

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

WALÉRIA RIBEIRO LOPES

**INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM PLANTAS MEDICINAIS
USANDO *SPECKLE* DINÂMICO**

Maceió/AL

2014

WALÉRIA RIBEIRO LOPES

**INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM PLANTAS MEDICINAIS
USANDO *SPECKLE* DINÂMICO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE em Física pelo programa de Pós- Graduação em Física.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Tereza de Araujo

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Valentim dos Santos

Maceió-AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

- L864i Lopes, Waléria Ribeiro.
 Investigação de atividade biológica em plantas medicinais usando *speckle* dinâmico / Waléria Ribeiro Lopes. – 2014.
 86 f. : il., grafs.
- Orientadora: Maria Tereza de Araujo.
 Coorientador: Pedro Valentim dos Santos.
 Dissertação (mestrado em Física da Matéria Condensada) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Maceió, 2014.
- Bibliografia: f. 78-83.
 Anexo: f. 84-86.
1. Bioatividade. 2. Biospeckle. 3. *Pletranthus amboinicus*. 4. *Melissa officinalis*. 5. *Morus nigra*. I. Título.

CDU: 53:621.03



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Física

Programa de Pós Graduação em Física

BR 104 km 14, Campus A.C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970 Maceió - AL, Brasil
FONE : (82) 3214-1423/FAX 3214-1645

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

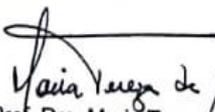
*“Investigação de atividade biológica em plantas
medicinais usando speckle dinâmico”.*

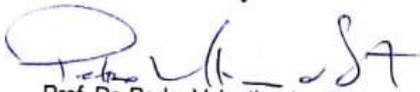
por

Waléria Ribeiro Lopes

A Banca Examinadora composta pelos professores Maria Tereza de Araujo (orientadora), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Pedro Valentim dos Santos (co-orientador), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Maria Socorro Seixas Pereira, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas e Francine Santos de Paula, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas consideram a candidata aprovada com grau “A”.

Maceió, 29 de agosto 2014


Prof. Dra. Maria Tereza de Araujo


Prof. Dr. Pedro Valentim dos Santos


Prof. Dra. Maria Socorro Seixas Pereira


Prof. Dr. Francine Santos de Paula

Dedico esta dissertação
à minha mãe Maria das Neves, ao meu pai Antônio Waldir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma realização profissional e por estar presente em minha vida e iluminar o meu caminho.

Aos meus pais e toda a minha família por estarem sempre me apoiando, pelo incentivo e por tudo que fizeram pelo meu crescimento pessoal e profissional.

A minha Orientadora Professora Maria Tereza, pela paciência, sempre disposta a ajudar em tudo, pelos ensinamentos que foram de grande valia durante os estudos, e também pelo crédito de confiança em me orientar.

Ao professor Pedro Valentim, sempre com boa vontade em ajudar em nossa pesquisa.

Aos meus amigos Carlos Henrique, Daniela, Job, Maíra, Nilce, Sheila, Laís, Renan. Por toda a amizade e companheirismo, mesmo distantes sempre me incentivando.

As minhas amigas Debby, Elaine e Tainã, por me receberem de braços abertos na república das randômicas. Pelas boas e divertidas conversas. Por saber que posso sempre contar com vocês.

Ao Grupo de Fotônica e Fluidos Complexos, professores e alunos.

Aos amigos Beliato, Robenilson, Zé Maria, Jefferson e Wesley. Pelos ensinamentos em laboratório e por sempre estarem dispostos a ajudar e ao Alexandro por diminuir minha dificuldade computacional permitindo o uso de seu programa para nossas simulações.

Ao David J. Lucena por permitir o uso do programa STMD nas análises do processamento das imagens digitais.

Aos meninos do Laboratório de Ensino Helton e Tiago. Pela grande ajuda no laboratório de pesquisa. Por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos mestres pelos ensinamentos durante as disciplinas;

A todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES e ao projeto PRONEX-NEXO pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho investigou-se a bioatividade de folhas de plantas medicinais mediante a aquisição de imagens interferométricas granuladas chamadas de padrão de *Speckle*. Quando a luz coerente (laser) incide sobre uma superfície de um meio biológico, ocorre um fenômeno óptico de interferência chamado de *biospeckle* ou *speckle* dinâmico. Para um meio biológico que está em atividade, as ondas incidentes sobre os centros espalhadores sofrem várias interferências e torna-se possível obter informações desse sistema, tanto espacial quanto temporalmente, através do *biospeckle*. Utilizamos métodos de análise de imagens do tipo Correlação de Pearson, no qual se observa o grau de similaridade entre as imagens coletadas, as matrizes THSP (História Temporal do Padrão de *Speckle*) e a MCO (Matriz de Co-ocorrência) para determinar a probabilidade de ocorrências das intensidades. Para quantificar a medida de dispersão dos pontos em torno da diagonal principal da matriz MCO, o Momento de Inércia (MI) foi utilizado. Arranjos experimentais para obter-se o padrão de *speckle* por reflexão de forma objetiva e subjetiva foram usados no monitoramento da hortelã da folha grossa (*Plectranthus amboinicus*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*) e folha de amoreira preta (*Morus nigra*). Investigamos a bioatividade desses meios como função do tempo de coleta (desde a folha recém-colhida até sua completa desidratação de forma natural). Tomando como base a teoria de Akira Ishimaru para o espalhamento de um feixe de luz que incide em uma superfície rugosa, fizemos uso de ferramenta computacional simulando o comportamento do coeficiente de correlação e ajustamos as simulações aos dados experimentais para as medidas de Correlação de Pearson obtidas nos três espécimes botânicos objetos de estudo desta dissertação. Uma boa concordância entre simulação e experimento foi observada com aparente comprovação de bioatividade.

Palavras-chaves: Bioatividade. Biospeckle. *Plectranthus amboinicus*. *Melissa officinalis*. *Morus nigra*.

ABSTRACT

We investigate in this work the bioactivity of leaves medicinal plants by means of the acquisition interferometric granulated images called Speckle pattern. When the coherent light (laser) focuses on a surface of a biologic environment, happen a optics phenomenon of interference called of *biospeckle* or *dinamic speckle*. For a environment biologic that is in activity, the incidents on the scattering centers undergo many interferences and become possible obtain informations about this system, as spatial as temporally, by biospeckle. We use methods of images analysis of the type Pearson's Correlation, in the which is observed the degree of similarity between the collected images, the matrices THSP (Temporal History of Speckle Pattern) and the MCO (Matrice of Co-ocorrence) to determine the probability of occurrence of intensities. For quantify the measure of dispersion of the poists around the main diagonal of the matrice MCO, the moment of inertia (MI) was used. Experimental arrangements to get the Speckle pattern by reflection objectively and subjectively were used in the monitoring of the thick leaf mint (*Plectranthus amboinicus*), balm (*Melissa officinalis*) and black mulberry leaf (*Morus nigra*). We investigate the bioactivity of these means like time function of collection (from freshly harvested leaf until its complete dehydration naturally). Based on the Akira Ishimaru theory for the scattering of a light beam that focuses on a rough surface, we used computational tools to simulate the behavior of correlation coefficient and adjust the simulations to the experimental datas for the measures of Pearson Correlation obtained in the three botanical specimens objects of study of this dissertation. A good agreement between simulation and experiment was observed with apparent evidence of bioactivity.

Keywords: Bioactivity. Biospeckle. *Plectranthus amboinicus*. *Melissa officinalis*. *Morus nigra*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Espectro de absorbância do produto macerado da folha da <i>Plectranthus amboinicus</i> (Hortelã da folha grossa).	17
Figura 2 - Fotografia das folhas e frutos da amoreira-preta (<i>Morus nigra</i> L.)	22
Figura 3- Fotografia da planta <i>Melissa officinalis</i>	24
Figura 4- <i>Plectranthus amboinicus</i> conhecida como hortelã da folha grossa	26
Figura 5- Configuração experimental básica utilizada em medidas de espalhamento de luz	30
Figura 6- Espalhamento geométrico.	31
Figura 7- Padrão de <i>speckle</i>	32
Figura 8- Arranjo experimental do <i>speckle</i> objetivo	33
Figura 9- Arranjo experimental do <i>speckle</i> subjetivo	33
Figura 10- Representação de como montar uma THSP selecionando a linha 100.....	36
Figura 11- a) baixa atividade b) média atividade c) alta atividade.....	38
Figura 12- Onda eletromagnética incidindo sobre uma superfície lisa	41
Figura 13- Onda eletromagnética incidindo sobre uma superfície rugosa ...	42
Figura 14- Características gerais da potência em uma superfície rugosa... ..	43
Figura 15- Aparato experimental para <i>speckle</i> objetivo evidenciando o laser de diodo em 532 nm, diafragma, espelhos E1 e E2, lente para expandir o feixe (L) feixes espalhados pela superfície da amostra e coleta por câmera CCD.....	52
Figura 16- Aparato experimental para <i>speckle</i> subjetivo evidenciando o jogo de lentes L2 e o microscópio (M)	53
Figura 17- Estágios das folhas investigadas (na sequência da esquerda para a direita: amoreira-preta, erva-cidreira e hortelã da folha grossa). (A) Folhas recém-colhidas e (B) folhas secas naturalmente	54

Figura 18- Matrizes THSP e MCO das plantas obtidas através do <i>biospeckle</i> objetivo	58
Figura 19- Matrizes THSP e MCO das plantas obtidas através do <i>biospeckle</i> subjetivo	59
Figura 20- Comportamento apresentado pelo momento de inércia. <i>Biospeckle</i> objetivo (<i>Morus nigra</i>)	61
Figura 21- Comportamento apresentado pelo momento de inércia. <i>Biospeckle</i> objetivo (<i>Melissa officinalis</i>)	61
Figura 22- Comportamento apresentado pelo momento de inércia. <i>Biospeckle</i> objetivo (<i>Plectranthus amboinicus</i>)	62
Figura 23- Comportamento apresentado no momento de inércia. <i>Biospeckle</i> subjetivo (<i>Morus nigra</i>)	63
Figura 24- Comportamento apresentado no momento de inércia. <i>Biospeckle</i> subjetivo (<i>Melissa officinalis</i>).....	63
Figura 25- Comportamento apresentado no momento de inércia <i>biospeckle</i> subjetivo (<i>Plectranthus amboinicus</i>)	64
Figura 26- Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (<i>Morus nigra</i>).....	65
Figura 27 Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (<i>Melissa officinalis</i>).....	66
Figura 28- Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (<i>Plectranthus amboinicus</i>).....	66
Figura 29- Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (<i>Morus nigra</i>). Em detalhe comportamento de 1 a 10 horas.....	68
Figura 30- Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (<i>Melissa officinalis</i>). Em detalhe comportamento de 1 a 10 horas	68

Figura 31- Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (<i>Plectranthus amboinicus</i>). Em detalhe comportamento de 1 a 10 horas	69
Figura 32- Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente obtido através de simulação (<i>Morus nigra</i>)	70
Figura 33- Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente obtido através de simulação (<i>Melissa officinalis</i>)	71
Figura 34- Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente obtido através de simulação (<i>Plectranthus amboinicus</i>)	71
Figura 35- Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente. Os símbolos foram obtidos experimentalmente e a curva contínua através de simulação	72
Figura 36- Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente. Os símbolos foram obtidos experimentalmente e a curva contínua através de simulação	73
Figura 37- Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente. Os símbolos foram obtidos experimentalmente e a curva contínua através de simulação	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Momento de inércia das matrizes MCO	38
Tabela 2- Especificações dos equipamentos utilizados	51
Tabela 3-Valores do momento de inércia do padrão do <i>biospeckle</i> objetivo e subjetivo	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivo geral	18
1.2 Objetivo específico	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Plantas medicinais	19
2.1.1 <i>Morus nigra</i> L.	21
2.1.2 <i>Melissa officinalis</i>	23
2.1.3 <i>Plectranthus amboinicus</i>	26
2.2 Métodos ópticos para estudo de meios biológicos	27
2.3 Espalhamentos da Luz	28
2.3.1 Espalhamento Rayleigh, Mie e Geométrico	29
2.4 Propriedades do Speckle	32
3 MÉTODOS DE ANÁLISE DO SPECKLE DINÂMICO	35
3.1 Técnicas de processamento das imagens do speckle dinâmico (biospeckle)	35
3.1.1 História Temporal do Padrão do Speckle (THSP)	36
3.1.2 Matriz de Co-ocorrência	37
3.1.3 Momento de inércia (MI)	38
3.2 Coeficientes de Correlação de Pearson	39
3.3 Teoria do espalhamento da luz sobre uma superfície rugosa	41
3.4 Simulação	44
3.4.1 Simulação da evolução do coeficiente de correlação de Pearson	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50

4.1 Metodologias: experimento e simulação	50
4.1.1 Procedimentos experimentais	50
4.1.2 Programas usados na análise dos dados	54
4.2 Resultados	55
4.2.1 Análise do padrão de biospeckle através de processamento de imagem digital	56
4.2.2 Análise do padrão de biospeckle através do coeficiente de correlação de Pearson	64
4.3 Simulações	70
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	79
ANEXO	86

1 INTRODUÇÃO

A análise de materiais biológicos por meio de técnicas ópticas é de fundamental importância para a ciência. Essas técnicas utilizam métodos não invasivos, uma vez que preservam o produto analisado, permitindo examinar e determinar comportamentos dos materiais estudados.

Alguns métodos e técnicas são baseados nos fenômenos de interferência de onda. Quando um determinado material é iluminado com luz coerente, neste caso com um laser, observa-se uma imagem de interferência conhecida como *speckle*. Se o meio iluminado possui alguma movimentação relacionada com a mudança de posição dos elementos dispersos da luz, esta atividade provocará uma mudança no padrão do *speckle*, neste caso esse processo, que se assemelha à ebulição, chama-se *speckle* dinâmico ou *biospeckle* tratando-se de material biológico. A ferramenta *biospeckle* serve para medir a atividade biológica de tecidos vegetais e animais.

A atividade do *biospeckle* vem sendo extensamente estudada e tem sido propostas muitas formas para medir, por exemplo, a atividade de espécimes botânicos, fluxo sanguíneo e outras aplicações em medicina (DAINTY, 1970, ASAKURA *et al*, 1981, OULAMARA *et al*, 1989, RUTH, 1988).

Desde que foi descoberto, muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de explorar esse fenômeno como uma ferramenta não destrutiva de medição, e muitas abordagens vêm sendo desenvolvidas (OULAMARA *et al*, 1989, RABAL *et al*, 1995).

XU *et al* (1995) realizaram alguns experimentos com *speckle* em placas de metal, mas também em tomate, batata, maçã e laranjas, demonstrando a possibilidade de correlacionar padrão de *speckle* com as atividades biológicas de frutos e vegetais.

Segundo Briers (1975), quando um objeto iluminado é uma entidade viva, como, por exemplo, uma fruta, o padrão de *speckle* é visto como flutuações, e a taxa dessas flutuações dependem do comprimento de onda da luz utilizada. Devemos incidir luz numa frequência onde não haja interação (absorção) com o meio, para que não tenhamos variações nos resultados devido a essa interação. Por exemplo, o

tomate vermelho sendo iluminado com um comprimento de onda 637 nm (vermelho) produz flutuações bem mais rápidas e mais intensas do que incidindo uma luz de comprimento de onda 514 nm (verde), pois quando um tomate vermelho é iluminado com luz vermelha, a maior parte dessa luz é dispersa (não há absorção) a partir de cloroplastos vermelhos no interior das células do tomate. Quando a luz verde é utilizada, esta é absorvida pelos cloroplastos, e parte da luz que atinge um observador ou um detector surge da reflexão especular na pele do tomate (Campos, 2013).

Braga Junior (2000) fez um estudo em sementes de feijão, comprovando de forma conclusiva em seus experimentos a direta influência do teor de água na semente nos resultados do *speckle* dinâmico. Em outro trabalho, Braga Jr. Et al (2005) usaram a técnica do *biospeckle* para a detecção de fungos em sementes de feijão.

Em um estudo feito por Ribeiro et al. (2004) foi utilizado a técnica do *biospeckle* para tratar da mobilidade molecular em biscoitos de polvilho. A técnica foi usada para avaliar a variação da mobilidade molecular em amostras de biscoitos acondicionadas em ambientes com diferentes níveis de umidade relativa.

Pereira (2012) seguiu o roteiro apresentado por Akira Ishimaru (1978) para espalhamento de luz por uma superfície levemente rugosa. Para a sua investigação, Pereira, comparou padrões de *speckles* gravados (por uma câmera CCD) em diferentes instantes de tempo originados do espalhamento coerente de luz em 635nm, a partir de uma folha vegetal recém-colhida. O parâmetro de comparação utilizado foi o coeficiente de correlação de Pearson. Para os dados obtidos experimentalmente do coeficiente de correlação de Pearson em função do tempo, observou uma evolução temporal do tipo exponencial decrescente, indicando um comportamento de degradação da folha quimicamente ativo. Em seus dados teóricos, obtido por simulação, também evidenciou o comportamento exponencial decrescente indicando uma boa concordância com o resultado experimental.

Silva (2013) estudou a investigação temporal de padrões de *speckle* aplicados ao monitoramento da atividade biológica do capim *Brachiaria Brizantha* Cv Marandu no intuito de medir a qualidade e produção do capim. Para tal fim, ele

utilizou uma ferramenta computacional que reúne técnicas de processamento de imagem (como THSP, Matriz de co-ocorrência e momento de inércia, que serão mostrados posteriormente).

Como podemos ver, em diferentes situações ou trabalho, a técnica interferométrica através do padrão do *speckle* mostrou ser de grande utilidade.

Para verificar a validade do uso do *biospeckle* laser na análise de atividade biológica através de métodos computacionais, escolheu-se trabalhar com espécimes botânicos. Os espécimes aqui estudados foram a *Morus nigra* (amoreira preta), *Melissa officinalis* (erva cidreira) e *Plectranthus amboinicos* (hortelã da folha grossa). Essas plantas são caracterizadas como plantas medicinais, pois tem princípios ativos em sua composição (que serão mostrados posteriormente). A parte dessas plantas utilizadas para o estudo foram as suas folhas, colhidas em diferentes estágios. A priori investigamos a atividade biológica da folha recém-colhida monitorando temporalmente sua atividade biológica comparando os diferentes padrões de *speckle* produzidos a partir da folha em função do tempo. Depois investigamos as folhas amareladas e secas. Para essas folhas, analisamos apenas a magnitude da atividade biológica, comparando-a com as folhas recém- colhidas.

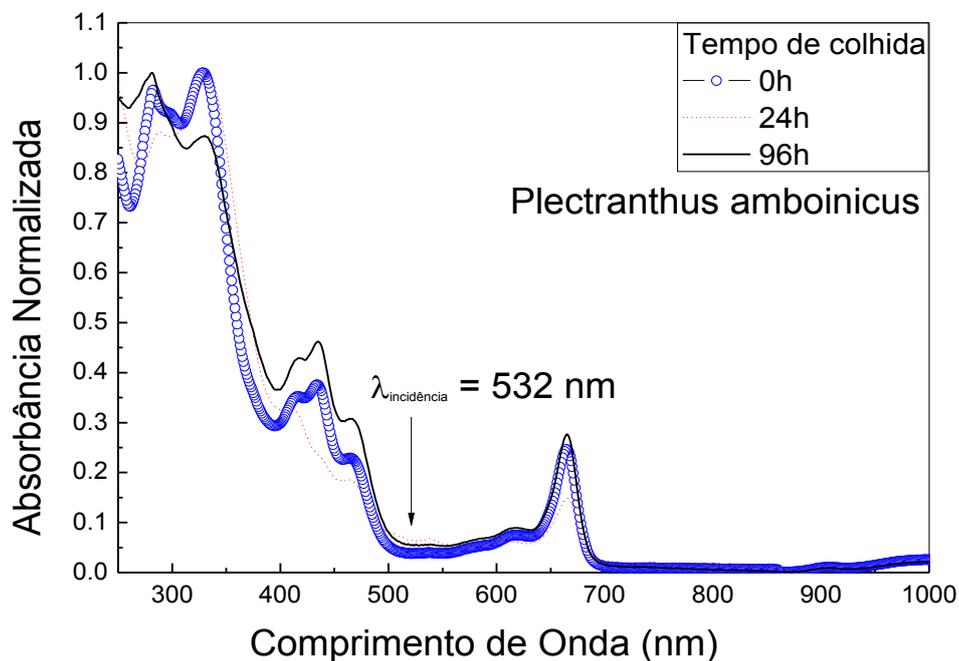
Como já foi dito, o *biospeckle* tem sido utilizado para quantificação e determinação de áreas com diferentes atividades biológicas. Para que o *biospeckle* seja quantificado, capturam-se imagens em curtos intervalos de tempo e aplicam-se tratamentos matemáticos e estatísticos através de processamento de imagens.

Este trabalho tem como finalidade aplicar a técnica do *biospeckle* em um conjunto de imagens, obtidas a partir de observação temporal de espécime botânica iluminada por laser para investigar a atividade biológica. Para isso, utilizamos uma ferramenta computacional que nos forneceu a THSP formada a partir do conjunto de imagens capturada, a Matriz de Co-ocorrência (MCO) que é computada sobre a THSP e o Momento de inercia (MI) que é uma forma de medir a dispersão dos pontos em torno da diagonal principal da MCO (Lucena, 2012). Além disso, usamos o coeficiente de correlação de Pearson no intuito de observar a evolução temporal da atividade biológica correlacionando imagens obtidas ao longo do tempo, usando

dados experimentais e dados simulados. Para a obtenção dos dados simulados usamos a simulação desenvolvida por Pereira (2012).

Para a nossa investigação comparamos padrões de *speckle* gravados por uma câmera CCD, em diferentes instantes de tempo obtidos por espalhamento de luz em 532nm, a partir dos espécimes botânicos estudados. Com esse comprimento de onda de 532nm diminuimos o efeito de absorção por parte das amostras, assim nos aproximamos da teoria de perturbação de primeira ordem proposta por Ishimaru (1978) obtendo mais espalhamento do que absorção. A figura 1 mostra o espectro de absorbância da folha da *Plectranthus amboinicus* (hortelã da folha grossa), onde prevalecem as bandas de absorção da clorofila extraída do macerado da folha recém-colhida. Podemos perceber pelo espectro uma alta absorção na região do ultravioleta e do vermelho e uma baixa absorção na região do verde.

Figura 1: Espectro de absorbância do produto do macerado da folha da *Plectranthus amboinicus* (hortelã da folha grossa).



Fonte: Autor, 2014.

Uma das diferenças entre este trabalho e o trabalho desenvolvido por Pereira (2012) foi a escolha do comprimento de onda da radiação incidente nas amostras, tornando nossas simulações mais fidedignas com a teoria de Akira Ishimaru (1978).

Em seu trabalho, Pereira utilizou um feixe laser na região do vermelho, com comprimento de onda de 635 nm, região de grande absorção por folhas verdes.

A seguir serão apresentadas as metas deste trabalho, exibindo os objetivos gerais e específicos.

1.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade biológica dos espécimes botânicos *Morus nigra*, *Melissa officinalis* e *Plectranthus amboinicus* em função do tempo utilizando a técnica de *biospeckle* laser.

1.2 Objetivos específicos

- Utilizar as técnicas de *biospeckle* objetivo e subjetivo;
- Avaliar as ferramentas de processamento de imagem para o uso na investigação da atividade biológica;
- Utilizar o coeficiente de correlação de Pearson como parâmetro de avaliação de atividade biológica.

Estudar os padrões do *biospeckle* em meio biológico é o objeto de investigação desta dissertação. Nos próximos capítulos vamos tratar do material biológico utilizado, dos fenômenos que são a base do *biospeckle*, os métodos de processamento de imagem utilizados, a metodologia experimental, os resultados e a conclusão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas Medicinais

O Brasil abriga cerca de 60 mil espécies de plantas, aproximadamente um quarto de todas as espécies conhecidas. Quanto maior o número de espécies, maior o potencial de novos medicamentos. Apesar dos mais de 50 anos de pesquisa com plantas medicinais no país, o número de espécies estudadas ainda é muito reduzido (DI STASI, 1996). Consideram-se plantas medicinais aquelas que possuem, em um ou mais órgãos, substâncias utilizadas com finalidade terapêutica, ou que sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. E os compostos quimicamente ativos responsáveis pela ação terapêutica são denominados “princípios ativos” (MARTINS et al., 2003).

O princípio ativo determina o valor da planta, pois este princípio ativo tem um papel importante sobre os efeitos farmacológicos, aumentando a estabilidade da substância e possibilitando um melhor efeito terapêutico como ocorre com os polissacarídeos na camomila (*Matricaria recutita*), aumentando a atividade anti-inflamatória da apigenina e luteolina dentre outras flavononas (TUROLLA, 2004).

Vários fatores poderão alterar a quantidade e a qualidade do princípio ativo produzido pelas plantas como metabólitos secundários, esses fatores podem ser de ordem genética, técnica e fitotécnicas como: a forma de plantio, adubação, tratamentos culturais e época de colheita. Os fatores fitossanitários e as condições ambientais também influenciam na qualidade da planta como: o fotoperíodo, umidade do solo, temperatura, disponibilidade de nutrientes, época do ano, vento e poluição atmosférica, variações circadianas, latitude e altitude também são fundamentais para um bom cultivo com obtenção de substâncias químicas de qualidade (STEFANINI et al., 2002; ROSAL, 2008). A idade da planta é muito importante, uma vez que enzimas, hormônios e outros compostos são produzidos, degradados e ou reelaborados para expressar respostas biológicas. Também é importante saber qual o órgão da planta a ser utilizado e o horário de colheita, pois determinadas plantas

concentram suas substâncias em locais específicos do vegetal (CORREA JÚNIOR et al., 1994; MAY et al., 2008).

Com o avanço químico, farmacológico e industrial, esses compostos secundários presentes nas plantas, sofreram modificação na forma de uso, passando a ser reproduzidos artificialmente e as substâncias ativas isoladas. Com o início desse avanço tecnológico, as plantas ficaram para um segundo plano, voltando a ser reconhecidas como recursos terapêuticos recentemente (SCHEFFER et al., 1998; MENEGHELLO et al., 2002)

Hoje em dia, sabemos que algumas substâncias produzidas pela planta podem ter ação no organismo humano e, se utilizadas de maneira correta, podem atuar como medicamento, seja ele preventivo, paliativo ou curativo. Estas substâncias são chamadas de princípios ativos e, na maioria das vezes, uma planta apresenta mais de um princípio ativo, o que lhe confere diversas propriedades medicinais. No entanto, geralmente, um grupo de substâncias ativas determina sua ação principal, de forma que uma planta medicinal, mesmo possuindo diversas propriedades, sempre apresentará uma que se sobressai.

O conceito de “plantas bioativas” é relativamente recente e, por vezes, pode causar estranheza, quando se leva em conta que toda a planta possui uma atividade biológica inerente a si própria. Contudo, a expressão foi criada para designar aquelas plantas que possuem alguma ação sobre outros seres vivos e cujo efeito pode manifestar-se tanto pela sua presença em um ambiente quanto pelo uso direto de substâncias delas extraídas, desde que mediante uma intenção ou consciência humana deste efeito. Assim, são consideradas como bioativas as plantas medicinais, aromáticas, condimentares, inseticidas, repelentes, tóxicas, bactericidas e até mesmo as que possuem cunho místico ou religioso.

Existe um grande número de plantas medicinais em todo mundo, usadas por diversos povos na medicina popular desde tempos pré-históricos. Todavia, a planta “in natura” ou previamente processada utilizada sem recomendações médicas oferece alguns riscos, como por exemplo, a dificuldade em se estabelecer o modo de usar o medicamento e, em alguns casos, a verdadeira identidade de algumas espécies. As propriedades medicinais de uma planta também podem ser

consideradas tóxicas. Essas propriedades são pesquisadas em laboratórios de empresas farmacêuticas ou de universidades, no intuito de identificar as substâncias que lhes conferem as propriedades farmacológicas, ou seja, encontrar seus princípios ativos.

No presente trabalho, não nos preocupamos com as substâncias presentes nas plantas medicinais aqui estudadas. A priori, vamos investigar a atividade biológica da planta inerente às substâncias presentes nela.

As plantas medicinais utilizadas foram a *Morus nigra* L. (Amoreira-preta), a *Melissa officinalis* (Erva Cidreira) e a *Plectranthus amboinicus* Lour Spreng (Hortelã da folha grossa). Descreveremos a seguir cada espécie.

2.1.1 *Morus nigra* L.

A amoreira-preta (*Morus nigra* L.) é uma planta nativa da Ásia, Europa, América do Norte e América do sul, que cresce apenas em regiões determinadas de acordo com o clima ideal para o seu desenvolvimento. É uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro. A espécie *Morus nigra* L. é um exemplo de planta que vem sendo muito utilizada como fitoterápico. Conhecida popularmente como amoreira-negra, amoreira ou amora-preta, pertence à família Moraceae e é uma árvore caducifólia, podendo atingir até 15 m de altura (Backer; Irgang, 2004).

A seguir, na figura 2 apresentamos uma imagem da amoreira-preta, semelhante a utilizada em nossas pesquisas. A planta utilizada se encontra nas mediações do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, e dela retiramos as folhas para nossas investigações.

Figura 2 - Fotografia das folhas e frutos da amoreira-preta (*Morus nigra* L.).



Fonte: <http://www.big1news.com.br/cha-de-folhas-de-amora-beneficios.html>

Na medicina popular as folhas da amoreira-preta têm sido indicadas para mulheres durante a menopausa. Estudos estão sendo realizados para a comprovação da ação em receptores estrogênicos (Franzotti et al., 2004).

Diferentes grupos de compostos químicos têm sido investigados no gênero *Morus*, tais como alcaloides, cumarinas, flavonoides, triterpenos e esteróides (Toshio et al., 2005; Camélia et al., 1997). Na medicina chinesa, as plantas do gênero *Morus* são usadas como anti-inflamatório, diurético, antitussígeno, analgésico e antipirético (Nomura, 1988; Jiang, 1977). As raízes são utilizadas no tratamento de hipertensão arterial, reumatismo, problemas oculares e espasmos infantis. O fruto da amora é usado para doenças hepáticas e renais e suas folhas utilizadas para o tratamento de febre, dor de cabeça, beribéri, vômitos e dor estomacal causada pelo agente da cólera. Os ramos jovens da árvore são usados para o tratamento de hipertensão e paralisia de braços e pernas (Jiang, 1977).

Folhas, raízes e galhos de espécies do gênero *Morus* têm sido amplamente usados na medicina Chinesa para tratamento da febre, proteção hepática, melhora da visão, fortalecimento das articulações e redução da pressão arterial (ZHISHEN;

MENGCHENG; JIANMING, 1999). As folhas de algumas espécies de amora são consumidas na Coreia e Japão como alimento nutracêutico hipoglicemiante por pacientes com diabetes mellitus devido à presença da 1-deoxinojirimicina, conhecida por ser um dos mais potentes inibidores da α -glicosidase (KIM et al., 2003).

Extratos das folhas e raízes de *Morus alba* mostraram significativa atividade sequestrante de radicais livres e exibiram atividades antioxidantes (ANDALLU; VARADACJARYULU, 2003; FANG; HOU; CHAO, 2005). O extrato butanólico das folhas da amora também apresentou atividade sequestrante do radical DPPH e inibiu a oxidação do LDL em humanos e coelhos (DOI; KOJIMA; FUJIMOTO, 2000).

Segundo Toshio et al. (2005), foi isolada uma substância denominada chalcomoracina de espécies de *Morus*, a qual apresentou considerável atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. A potência da atividade inibitória contra o crescimento microbiano foi similar à vancomicina.

O uso medicinal da amora-preta dependerá da sua finalidade, como, por exemplo, para utilizarmos a planta no controle da alta pressão arterial temos que fazer infusão de 15 g de folhas frescas em meio litro de água fervente. E, para fins diuréticos fazer infusão de 15 g de folhas secas em um litro de água fervente, para os diabéticos deve-se fazer infusão de 10 g de folhas frescas em 100 ml de água. Contudo, o modo de preparo do mesmo sendo em forma de infusão, suco ou xarope a priori devemos saber o que será tratado.

2.1.2 *Melissa officinalis*

A melissa (*Melissa officinalis* L.), conhecida como erva-cidreira verdadeira, também possui outros nomes populares como chá-de-França, cidrilha, citronelamenor, erva-luísa, e melissa romana. Pertence à família Lamiaceae, de origem Asiática e Europeia, é cultivada no Brasil a mais de um século. Possui características semelhantes à hortelã-pimenta (*Mentha piperita* Linn.), é perene, herbácea, rizo matosa, podendo variar de 20 a 80 cm e 30 a 100 cm de altura, possui caule quadrangular dispendo-se em tufo, herbáceo, ereto, piloso e

aromático, ramificando-se desde a base formando touceiras com raízes fibrosas. Suas folhas membranáceas são de cor verde-escuro na parte superior e verde-claro na parte inferior atingindo de 3 a 6 cm de comprimento, são grandes, pecioladas, opostas, lanceoladas, ovais e pilosas, serrilhadas e com nervuras bem salientes (CORREA JÚNIOR et al., 1991; COUTO, 2006). As folhas e flores da planta são mostradas na figura 3.

Figura 3 - Fotografia da planta *Melissa Officinalis*.



Fonte: <http://flores.culturamix.com/flores/naturais/erva-cidreira-uma-planta-com-propriedades-medicinais>

Esta planta é conhecida por seus múltiplos usos popular, entre as afecções tratadas têm-se: dores de cabeça, enxaqueca, dores de dente, dores de ouvido, flatulência, indigestão, cólica, náuseas, nervosismo, anemia, vertigens, síncope, asma, bronquite, amenorreia, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, arritmias, insônia, epilepsia, depressão, psicose, histeria, desordens estomacais, úlceras, feridas, reumatismos e torcicolos (CARNAT *et al.*, 1998; HERODEZ *et al.*, 2003; SALAH & JÄGER, 2005; DASTMALCHI *et al.*, 2007).

Os efeitos cientificamente comprovados são: antioxidante (CARNAT *et al.*, 1998; RIBEIRO, BERNARDO GIL & ESQUÍVEL, 2001), sedativo (KENNEDY *et al.*, 2003; MÜLLER & KLEMENT, 2006), anti-inflamatório intestinal, hepatoprotetor,

digestivo (SIMMEN *et al.*, 2006; SCHEMANN *et al.*, 2006), antibacteriano, antifúngico, antiviral (especialmente contra o *Herpes simplex*), anti-histamínico (CARNAT *et al.*, 1998; SANDRAEI *et al.*, 2003; ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2004), redutor da motilidade gastrointestinal, redutor do colesterol (BOLKENT *et al.*, 2005), redutor do estresse e da agitação (SANTOS-NETO *et al.*, 2006) e eficácia no controle da demência em casos leves a moderados de Alzheimer (AKLHODZADEH *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2006).

A melissa encontra-se numa posição de destaque no rol das plantas medicinais devido à sua importância fitoterapêutica (SANGUINETTI, 1989), utilizadas popularmente para controlar as emoções (crises nervosas, taquicardia, melancolia, histerismo e ansiedade), também é considerada indutora do sono devido ao citral seu constituinte majoritário que é responsável pela ação relaxante (SANDRAEI *et al.*, 2003; BLANK *et al.*, 2005a). Suas folhas e inflorescência frescas são empregadas na forma de chás, que por infusão, tomado pela manhã ou à noite, combate dores de cabeça, problemas digestivos, cólicas intestinais e, também são utilizadas as folhas maceradas no combate aos ferimentos (FIALHO; ALFONSO 1998; LORENZI; MATOS, 2002; HABER *et al.*, 2005).

Além dessas propriedades, o óleo essencial extraído de matéria fresca ou seca da planta é muito utilizado pelas indústrias farmacêuticas devido à sua atividade antioxidativa, antimicótica, sedativa, antivirótico, principalmente sobre o Vírus Herpes Simplex causador do herpes labial e caxumba, antibiótica, antibacteriana, antifúngica, analgésico, relaxante, expectorante, antialérgica, adstringente, antisséptica, anti-inflamatória, antidiarreica, diurética, antiespasmódica e até mesmo tônico revigorante da pele (TESKE; TRENTTINI, 1997; LORENZI; MATOS, 2002; HABER *et al.*, 2005).

No Nordeste do Brasil, estudos científicos afirmam sua atividade antitumoral (BLANK, 2005b). Também, explorada comercialmente pelas indústrias de cosméticos na fabricação de xampus, sabonetes e hidratantes. Nas indústrias alimentícias, é utilizada na produção de licores e como aromatizante pelas indústrias de produtos de limpeza (MONTANARI JÚNIOR, 1999; MARTINS *et al.*, 2000).

2.1.3 *Plectranthus amboinicus*

Pertence à família Lamiaceae, é uma erva perene, tortuosa, pilostomentosa e aromática, encontrada em toda a América Tropical. Indicações Terapêuticas: possui propriedades antibacteriana, antifebril, anti-inflamatória da boca e da garganta, antisséptica bucal e da garganta, também age como calmante digestivo e da tosse e quando usada como chá, combate a insônia.

Utilizada na medicina popular como antiespasmódico, analgésico, emenagogo, catártico, estimulante e estomáquico. Indicado para casos de tosse, rouquidão, bronquite, inflamação da boca e dores de garganta, além do uso tópico em afecções da pele. O sumo das folhas como medicação oral é utilizado para problemas ovarianos e uterinos, inclusive cervicite. A figura 4 mostra a planta *Plectranthus amboinicus*.

Figura 4 - *Plectranthus amboinicus* conhecida como hortelã da folha grossa.



Fonte: <http://reocities.com/Hotsprings/Villa/7960/hgrauda.htm>

2.2 Métodos ópticos para estudo de meios biológicos

A combinação de sistemas de aquisição e processamento digital de imagem moderno constitui uma ferramenta importante para os pesquisadores desenvolverem novas técnicas para avaliação da qualidade de produtos vegetais de forma não destrutiva (Rabelo, 2000). Esse sistema de aquisição é composto por uma fonte de luz laser, uma câmera, um monitor, um processador de imagens e um microcomputador.

O desenvolvimento de métodos que se utilizam de imagens de objetos para análise de suas características tem sido atualmente objeto de pesquisa. Através da análise de imagem, é possível compreender características como grau de rugosidade, variação de forma com relação a um padrão, nível de esforço mecânico e grau de atividade biológica.

Uma técnica usada para avaliação de atividades biológicas baseia-se em um fenômeno de interferência óptico, ocorrendo quando a luz laser interage com uma superfície desenvolvendo um processo dinâmico. Esse fenômeno é conhecido como “*speckle* dinâmico” ou “*biospeckle*”. Segundo Dainty (1975), esse fenômeno é bem conhecido em estudos de óptica, e ocorre quando a luz laser se dispersa sobre uma superfície de incidência, exibindo algum tipo de atividade. Podemos observar esse fenômeno, quando se ilumina meios biológicos como, por exemplo, a madeira, os frutos, as sementes, as folhas, ou em materiais não biológicos, nesse último caso, a técnica é chamada apenas de *speckle*.

Quando um feixe de luz é espalhado ou transmitido por uma superfície com rugosidades da ordem do comprimento de onda da fonte, ocorre a formação de uma estrutura granular à qual é dado o nome de *speckle*, que em português significa granulado ou salpicado.

A técnica *speckle* faz uso de uma figura de aspecto granuloso (granulado óptico), formada por uma alternância de pontos claros e escuros devido a interferências predominantemente construtivas ou destrutivas da luz coerente espalhada por uma superfície rugosa.

Em 1976, Goodman fez um estudo sobre as flutuações de irradiância resultante que obedecia a exponenciais estatísticos negativos e com isso poderia ser descrito as propriedades estatísticas do padrão de *speckle* sobre um conjunto de superfícies ásperas. Anos mais tarde foram exploradas propriedades estatísticas de padrões de *speckle*, fazendo análises geométricas contidas nos campos espalhados. Esse estudo tem algumas aplicações em holografia e, no campo da óptica, em medidas de gradiente de fase de ondas incidentes (Campos, 2013).

Quando temos um objeto difusor e os grãos individuais se movem, o padrão do *speckle* também se move e altera a sua forma, permitindo assim, que os padrões de *speckle* dinâmico contenham informações sobre o movimento da superfície. Isso está presente em materiais biológicos.

Uma forma de se utilizar o *speckle* como ferramenta de medição de atividade de material seja biológico ou não biológico, é a medição da movimentação dos grãos de *speckle*, ou em outras palavras, a medição da duração ou do tempo de vida de um grão de *speckle*.

Na prossecução deste trabalho, mais precisamente nos itens a seguir, encontra-se uma descrição mais detalhada do fenômeno *biospeckle*, principal elemento deste estudo, com suas principais propriedades.

2.3 Espalhamentos da luz

Vários são os fenômenos envolvidos no processo de interação da luz com a matéria, entre os quais se podem destacar absorção, transmissão, dispersão, reflexão e espalhamento, sendo este último essencial na formação do granulado óptico [Silva, 2007].

Para o espalhamento da luz sabemos que ele pode ser considerado elástico, inelástico e quase elástico. No espalhamento do tipo inelástico, a luz que é espalhada tem comprimento de onda maior que a luz incidente, isto ocorre porque os elétrons excitados pela interação (luz – matéria) decaem para estados

intermediários, emitindo fótons de energias menores. O espalhamento elástico não altera o comprimento de onda da radiação, neste caso os centros espalhadores são estáticos, mudando somente a direção da onda incidente. Já no espalhamento quase elástico, a frequência da onda espalhada é distinta da incidente. Isso se deve ao fato de que os centros espalhadores estão em movimento, fazendo com que ocorra um deslocamento nas ondas espalhadas pelos diferentes centros espalhadores.

No *speckle* dinâmico, os espalhamentos envolvidos para estudar esse fenômeno, são do tipo elástico ou quase elástico, haja vista que, segundo Silva (2007), quando há formação do granulado óptico, a interferência entre ondas com frequências diferentes dá origem ao fenômeno do batimento, provocando as flutuações de intensidade observadas no *speckle* dinâmico. Nos deteremos a descrever alguns tipos de espalhamento de interesse para o entendimento do *speckle*.

2.3.1 Espalhamento Rayleigh, Mie e Geométrico.

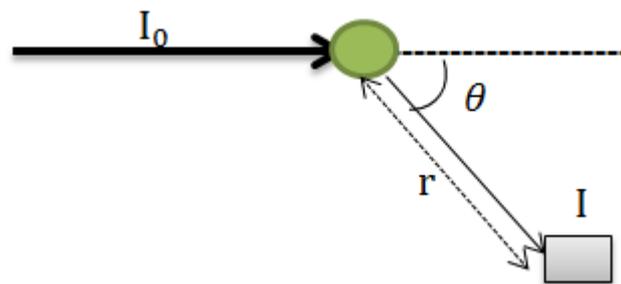
Um tipo especial de espalhamento elástico é o espalhamento Rayleigh. A sua única restrição é que as partículas de dispersão devem ser menores do que o comprimento de onda da radiação incidente. Em particular, encontra-se uma relação entre a intensidade dispersa e o índice de refração, e de que o espalhamento é inversamente proporcional à quarta potência do comprimento de onda. Esta última afirmação também é conhecida como lei de Rayleigh (Niemz, 2003).

Segundo Cardoso (2001) na teoria de Rayleigh, a intensidade de luz espalhada por uma partícula de índice de refração próximo da unidade e diâmetro da ordem de 1/20 do comprimento de onda da radiação incidente, é dada por:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{8\pi^4}{\lambda^4 r^2} \left(\frac{\alpha}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta) \quad (2.3.1)$$

Em que I_0 é a intensidade da radiação incidente não polarizada, de comprimento de onda λ que incide sobre a partícula, α é a polarizabilidade do material e ϵ_0 é a permissividade elétrica do material. O ângulo θ é formado entre o feixe da radiação incidente e o feixe da radiação espalhada, sendo que a intensidade I é medida a uma distância r da partícula, conforme é mostrado na figura 5:

Figura 5 - Configuração experimental básica utilizada em medidas de espalhamento de luz.



Fonte: Autor, 2014.

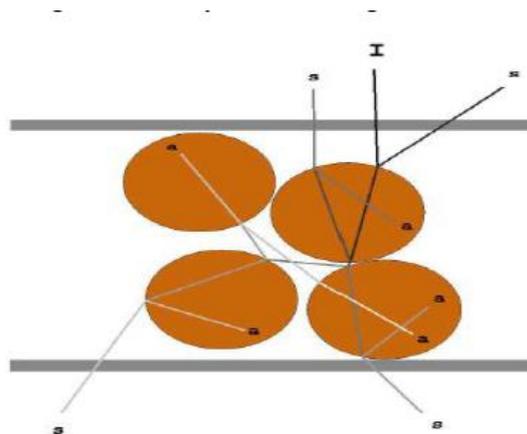
No espalhamento Mie, raios oriundos de pontos distintos da mesma partícula podem interferir entre si. As diferenças de fase entre ondas espalhadas são menores na direção da onda incidente, levando a interferências construtivas mais intensas e irradiâncias maiores nesta direção. Este tipo de espalhamento, presente em sistemas coloidais, fumaças, névoas e nas nuvens, é independente do comprimento de onda da radiação. Isto explica, por exemplo, porque as nuvens são brancas, pois as gotículas de água que as formam têm dimensões da ordem do comprimento de onda visível.

De acordo com Niemz (2007) o espalhamento Mie é aplicado em situações em que o comprimento de onda da luz incidente é da ordem do tamanho das partículas que compõem o meio espalhador. Podemos destacar dois aspectos importantes que diferenciam o espalhamento Mie do espalhamento Rayleigh. Primeiramente, destacaremos que a intensidade da luz espalhada I no espalhamento Mie tem uma dependência fraca com o comprimento de onda da luz incidente ($\sim \lambda^{-x}$ com $0.4 \leq x \leq 0.5$), entretanto, para o espalhamento Rayleigh

temos que $I \propto \lambda^{-4}$. Em segundo Lugar, a intensidade da luz espalhada no espalhamento Mie segue preferencialmente para frente, enquanto no espalhamento Rayleigh as intensidades espalhadas para frente e para traz são as mesmas (Pereira, 2012).

No espalhamento geométrico, a luz penetra na partícula e sofre reflexões e refrações em seu interior, desenvolvendo trajetórias que podem ser descritas por meio das leis da óptica geométrica. Todavia, a descrição completa dessas trajetórias é complexa, pois os espalhamentos são múltiplos e a quantidade de parâmetros envolvidos é grande. Simulações numéricas, baseadas no método de Monte Carlo, são utilizadas para descrever esses espalhamentos.

Figura 6 - Espalhamento Geométrico



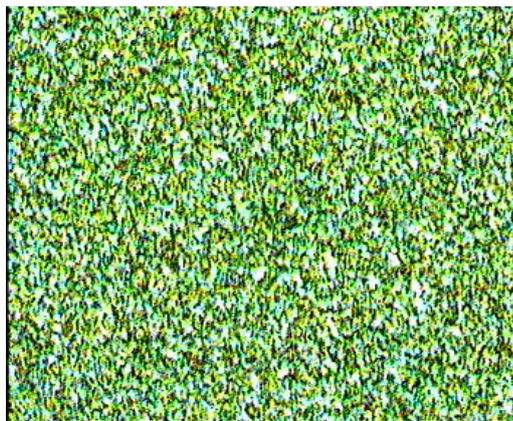
Fonte: Silva, 2007.

Nos estudos em meios biológicos ocorrem estes três tipos de espalhamento, pois os tecidos biológicos apresentam estruturas cujas dimensões variam desde poucos nanômetros (cadeias enzimáticas, por exemplo) até dezenas de micrômetros (a própria célula). O espalhamento Mie e espalhamento Geométrico são predominantes na formação do granulado óptico.

2.4 Propriedades do *Speckle*

O efeito *speckle* é um dos principais fenômenos resultantes de uma iluminação coerente (luz laser) sobre uma superfície opticamente rugosa. Como é mostrado na figura 7, o *speckle* é formado por uma alternância de pontos claros e escuros tratando-se de um fenômeno de múltiplas interferências construtivas (pontos claros) e destrutivas (pontos escuros). Esse fenômeno tem característica ondulatória e é observado tanto na região do visível quanto em outras regiões do espectro eletromagnético.

Figura 7 - Padrão de *speckle*.



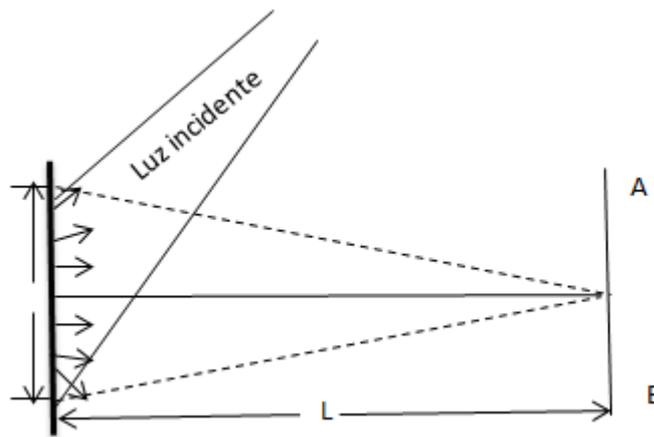
Fonte: Autor, 2014.

Um padrão *speckle* pode ser obtido de duas maneiras, sendo classificado de objetivo ou subjetivo. No padrão *speckle* objetivo, também conhecido como propagação em espaço livre, a configuração do aparato experimental é caracterizada por não ter nenhum elemento óptico colocado entre a superfície espalhadora e o plano de registro. Para o padrão subjetivo, também chamado de geometria imagem, temos elementos ópticos entre a superfície e o plano de observação. As figuras 8 e 9 a seguir, mostram os arranjos ópticos para a gravação do *speckle* objetivo e subjetivo, respectivamente, enfatizando que um ponto iluminado de uma superfície rugosa espalha luz por todas as direções e que nas

figuras 8 e 9, as linhas delimitadas pelos pontos A e B representam o plano de observação.

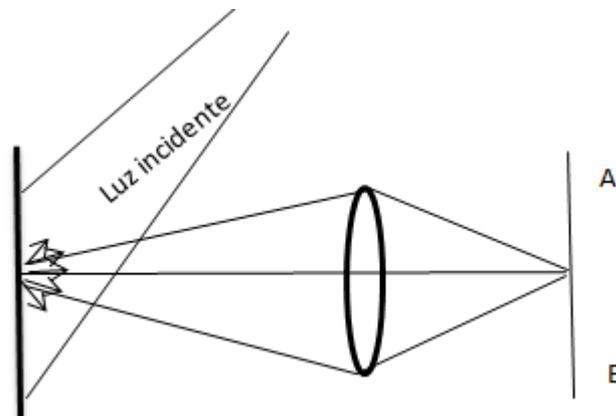
Na figura 8, a luz espalhada pela superfície do objeto analisado incide sobre um ponto de observação. Na figura 9, a radiação espalhada passa por um elemento óptico (neste caso uma lente) que converge os raios da luz, os quais têm sua origem em uma pequena região da superfície iluminada, para um ponto de observação.

Figura 8 - Arranjo experimento do *speckle* objetivo.



Fonte: Autor, 2014.

Figura 9 - Arranjo experimental *speckle* subjetivo.



Fonte: Autor, 2014.

Podemos distinguir o padrão *speckle* objetivo do *speckle* subjetivo, explorando o fato de que um pequeno fragmento do padrão objetivo contém informação de toda a superfície do objeto, enquanto uma pequena área do padrão subjetivo corresponde a uma parte definida da superfície do objeto.

Neste trabalho, utilizamos os padrões de *speckle* objetivo e subjetivo com o intuito de investigar a atividade biológica das espécies botânicas citadas anteriormente. Segundo Braga et al (2009), a atividade biológica expressa na dinâmica do padrão *speckle* não apresenta uma definição de qual fenômeno 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 estruturas.

A seguir, mostraremos um estudo detalhado de métodos de análise de imagem obtidas a partir do *biospeckle* laser.

3 MÉTODOS DE ANÁLISE DO *SPECKLE* DINÂMICO

Neste capítulo será apresentado o embasamento teórico necessário ao tratamento de imagens adquiridas com a investigação, ao longo do tempo, da atividade biológica das espécies botânicas pesquisadas, fazendo a evolução temporal através da Historia Temporal do Padrão *Speckle* (THSP), uma figura bidimensional que codifica informações espaciais e temporais das intensidades que são obtidas no granulado. Será mostrado também, o método de matrizes de Co-ocorrência (MCO) para investigar alta e baixa atividade de sistemas biológicos. Usaremos o método de correlação para fazer uma comparação e estabelecer o grau de similaridade entre as imagens, com dados teóricos e experimentais.

3.1 Técnicas de processamento das imagens do *speckle* dinâmico (*biospeckle*)

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). São diversos os métodos de análise do *speckle* dinâmico, no qual, destacam-se o Momento de Inércia (MI), o método do contraste e a auto correlação, como ferramentas que apresentam resultados numéricos. Este tipo de análise numérica é indicado para materiais homogêneos, ou seja, materiais que mantêm, em todas as suas regiões o mesmo tipo de atividade.

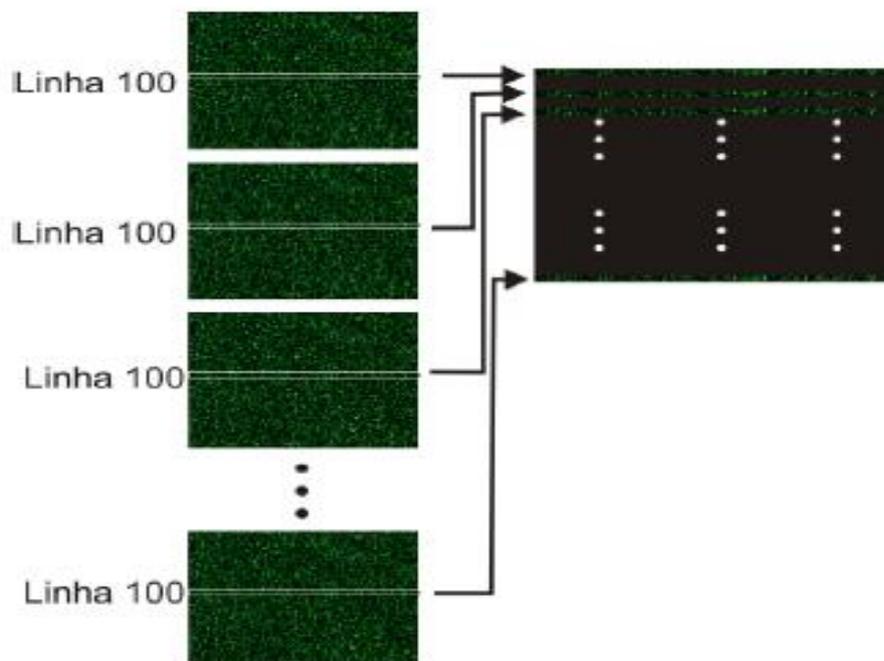
Outro tipo de análise do *biospeckle* são as gráficas, que são indicadas para materiais heterogêneos em relação ao nível de atividade presente. Nesta análise, as principais técnicas utilizadas são Fuji (Fujii et al., 1989), Diferenças Generalizadas (Arizaga et al., 2002) e Contraste de Briers (também conhecida como Lasca) (Briers, 1975). (Apud Alves, 2012).

3.1.1 História Temporal do Padrão do *Speckle* (THSP)

A história temporal do padrão do *Speckle* (THSP do inglês “*Time History Speckle Pattern*”) ou também chamada de *Spatial Temporal Speckle* (STS) é uma técnica que permite a análise das intensidades do pixel de uma sequência de imagens. A THSP é usada para obter informações de níveis de atividade em um material iluminado por feixe laser, representada por uma figura que mostra, em tons de cinza, os níveis de atividade dos pixels ao longo do tempo.

A THSP é uma imagem bidimensional montada tomando sempre a mesma linha numa sequência de imagens registradas temporalmente, ou seja, a primeira linha da THSP corresponde à linha registrada no primeiro instante. A segunda linha corresponde à mesma fila de pixels registrada no segundo instante e assim sucessivamente até compor uma nova imagem na qual fica registrada a evolução temporal de uma fila do padrão. Nessa imagem formada na direção horizontal, fica registrada um conjunto de pixels que correspondem à distribuição espacial do padrão, já na direção vertical é representada a evolução temporal desses pixels ao longo dos instantes sucessivos (a representação está na figura 10) (Campos, 2013).

Figura 10 - Representação de como montar uma THSP selecionando a linha 100.



3.1.2 Matrizes de Co-ocorrências (MCO)

Como foi mostrada anteriormente, a imagem da THSP nos fornece apenas uma informação visual da atividade da superfície, possibilitando apenas identificar se a superfície possui ou não atividade, porém não permite quantificá-la. Com essa limitação da THSP, foi desenvolvido um procedimento de geração de matriz de Co-ocorrência (MCO) a partir de imagens de THSP. (Arizaga; Trivi; Rabal, 1999).

A principal função da MCO é caracterizar texturas em uma imagem através de um conjunto de estatísticas para as ocorrências de cada nível de cinza em pixels diferentes ao longo de direções distintas. As matrizes de Co-ocorrência são ferramentas para a classificação de imagens (Vasconcelos, 2008). A matriz de Co-ocorrência é computada sobre a THSP, que pode ser definida como:

$$MCO = [N_{ij}], \quad (3.1.1)$$

onde N_{ij} refere-se ao número de vezes que o valor da intensidade i de um pixel passou para a intensidade j . A ordem desta matriz equivale ao número de tons de cinza que o sistema de aquisição pode fornecer. O sistema utilizado para esta pesquisa foi o de 8bits, no qual obtemos matrizes de Co-ocorrência de 256x256.

Segundo Vasconcelos (2008), para obtermos a forma final da MCO devemos normalizá-la, ou seja, dividir cada elemento da matriz de Co-ocorrência pelo valor do somatório contido em todas as células da MCO, tendo como resultado uma matriz quadrada de probabilidade P_{ij} , onde os elementos (i,j) representam a probabilidade de uma certa intensidade i mudar para uma intensidade j na THSP. Na forma matemática temos,

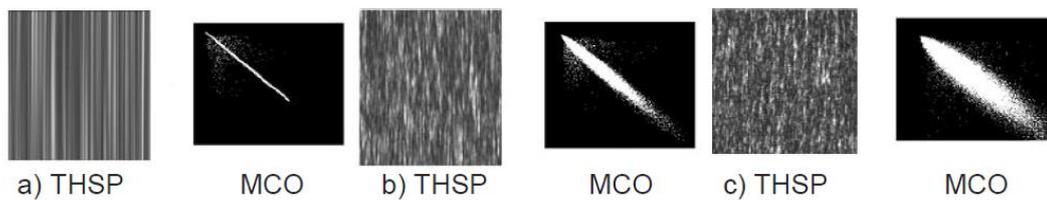
$$P_{(i,j)} = \frac{N_{ij}}{\sum_{ij} N_{ij}} \quad (3.1.2)$$

A matriz quadrada obtida pela equação acima, é a mesma da equação (3.1,1), porém normalizada com a soma de todos os elementos iguais a 1.

Com a MCO montada, observa-se que a diagonal principal está relacionada com intensidades que não variam com o tempo, enquanto que fora da mesma aparecem as ocorrências que caracterizam uma mudança no tempo. Deste modo, quanto mais afastada a ocorrência estiver da diagonal principal maior será a

mudança na intensidade do pixel i para o pixel j . Então, com a matriz de Co-ocorrência, é possível analisar o nível do *speckle* observado no tempo (Braga Júnior, 2000). Isso pode ser visualizado facilmente na representação gráfica das ocorrências como mostrado na figura 11 a seguir, com as THSP e suas respectivas MCO, e na tabela 1 com os seus valores de momento de inércia.

Figura 11 – a) baixa atividade b) média atividade c) alta atividade



Fonte: Silva, 2007.

Tabela 1- Momento de Inércia das MCO

Matriz	MI
a)	5,3
b)	11,8
c)	65,4

Fonte: Silva, 2007.

3.1.3 Momento de Inércia (MI)

Uma forma de quantificar a medida de dispersão dos pontos em torno da diagonal principal da MCO é por meio do cálculo do momento de inércia da matriz. O nome momento de inércia é sugerido por analogia à mecânica de sua operação. Com a finalidade de obter um valor numérico que permite quantificar as diferenças entre duas imagens distintas, pode ser utilizado o conceito de momento de segunda

ordem. O momento de inércia pode ser relacionado com a atividade biológica, ou seja, valores altos de MI equivalem à alta atividade da superfície e valores baixos de MI relatam baixa atividade biológica. O cálculo do MI da matriz nos é dado por:

$$MI = \sum_{i,j} MCO_{(i,j)} * (i - j)^2 , \quad (3.1.3)$$

onde

MI: Momento de inércia

MCO(i,j): Matriz de Co-ocorrência

\hat{i} : i-ésima linha da MCO, com valores de intensidades entre 0 e 255

j: j-ésima coluna da MCO, com valores de intensidade entre 0 e 255

O momento de inércia, segundo Arizaga et al (1999), (Apud Rabal et al 2003) é a medida que indica com que frequência ocorre mudanças bruscas de intensidades na matriz THSP e, geralmente, é utilizada para caracterizar os padrões de *speckle*. Esta medida exhibe altos valores quando a amostra apresenta alta atividade e baixos valores em situação contrária.

3.2 Coeficiente de Correlação de Pearson

A correlação é uma medida de associação bivariada do grau de relacionamento entre duas variáveis (Stanton, 2001). A palavra correlação, tem como significado relação mútua entre dois termos. Desse modo, quando temos duas variáveis quantitativas podemos medir associação calculando um coeficiente de correlação.

De acordo com a estatística descritiva, a medida que nos fornece o grau de dependência linear entre duas variáveis é o coeficiente de Correlação. Podemos ter diferentes tipos de coeficientes de correlação, onde o mais conhecido é o coeficiente de correlação de Pearson (Ron, 2007; Triola, 2008). Neste trabalho utilizaremos o

coeficiente de correlação de Pearson, pois é o mais indicado para medir a relação linear entre duas variáveis aleatórias.

O método mais utilizado para medir a correlação entre duas variáveis é o Coeficiente de Correlação Linear de Pearson, também conhecido como Coeficiente de Correlação do Momento Produto. Este foi o primeiro método de correlação, estudado por Francis Galton e seu aluno Karl Pearson, em 1897 (SCHULTZ e SCHULTZ, 1992). Matematicamente o coeficiente pode ser escrito como,

$$c = \frac{\sum_{i=1}^N (r_i - \bar{r})(x_i - \bar{x})}{\left(\sqrt{\sum_{i=1}^N (r_i - \bar{r})^2}\right)\left(\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}\right)} \quad (3.2.1)$$

Em que r_i são os valores de tons de cinza correspondentes aos pontos da imagem cuja média é \bar{r} e x_i são os valores de tons de cinza da imagem padrão alterada, cuja média é \bar{x} . O coeficiente pode variar de -1 até 1, onde para $c = 1$ temos uma correlação perfeitamente positiva entre as duas variáveis. E para $c = -1$ temos uma correlação perfeitamente negativa. No caso em que $c = 0$ não teremos correlação linear. Contudo, podemos investigar $c = 0$ por outros métodos de correlação.

Para a análise do coeficiente de correlação neste trabalho, nosso interesse será observar a evolução temporal da atividade biológica das amostras medindo o coeficiente de correlação entre o padrão de *speckle* produzido por ela em um determinado intervalo de tempo. Inicialmente ao iluminarmos a amostra forma-se um padrão de *speckle* que é registrado como referência. Uma vez que a amostra é ativa, os centros espalhadores movimentam-se, mudando frequentemente com o tempo os caminhos óticos entre cada ponto da superfície examinada e cada ponto do plano de observação, formando assim o padrão do *speckle*. Deste modo ocorre a mudança das fases relativas às frentes de onda, alterando assim a condição inicial do *speckle*.

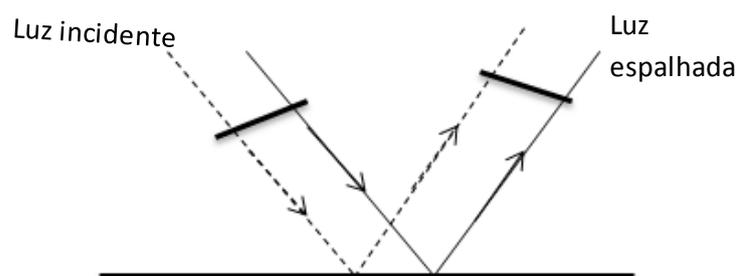
Assim, podemos observar a evolução temporal da atividade biológica de uma determinada superfície a partir do coeficiente de correlação de Pearson, correlacionando imagens obtidas ao longo do tempo. Como o meio é ativo o padrão inicial é modificado com o tempo, com isso efetuam-se os registros dos padrões subsequentes. As imagens são transformadas em matrizes de pixels, e estes são

convertidos para valores em preto e branco, aplicando o coeficiente de correlação de Pearson para gerar um índice para cada imagem. Todas as imagens analisadas usam a primeira imagem como parâmetro de comparação, gerando assim a correlação de todas as imagens comparando-se com a primeira. Ao final desse processo, obtemos para cada instante de tempo, um valor para o coeficiente de correlação, que pode ser exposto em um gráfico como função do tempo.

3.3 Teoria do espalhamento da luz sobre uma superfície rugosa

Muitas superfícies naturais e biológicas são rugosas em diferentes graus, e esta rugosidade afeta as características de propagação e espalhamento de uma onda. Por exemplo, as características de uma superfície rugosa são diferentes das características de uma superfície lisa (Ishimaru, 1978). Vamos considerar uma onda eletromagnética com comprimento de onda λ incidindo sobre uma superfície lisa, como mostra a figura 12. Para esta superfície a onda deve ser refletida especularmente, os raios refletidos estão em fase, e o ângulo de reflexão é igual ao ângulo de incidência. Portanto, o feixe refletido existe somente na direção especular, sendo formado apenas por ondas que se encontram em fase.

Figura 12 - Onda eletromagnética incidindo sobre uma superfície lisa.



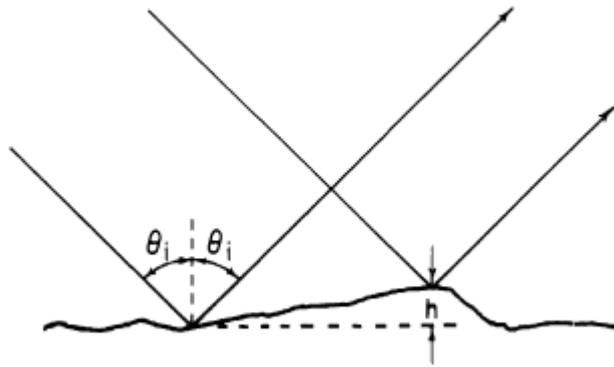
Fonte: Autor, 2014.

Para o caso de uma superfície rugosa (figura 13), as ondas refletidas não estão mais em fase, a diferença de fase é dada por:

$$\Delta\phi = 2kh \cos \theta_i$$

Onde $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ é o módulo do número de onda e h a altura da superfície.

Figura 13 - Onda eletromagnética incidindo sobre uma superfície rugosa.



Fonte: Ishimaru, 1978.

Como h é desprezível quando comparado ao comprimento de onda, consideramos a diferença de fase e a superfície deve ser considerada lisa. No entanto, ocorre uma redução na reflexão especular devido ao fenômeno de interferência e parte da onda é espalhada em todas as direções, então para este caso devemos considerar a superfície sendo rugosa.

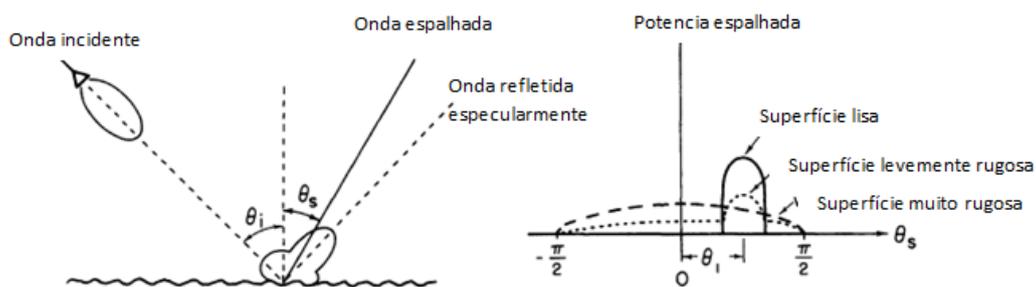
Segundo Ishimaru (1978), para determinar se uma superfície deve ser considerada lisa ou rugosa devemos utilizar os critérios propostos por Reyleigh. Seguindo os critérios, devemos analisar se a diferença de fase é maior ou menor que $\frac{\pi}{2}$. Em termos de h , os critérios de Reyleigh são:

- $h < \frac{\lambda}{8 \cos \theta_i}$, neste caso a superfície deve ser considerada lisa.
- $h > \frac{\lambda}{8 \cos \theta_i}$, a superfície deve ser considerada rugosa.

Estatisticamente h é considerado como o desvio padrão das alturas distribuídas aleatoriamente no relevo de uma superfície rugosa.

Para as características gerais do espalhamento sobre uma superfície rugosa, suponha-se que uma onda é irradiada a partir de um transmissor e incide sobre uma superfície, como é mostrado na figura 14. Se a superfície é lisa, a onda refletida é idêntica a incidente. Se a superfície é levemente rugosa, esta onda refletida fica ligeiramente atenuada devido ao espalhamento e a potência correspondente, a onda refletida diminui devido ao espalhamento em todas as direções. A potência refletida é geralmente chamada de componente especular, enquanto a potência espalhada é denominada de componente difusa. Entretanto, se a superfície é muito rugosa a componente especular quase desaparece e a componente difusa é praticamente dominante.

Figura 14 - Características gerais da potência em uma superfície rugosa.



Fonte: Adaptado de Ishimaru (1978).

Para Ishimaru (1978) há duas abordagens gerais para o espalhamento da luz sobre uma superfície rugosa, são elas: a aproximação de Kirchhoff e o método perturbativo de primeira ordem. A aproximação de Kirchhoff é aplicada em situação que o raio de curvatura da superfície é muito menor que o comprimento de onda da luz incidente. O método perturbativo de primeira ordem é aplicado para uma superfície levemente rugosa cuja inclinação da superfície é muito menor que a unidade. Nesta dissertação foi usado apenas o método perturbativo de primeira ordem, que serviu para obter a seção de choque de radiação espalhada por unidade de área da superfície rugosa, a qual foi usada na simulação do coeficiente de correlação de Pearson que veremos no próximo capítulo.

3.4 Simulação

Nesta dissertação, fizemos um estudo teórico e experimental da técnica de *biospeckle* para análise de superfície rugosa com aplicação na investigação da atividade biológica. Para nossos estudos utilizamos a teoria de espalhamento da luz, em particular usando o método perturbativo de primeira ordem, buscando obter a seção de choque de radiação espalhada por unidade de área da superfície rugosa. Esse estudo foi elaborado por Pereira (2012), baseando-se no modelo proposto por Ishimaru (1978). Em seu trabalho, Pereira determinou a seção de choque, onde foi possível obter a distribuição de intensidades numa certa região do espaço, em função do tempo, permitindo a comparação das diferentes distribuições de luz em instantes distintos, no intuito de comparar os dados experimentais com os dados teóricos com base no coeficiente de correlação de Pearson. Os resultados experimentais de sua pesquisa mostraram que o coeficiente de correlação de Pearson evoluindo no tempo era uma exponencial do tipo decrescente. No resultado teórico do coeficiente de correlação, obtido por meio de simulação, também se destacou o comportamento exponencial decrescente indicando uma boa concordância com o resultado experimental. Vale ressaltar que o objeto de estudo analisado por ele, foi uma folha recém-colhida, que também é um dos nossos objetos de estudo.

Para este trabalho, como já foi dito anteriormente, utilizaremos a simulação feita por Pereira, com base no roteiro de Ishimaru para uma superfície levemente rugosa, onde foi usada a teoria perturbativa de primeira ordem para encontrar a seção de choque da radiação espalhada por unidade de área de uma superfície rugosa. A seção de choque para uma onda polarizada deve ser expressa como:

$$\sigma_{vh} = 4\pi k^4 \cos^2 \theta_i \sin^2 \phi_s |\alpha_{vh}|^2 W(p, q) \quad (3.3.1)$$

$$\sigma_{hv} = 4\pi k^4 \cos^2 \theta_s \sin^2 \phi_s |\alpha_{hv}|^2 W(p, q), \quad (3.3.2)$$

onde $k = \frac{2\pi}{\lambda}$, $W(p, q)$ é calculado em $p = k \sin \theta_s \cos \phi_s - k \sin \theta_i$ e $q = k \sin \theta_s \cos \phi_s$, α_{vh} e α_{hv} são dados por:

$$\alpha_{vh} = \frac{(\mathcal{E}_r - 1)(\mathcal{E}_r - \sin^2 \theta_s)^{\frac{1}{2}}}{\left[\cos \theta_i + (\mathcal{E}_r - \sin^2 \theta_i)^{\frac{1}{2}} \right] \left[\mathcal{E}_r \cos \theta_s + (\mathcal{E}_r - \sin^2 \theta_s)^{\frac{1}{2}} \right]}$$

$$\alpha_{vh} = \frac{(\mathcal{E}_r - 1)(\mathcal{E}_r - \sin^2 \theta_i)^{\frac{1}{2}}}{\left[\mathcal{E}_r \cos \theta_i + (\mathcal{E}_r - \sin^2 \theta_i)^{\frac{1}{2}} \right] \left[\cos \theta_s + (\mathcal{E}_r - \sin^2 \theta_s)^{\frac{1}{2}} \right]}$$

Essas equações tratam apenas de casos em que a superfície rugosa não está variando no tempo. Para a variação temporal, temos:

$$\sigma = \frac{\pi k^2}{4} |f(p, q)|^2 W(p, q) \exp(-i\omega_r \tau), \quad (3.3.3)$$

onde $p = k \sin \theta_s \cos \phi_s - k \sin \theta_i$ e $q = k \sin \theta_s \cos \phi_s$.

A partir da equação (3.3.3) (com suas versões para diferentes polarizações) pode-se obter, para uma região fixa no espaço, a evolução temporal do padrão de *speckle* em função do tempo. A correlação entre esses padrões de *speckle* em instantes diferentes deve conter informação da atividade da superfície. Embora a dependência aqui usada seja do tipo harmônico, é possível utilizar outras dependendo da superfície analisada (Pereira, 2012).

Apresentaremos a seguir a abordagem utilizada para determinar o espalhamento de luz em uma superfície rugosa, e a simulação do coeficiente de correlação de Pearson.

3.4.1 Simulação da evolução do coeficiente de correlação de Pearson

Com o objetivo de simularmos a variação temporal do coeficiente de correlação de Pearson entre os padrões de *speckle* que aparecem devido ao espalhamento de luz laser sobre uma superfície rugosa, partiremos das equações de seção de choque mostradas anteriormente. Uma vez que os experimentos realizados nesta dissertação usaram lasers verticalmente polarizados, teremos:

$$\sigma_{hv} = 4\pi k^4 \cos^2 \theta_s \sin^2 \phi_s |\alpha_{hv}|^2 W(p, q) \quad (3.3.4)$$

$$\sigma_{vv} = 4\pi k^4 (\sin^2 \theta_i \sin^2 \theta_s - \cos \phi_s)^2 |\alpha_{vv}|^2 W(p, q) \quad (3.3.5)$$

Com seção de choque total como:

$$\sigma_t = a\sigma_{hv} + b\sigma_{vv}, \quad (3.3.6)$$

onde a e b são parâmetros incluídos para levar em conta a radiação espalhada com outras polarizações decompostas nas direções horizontal e vertical, respectivamente. Substituindo (3.3.4) e (3.3.5) em (3.3.6) teremos:

$$\begin{aligned} \sigma_t = & a(4\pi k^4 \cos^2 \theta_s \sin^2 \phi_s |\alpha_{hv}|^2 W(p, q)) \\ & + b[4\pi k^4 (\sin^2 \theta_i \sin^2 \theta_s - \cos \phi_s)^2 |\alpha_{vv}|^2 W(p, q)] \end{aligned}$$

$$\sigma_t = 4\pi k^4 [a \cos^2 \theta_s \sin^2 \phi_s |\alpha_{hv}|^2 + b (\sin^2 \theta_i \sin^2 \theta_s - \cos \phi_s)^2 |\alpha_{vv}|^2] W(p, q) \quad (3.3.7)$$

Para resolver a equação (3.3.7), precisamos conhecer a função densidade espectral da altura da superfície $W(p, q)$, onde sabemos que a função correlação das alturas da superfície rugosa é $\langle \zeta(x_1, y_1) \zeta(x_2, y_2) \rangle$. Podemos assumir que a função correlação pode ser escrita como:

$$\langle \zeta(x_1, y_1) \zeta(x_2, y_2) \rangle = h^2 \exp\left(-\frac{x_d^2}{l^2} - \frac{y_d^2}{l^2}\right), \quad (3.3.8)$$

em que h é o desvio quadrático das alturas da superfície rugosa e l é o comprimento de correlação.

A função de densidade espectral $W(p, q)$ pode ser expressa matematicamente como (Ishimaru, 1978; Pereira, 2012) :

$$W(p, q) = \frac{1}{\pi^2} \iint_{-\infty}^{\infty} dx_d dy_d \langle \zeta(x_1, y_1) \zeta(x_2, y_2) \rangle \exp(-ipx_d - iqy_d) \quad (3.3.9)$$

Substituindo a função de correlação na equação acima temos:

$$W(p, q) = \frac{h^2}{\pi^2} \iint_{-\infty}^{\infty} dx_d dy_d \exp \left[\left(-\frac{x_d^2}{l^2} - ipx_d \right) + \left(-\frac{y_d^2}{l^2} - iqy_d \right) \right] \quad (3.3.10)$$

Calculando a integral, vamos definir que,

$$I = \iint_{-\infty}^{\infty} dx_d dy_d \exp \left[\left(-\frac{x_d^2}{l^2} - ipx_d \right) + \left(-\frac{y_d^2}{l^2} - iqy_d \right) \right]$$

Onde é possível mostrar que a solução da integral acima é dada por:

$$I = l^2 \pi \exp \left[-\frac{l^2}{4} (p^2 + q^2) \right] \quad (3.3.11)$$

Dessa maneira, obtemos a função densidade espectral da altura da superfície $W(p, q)$ que é:

$$W(p, q) = \frac{h^2 l^2}{\pi} \exp \left[-\frac{l^2}{4} (p^2 + q^2) \right] \quad (3.3.12)$$

Ao substituir a expressão (3.3.12) em (3.3.7) encontramos que

$$\begin{aligned} \sigma_t = & 4h^2 l^2 k^4 [\text{acos}^2 \theta_s \sin^2 \phi_s |\alpha_{hv}|^2 + \\ & b(\sin^2 \theta_i \sin^2 \theta_s - \cos \phi_s)^2 |\alpha_{vv}|^2] \left\{ \exp \left[-\frac{l^2 k^2}{4} (\sin \theta_s \cos \phi_s - \sin \theta_i)^2 - \right. \right. \\ & \left. \left. \frac{l^2 k^2}{4} \exp(\sin \theta_s \sin \phi_s)^2 \right] \right\} \quad (3.3.13) \end{aligned}$$

A equação acima é a expressão geral para a seção de choque da radiação espalhada que é detectada pela CCD. Porém, até agora tratamos apenas de casos em que a superfície rugosa não está variando com o tempo, então teremos que incluir nas expressões a variação temporal da superfície rugosa. Para incluirmos a variação temporal da superfície rugosa na expressão da seção de choque por unidade de área, consideramos que cada componente harmônica espacial de uma onda move-se com velocidade de fase definida, como é o caso de ondas marítimas, em que é possível idealizar que elas viajam com uma velocidade de fase definida

por $v_p = \sqrt{\frac{gl}{2\pi}}$, em que g é a aceleração da gravidade e l é o comprimento de onda.

Com isso podemos mostrar que a seção de choque espalhada por unidade de área para uma onda marítima (vide anexo 1) é dada por:

$$\sigma = \frac{\pi k^2}{4} |f(p, q)|^2 W(p, q) \exp(-i\omega_r \tau), \quad (3.3.14)$$

onde

$$\omega_r = \left[g(p^2 + q^2)^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Lembrando que a expressão (3.3.14) foi deduzida com ω para uma onda marítima, ou seja, a rugosidade para a superfície do oceano varia praticamente de forma harmônica no tempo (Pereira, 2012). Para o nosso caso, onde observamos uma folha recém-colhida, é esperado que a atividade biológica da planta decaísse exponencialmente com o tempo, sabendo que o mesmo é um processo de degradação quimicamente ativo, em que esse processo é regido por equações de taxas que resultam em decaimentos exponenciais. Desse modo, vamos supor que o decaimento seja exponencial com o tempo, que equivale a $\omega_r \rightarrow -i\omega_r$. Assim teremos que a evolução temporal da seção de choque por unidade de superfície rugosa será expressa por:

$$\begin{aligned} \sigma_t = & 4h^2 l^2 k^4 [\cos^2 \theta_s \sin^2 \phi_s |\alpha_{hv}|^2 + \\ & b(\sin^2 \theta_i \sin^2 \theta_s - \cos \phi_s)^2 |\alpha_{vv}|^2] \left\{ \exp \left[-\frac{l^2 k^2}{4} (\sin \theta_s \cos \phi_s - \sin \theta_i)^2 - \right. \right. \\ & \left. \left. \frac{l^2 k^2}{4} \exp(\sin \theta_s \sin \phi_s)^2 \right] \exp[-\omega_r t] \right\} \end{aligned} \quad (3.3.15)$$

Agora podemos simular a evolução temporal do coeficiente de correlação de *speckle* $C(t)$. Para isso devemos partir da equação (3.3.15), que nos fornece a evolução temporal da seção de choque por unidade de superfície rugosa σ_t em que consideramos a luz incidente como verticalmente polarizada. Pois, σ é proporcional

a intensidade da luz espalhada pela superfície. Consequentemente, podemos usar a equação (3.3.15) para simular $C(t)$ (coeficiente de correlação).

Contudo, partindo de σ_t , faz-se necessário construir uma matriz a partir dos valores obtidos para σ_t , quando fazemos $t = 0$ e variamos θ e ϕ . Matriz essa que será usada como referência para comparação com outras matrizes obtidas para t maior que zero. Posteriormente, construiremos novas matrizes variando θ e ϕ , mas dessa vez também variando t . Sendo assim, calculamos o coeficiente de correlação em cada matriz que evolui no tempo com a matriz referência, obtendo assim uma série de valores para o coeficiente de correlação, que poderão ser expressos em um gráfico $C \times t$ (Coeficiente de correlação de Pearson versus tempo). Com isso, poderemos investigar o comportamento temporal do coeficiente de correlação de Pearson para padrões de *speckle*, e compará-los com os resultados do coeficiente obtidos experimentalmente.

A utilização dos métodos mencionados neste capítulo, foram aplicados aos dados obtidos experimentalmente. Explanaremos a metodologia utilizada em laboratório no capítulo seguinte.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados experimentais de *biospeckle* objetivo e subjetivo em 3.0 (três) espécimes botânicos, as simulações obtidas para ajustar os resultados de correlação de Pearson, além da aplicação do programa STMD (Speckle – THSP – MCO – Descritores) usado para calcular os descritores de textura de segunda ordem a partir de um volume de imagens obtidas pelo padrão de *speckle*. O programa STMD nos fornecerá valores de Momento de Inércia (MI) os quais estão diretamente relacionados à bioatividade das folhas de amoreira preta, erva-cidreira e hortelã da folha grossa investigadas nesta dissertação.

4.1 Metodologias: experimento e simulação

Exploramos o *speckle* subjetivo e o objetivo que são diferenciados pela presença ou não de elementos ópticos do tipo lente antes da câmera CCD, a qual capta as imagens do padrão formado pelos feixes espalhados pelas superfícies das amostras. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Preparação de Materiais (LPM) do Grupo de Fotônica e Fluidos Complexos (GFFC) do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas. Simulações computacionais, usando programa especificamente baseado na teoria de Akira Ishimura (1978), serão apresentadas como ajuste dos dados experimentais obtidos.

4.1.1 Procedimentos experimentais

Uma das vantagens de se usar a técnica do *speckle* laser reside na simplicidade experimental. Basicamente, precisamos de um laser, um dispositivo CCD (Charge-Coupled Device) de média resolução, itens ópticos do tipo lentes e espelhos, além de placa de aquisição de imagens e um computador.

Para este trabalho utilizamos um microcomputador com placa de aquisição de imagens, uma câmera CCD Fujitsu com resolução de 320x240 *pixels* um laser de diodo (532nm; cw; 80mW) com potência de saída ajustada em 10mW, filtro espacial (lente para expansão e diafragma para selecionar a parte central do feixe), espelhos para guiar os feixes até a amostra e, no caso do *speckle* subjetivo, um microscópio Zeiss modelo Stemi 2000c. Na tabela 2, mostramos de forma mais organizada os itens necessários aos arranjos experimentais e suas especificações.

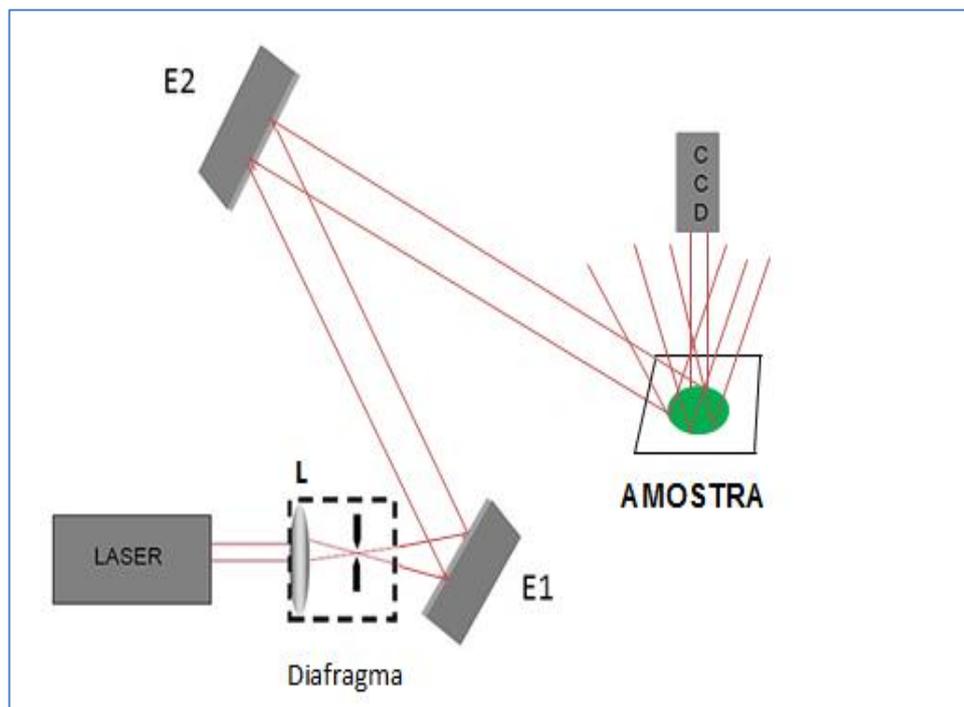
O procedimental experimental consistiu na incidência da luz laser sobre uma lente onde o feixe foi expandido, um diafragma foi usado para filtrar a parte central do feixe e assim conseguimos um padrão de intensidade mais homogêneo, espelhos foram usados para refletir e guiar esse feixe para incidir completamente sobre a superfície da amostra. Para os nossos estudos utilizamos a configuração experimental do *speckle* objetivo e subjetivo, anteriormente mostrado no capítulo 2 deste trabalho. Podemos ver na figura 15 o arranjo experimental usado na gravação do padrão do *speckle* objetivo, e na figura 16 o arranjo para o padrão do *speckle* subjetivo.

Tabela 2 - Especificações dos equipamentos utilizados.

Equipamentos	Especificações
Laser Izi – Laserline Ind. e Com. de Equip. Elet.	$\lambda = 532\text{nm}$ Potência: 0 - 80mW
Câmera CCD – Fujitsu	Resolução 8bits Taxa de aquisição: 4 – 30Hz
Microscópio – Zeiss – Stemi 2000c	Coluna: 260mm (1-1/4) Oculares: W-PL 10x/23
Formato dos vídeos	Avi
Formato das imagens	PNG (Portable Network Graphics)

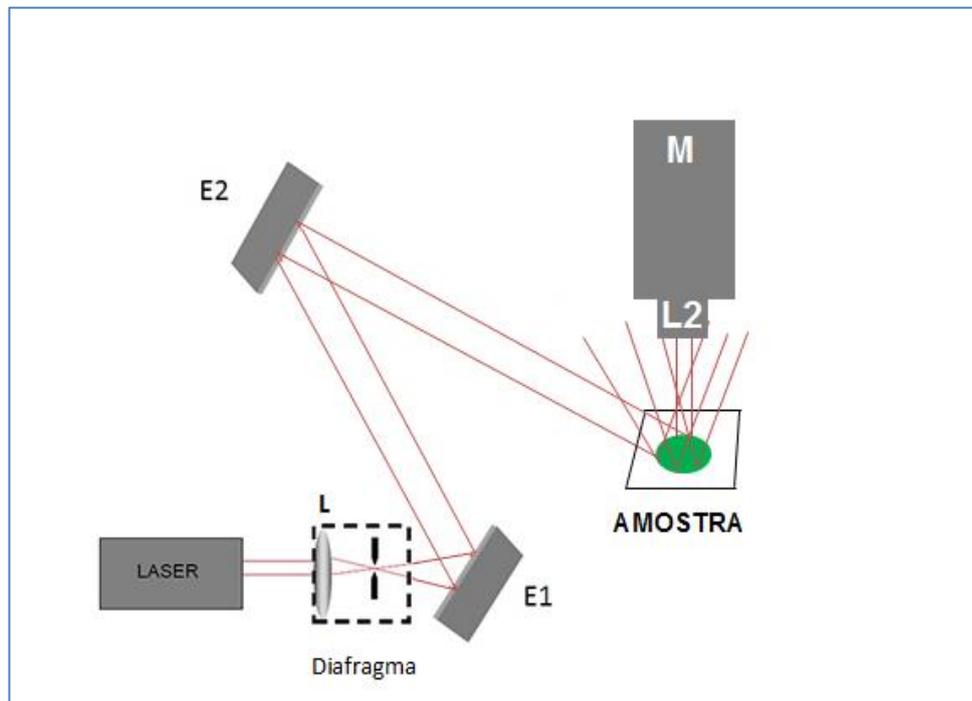
Os experimentos foram realizados nos espécimes botânicos *Morus nigra* (amoreira preta), *Melissa officinalis* (erva cidreira) e *Plectranthus ambonicus* (hortelã da folha grossa). Essas plantas não foram confinadas em estufa para controle de umidade, incidência solar ou tipo de solo usado, foram plantadas livremente em espaço aberto sob todas as intempéries climáticas de nossa região. Nosso objeto de análise foram as folhas dessas plantas.

Figura 15 - Aparato experimental para speckle objetivo evidenciando o laser de diodo em 532 nm, diafragma, espelhos E1 e E2, lente para expandir o feixe (L), feixes espalhados pela superfície da amostra e coleta por câmera CCD.



Fonte: Autor, 2014.

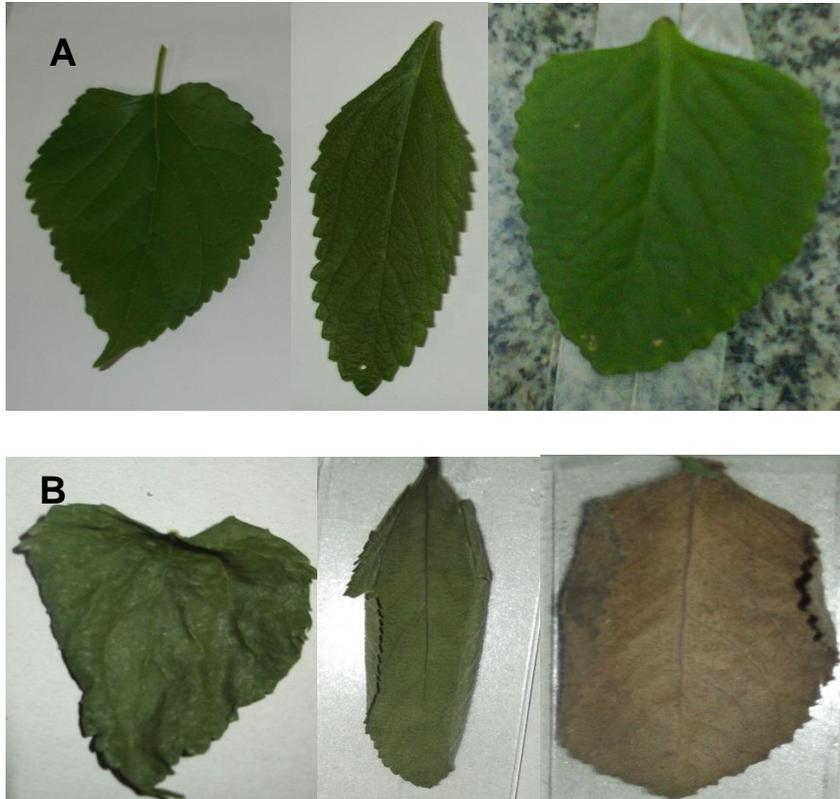
Figura 16 - Aparato experimental para Speckle subjetivo, evidenciando o jogo de lentes L2 e o microscópio (M).



Fonte: Autor, 2014.

Para os ensaios usamos as folhas nos seguintes estágios: folha recém-colhida, folha amarelada e folha seca. Realizamos pequenos filmes de 20 segundos nas folhas recém-colhidas e repetimos essa aquisição a cada hora até 24 horas após a colheita. Adquirimos vídeos curtos de 20 segundos e vídeos mais longos com duração de 5 minutos. Nas folhas amareladas e nas folhas secas, adquirimos apenas um vídeo curto de 20 segundos para comparar a magnitude do momento de inércia e do coeficiente de correlação de Pearson com os valores obtidos para as folhas recém-colhidas. Na figura 17 mostramos os estágios das folhas utilizadas.

Figura 17: Estágios das folhas investigadas (na sequência da esquerda para a direita: amoreira preta, erva-cidreira e hortelã da folha grossa). (A) Folhas recém-colhidas e (B) folhas secas naturalmente.



Fonte: Autor, 2014.

4.1.2 Programas usados na análise dos dados

Um dos programas utilizados foi o VirtualDub 1.9.11 (de livre acesso na Internet), ele foi usado para transformar os vídeos (avi) em imagens (PNG). Outra ferramenta utilizada foi o STMD (Speckle – THSP – MCO – Descritores) proposto por Lucena (2012). O objetivo dessa ferramenta é calcular os descritores de textura de segunda ordem a partir de um volume de imagens obtidas pelo padrão de *speckle*.

O sistema do STMD é baseado em quatro requisitos básicos (Lucena, 2012):

1. Carregar os *speckles* a partir de um diretório definido pelo usuário;

2. Criar uma THSP a partir do *speckle* carregado;
3. Construir a MCO a partir da THSP e normalizá-la;
4. Calcular os descritores de textura com base na MCO normalizada.

O programa STMD, a partir das imagens do padrão de *speckle*, nos fornece as matrizes THSP, MCO e os valores dos momentos de inércia (MI), dentre outros descritores de textura que não serão utilizados nesta dissertação.

Para as simulações, usamos programa desenvolvido por Pereira (2012) e baseado na teoria de Akira Ishimura para espalhamento de luz em superfície rugosa. Todas as simulações foram realizadas para ajustar os primeiros vinte segundos de dados nos gráficos de coeficiente de correlação de Pearson. Mantivemos fixo o ângulo de incidência da luz sobre a amostra e permitimos variações em parâmetros tais como a altura da rugosidade das folhas e os ângulos que formam o padrão interferométrico responsável pelo granulado óptico (*speckle*).

4.2 Resultados

Como foi referido na seção anterior, incidimos sobre o material botânico radiação no comprimento de onda de 532nm (região espectral do verde) com potência de saída de 10mW de um laser de diodo. O comprimento de onda de 532nm foi escolhido com o intuito de evitarmos absorção da radiação pela amostra e nos aproximarmos o máximo possível das condições usadas na teoria de Akira Ishimaru (Ishimaru, 1978). Toda a superfície das folhas foi exposta à radiação luminosa e fizemos o possível para não variarmos a forma e as dimensões do feixe permitindo, assim, a comparação dos resultados obtidos. A radiação coerente foi usada para obter o padrão de interferência que gera o *speckle*. Os vídeos curtos foram captados para posteriormente serem transformados em imagens para as futuras análises. Nas seções seguintes mostraremos os resultados obtidos experimentalmente e os métodos de análise usados.

4.2.1 Análise do padrão de *biospeckle* através de processamento de imagem digital

A partir das imagens do padrão de *biospeckle* objetivo e subjetivo, utilizamos a ferramenta STMD (Speckle – THSP – MCO – Descritores) proposto por Lucena (2012) para os cálculos da matriz de Co-ocorrência (MCO), da matriz THSP e do momento de inércia (MI). Após monitorar por 24 horas as folhas das plantas, foram processados os padrões de *biospeckle* e tabulados os valores de momento de inércia que estão dispostos na tabela 3. O momento de inércia está correlacionado com a atividade biológica. Uma análise semelhante usando o momento de inércia (MI) como parâmetro para avaliar a atividade biológica foi feita em 2009 por Oliveira e colaboradores em folhas de tomateiro para avaliar a presença de agrotóxicos nas folhas obtendo diferentes níveis de atividades. Existem alguns fatores que interferem no momento de inércia. Rabal (1998) afirmou ao analisar sementes de feijão que fatores como os níveis de umidade presentes nas sementes podem interferir na quantidade da atividade biológica estimada pelo MI. Quando se trata de espécimes botânicos, alguns fatores devem ser levados em consideração, tais como a perda de umidade da folha, o mecanismo de defesa que algumas espécies botânicas têm quando são retiradas das plantas originais para evitar a perda de umidade, dentre outros fatores. Na figura 18 e na figura 19 mostraremos as matrizes MCO e THSP que foram obtidas temporalmente através da técnica do *biospeckle* objetivo e subjetivo, respectivamente.

Tabela 3 - Valores do Momento de Inércia do padrão do biospeckle objetivo e subjetivo

Speckle Objetivo				Speckle Subjetivo		
Tempo	Amora	Cidreira	Hortelã	Amora	Cidreira	Hortelã
0h	1551,967	1422,009	1653,133	210,837	205,607	425,477
1h	1048,618	437,110	934,636	237,826	237,357	337,858
2h	1634,537	517,238	878,309	218,496	206,518	564,545
3h	1062,910	368,155	701,470	204,826	235,035	341,336
4h	958,279	427,647	997,150	234,637	241,466	385,501
5h	1006,815	361,332	850,267	308,857	251,067	397,589
6h	842,506	454,275	836,860	200,63	229,597	280,149
7h	898,987	318,304	696,815	274,08	257,763	400,208
8h	192,838	75,699	223,347	200,702	246,627	436,419
9h	172,003	81,386	278,131	201,09	241,228	451,144
10h	163,784	80,648	275,796	203,017	238,015	418,090
24h	753,425	2211,688	1973,000	240,441	234,167	515,232

Fonte: Autor, 2014.

Figura 18 – Matrizes THSP e MCO das plantas obtidas através do *biospeckle* objetivo

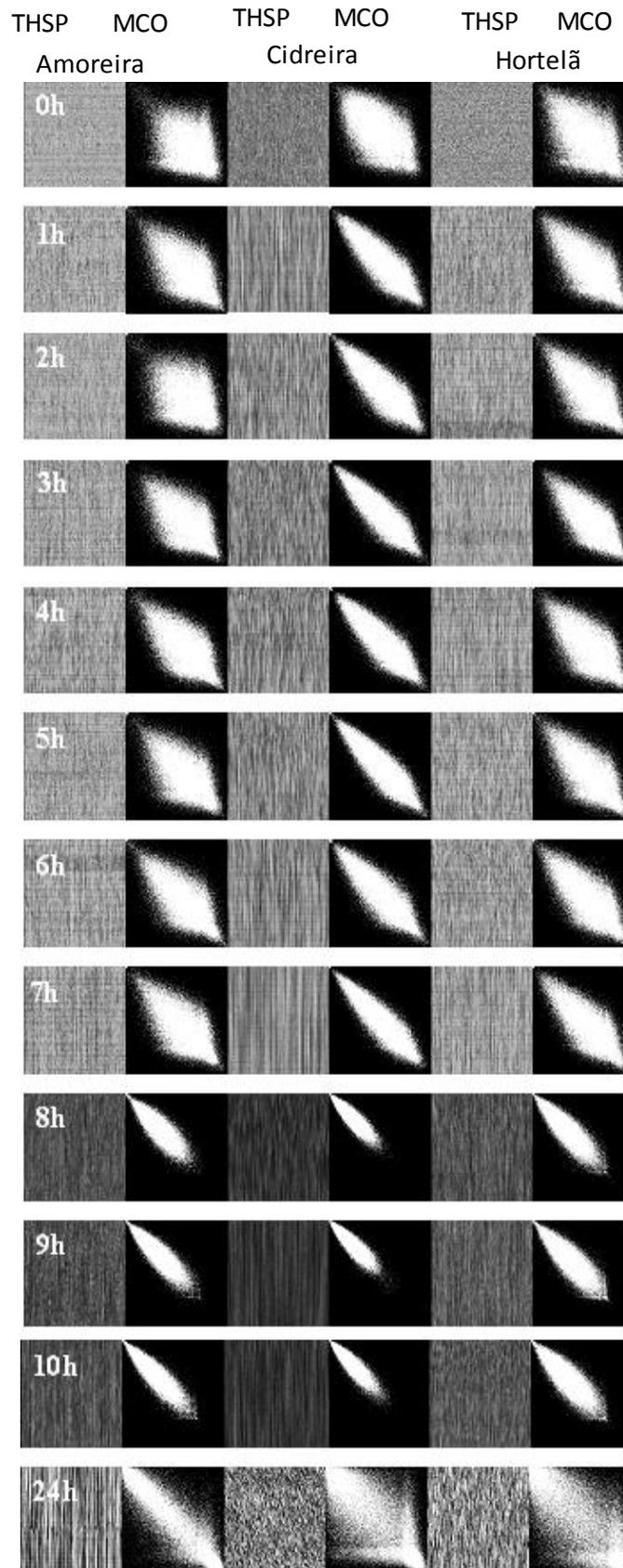
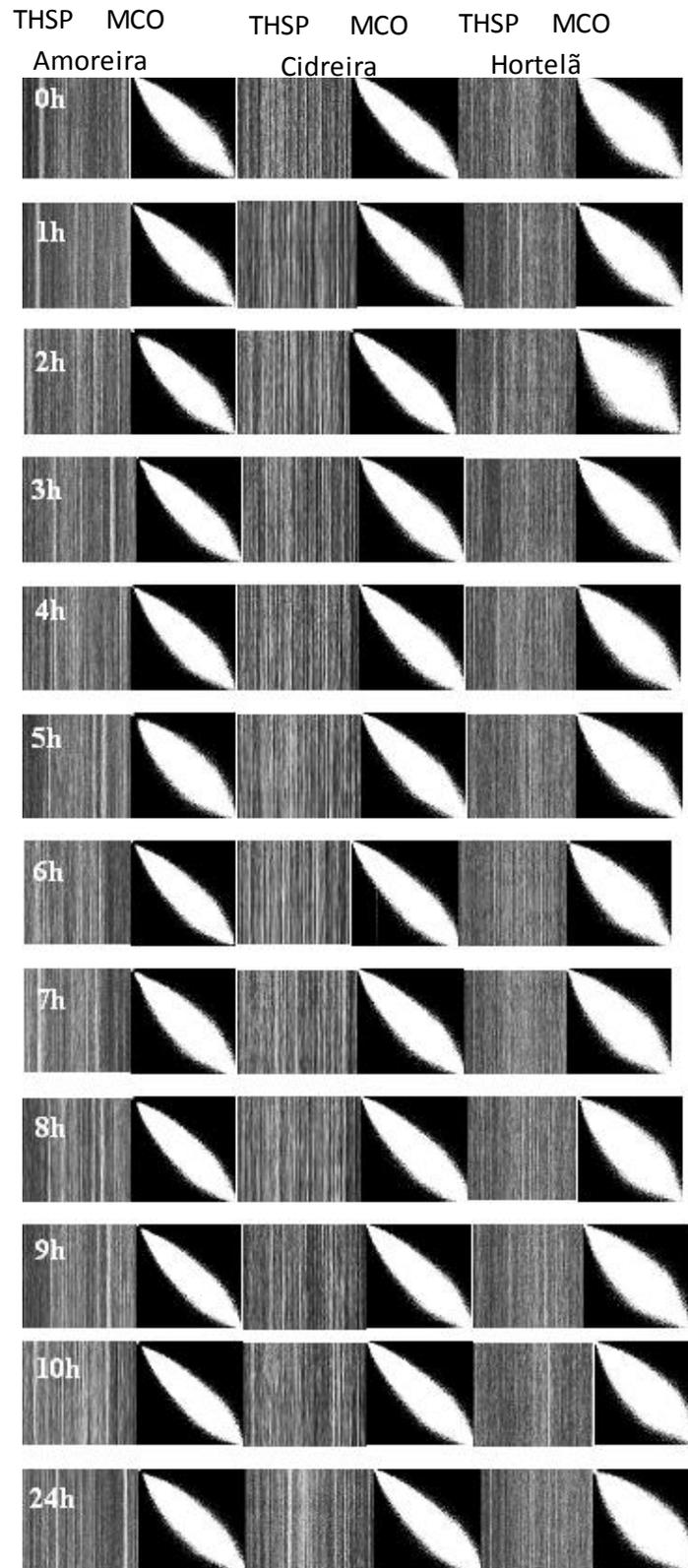


Figura 19 – matrizes THSP e MCO das plantas obtidas através do *biospeckle* subjetivo.

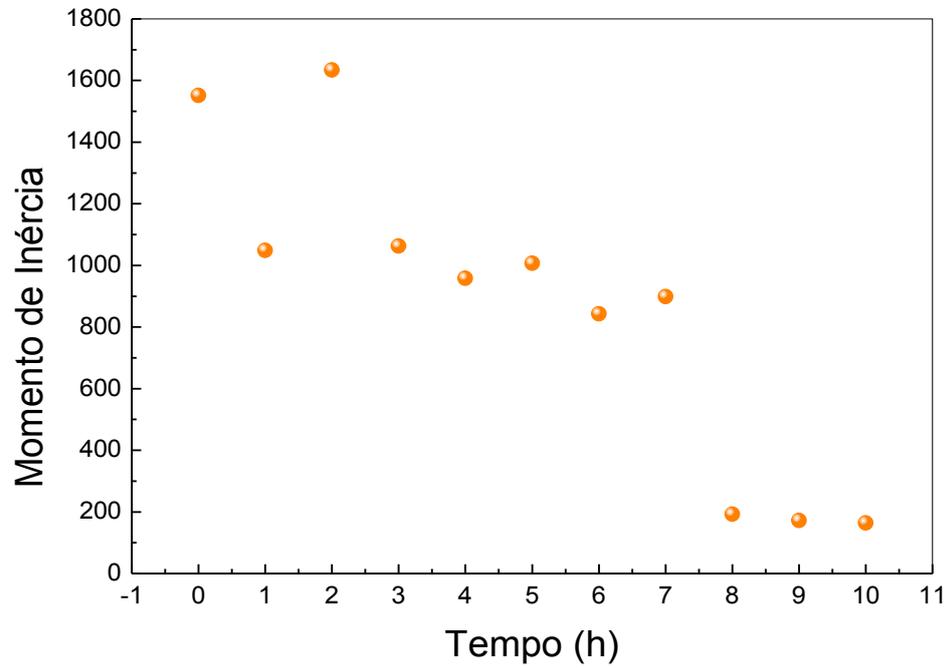


Quanto mais espalhados estiverem os resultados com relação à diagonal, maior será o valor de MI e conseqüentemente a bioatividade dessas folhas.

As figuras 20, 21 e 22 apresentam a dispersão das intensidades em torno da diagonal principal da matriz MCO feito a partir de uma quantidade de imagens coletadas ao longo de 10 horas obtidas a partir da técnica de *biospeckle* objetivo para as folhas da *Morus nigra*, *Melissa officinalis* e *Plectranthus amboinicus*, respectivamente. Para gerar as matrizes escolhemos imagens nos intervalos de uma em uma hora durante as 10 horas. Com uma hora de monitoramento fizemos um vídeo de 20 segundos, desse vídeo coletamos 350 imagens, e assim sucessivamente até o final das 10 horas. Observamos que ao fazer a análise de vídeos curtos havia atividade biológica, observando um declínio nos valores.

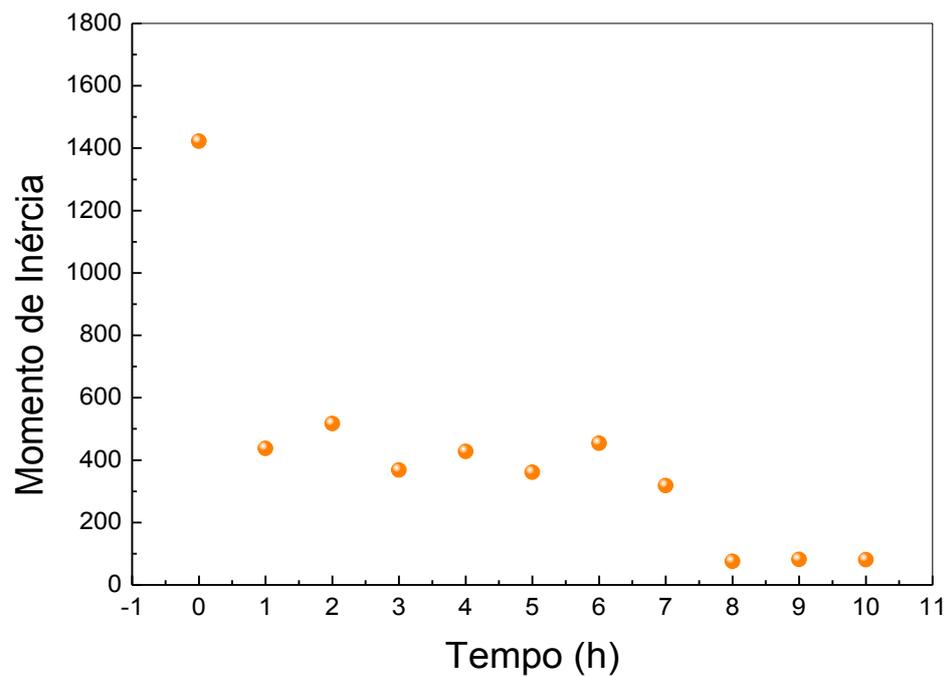
Segundo Arizaga et al (1999) foi observado que o momento de inércia atingia valores mais altos para amostras de material biológico vivos e baixos valores para um material biológico morto, concordando com nossos resultados. Nas figuras 20, 21 e 22 podemos observar temporalmente que há uma redução na dispersão das intensidades em torno da diagonal principal na MCO, estando coerente com os dados de MI da figura 18 até 10h. Percebemos na figura 20 que houve uma constância nos dados obtidos a partir de 8h de investigação, mostrando a perda de bioatividade nesse intervalo de tempo.

Figura 20 - Comportamento apresentado pelo momento de inércia. *Biospeckle* objetivo (*Morus nigra*).



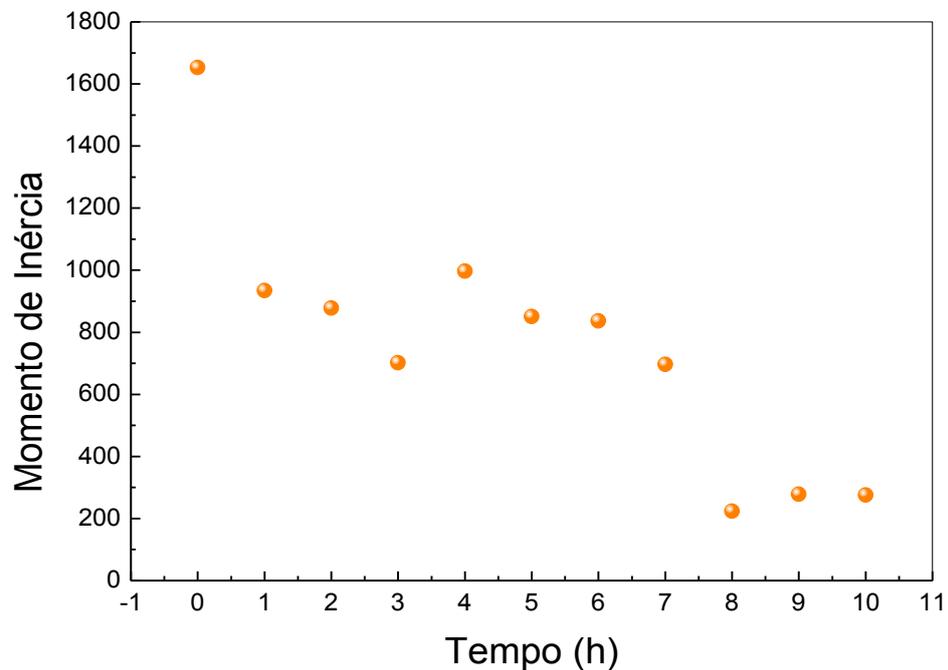
Fonte: Autor, 2014.

Figura 21 - Comportamento apresentado pelo momento de inércia. *Biospeckle* objetivo (*Melissa Officinalis*).



Fonte: Autor, 2014.

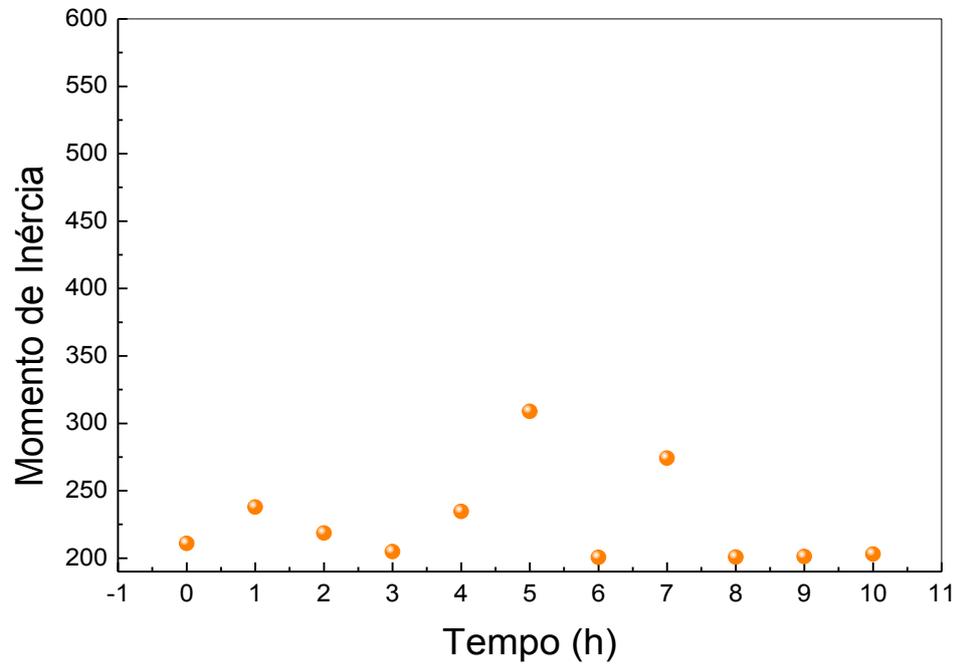
Figura 22 - Comportamento apresentado pelo momento de inércia. *Biospeckle* objetivo (*Plectranthus amboinicus*).



Fonte: Autor, 2014.

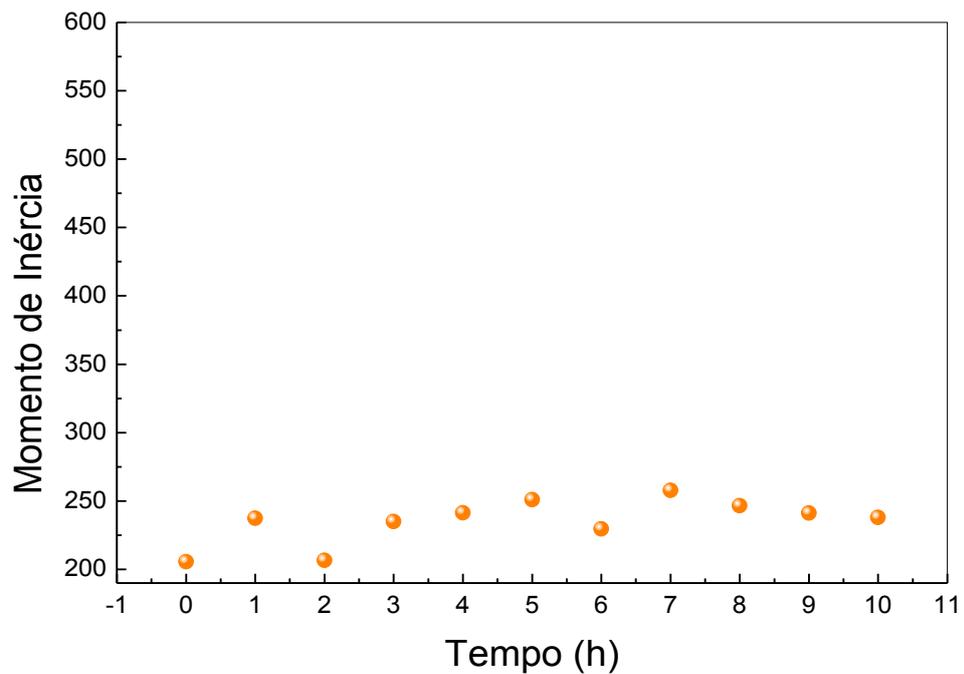
Faremos uma análise das imagens obtidas da técnica de *biospeckle* subjetivo para as folhas da *Morus nigra*, *Melissa officinalis* e *Plectranthus amboinicus*. Para o *biospeckle* subjetivo percebemos que o sistema de lentes do microscópio estava saturando as imagens capturadas pela CCD. Sendo assim, os resultados obtidos por essa técnica não estão de acordo com os obtidos com o *biospeckle* objetivo. As figuras 23, 24 e 25 apresentam a dispersão das intensidades em torno da diagonal principal da matriz MCO feita a partir de uma quantidade de imagens coletadas ao longo de 10 horas obtidas a partir da técnica do *biospeckle* subjetivo para os espécimes botânicos. Como podemos perceber, não há uma regularidade, um comportamento dominante nos gráficos apresentados. A partir da tabela 3, percebemos uma variação mínima nos valores obtidos para o *biospeckle* subjetivo mostrando uma possível saturação e, com isso, justificando a irregularidade no comportamento dos gráficos das figuras 23 a 25.

Figura 23 - Comportamento apresentado no momento de inércia. Biospeckle subjetivo (*Morus nigra*).



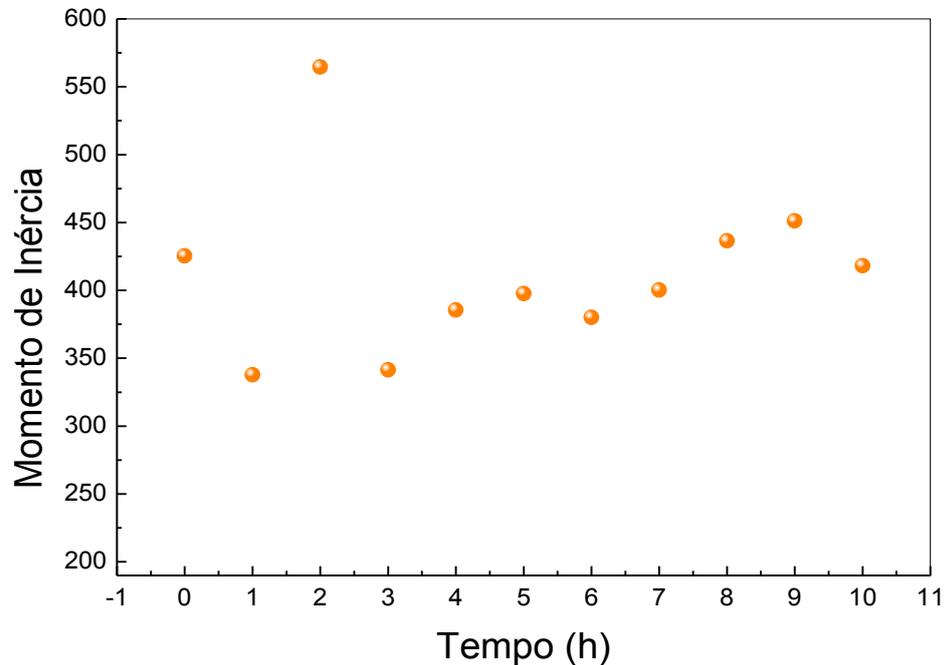
Fonte: Autor, 2014.

Figura 24 - Comportamento apresentado no momento de inércia. Biospeckle subjetivo (*Melissa Officinalis*).



Fonte: Autor, 2014.

Figura 25 - Comportamento apresentado no momento de inércia. *Biospeckle* subjetivo (*Plectranthus amboinicus*).



Fonte: Autor, 2014.

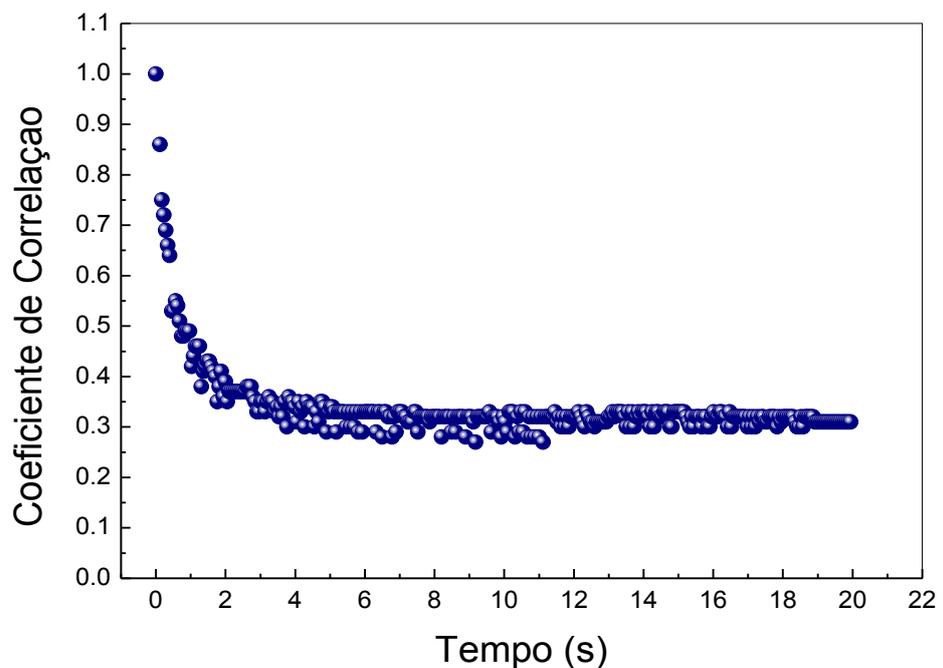
Como, no *speckle* subjetivo, existem lentes que focalizam a luz espalhada pela amostra na câmera CCD, o sinal coletado é mais intenso justificando a saturação.

4.2.2 Análise do padrão de *biospeckle* através do coeficiente de correlação de Pearson

Para investigar o comportamento do coeficiente de correlação de Pearson para os padrões de *biospeckle* obtidos temporalmente, foi utilizado o mesmo procedimento de gravação de imagens descrito na seção anterior. Os valores do coeficiente de correlação foram calculados para os intervalos de tempo de uma em uma hora durante 10 horas. As figuras 26, 27 e 28 mostram o coeficiente de correlação de Pearson em função do tempo para os primeiros 20s de colheita das folhas. Percebemos grande atividade biológica, para todos os espécimes botânicos

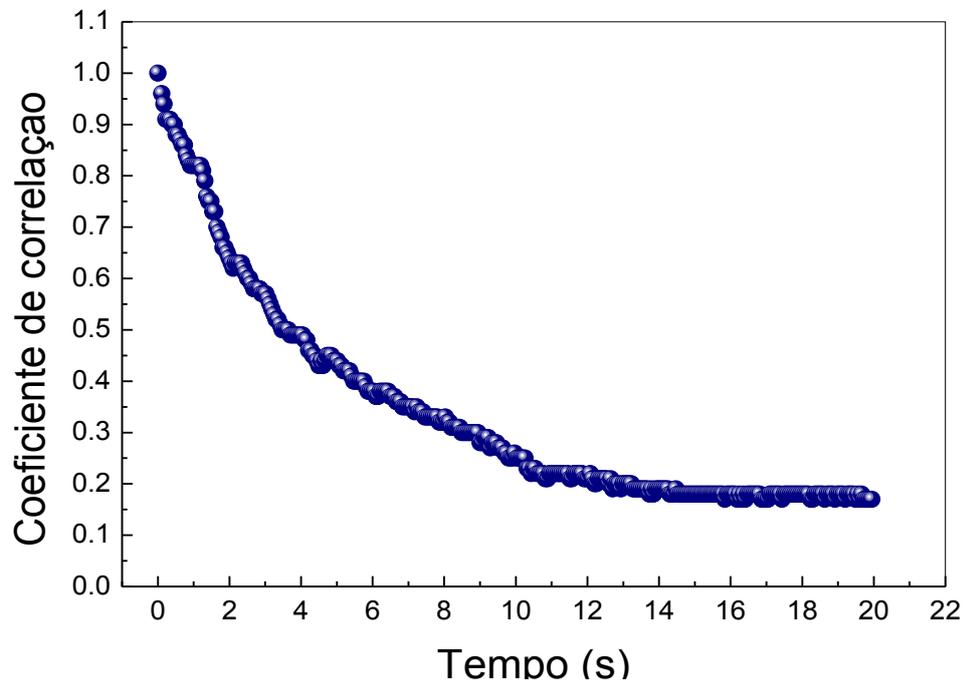
investigados nesse intervalo de tempo. Nas figuras 29, 30 e 31 é apresentada a evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson no intervalo de 0 a 10 horas para a *Morus nigra*, *Melissa officinalis* e *Plectranthus amboinicus*. Em cada um desses gráficos foi omitido o ponto experimental para 0h para melhor visualizarmos o comportamento para tempos longos de colheita. Isso não compromete a apresentação dos resultados, visto que as figuras 26, 27 e 28 exploram os primeiros momentos de atividade biológica. Os resultados mostrados foram obtidos experimentalmente através de *biospeckle* objetivo.

Figura 26 – Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (*Morus nigra*).



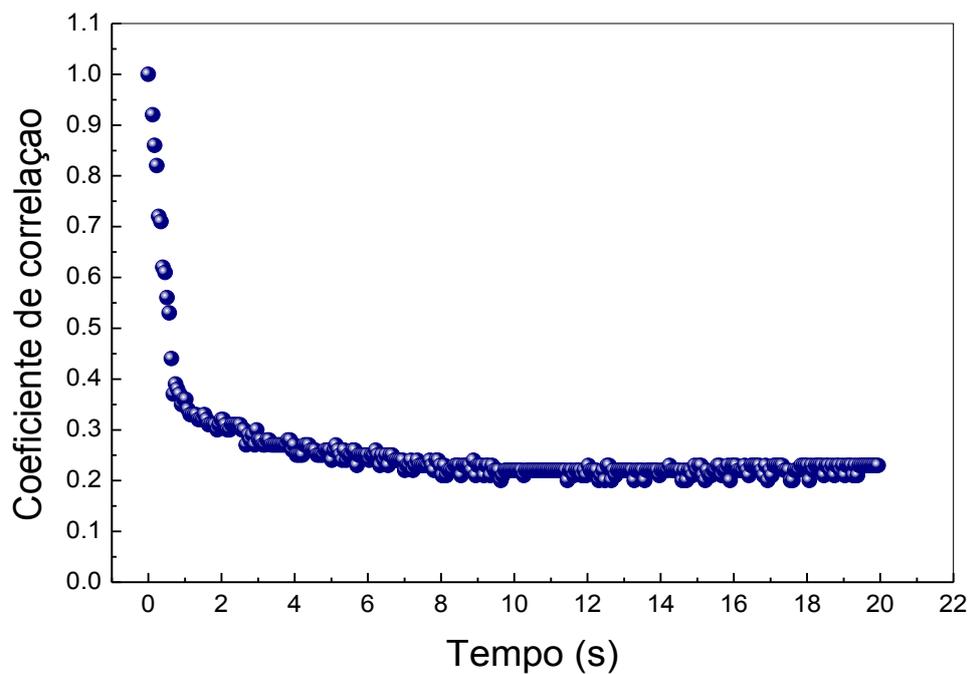
Fonte: Autor, 2014.

Figura 27 – Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (*Melissa officinalis*).



Fonte: Autor, 2014.

Figura 28 – Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (*Plectranthus amboinicus*).



Fonte: Autor, 2014.

Como podemos perceber na figura 26 o coeficiente de correlação de Pearson tem um comportamento de uma exponencial decrescente com queda acentuada nos primeiros $t = 5$ segundos. Depois desta queda inicial ele decresce muito lentamente. Isso significa que os padrões do biospeckle gerados em $t > 5$ segundos não se modificam de forma significativa ao longo do tempo restante do experimento. Este comportamento mostra-se coerente com a figura 29 que nos mostra o coeficiente de correlação para t variando até 10 horas.

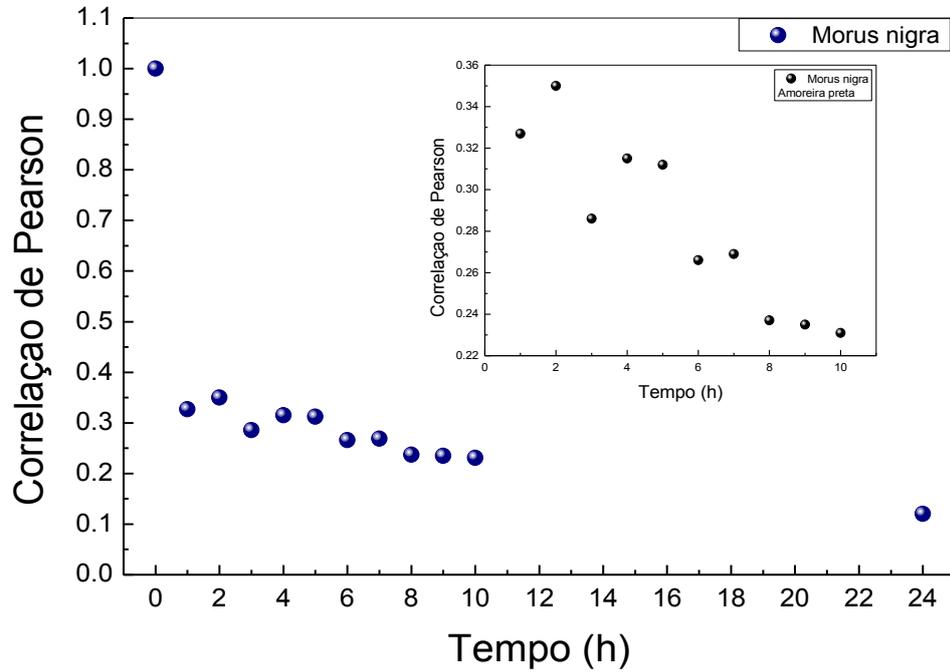
Na figura 27 o comportamento do coeficiente de correlação tem uma queda acentuada até aproximadamente $t = 15$ segundos e se manteve praticamente constante no tempo restante.

O comportamento do coeficiente de correlação de Pearson mostrado na figura 28 é semelhante ao comportamento mostrado na figura 26. Observou-se uma queda em aproximadamente $t = 10$ segundos, após esse tempo os valores do coeficiente de correlação tornam-se praticamente constantes.

Para a investigação de 10 horas, na figura 29, observou-se que o comportamento para o coeficiente de correlação sofreu uma variação do primeiro ponto com relação ao último mostrando, ainda, um decaimento. No gráfico não colocamos o primeiro ponto, que é a correlação da primeira imagem com ela mesma. Como as imagens são iguais o coeficiente de correlação será igual a um, o que não significa atividade, isso ocorre também para as figuras 30 e 31.

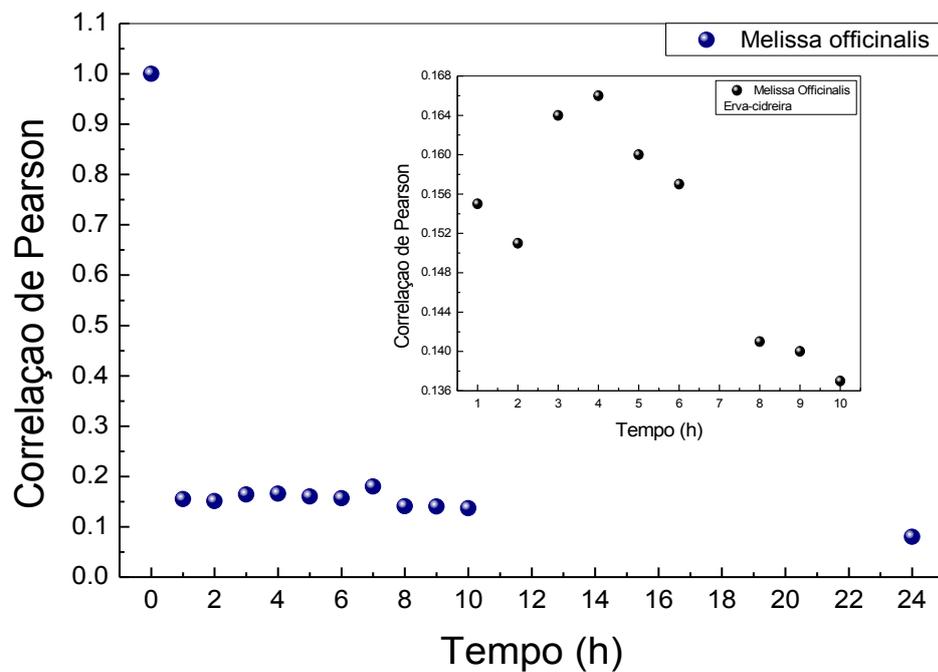
Como podemos observar na figura 30 o coeficiente de correlação ficou constante em torno do valor 0,16 entre 1 e 10 horas. Nas figuras que mostram o comportamento do coeficiente de correlação até 10 horas, não levamos em consideração o primeiro ponto da correlação que seria igual a um. Como o coeficiente de correlação de Pearson é obtido temporalmente a partir de imagens capturadas através de padrões de *biospeckle*, após certo intervalo de tempo, com a atividade praticamente nula, os coeficientes de correlação tendem a uma constante.

Figura 29 – Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (*Morus nigra*). Em detalhe comportamento de 1 a 10 horas.



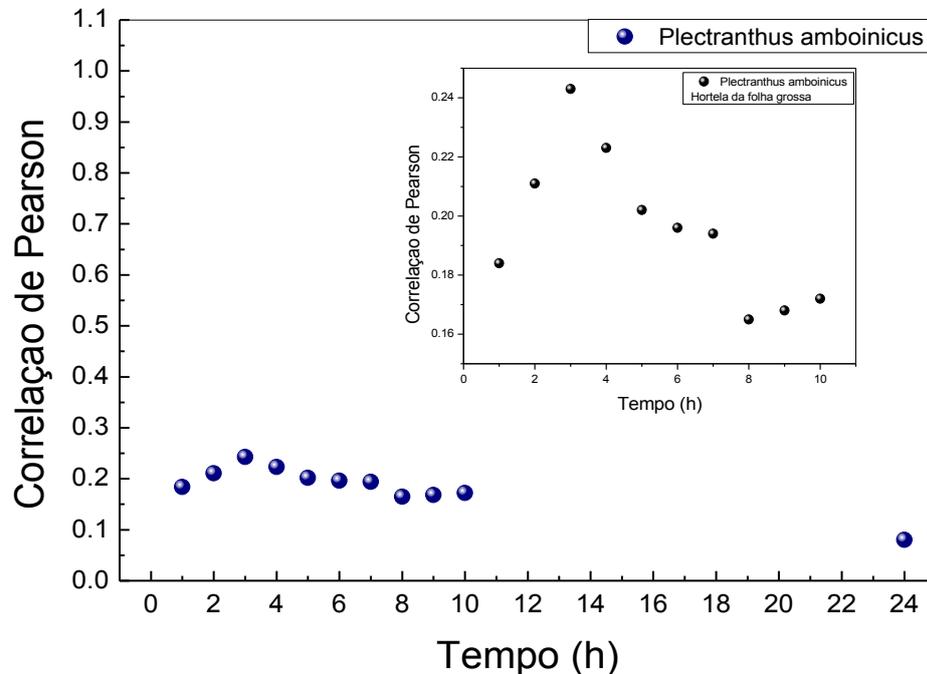
Fonte: Autor, 2014.

Figura 30 – Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (*Melissa officinalis*). Em detalhe comportamento de 1 a 10 horas.



Fonte: Autor, 2014.

Figura 31 – Evolução temporal do coeficiente de correlação de Pearson obtido experimentalmente (*Plectranthus amboinicus*). Em detalhe comportamento de 1 a 10 horas.



Fonte: Autor, 2014.

Para os valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir de padrões de *biospckle* capturados por imagens da folha da *Plectranthus amboinicus*, mostrados na figura 31, observamos uma queda sutil do primeiro ponto com relação ao último. As maiores variações no coeficiente de correlação ocorreram nas folhas da amoreira preta (*Morus nigra*) e da hortelã da folha grossa (*Plectranthus amboinicus*), corroborando com a variação dos valores do MI na tabela 18 para esses dois espécimes botânicos. O que nos leva a intuir que esses espécimes têm uma maior bioatividade. Tanto na figura 30 quanto na tabela 3, percebemos que as variações de MI e coeficiente de correlação, apresentam menores valores para a erva-cidreira (*Melissa officinalis*), observando sua menor bioatividade.

Esses comportamentos mostrados para o coeficiente de correlação de Pearson para os espécimes botânicos podem ser explicados pelo fato das folhas recém-colhidas estarem em um processo de degradação devido à perda da

atividade biológica, uma vez que o vínculo da folha com a planta foi perdido. Assim que colhemos as folhas, sua atividade biológica começa a diminuir rapidamente.

4.3 Simulações

Para simular o espalhamento na superfície da folha, foi adotada uma constante dielétrica aproximadamente igual a da água, em torno de 70 (Pereira, 2012). A simulação foi feita para produzir padrões de *biospeckle* objetivo.

As figuras 32, 33 e 34 mostram os gráficos do coeficiente de correlação de Pearson em função do tempo para t variando de 0 a 20 segundos. As curvas simuladas foram obtidas através das discussões apresentadas no capítulo três. Para cada espécime botânico fizemos ajustes nos parâmetros livres para obter um resultado teórico mais próximo do experimental.

Figura 32 – Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente obtido através de simulação (*Morus nigra*)

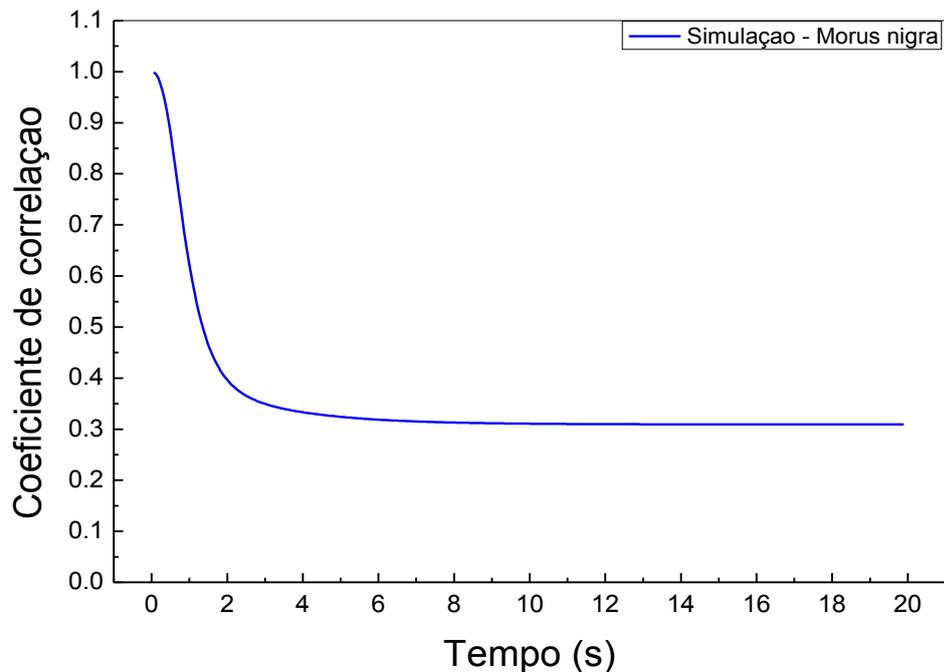
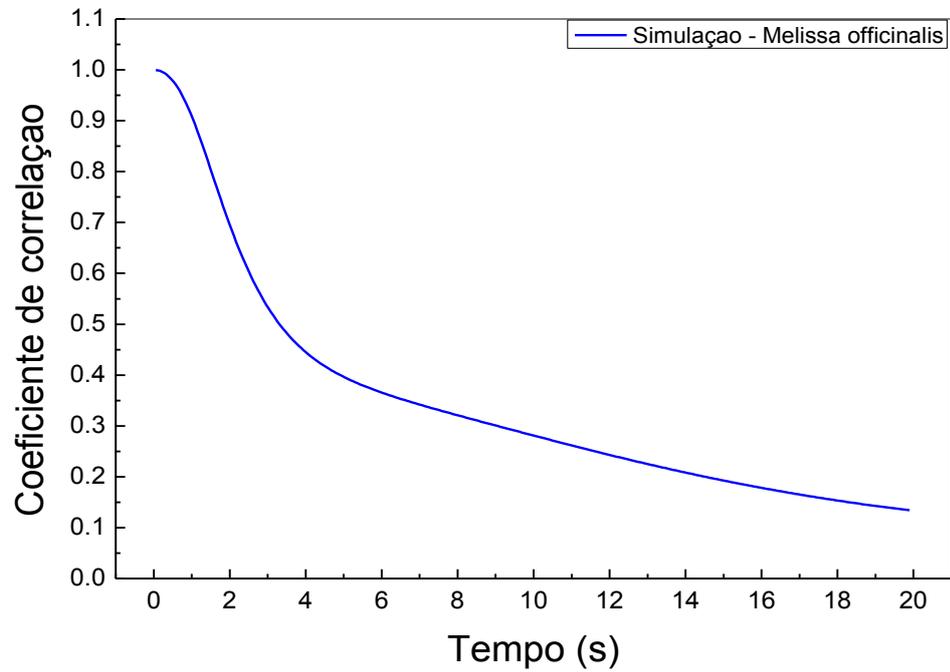
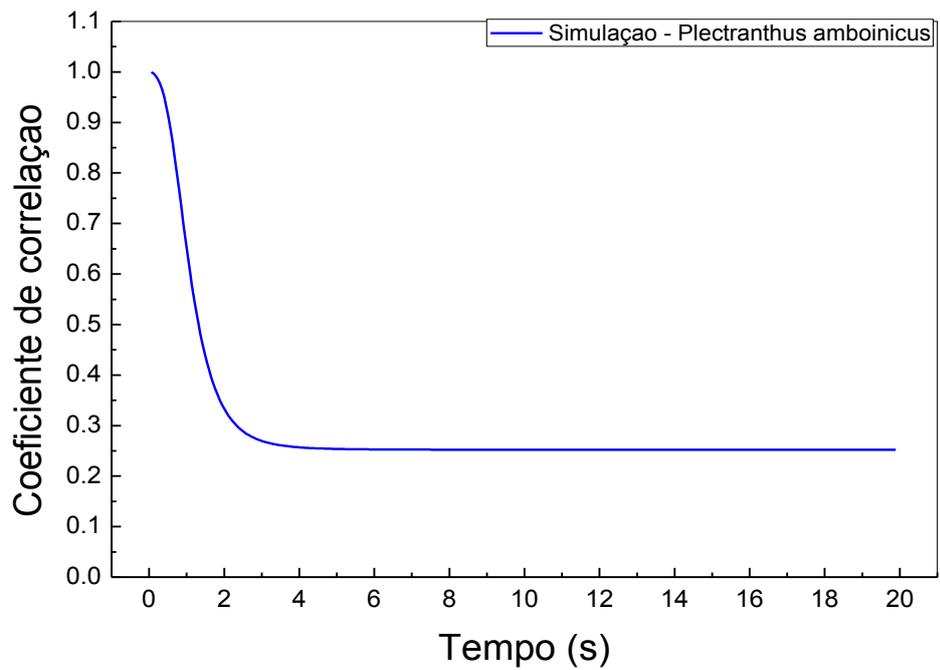


Figura 33 – Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente obtido através de simulação (*Melissa officinalis*)



Fonte: Autor, 2014

Figura 34 – Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente obtido através de simulação (*Plectranthus amboinicus*)

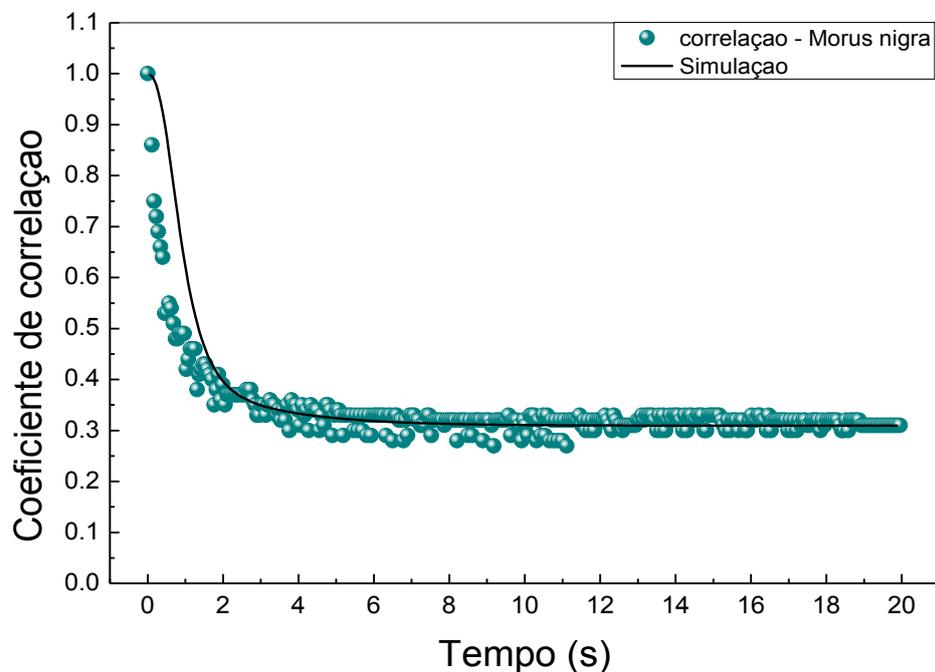


Fonte: Autor, 2014

Em todas as simulações mantivemos constante o ângulo de incidência de 50 graus (Θ_i) e variamos um pouco os valores dos passos de variação dos ângulos dos feixes espalhados que formam o padrão de speckle (θ e φ), já que esses ângulos mudam à medida que a rugosidade das folhas varia. Outro termo que variamos nas simulações foi a constante multiplicativa (presente na equação 3.3.15 no capítulo 3) que é proporcional à variação das alturas das rugosidades.

Na figura 35 mostramos as duas curvas do coeficiente de correlação em função do tempo obtidas para a folha da *Morus nigra*. Os símbolos foram obtidos experimentalmente e a curva preta contínua é o resultado da simulação. Usamos $\Theta_i = 50^\circ$, passos para a variação dos ângulos θ e φ de 0,10 e constante multiplicativa igual a 2,0.

Figura 35 – Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente. Os símbolos foram obtidos experimentalmente e a curva contínua através de simulação (*Morus nigra*).

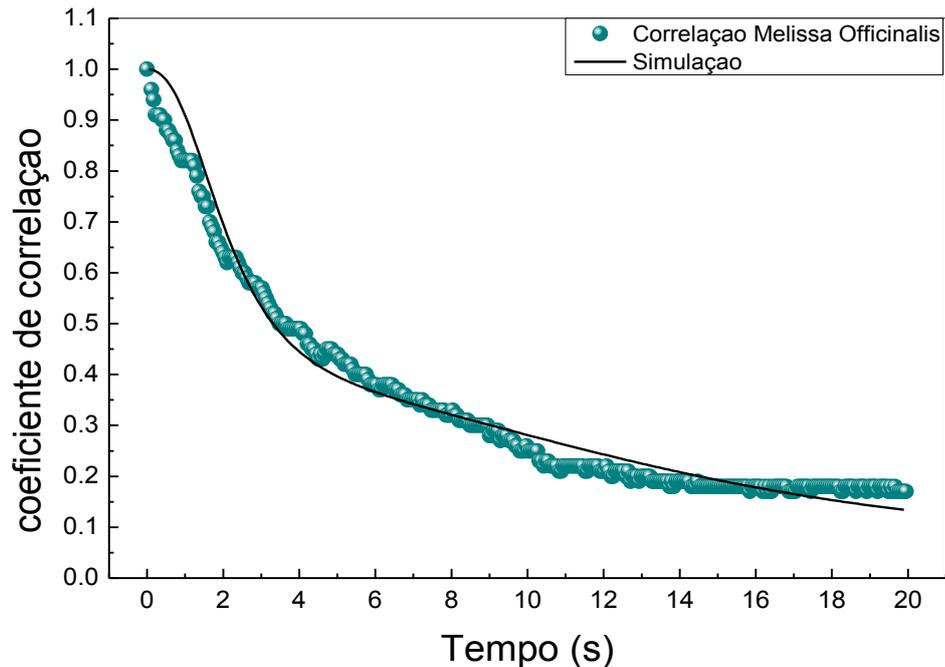


Fonte: Autor, 2014.

Para a folha da *Melissa officinalis*, a figura 36 mostra os resultados do coeficiente de correlação obtidos experimentalmente e através de simulação em

função do tempo. Usamos $\Theta_i = 50^\circ$, passos para a variação dos ângulos θ e φ de 0,085 e constante multiplicativa igual a 1,0.

Figura 36 – Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente. Os símbolos foram obtidos experimentalmente e a curva contínua através de simulação (*Melissa officinalis*)

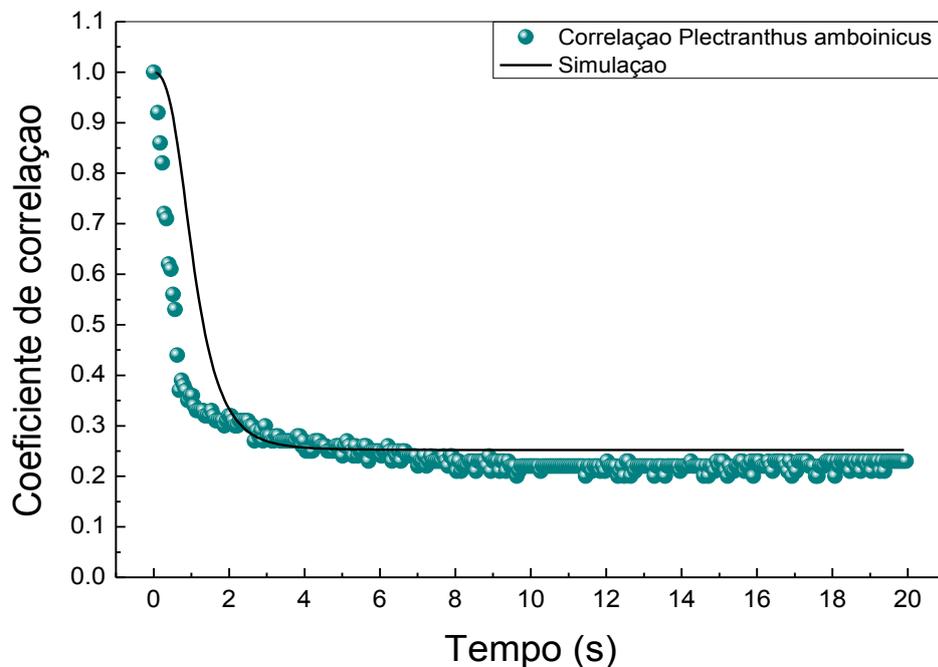


Fonte: Autor, 2014.

Na figura 37 apresentamos o coeficiente de correlação evoluindo temporalmente para o espécime botânico *Plectranthus amboinicus*, onde são mostrados os pontos obtidos experimentalmente e a simulação baseada na teoria de Akira Ishimaru. Novamente, há uma concordância muito boa entre experimento e simulação teórica. Esses resultados corroboram com o fato de que, mesmo com o mesmo ângulo de incidência de luz ($\Theta_i = 50^\circ$) sobre as amostras, variações têm que ser levadas em conta quando investigamos superfícies com rugosidades distintas. Esses fatores mostram que o padrão interferométrico formado e captado pela CCD tem dependência direta com o espalhamento sofrido pela luz ao incidir em superfície rugosa. Usamos $\Theta_i = 50^\circ$, passos para a variação dos ângulos θ e φ de 0,12 e constante multiplicativa igual a 1,3.

À medida que diminuimos os passos para a variação dos ângulos θ e φ , estamos melhorando a qualidade da imagem do *speckle* captada pela CCD e, aumentando a constante multiplicativa, estamos afirmando que a variação de rugosidade é maior naquele espécime. Comparando com as análises para a *Morus nigra* e a *Plectranthus amboinicus*, vemos que uma maior variação das alturas das rugosidades, coincide com uma maior bioatividade.

Figura 37 – Coeficiente de correlação de Pearson variando temporalmente. Os símbolos foram obtidos experimentalmente e a curva contínua através de simulação (*Plectranthus amboinicus*)



Fonte: Autor, 2014.

A boa concordância entre experimento e simulação para todos os resultados apresentados neste capítulo, nos faz ver que acertamos ao escolher um comprimento de onda da luz incidente que interaja o mínimo possível com o meio investigado. Observamos um espalhamento de luz mais eficaz, já que não houve absorção de luz pelas superfícies dos espécimes botânicos.

Nos resultados apresentados na tabela 3 e nas figuras 18, 20, 21 e 22 comprovamos que a técnica interferométrica *speckle* (ou *biospeckle*) permite medir a atividade biológica de folhas colhidas de uma planta mãe e acompanhar seu comportamento temporalmente.

No próximo capítulo teceremos algumas conclusões sobre os resultados apresentados nesta dissertação.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi investigada a atividade biológica em espécimes botânicos através da técnica do *biospeckle*, em que padrões de interferência trazem informações sobre a superfície do material em estudo.

Em nosso trabalho o aparato experimental foi configurado para que houvesse reflexão do feixe laser. A investigação foi feita a partir da comparação de padrões de *biospeckle* gerados por uma câmera (CCD) em diferentes instantes de tempo originados do espalhamento coerente de luz laser em 532 nm, a partir de folhas dos espécimes botânicos *Morus nigra*, *Melissa officinalis* e *Plectranthus amboinicus*. Para analisar os dados, utilizamos métodos de processamento de imagem digital, como as matrizes THSP e MCO e a dispersão dos pontos em torno da diagonal principal da MCO usando o momento de inércia (MI). Analisando o grau de similaridade das imagens ao longo do tempo, fizemos uso do coeficiente de correlação de Pearson.

No monitoramento das folhas durante 10 horas, constatamos atividade biológica através da técnica do *biospeckle* objetivo. O que não foi possível detectar usando os resultados obtidos por meio do *biospeckle* subjetivo, em virtude do conjunto de lentes presente no microscópio usado saturar as imagens capturadas pela CCD. No caso do *biospeckle* subjetivo, podemos observar nas imagens das matrizes MCO (Figura 19) que a dispersão das intensidades em torno da diagonal principal tem um comportamento praticamente constante ao longo do tempo para os espécimes botânicos estudados. Portanto, como o momento de inércia é uma ferramenta para quantificar a medida de dispersão dos pontos em torno da diagonal principal da MCO, os resultados obtidos do MI não estão coerentes para comparação com os obtidos no *biospeckle* objetivo. Assim, tornou-se inviável o uso do microscópio na técnica do *biospeckle* subjetivo sem a devida diminuição da potência do feixe incidente nas amostras.

Nos resultados obtidos através do *biospeckle* objetivo, observamos nas figuras da MCO, variação ao longo do tempo na dispersão das intensidades na diagonal principal (Figura 18), que nos indica atividade biológica nas folhas. Os

valores do MI mostram um comportamento decrescente indicando uma degradação das folhas.

Para o coeficiente de correlação de Pearson foi investigada a correlação das imagens em função do tempo, geradas a partir dos padrões de *biospeckle* sobre uma superfície rugosa para determinação de atividade biológica. Foram obtidos resultados experimentais e simulações computacionais.

Nos resultados experimentais do coeficiente de correlação, determinamos a partir das imagens a comparação dos padrões de interferência gerados temporalmente. Assim percebemos que há uma rápida queda para $t < 20$ segundos, e após essa queda os valores do coeficiente de correlação variam muito lentamente ficando praticamente constantes ao fim das 24 horas.

O estudo teórico usado para a obtenção do coeficiente de correlação foi realizado com base na teoria de espalhamento de luz, usando o método de perturbação de primeira ordem para encontrarmos a seção de choque da radiação espalhada por superfície rugosa. A priori, nesta dissertação apresentamos apenas os cálculos usados para gerar o coeficiente de correlação, simulado com base na teoria proposta por Ishimaru (1978) e usada por Pereira (2012). Sendo assim, o coeficiente de correlação foi calculado para diferentes distribuições de luz em diferentes instantes.

Nos resultados simulados temporalmente para coeficiente de correlação, observou-se um comportamento exponencial decrescente em concordância com os resultados experimentais, haja vista que as curvas de simulação se ajustaram muito bem aos dados experimentais nas figuras 32, 33 e 34. Para cada espécime botânico usamos parâmetros livres diferentes, mas sempre com a preocupação de manter a simulação o mais próximo possível ao que desenvolvemos em laboratório.

Concluindo, as investigações de *biospeckle* contribuíram no estudo de espécimes botânicos, monitorando sua atividade biológica e mostrando resultados satisfatórios.

Como perspectivas futuras podemos citar a aplicação experimental da técnica *biospeckle* subjetivo em meios espalhadores, utilizando apenas uma lente colocada entre a superfície espalhadora e o plano de observação, controle da potência da luz

incidente sobre a amostra e o uso de uma câmera CCD mais rápida e com um maior número de imagens por segundo. Outros meios biológicos podem ser investigados, assim como, folhas de plantas *in vivo*. Utilizar outros métodos de análise como o Fujji e o Lasca, dentre outros. Fazer um estudo comparativo sobre a composição química de cada folha em diversos tempos de colheita, com o intuito de observar o que se modifica ao passo em que ocorre sua degradação. Acrescentar termos à expressão do coeficiente de correlação (simulação), tomando como base um *biospeckle* subjetivo considerando uma lente entre o meio estudado e o observador e aumentando o intervalo temporal da simulação.

REFERÊNCIAS

ALLAHVERDIYEV, A.; DURAN, N.; OZGUVEN, M.; KOLTAS, S. **ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE VOLATILE OILS OF MELISSA OFFICINALIS L. AGAINST HERPEX SIMPEX VIRUS TYPE-2**. PHYTOMEDICINE, 11: 657-661, 2004.

ANDALLU, B; VARADACJARYULU, N. **ANTIOXIDANT ROLE OF MULBERRY (MORUS INDICA L. CV. ANANTHA) LEAVES IN STREPTOZOTICIN-DIABETIC RATS**. CLINICA CHIMICA ACTA, V. 338, P. 3- 10,2003.

ARIZAGA R, TRIVI M, RABAL H. **SPECKLE TIME EVOLUTION CHARACTERIZATION BY THE CO-OCCURRENCE MATRIX ANALYSIS**. OPTICS & LASER TECHNOLOGY. 1999;31:163-170.

ARIZAGA, R. ET. AL. **DISPLAY OF THE LOCAL ACTIVITY USING DYNAMICAL SPECKLE PATTERNS**. OPTICAL ENGINEERING. REDONDO BECH. V. 41, N.2, P. 287-294, 2002.

ASAKURA, T., TAKAI, N. **DYNAMIC LASER SPECKLES AND THEIR APPLICATION TO VELOCITY MEASUREMENTS OF THE DIFUSE OBJECT**. JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, V. 25, P. 179-194, 1981.

BACKES, P; IRGANG, B. **ÁRVORES CULTIVADAS NO SUL DO BRASIL: GUIA DE IDENTIFICAÇÃO E INTERESSE PAISAGÍSTICO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES EXÓTICAS**. PORTO ALEGRE: PAISAGEM DO SUL, 2004. 205P.

BOLKENT, S.; YANARDAG, R.; KARABULUT-BULAN, O.; YESILYAPRAK, B. **PROTECTIVE ROLE OF MELISSA OFFICINALIS L. EXTRACT ON THE LIVER OF HYPERLIPIDEMIC RATS: A MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDY**. J ETHNOPHARMACOL, 99: 391-398, 2005.

BOLZAN, V. C. **EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DA MORUS NIGRA SOBRE A CITOLOGIA VAGINAL E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS EM RATOS WISTAR**. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS DA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE, 2008.

BRAGA JR., R.A. **“BIO-SPECKLE” : DESENVOLVIMENTO DE UMA TECNOLOGIA APLICADA A ANÁLISE DE SEMENTES**. 2000. TESE (DOUTORADO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA) – FACULDADE EM ENGENHARIA AGRÍCOLA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, CAMPINAS/SP.

BRAGA JR. R. A.; RABELO, G. F.; GRANATO, L. R.; SANTOS, E. F.; MACHADO, J. C.; ARIZAGA, R; RABAL, H. J.; TRIVI, M. **DETECTION OFF UNGI IN BEANS BY THE LASER BIOSPECKLE TECHNIQUE**. BIOSYSTEMS ENGINEERING. LONDON, V.91, N. 4, P. 465-469. 2005.

BREZINSKI ME. **OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY: PRINCIPLES AND APPLICATIONS**. ACA. 2006.

BRIERS J.D. **WAVELENGTH DEPENDENCE OF INTENSITY FLUCTUATIONS IN LASER SPECKLE PATTERN FROM BIOLOGICAL SPECIMENS.** OPTICS COMMUNICATIONS. V.13, P.324-326, 1975.

CAMELIA GAM, KENT DC, DON WILEY S. 1997. **PHYTOESTROGENS AND FLORAL DEVELOPMENT IN DIOECIOUS MACLURA POMIFERA (RAF.) SCHNEID. AND MORUS RUBRA L. (MORACEAE).** PLANT SCIENCE. 130: 27-40.

CAMPOS, B. S. **A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE BIOSPECKLE.** DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, MACEIÓ, AL. 2013.

CARDOSO, A. O. **ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO APLICADO NO ESTUDO DE SISTEMAS MICELARES.** QP 433, P. 1-12, CAMPINAS 2001

CARNAT, A.P.; CARNAT, A.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J.L. **THE AROMATIC AND POLYPHENOLIC COMPOSITION OF LEMON BALM (MELISSA OFFICINALIS L. SUBSP. OFFICINALIS) TEA.** PHARM ACTA HELV., 72: 301-305, 1998.

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C., **CULTIVO DE PLANTAS MEDICINAIS, CONDIMENTARES E AROMÁTICAS,** CURITIBA, EMATER-PR, 1991, 151P.

CORREA JÚNIOR, C. MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **CULTIVO DE PLANTAS MEDICINAIS, CONDIMENTARES E AROMÁTICAS.** 2.ED. JABOTICABAL: FUNEP, 1994, 162 P.

COUTO, M. E. O. **COLEÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS AROMÁTICAS E CONDIMENTARES.** EMBRAPA, PELOTAS, RS, DOCUMENTO 157, (ON LINE) 2006, 91P.

DASTMALCHI, K.; DORMAN H.J.D.; OINONEN, P.P.; DARWIS, Y.; LAAKSO, I. HILTUNEN, R. **CHEMICAL COMPOSITION AND IN VITRO ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF A LEMON BALM (MELISSA OFFICINALIS L.) EXTRACT.** LWT – FOOD SCI TECH. IN PRESS, 2007.

DAINTY J.C. **SOME STATISTICAL PROPERTIES OF RANDOM SPECKLE PATTERNS IN COHERENT AND PARTIALLY COHERENT ILLUMINATION.** OPTICAL ACTA, V.17, P. 761-772, 1970.

DI STASI, L. C. **PLANTAS MEDICINAIS: ARTE E CIÊNCIA UM GUIA DE ESTUDO INTERDISCIPLINAR.** 1TH ED. UNESP. 1996.

DOI, K; KOJIMA, T; FUJIMOTO, Y. **MULBERRY LEAF EXTRACT INHIBITS OXIDATIVE MODIFICATION OF RABBIT AND HUMAN LOW-DENSITY LIPOPROTEIN.** BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, V. 23, P. 1066-1071, 2000.

FANG, S. H; HOU, Y. C; CHAO, P. D. **PHARMACOKINETIC AND PHARMACODYNAMIC INTERACTIONS OF MORIN AND CYCLOSPORINE. TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY**, V. 205, P. 65-70, 2005.

FERREIRA, A.; PROENÇA, C.; SERRALHEIRO, M.L.M.; ARAÚJO, M.E.M. **THE IN VITRO SCREENING FOR ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MEDICINAL PLANTS FROM PORTUGAL. J ETHNOPHARMACOL.**, 108: 31-37, 2006.

FIALHO, V.R.F; ALFONSO, J.C. **ESTUDIOS FENOLÓGICOS EN PLANTAS MEDICINALES. REVISTA CUBANA PLANTAS MEDICINAIS**, V. 3, N.1, P. 12-17, 1998. GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M.A.; BORIN, M.R.M.B. **BIODIVERSIDADE, UM ENFOQUE QUÍMICO-BIOLÓGICO**. RIO DE JANEIRO: EDITORA UFRRJ, 1996, 147 P.

FRANZOTTI, E. M. **IDENTIFICAÇÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DE RECEPTORS NUCLEARES EM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS: MORUS NIGRA L., PLECTRANTHUS ORNATES CODD., IPOMEA CAIRICA (L) SWEET E POUTERIA TORTA (MART.) RADLK. TESE DE DOUTORADO. PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**, 2006.

FUJII, H. ET AL. **EVALUATION OF BLOOD FLOW BY LASER SPECKLE IMAGE SENSING. APPLIED OPTICS**, V.26, N.24, P.5321-5325

HABER, L.L.; LUZ, J.M.Q.; ARVATIDÓRO, L.F.; SANTOS, J.E. **DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA O CULTIVO DE MENTHA PIPERITA E MELISSA OFFICINALIS**, HORTICULTURA BRASILEIRA, V.23, N.4, P.1006-1009, 2005. HADID, A.A. PROPOSAL FOR EXPANDING THE CROP MANDATE OF ICARDA TO INCLUDE HORTICULTURAL CROPS. SYRIA, INTERNATIONAL CENTER FOR AGRICULTURAL RESEARCH IN THE DRY AREAS ICARDA, 2004, 53 P.

HERODEZ, S.S.; HADOLIN, M.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. **SOLVENT EXTRACTION STUDY OF ANTIOXIDANTS FROM BALM (MELISSA OFFICINALIS L.) LEAVES. FOOD CHEMISTRY**, 80: 275-282, 2003.

ISHIMARU, A. **WAVE PROPAGATION AND SCATTERING IN RANDOM MEDIA: MULTIPLE SCATTERING, TURBULENCE, ROUGH SURFACES AND REMOTE SENSING**, 1TH ED. NEW YORK: ACADEMIC PRESS, P. 463-482, 1978.

JIANG SU XIN YI XUE YUAN (NEW JIANG-SU MEDICAL SCHOOL WORKING PARTY), ZHONG YAO DA CI DIAN (ENCYCLOPAEDIA OF CHINESE CRUDE DRUGS), SHANGAI: SHANGHAI KE XUE JI SHU CHU BAN SHE (SHANGHAI SCIENCE AND TECHNOLOGY PUBLISHER); 1977.

KIM, J.W., KIM, S.U., LEE, H.S., KIM, I., AHN, M.Y., RYU, K.S., 2003. **DETERMINATION OF 1-DEOXYNOJIRIMYCIN IN MORUS ALBA L. LEAVES BY DERIVATIZATION WITH 9-FLUORENYLMETHYL CHLOROFORMATE**

FOLLOWED BY REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 1002, 93–99.

KENNEDY, D.O.; WAKE, G.; SAVELEV, S.; TILDESLEY, N.T.J.; PERRY, E.K. WESNES, K.A.; SCHOLEY, A.B. **MODULATION OF MOOD AND COGNITIVE PERFORMANCE FOLLOWING ACUTE ADMINISTRATION OF SINGLE DOSES OF MELISSA OFFICINALIS (LEMON BALM) WITH HUMAN CNS NICOTINIC AND MUSCARÍNICO RECEPTOR-BINDING PROPERTIES.** NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY, 28: 1871-1881, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL: NATIVAS E EXÓTICAS.** NOVA ODESSA, SP. INSTITUTO PLANTAREM, 2002, P.259-260.

LUCENA DJF, **FERRAMENTA PARA O CÁLCULO DOS DESCRITORES DE TEXTURA A PARTIR DE UM VOLUME DE SPECKLE'S [TCC].** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS. ARAPIRACA, 2012.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **PLANTAS MEDICINAIS.** IN: MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. 3.ED. VIÇOSA, MG: UFV, 2000,136-137.

MARTINS, E. R. CASTRA, D. M.; CASTELANNI, D.C. ET. AL. **PLANTAS MEDICINAIS.** UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, VIÇOSA, MG. 2003.

MAY, A.; BOVI, O.A.; SACCONI, L.V.; SAMRA, A.G.; PINHEIRO, M.Q. **PRODUTIVIDADE DA BIOMASSA DE MELISSA EM FUNÇÃO DE INTERVALO DE CORTES E DOSES DE NITROGÊNIO,** HORTICULTURA BRASILEIRA, V.26, P.312-315, 2008.

MENEGHELLO, G.E.; SCHNEIDER, S.M.H.; LUCCA-FILHO, O.A. **VERACIDADE DA GERMINAÇÃO INDICADA NAS EMBALAGENS DE SEMENTES DE ESPÉCIES MEDICINAIS,** REVISTA BRASILEIRA DE SEMENTES, V. 24, N. 1, P.5-10, 2002.

MONTANARI JUNIOR, I. **ASPECTOS DO CULTIVO COMERCIAL DA MELISSA OFFICINALIS,** BOLETIM AGROECOLÓGICO, V.14, N. 18, 1999.

MOREIRA, L. Q. ; PADILHA, M. M.; MORAIS, F. F.; ARAÚJO, T. H.; SILVA, G. A. **ESTUDO FARMOCOBOTÂNICO DAS FOLHAS DE AMOREIRA-PRETA, MORUS NIGRA L., MARACEAE.** REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, V. 20, N. 4, P. 621-626. 2010.

MUDDAPUR MV. **A SIMPLE TEST FOR CORRELATION COEFICIENTE IN A BIVARIANTE NORMAL DISTRIBUTION.** THE INDIAN JOURN OF STATICT. 1988;50:60-68.

MÜLLER, S.F.; KLEMENT, S. **A COMBINATION OF VALERIANA AND LEMON BALM IS EFFECTIVE IN THE TREATMENT OF RESTLESSNESS AND DYSSOMNIA IN CHILDREN.** PHYTOMEDICINE, 13: 383-387, 2006.

NOMURA, T (1988) **PHENOLIC COMPOUNDS OF THE MULBERRY TREE AND RELATED PLANTS**. FORTSCHRITTE DER CHEMIE ORGANISCHER NATURSTOFFE 53: 87-201.

NIEMZ MH. **LASER-TISSUE INTERACTIONS: BIOLOGICAL AND MEDICAL PHYSICS, BIOMEDICAL ENGINEERING**. 3ª ED. SPRINGER, 2003.

OULAMARA, A.; TRIBILLON, G.; DUVERNOY, J.; ARIZAGA, R.; TRIVI, M.R.; RABAL, H.J. **SPECKLE TIME EVOLUTION CHARACTERIZADA BY CO-OCCORRENCE MATRIX ANALYSIS**. OPTICO E LASR TECHNOLOGY, V. 4-5, P. 1-7, 1989.

PEREIRA, A. F. **CORRELAÇÕES DE IMAGENS POR BIOSPECKLE DE SUPERFÍCIES RUGOSAS: SIMULAÇÕES E EXPERIMENTOS**. (DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM FÍSICA). UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS. INSTITUTO DE FÍSICA. MACEIÓ, 2012.

RABAL, H. J., ARIZAGA, R. TRIVI, M. R., ROMERO, G. G. , ALANIS, E. **TRANSIENT PHENOMENA ANALYSIS USING DYNAMIC SPECKLE PATTERNS**. OPTICAL ENGINEERING, V. 35, N.1, P. 57-63, 1995.

RABAL, H. J.; BRAGA, R. A. **DYNAMIC LASER SPECKLE AND APPLICATIONS**. BOCA RATON: CRC, 2008. 304P.

RABELO, G.F. **AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DO “SPECKLE” DINÂMICO NO MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA LARANJA**. 2000. 149P. TESE (DOUTORADO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA) – FACULDADE EM ENGENHARIA AGRÍCOLA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, CAMPINAS/SP.

RIBEIRO, M.A.; BERNARDO-GIL, M.G.; ESQUÍVEL, M.M. MELISSA OFFICINALIS, L.: **STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY IN SUPERCRITICAL RESIDUES**. J SUPERCRIT FLUIDS, 21: 51-60, 2001.

RON, L. **ESTATÍSTICA APLICADA**. TRADUÇÃO CYRO PATARRA. 2 ED. SÃO PAULO: PEARSON PRENTICE HALL, 2007.

ROSAL, L.F. **PRODUÇÃO DE BIOMASSA, ÓLEO ESSENCIAL E CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS FOLIARES DE PLECTRANTHUS NEOCHILUS SCHLECHTER EM FUNÇÃO DA ADUBAÇÃO ORGÂNICA, MALHAS COLORIDAS E IDADE DAS PLANTAS**. 2008. 123P. TESE (DOUTORADO EM FITOTECNIA) DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, LAVRAS.

RUTH, B. **NOM – CONTACT BLOOD FLOW DETERMINATION USING A LASER SPECKLE METHOD**. OPTIC LASER TECHNOLOGY, V.20, P. 309-16, 1988.

SALAH, S.M.; JÄGER, A.K. **SCREENING OF TRADITIONALLY USED LEBANESE HERBS FOR NEUROLOGICAL ACTIVITIES.** J ETHNOPHARMACOL., 97: 145-149, 2005.

SANDRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. **RELAXANT EFFECT OF ESSENCIAL OIL OF MELISSA OFFICINALIS AND CITRAL ON RAT ILEUM CONTRATIONS.** FITOTERAPIA, 74: 445-452, 2003.

SANTOS-NETO, L.L.; TOLEDO, M.A.V.; MEDEIROS-SOUZA, P.; SOUZA, G.A. **THE USE OF HERBAL MEDICINE IN ALZHEIMER'S DISEASE – A SISTEMATIC REVIEW.** ADVANCE ACCESS PUBLICATION, 23: 441-445, 2006.

SCHEMANN, M.; MICHEL, K.; ZELLER, F.; HOHENESTER, B.; RÜHL, A. **REGION-ESPECIFIC EFFECTS OF STW 5 (IBEROGAST®) AND ITS COMPONENTS IN GASTRIC FUNDUS, CORPUS AND ANTRUM.** PHYTOMEDICINE, 13: 90-99, 2006.

SCHEFFER, M.C. **INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO ORGÂNICA SOBRE A BIOMASSA, O RENDIMENTO E A COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ACHILLEA MILLEFOLIUM L., MIL-FOLHAS,** IN: MING, L.C.; SCHEFFER, M.C.; CORREA-JUNIOR, C.; BARROS, I.B.I.; MATTOS, J.K.A. PLANTAS MEDICINAIS AROMÁTICAS E CONDIMENTARES: AVANÇOS NA PESQUISA AGRONÔMICA. BOTUCATU, UNESP, P.1-22, 1998.

SCHULTZ, DUANE P.; SCHULTZ, SYDNEY ELLEN. **HISTÓRIA DA PSICOLOGIA MODERNA.** 16. ED. SÃO PAULO: CULTRIX, 1992. 439 P.

SILVA, E.R. **ESTUDO DAS PROPRIEDADES DO BIOSPEKLE E SUAS APLICAÇÕES.** 2007. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM FÍSICA) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO.

SILVA, J.F. **ESTUDO EXPERIMENTAL DA EVOLUÇÃO TEMPORAL DE PADRÕES DE SPECKLE APLICADOS AO MONITORAMENTO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO CAPIM BRACHIARIA BRIZONTHA CV. MARANDU.** [TCC]. UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS. ARAPIRACA, 2013.

SIMMEN, U.; KELBER, O.; OKPANYI, S.N.; JAEGGI, R.; BUETER, B.; WEISER, D. **BINDING OF STW 5 (IBEROGAST®) AND ITS COMPONENTS TO INTESTINAL 5-HT, MUSCARÍNICO M3, AND OPIOID RECEPTORS.** PHYTOMEDICINE, 13: 51-55, 2006.

STANTON JM. **GALTON PEARSON AND THE PEAS: A BRIEF HISTORY OF LINEAR REGRESSION FOR STATISTICS INSTRUCTORS.** JOURNAL OF STATISTICAL EDUCATION. 2001; 9.

STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C. **AÇÃO DE FITORREGULADORES NO CRESCIMENTO DA ERVA-CIDREIRA-BRASILEIRA,** HORTICULTURA BRASILEIRA, BRASÍLIA, V. 20, N. 1, P. 18-23, MARÇO 2002.

TESKE, M.; TRENTTINI A. M.M. **COMPÊNDIO DE FITOTERAPIA**. PARANÁ, HERBARIUM, 1997, 317P

TOSHIO F, KIYOSHI K, SUMIO T. **ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 2-ARYLBENZOFURANS FROM *MORUS SPECIES* AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***. *FITOTERAPIA* V.76 P.708-711, 2005.

TRIOLA, M.F. **INTRODUÇÃO A ESTATÍSTICA**. TRADUÇÃO VERA REGINA LIMA DE FARIAS E FLORES. REVISÃO TÉCNICA ANA MARIA LIMA DE FARIAS. 10 ED. RIO DE JANEIRO: LTC, 2008.

TUROLLA, M.S.R. **AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DOS FITOTERÁPICOS: UM ESTUDO COMPARATIVO**. 2004. 145P. DISSERTAÇÃO (MESTRADO – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM TOXICOLOGIA) – DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO.

VASCONCELOS S. **MATRIZES DE CO-OCORRÊNCIAS** [ACESSO 17 NOV 2013]. DISPONÍVEL EM: WWW.IC.UFF.BR/ACONCI/COOCORRENCIA. PDF.

XU, Z.; JOENATHAN, C.; KHORANA, B. M. **TEMPORAL AND SPATIAL PROPRIETIES OF THE TIME-VARING SPECKLES OF BOTANICAL SPECIMES**. *OPTICAL ENGINEERING*. REDONDO BEACH, V. 34, N.5, P. 1487-1502, 1995.

ZHISHEN, J; MENGCHENG, T; JIANMING, W. **THE DETERMINATION OF FLAVONOID CONTENTS IN MULBERRY AND THEIR SCAVEGING EFFECTS IN SUPEROXIDE RADICALS**. *FOOD CHEMISTRY*, V. 64, P. 555-559, 1999.

ANEXO

Anexo A

Efeito da variação temporal da superfície rugosa

Vamos incluir a variação temporal da superfície rugosa na expressão da seção de choque por unidade de área. Em uma superfície rugosa de natureza estática, a sua altura tem sido expressa de uma serie de Fourier em duas dimensões dada por (Pereira, 2012):

$$\zeta(x, y) = \sum_m \sum_n P(m, n) \exp\left(i \frac{2\pi m}{L} x + i \frac{2\pi n}{L} y\right) \quad (\text{A.1})$$

Da equação (A.1) temos que cada componente harmônica espacial deve mover-se com uma velocidade de fase determinada. Como no caso das ondas marítimas, por exemplo, é possível provar de forma idealizada que elas viajam com uma velocidade de fase $v_p = \sqrt{\frac{gl}{2\pi}}$, em que g é a aceleração da gravidade e l é o comprimento da onda. Logo, a frequência angular ω_r , correspondente a essa velocidade de fase será:

$$\omega_r = \frac{2\pi}{l} v_p = \sqrt{\frac{2\pi}{l}} g \quad (\text{A.2})$$

Considerando o espaço harmônico da altura da superfície rugosa dada em (A.1). As componentes dos números de onda nas $\frac{2\pi m}{L}$ e $\frac{2\pi n}{L}$ nas direções x e y , respectivamente, a frequência angular ω_r para essas componentes de ondas de águas profundas é dada por:

$$\omega_{mn} = \left\{ g \left[\left(\frac{2\pi m}{L} \right)^2 + \left(\frac{2\pi n}{L} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.3})$$

onde definiremos que $p = \frac{2\pi m}{L}$ e $q = \frac{2\pi n}{L}$.

Logo, a equação (A.3) será escrita como:

$$\omega_{mn} = \left\{ g(p^2 + q^2)^{\frac{1}{2}} \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.4})$$

Agora podemos escrever a altura da superfície rugosa como uma função de x , y e t . Para isto, usaremos a mesma representação harmônica da equação (A.1), entretanto dessa vez além da parte espacial adicionaremos a parte temporal, Logo,

$$\zeta(x, y, t) = \sum_m \sum_n P(m, n) \exp\left(i \frac{2\pi m}{L} x + i \frac{2\pi n}{L} y - i\omega_{mn} t\right) \quad (\text{A.5})$$

A função correlação das alturas é dada por (Pereira, 2012):

$$\langle \zeta(x_1, y_1) \zeta(x_2, y_2) \rangle = \frac{1}{4} \iint_{-\infty}^{\infty} dpdq \{W(p, q) \exp[ip(x_1 - y_2) + iq(x_2 - y_1)]\} \quad (\text{A.6})$$

Da equação (A.5) a equação (A.6) pode ser escrita como:

$$\langle \zeta(x_1, y_1) \zeta(x_2, y_2) \rangle = \frac{1}{4} \iint_{-\infty}^{\infty} dpdq \{W(p, q) \exp(ipxd + iqyd - i\omega_{mn}\tau)\} \quad (\text{A.7})$$

Onde $\tau = t_1 - t_2$.

Assim, observamos que para conseguir a função de correlação das alturas da superfície rugosa dependente do tempo dada pela equação (A.7) a partir da função de correlação independente do tempo (A.6), trocamos apenas $W(p, q)$ por $W(p, q) \exp(i\omega_{mn}\tau)$. Desta forma, a variação temporal da seção de choque σ pode ser expressa como:

$$\sigma = \frac{\pi k^2}{4} |f(p, q)|^2 W(p, q) \exp(-i\omega_r \tau) \quad (\text{A.8})$$

Com a equação (A.8) (com suas versões para diferentes polarizações) pode-se obter, para uma dada região fixa no espaço, a unidade do padrão do speckle em função do tempo. A correlação entre esses padrões de speckle em instantes diferentes deve conter informações da atividade da superfície.