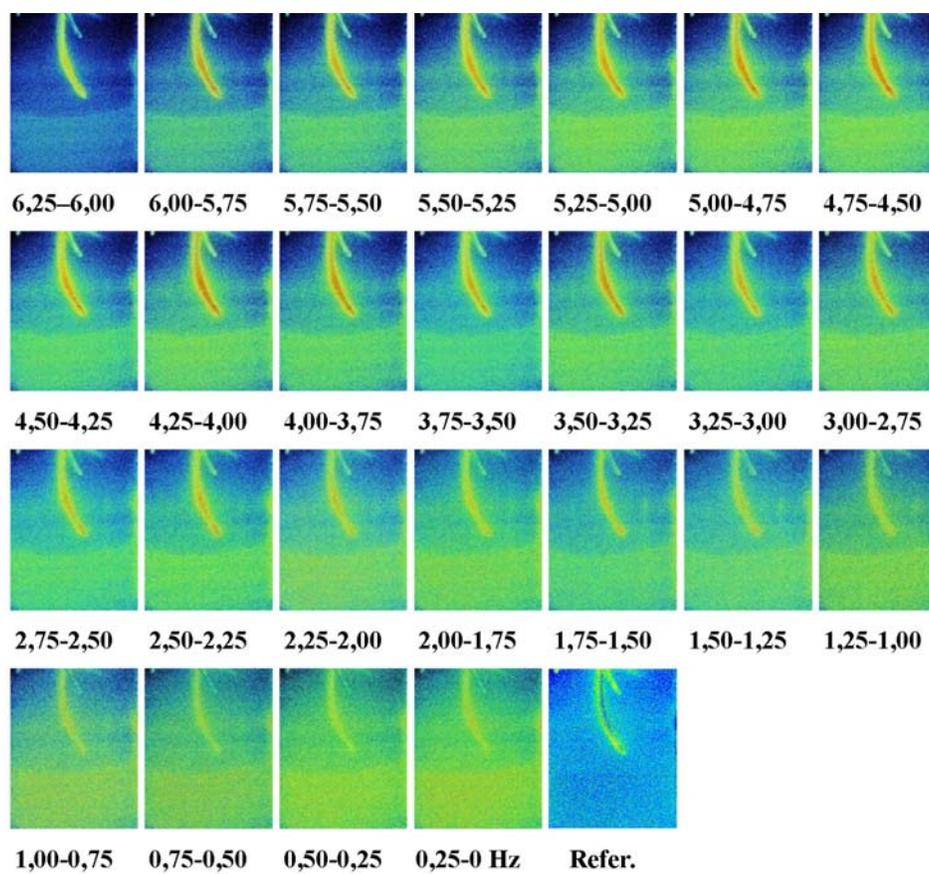


Figura 9 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 9

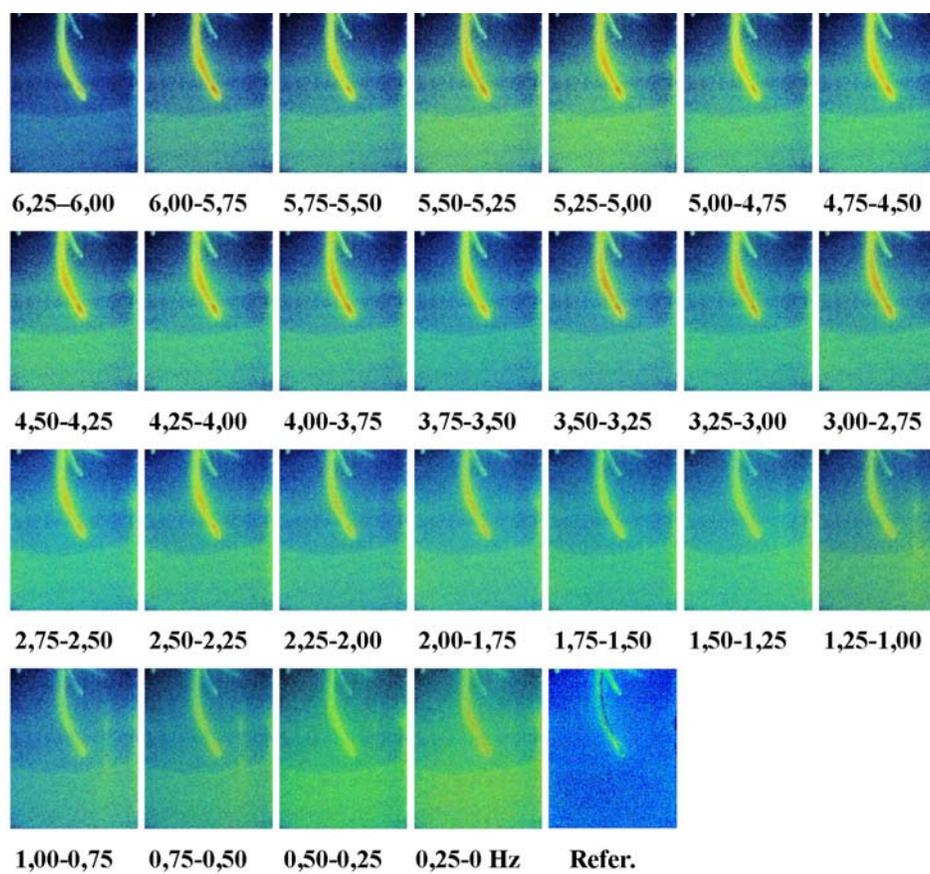


Figura 10 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 10

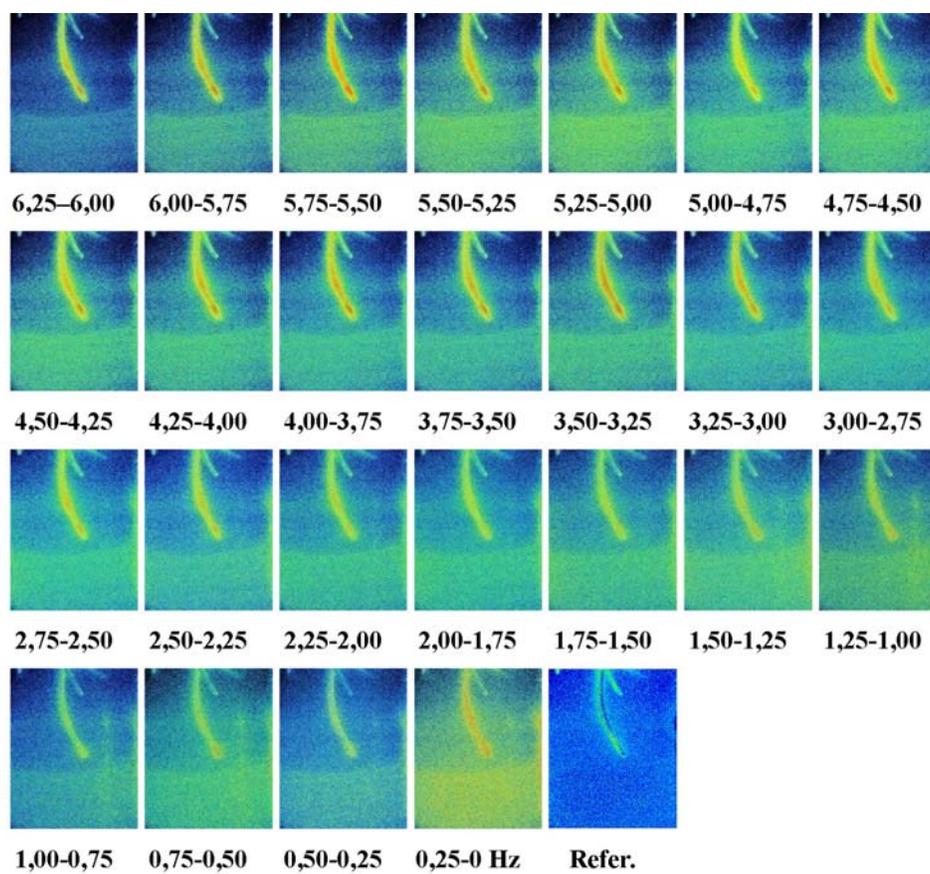


Figura 11 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 11

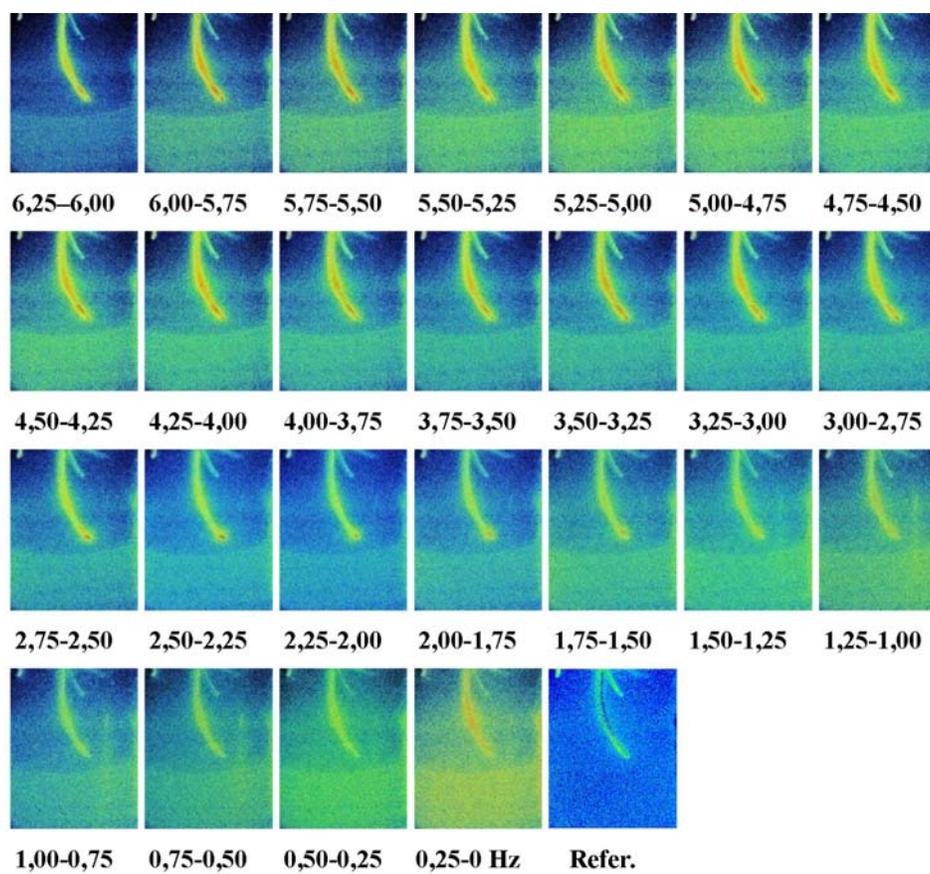


Figura 12 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 12

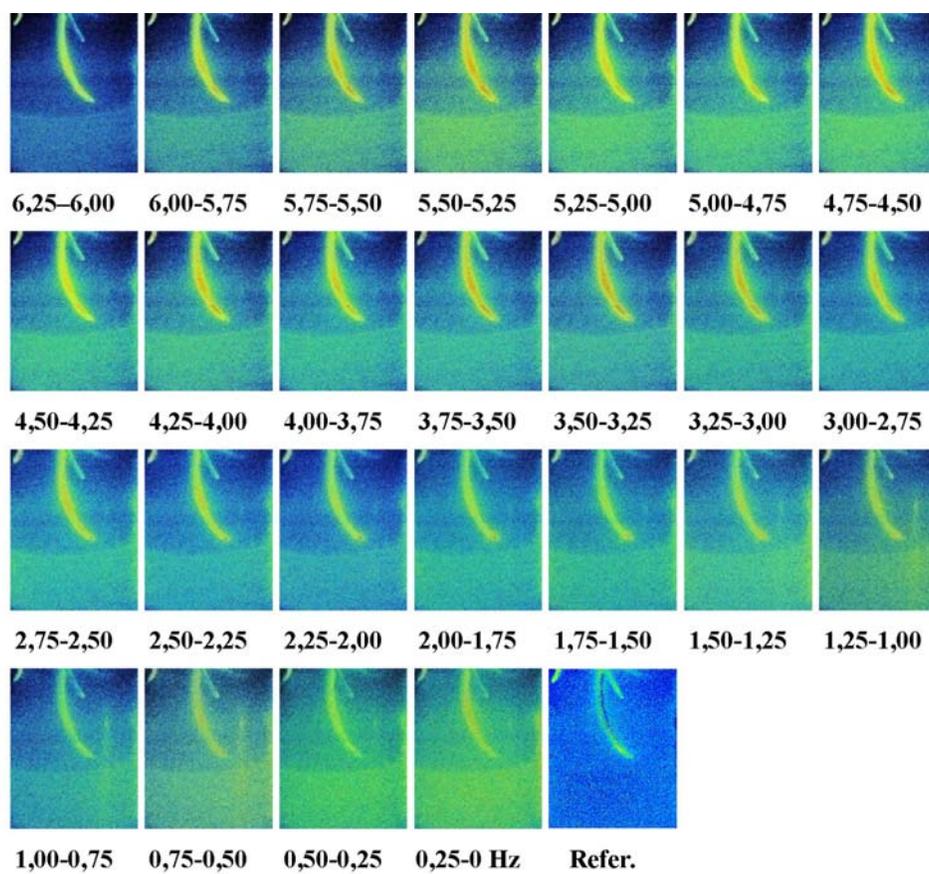


Figura 13 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 13

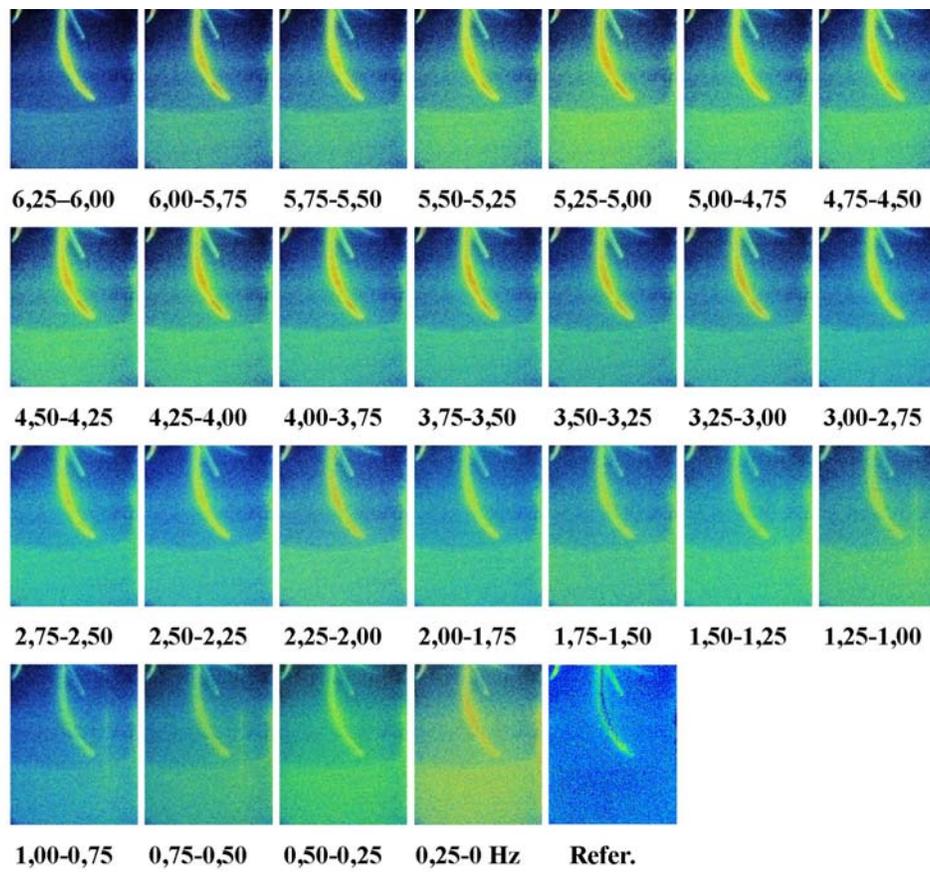


Figura 14 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 14

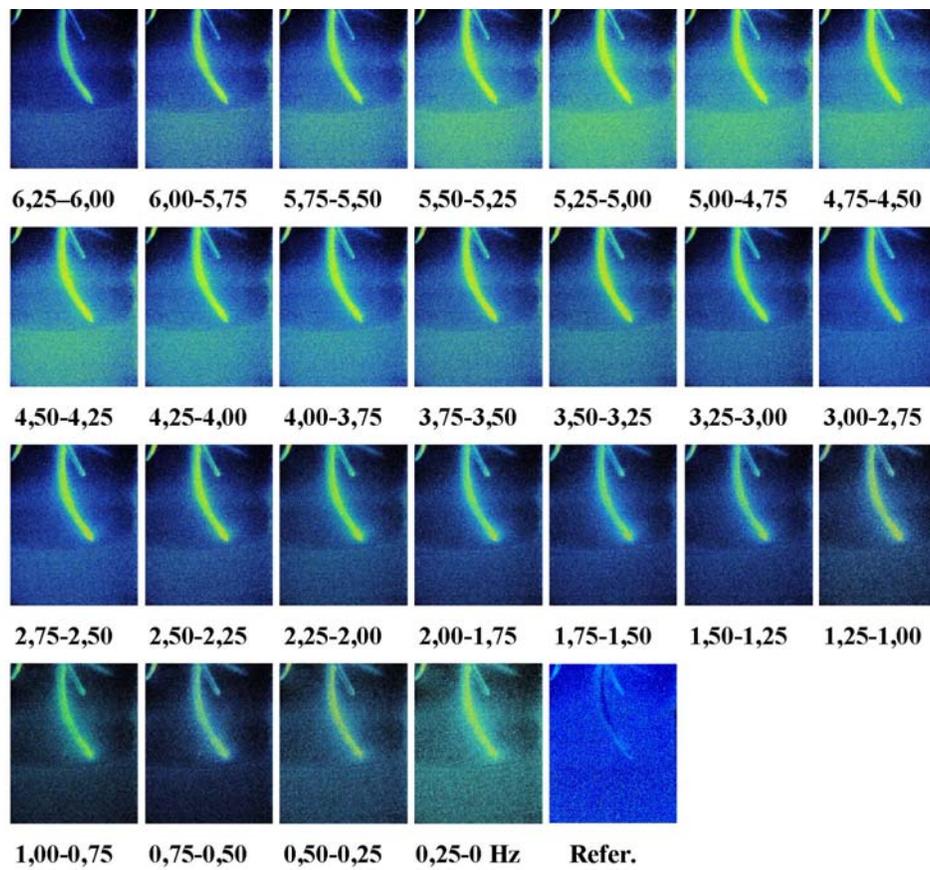


Figura 15 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 15

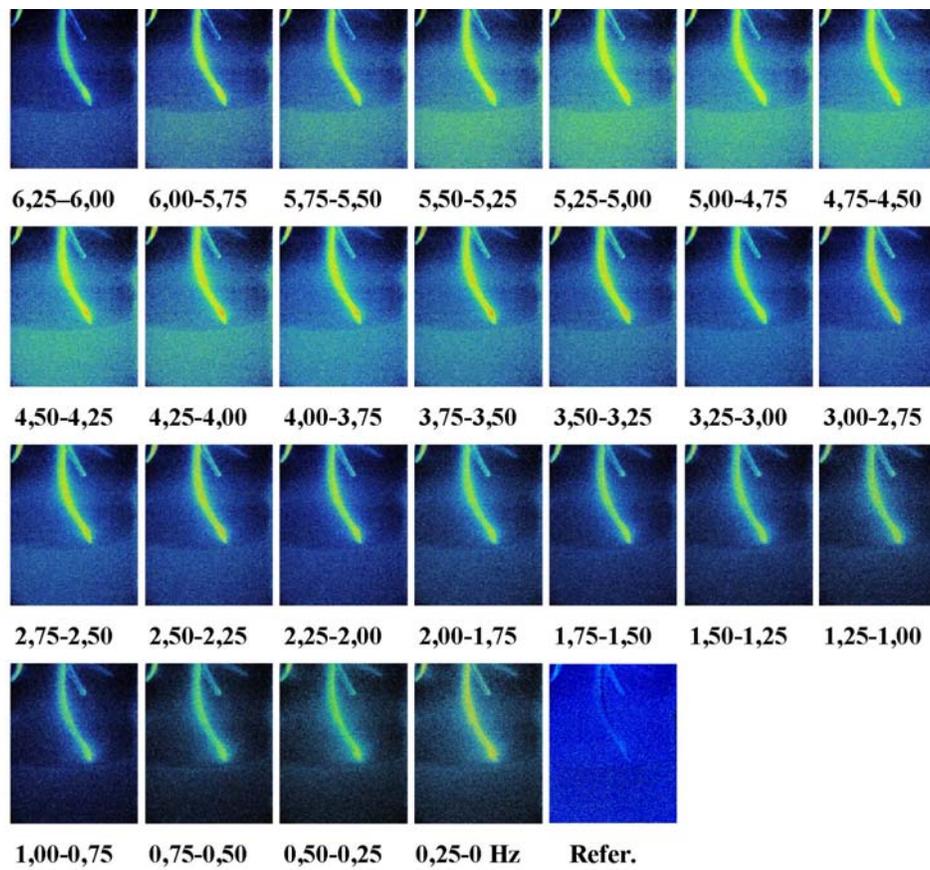


Figura 16 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 16

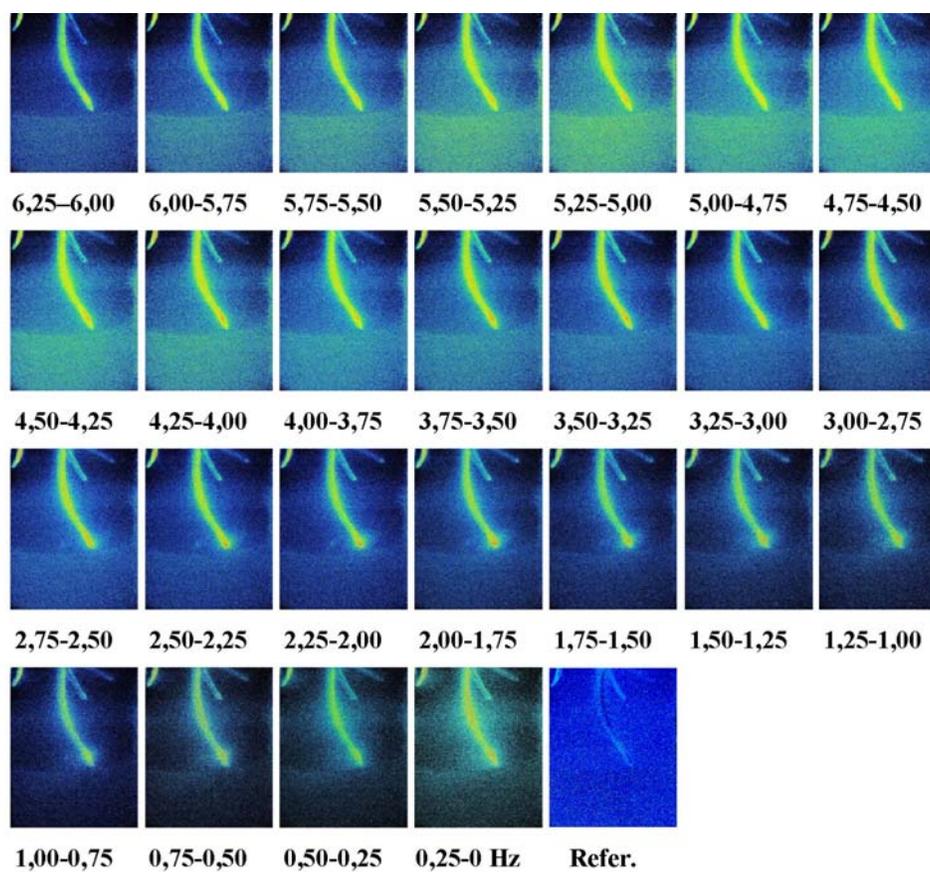


Figura 17 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 17

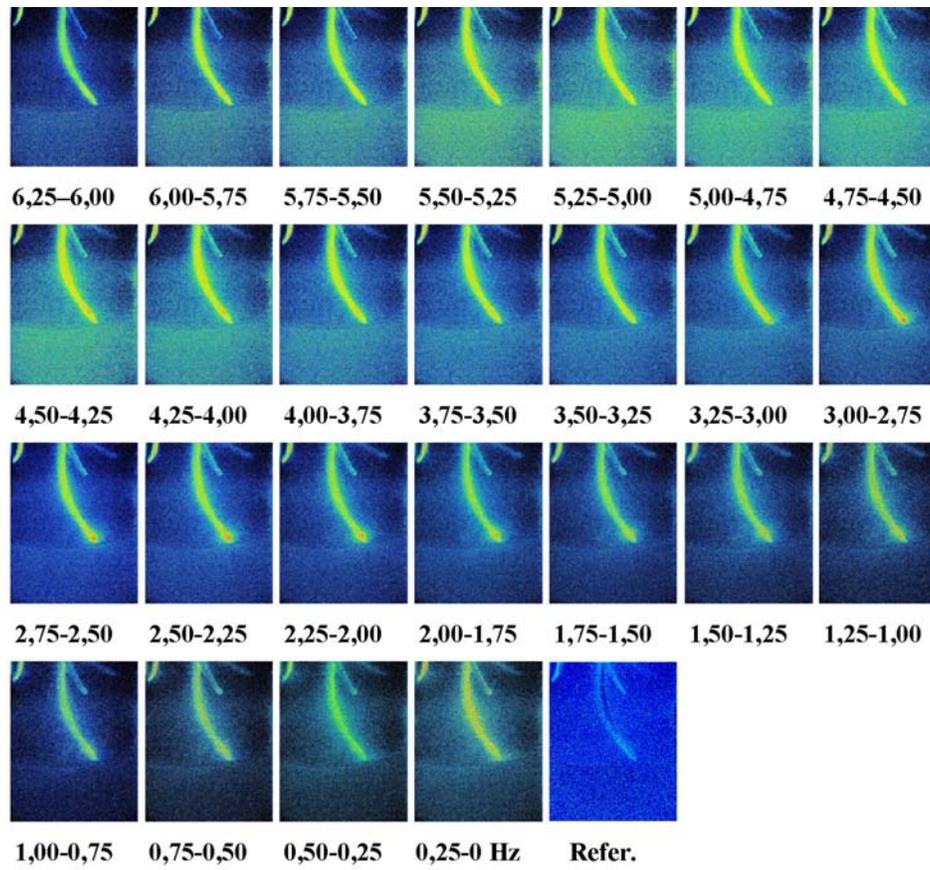


Figura 18 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 18

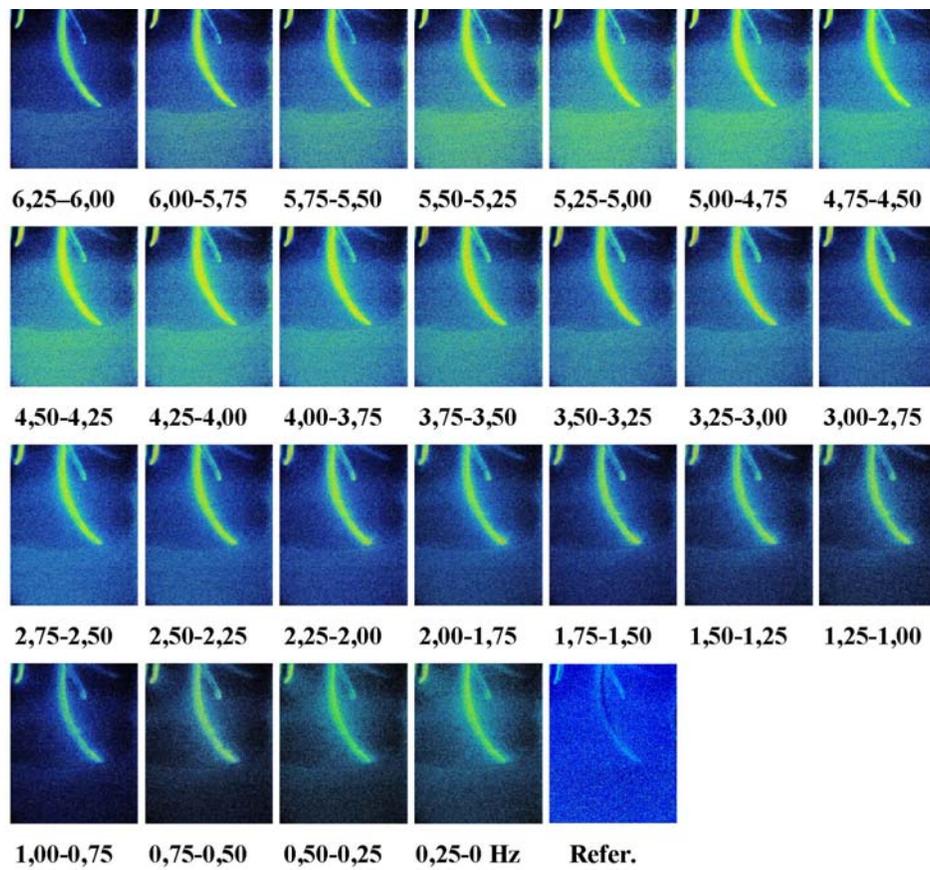


Figura 19 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 19

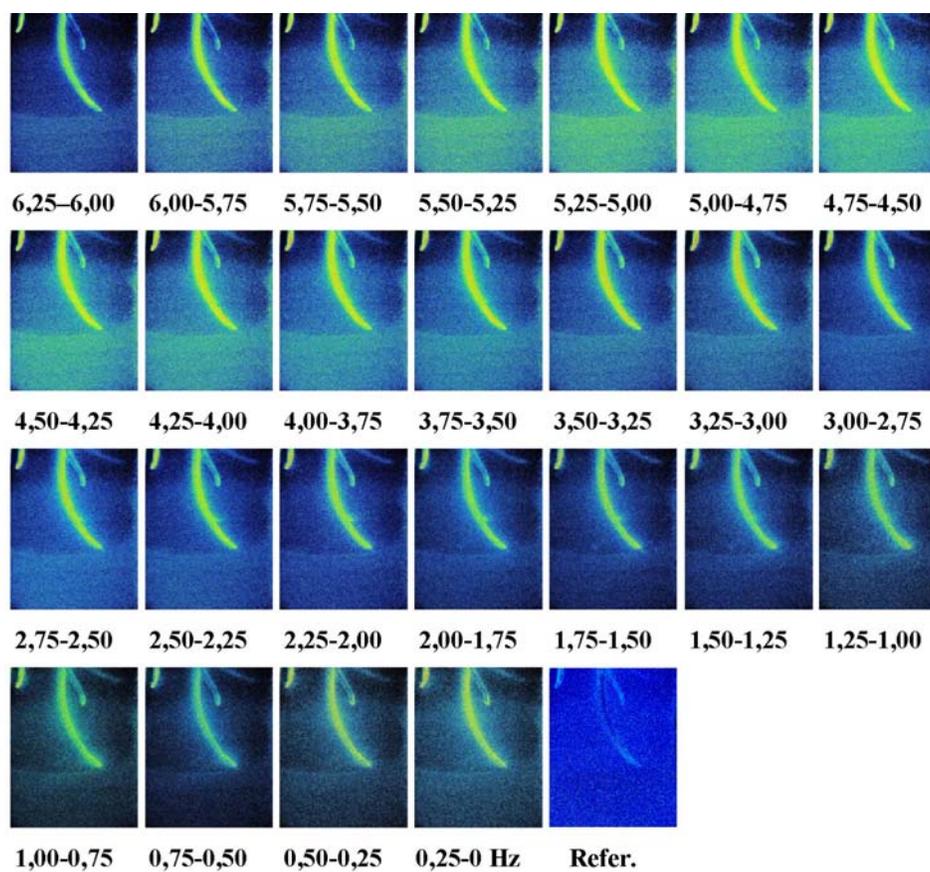


Figura 20 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 20

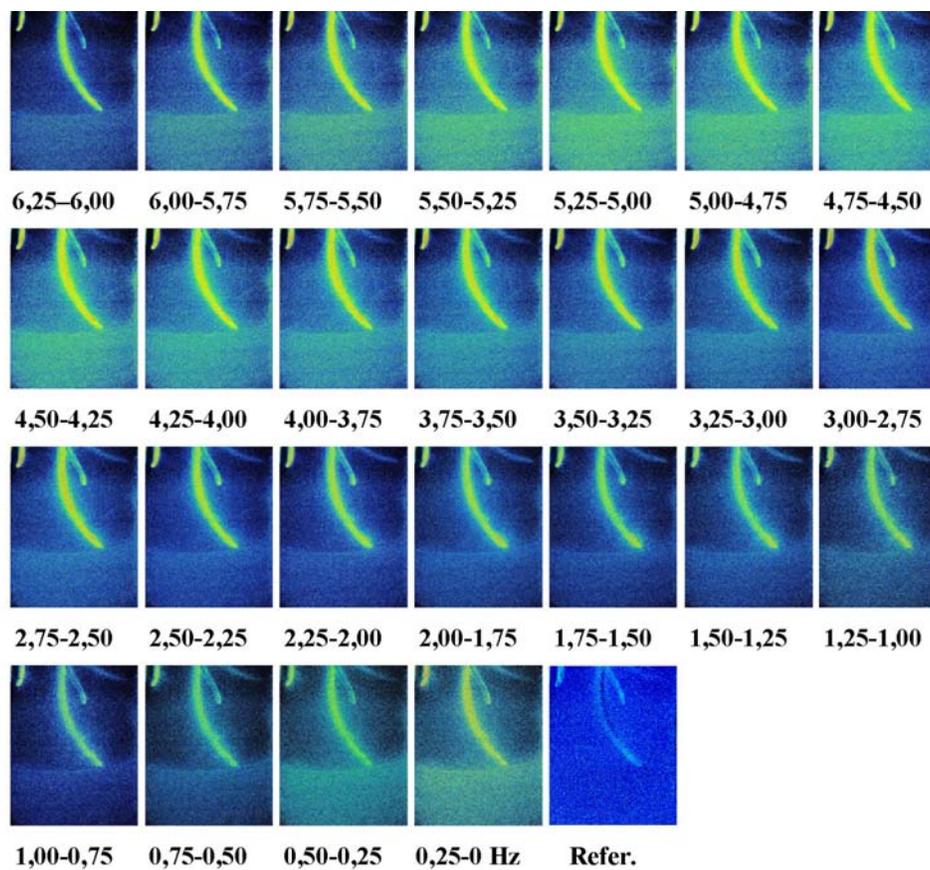


Figura 21 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 21

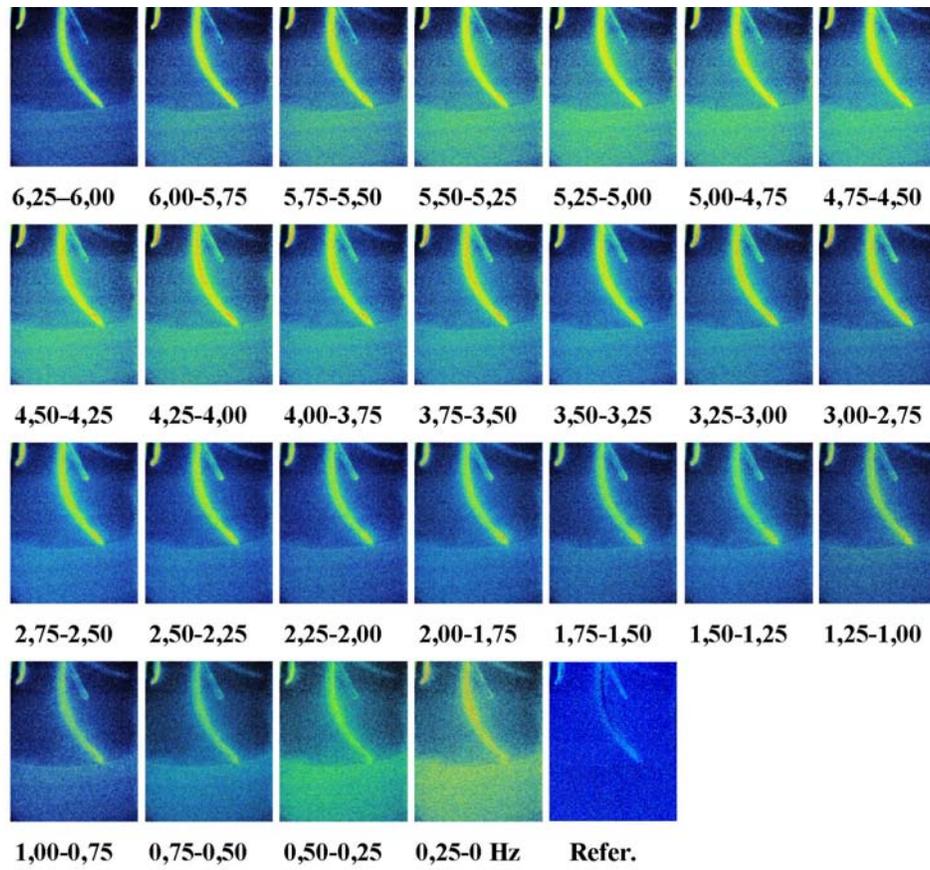


Figura 22 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 22

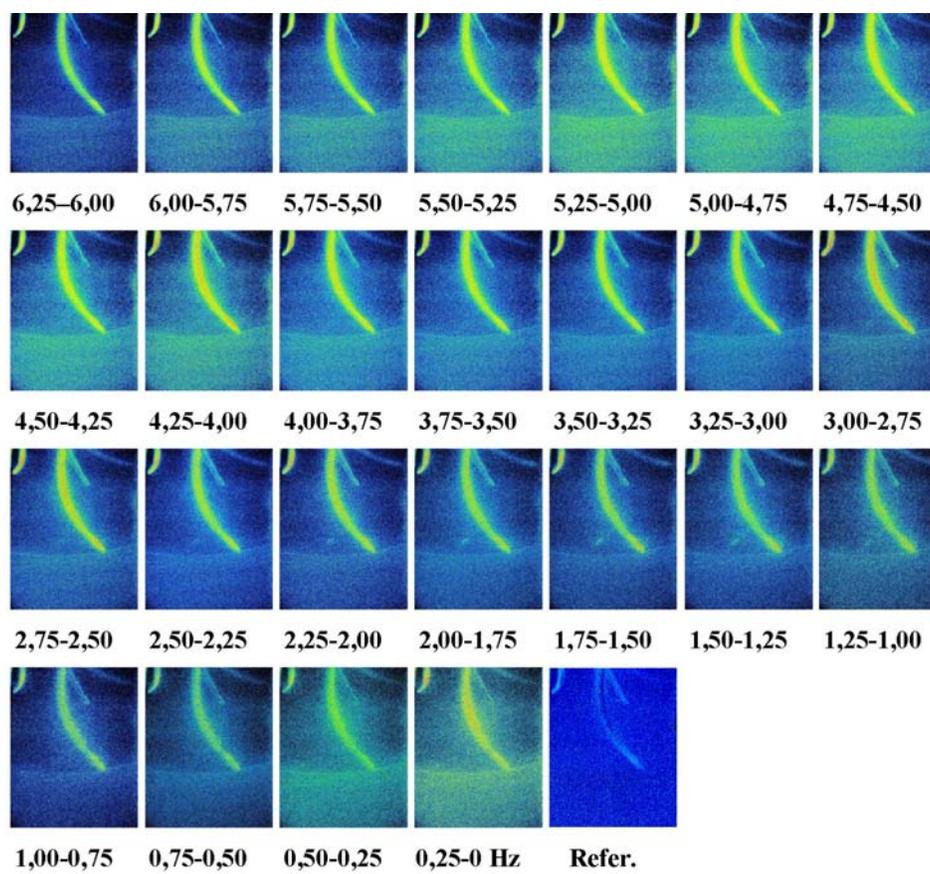


Figura 23 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 23

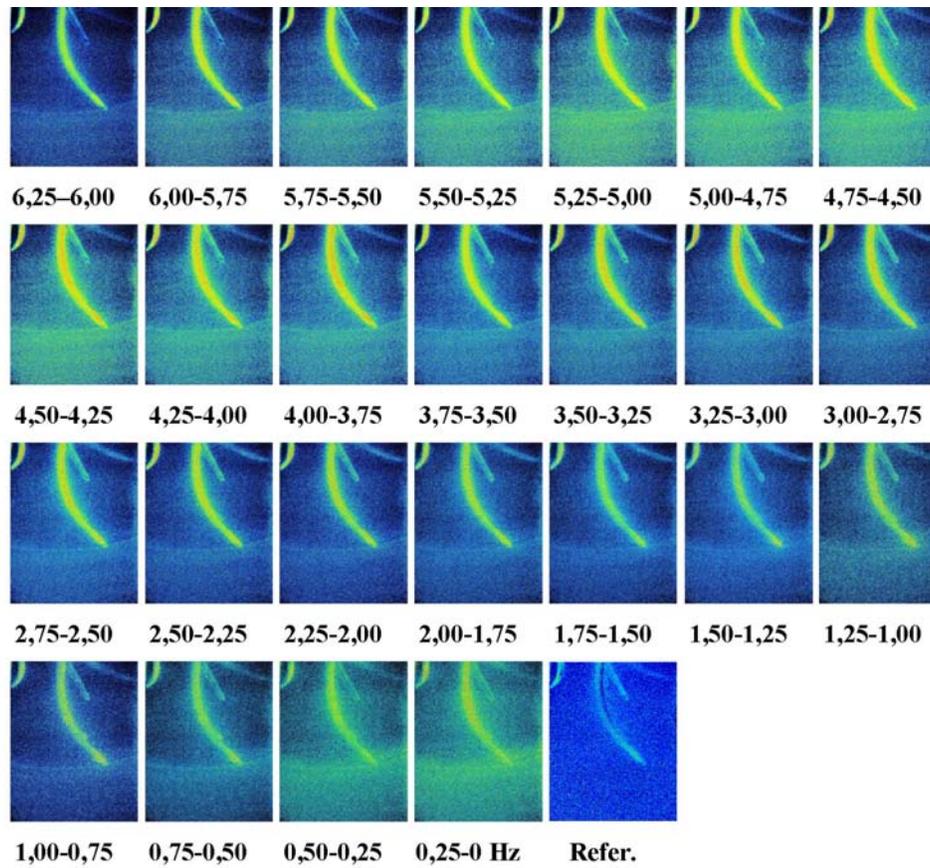


Figura 24 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 24

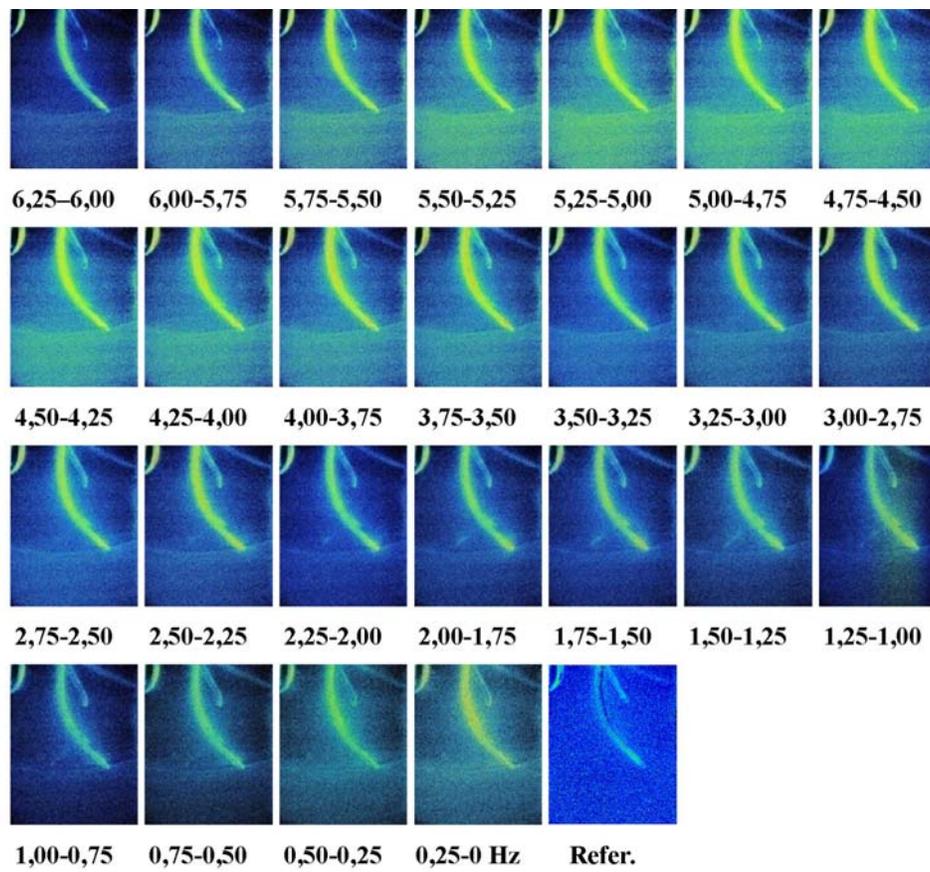


Figura 25 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 25

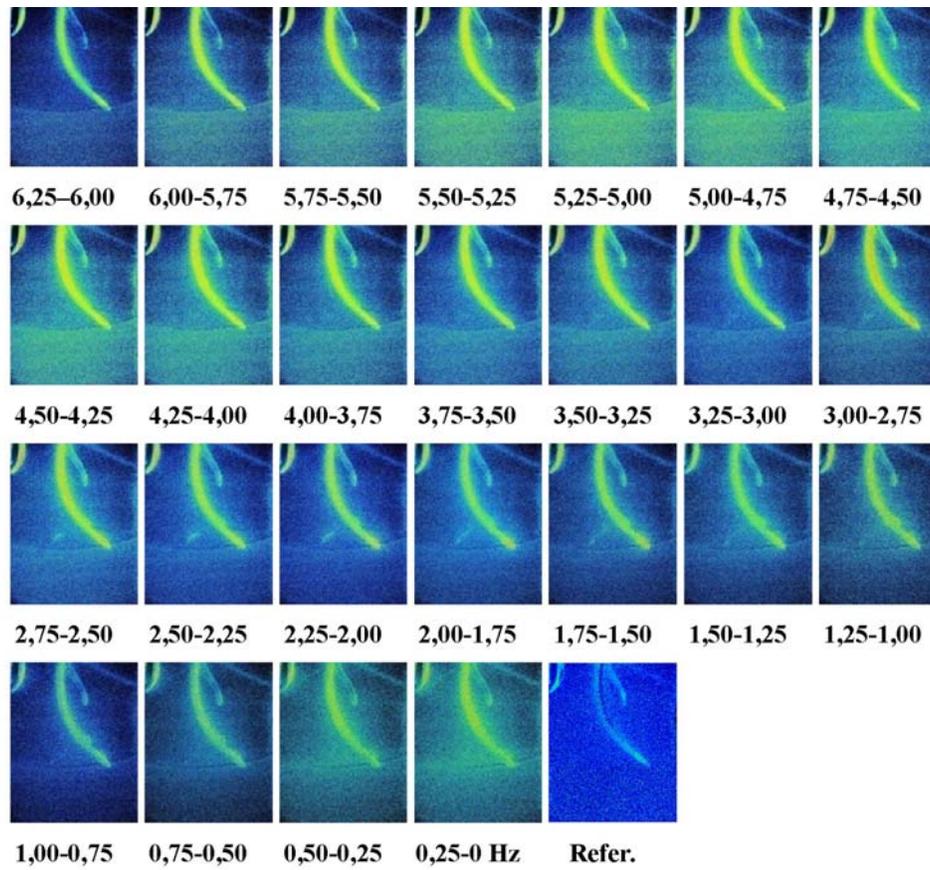


Figura 26 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 26

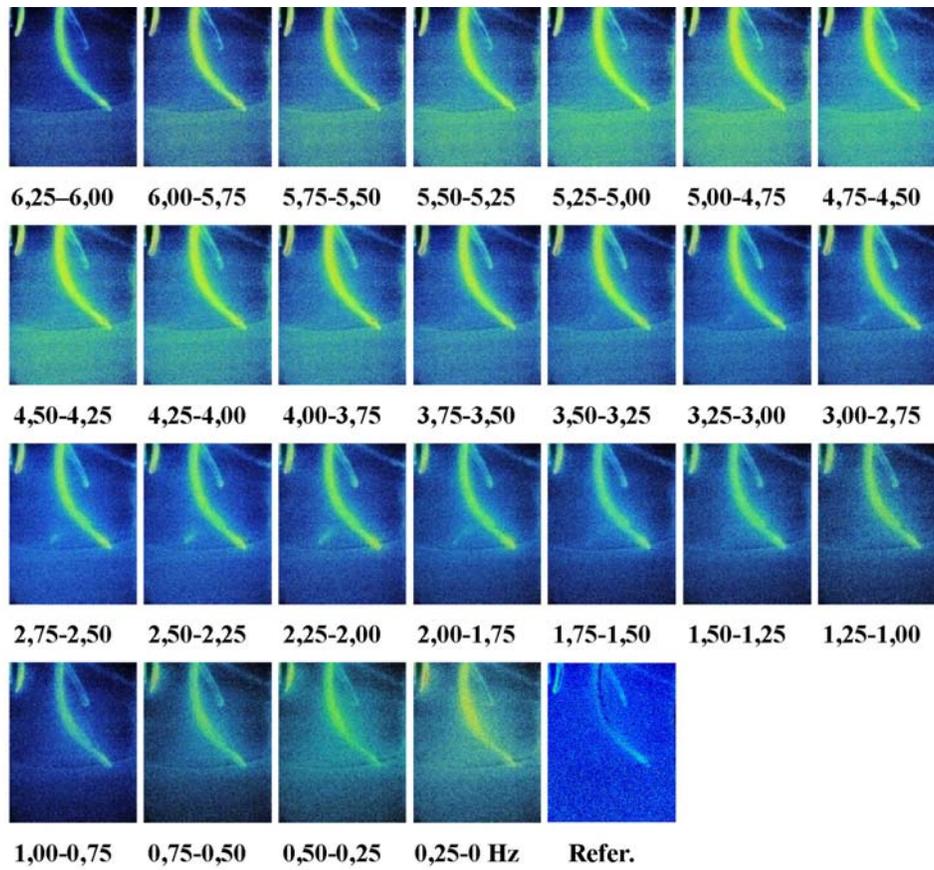


Figura 27 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 27

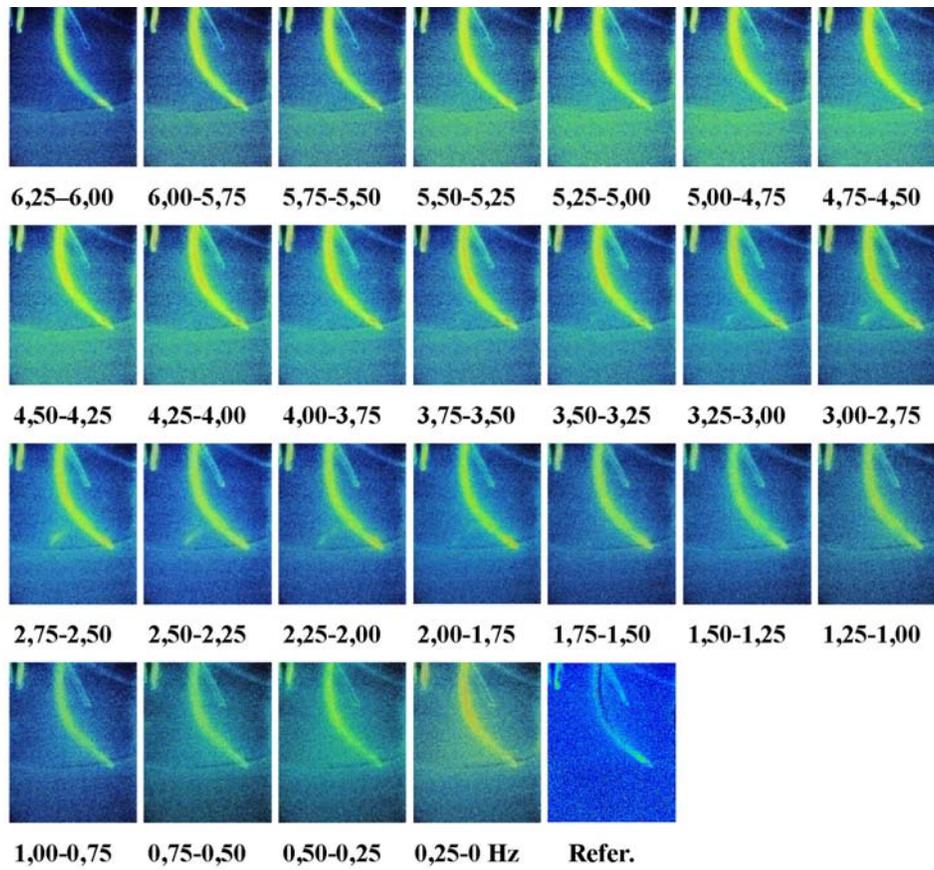


Figura 28 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 28

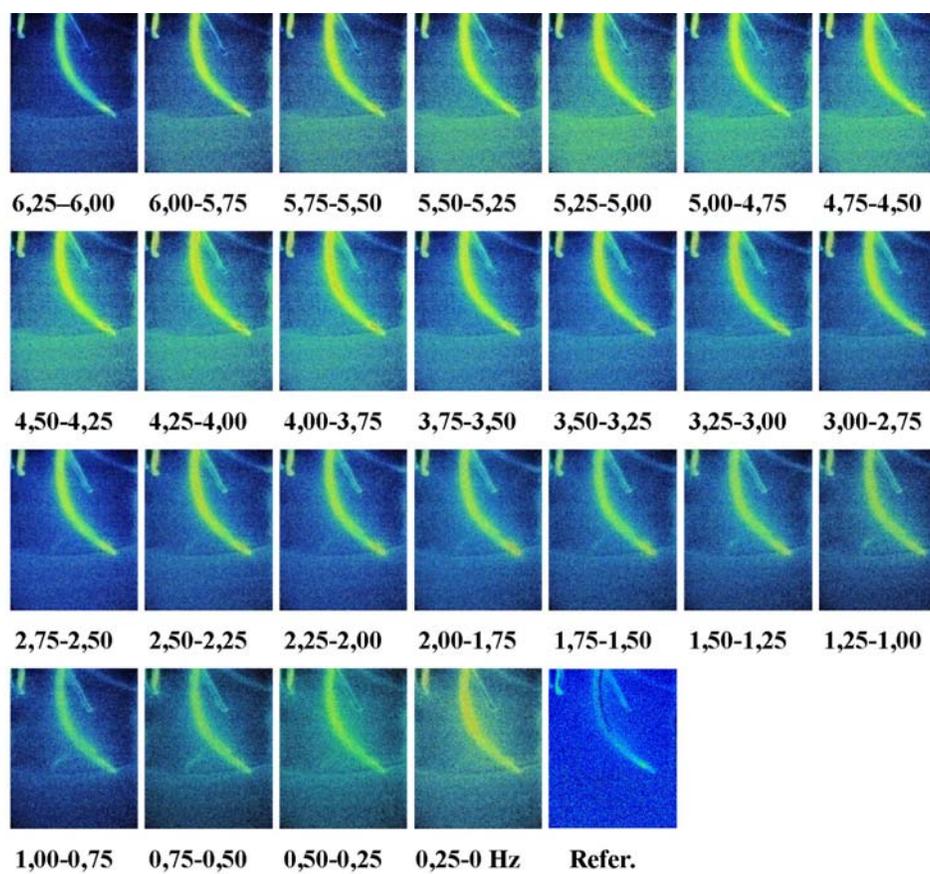


Figura 29 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 29

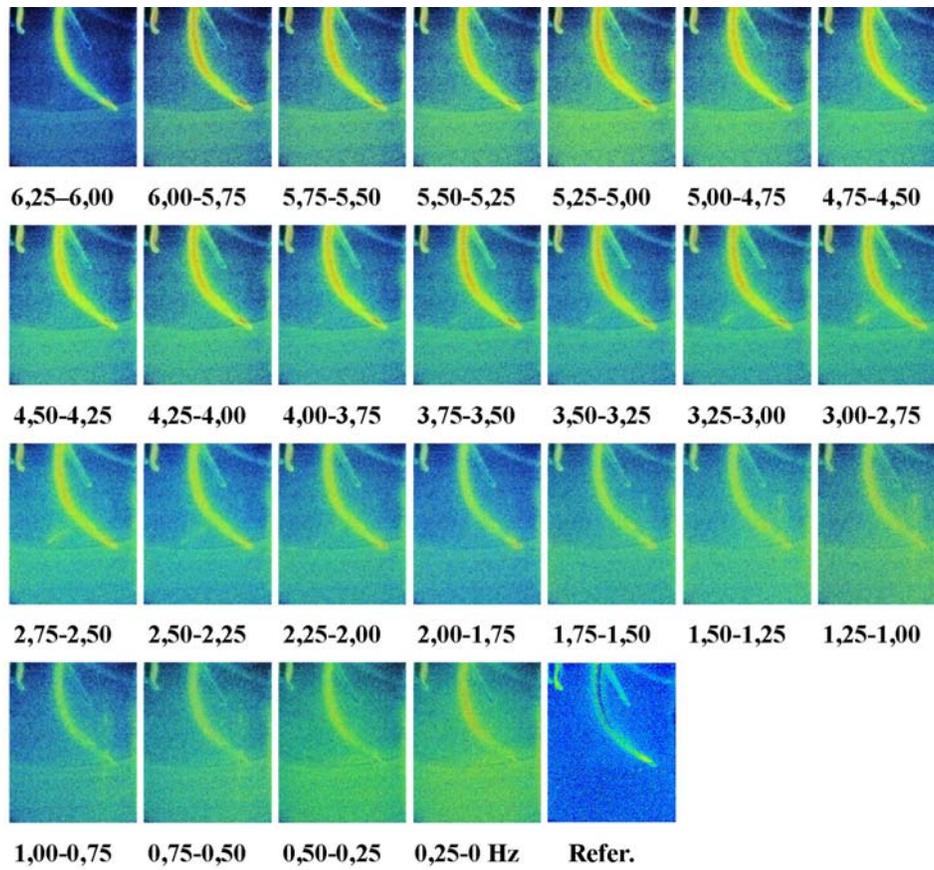


Figura 30 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 30

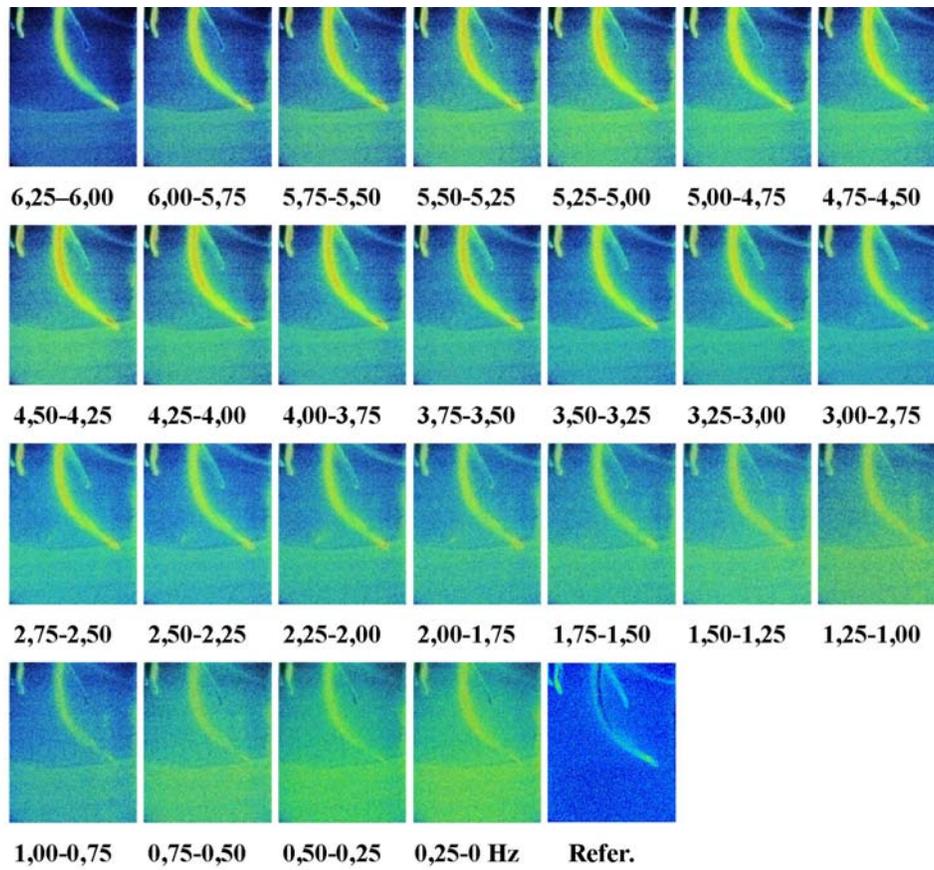


Figura 31 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 31

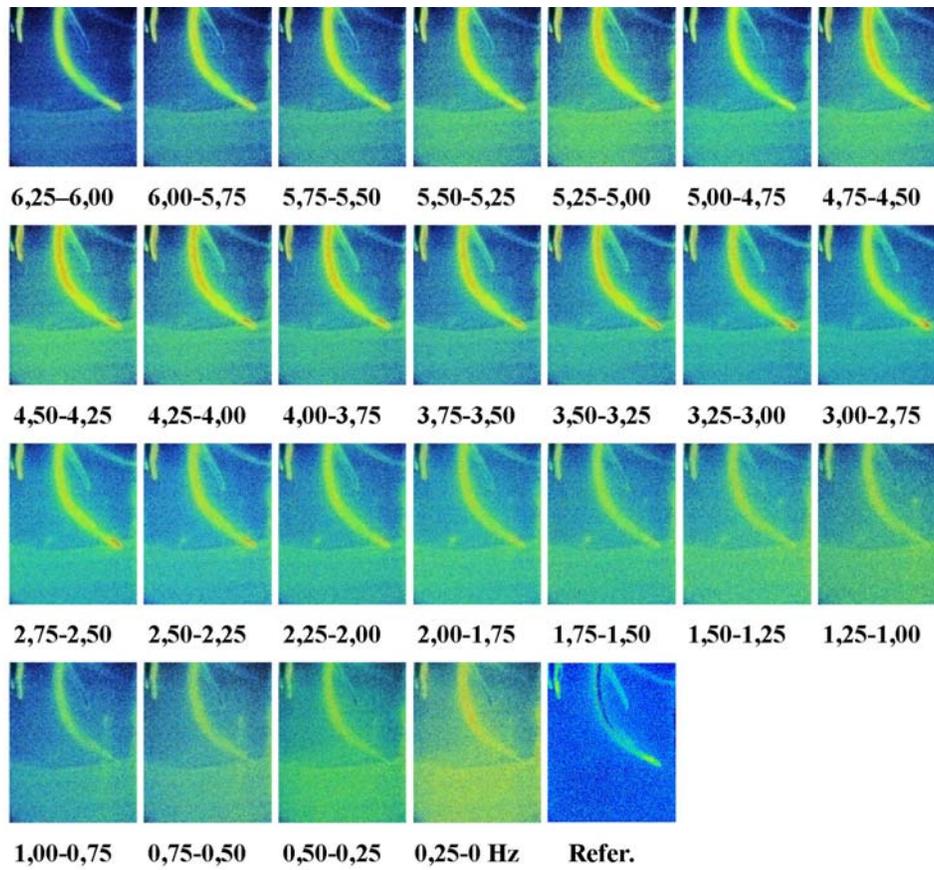


Figura 32 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 32

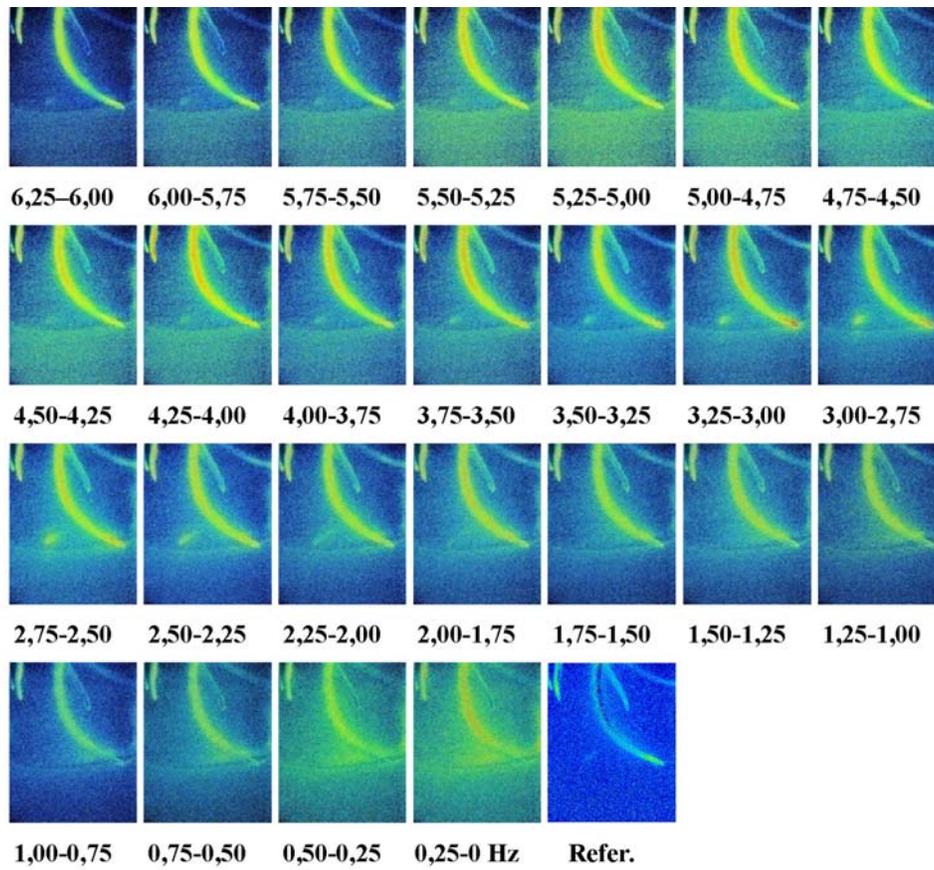


Figura 33 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 33

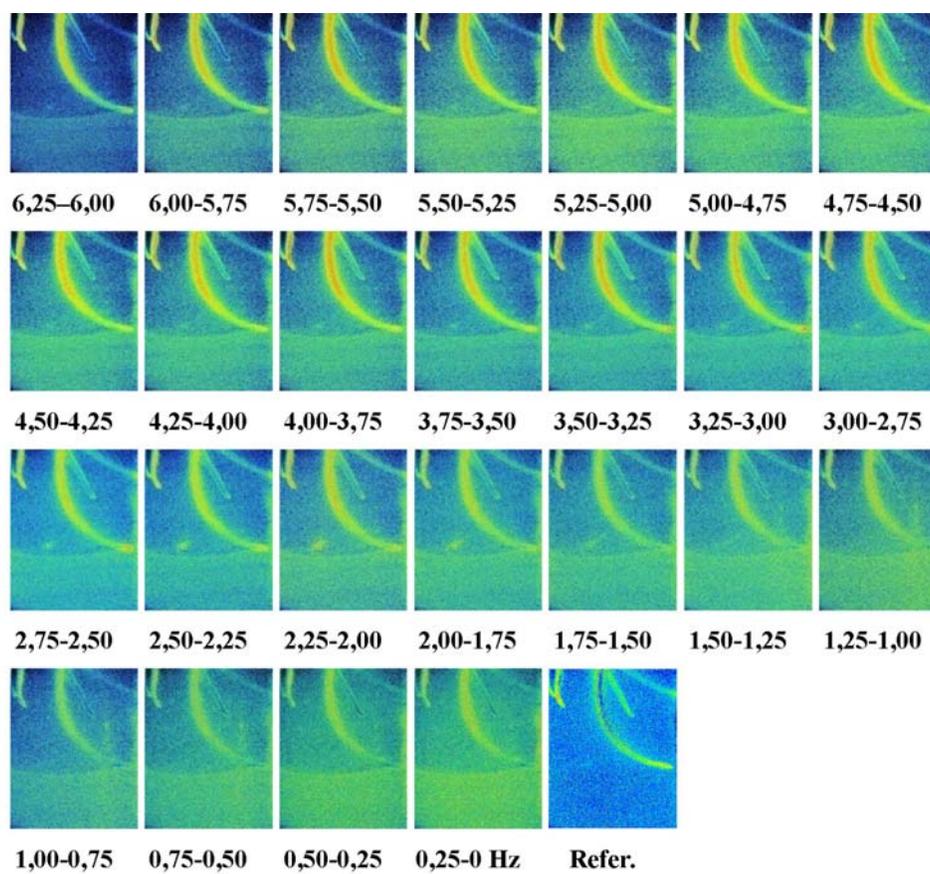


Figura 34 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 34

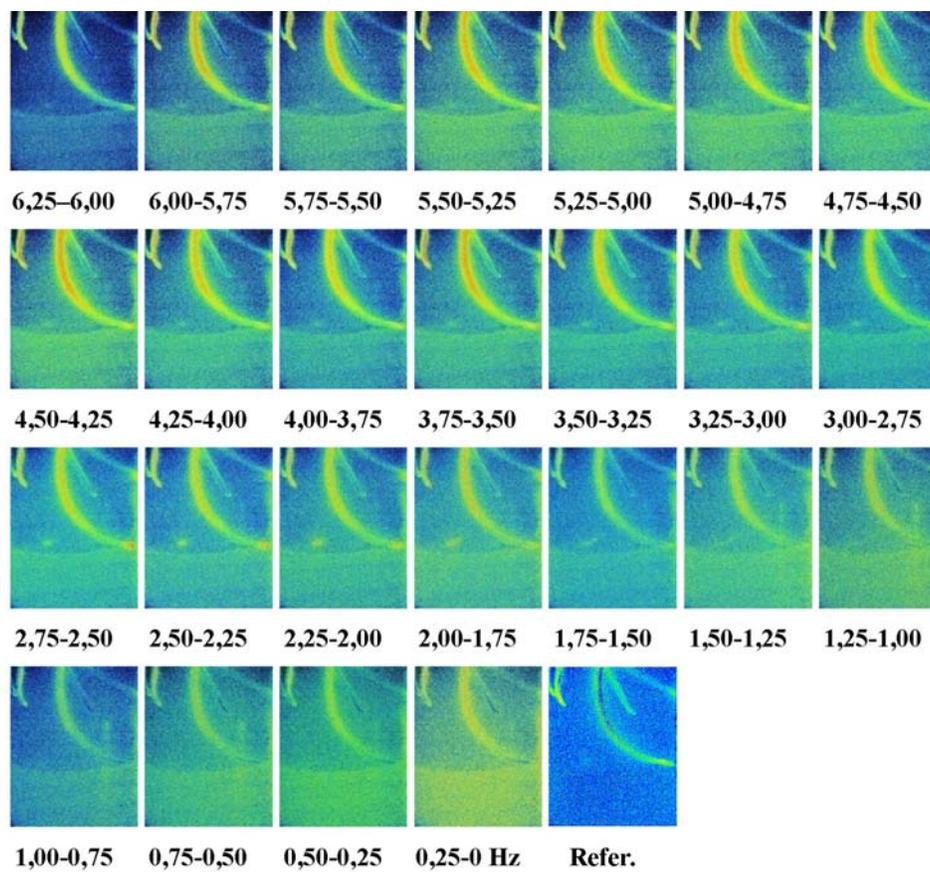


Figura 35 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 35

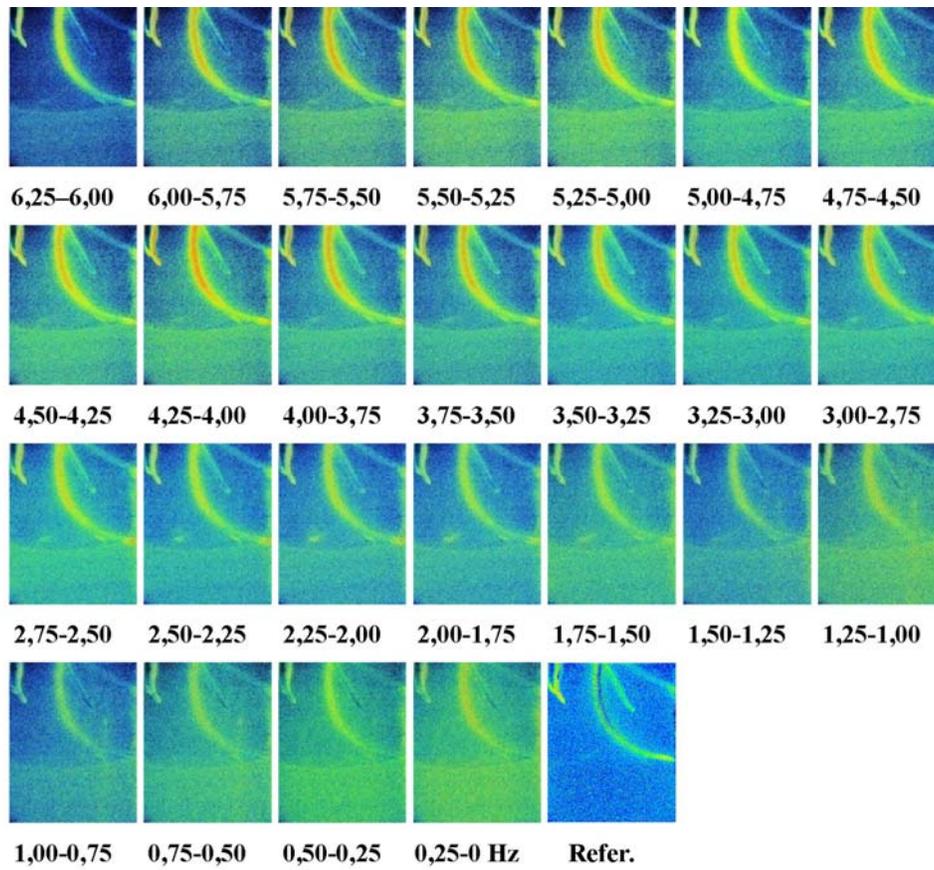


Figura 36 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 36

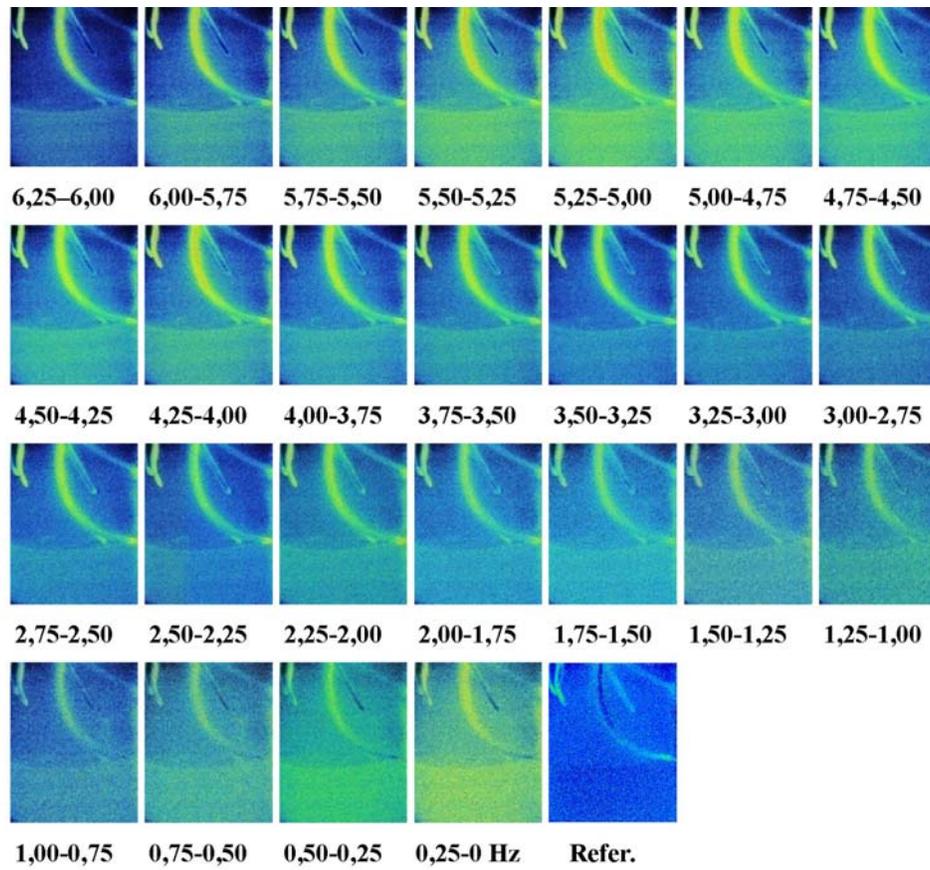


Figura 37 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 37

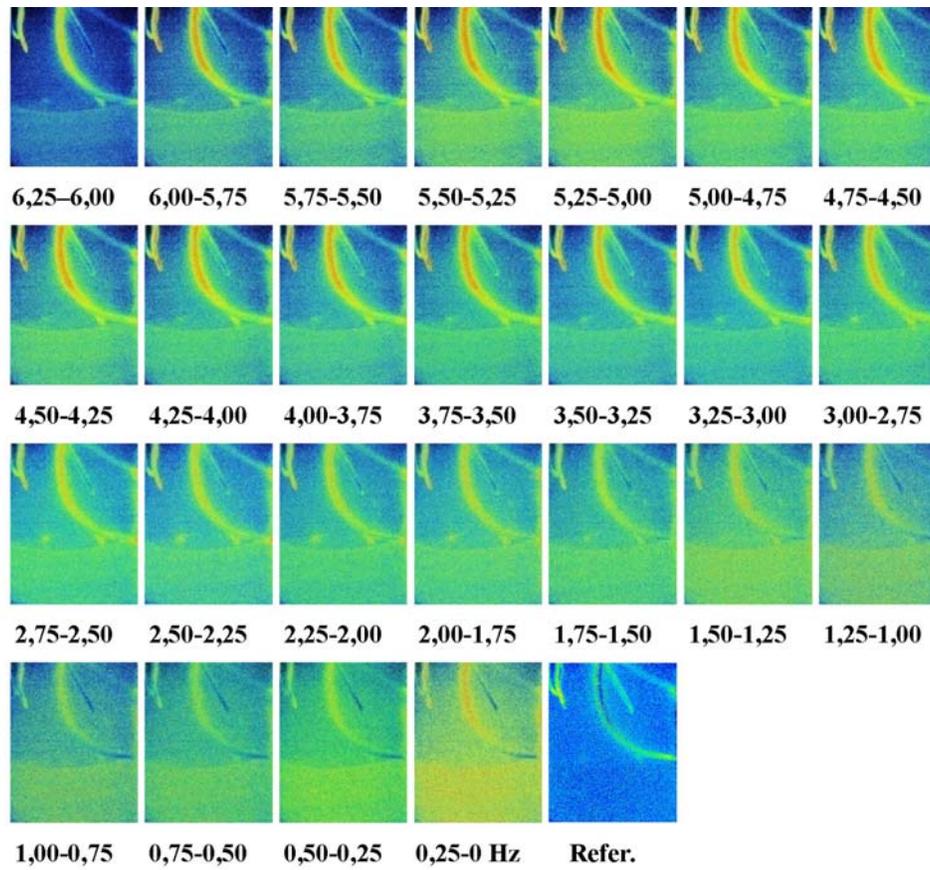


Figura 38 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 38

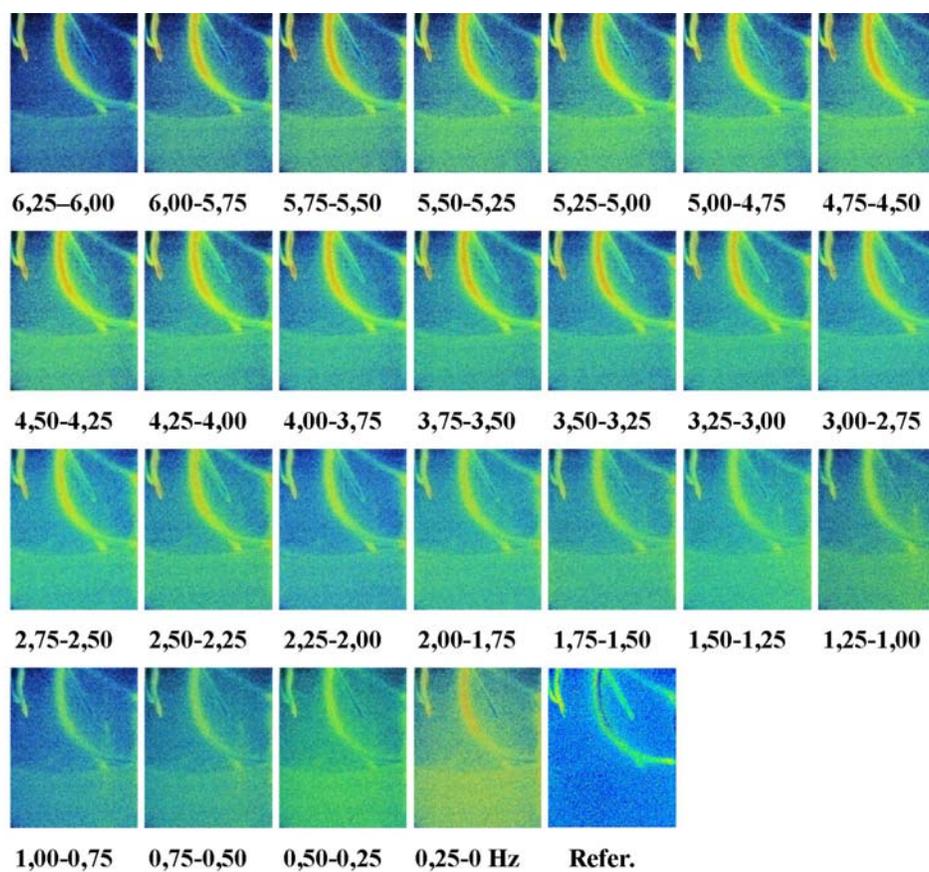


Figura 39 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays*– Imagem 39

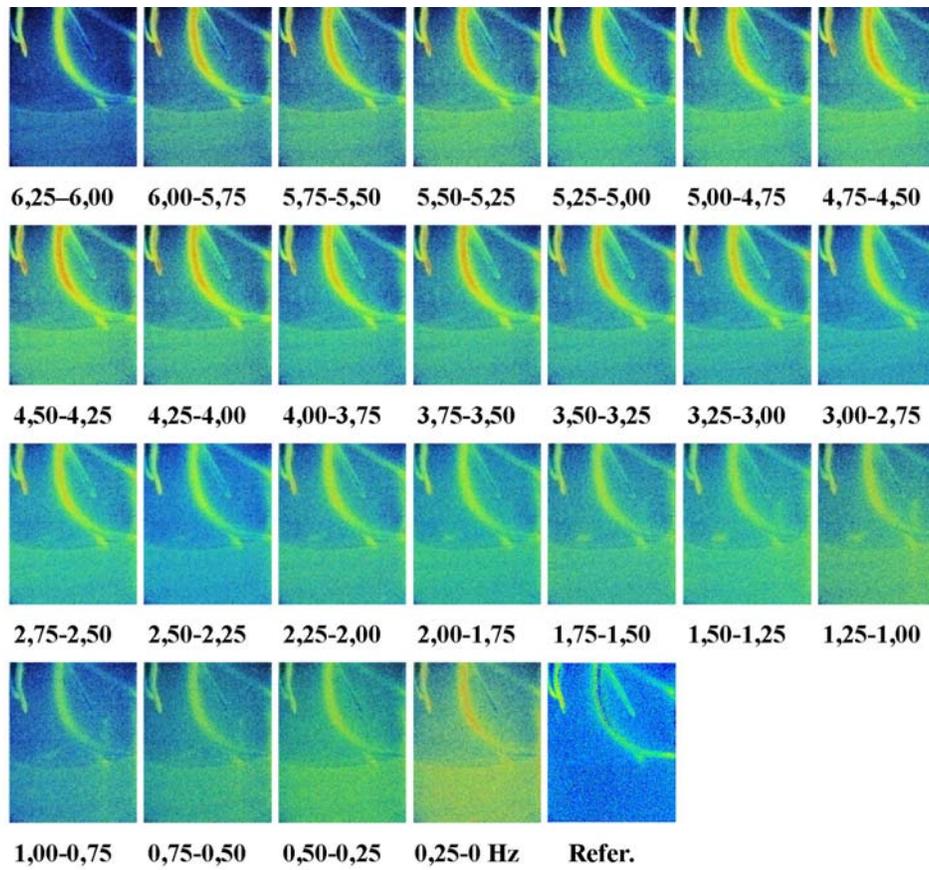


Figura 40 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 40

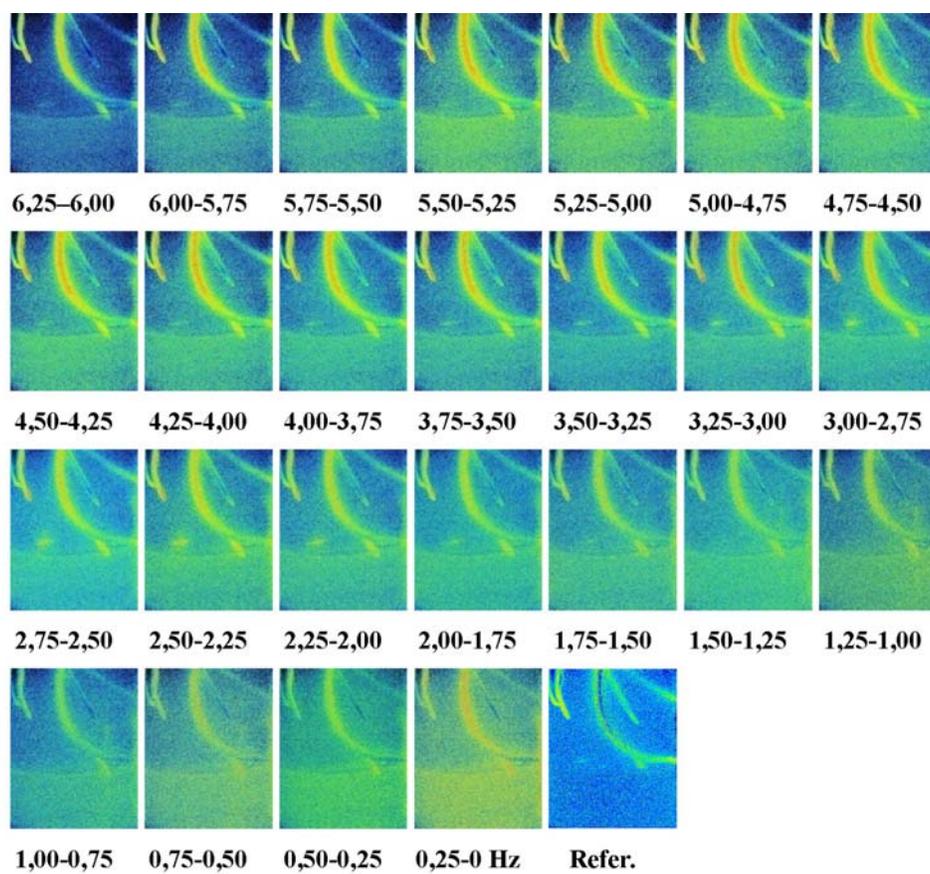


Figura 41 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 41

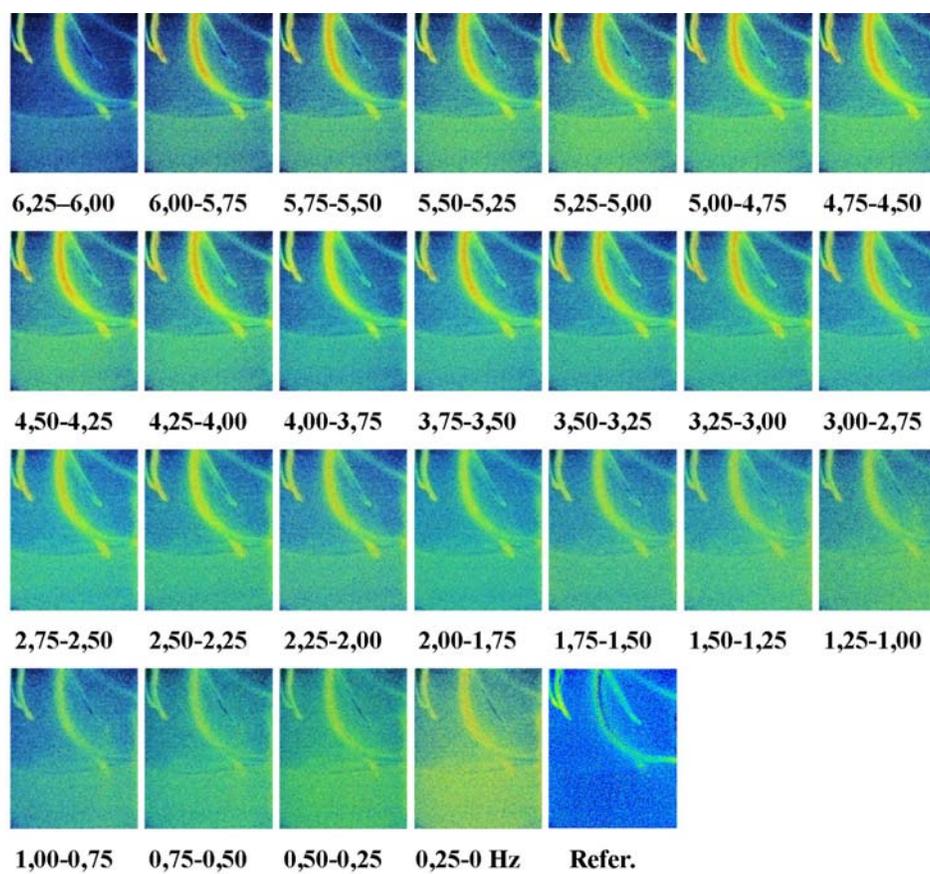


Figura 42 Análise em frequência do tecido radicular de *Zea mays* – Imagem 42