



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS-UFAL
CAMPUS DE ARAPIRACA
FÍSICA - LICENCIATURA**

DAIANE MARIA MEDEIROS DA SILVA

**USO DE PADRÕES DE BIOSPECKLE NA CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE SANGUE DE EQUINOS**

**ARAPIRACA
2020**

Daiane Maria Medeiros da Silva

Uso de padrões de biospeckle na caracterização da atividade biológica de sangue de equinos

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciada em Física na Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Campus de Arapiraca.

Orientador: Prof. Dr. Emerson de Lima

Arapiraca

2020

Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Biblioteca Campus Arapiraca - BCA
Bibliotecário Responsável: Nestor Antonio Alves Junior

CRB - 4 / 1557

S586u Silva, Daiane Maria Medeiros da
Uso de padrões de biospeckle na caracterização da atividade biológica de sangue de eqüinos / Daiane Maria Medeiros da Silva – Arapiraca, 2020.

42 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Física) - Universidade Federal de Alagoas, *Campus Arapiraca*, Arapiraca, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Emerson de Lima.

Bibliografia: p. 42.

1. Speckle. 2. Biospeckle. 3. Sangue. I. Lima, Emerson de. II. Título.

CDU 53

Daiane Maria Medeiros da Silva

Uso de padrões de biospeckle na caracterização da atividade biológica de sangue de equinos

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciada em Física na Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Campus de Arapiraca.

Data de Aprovação: 07/08/2020

Banca Examinadora



Prof. Dr. Emerson de Lima
Universidade Federal de Alagoas-UFAL
Campus Arapiraca
(Orientador)



Prof. Dr. André de Lima Moura
Universidade Federal de Alagoas-UFAL
Campus Arapiraca
(Examinador)



Prof. Me. Celso Westphalen Neto
Universidade Federal de Alagoas-UFAL
Unidade Educacional de Viçosa
(Examinador)

Em memória de minha avó Josefa Maria, e em homenagem aos meus pais Flávio Medeiros e Clemilda Medeiros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me dar forças e sabedoria, sem ele a finalização desse curso seria impossível. A minha família, por todo suporte, confiança e amor que depositam em mim todos os dias, por todo esforço que minha mãe (Clemilda) e meu pai (Flávio), juntamente com minha irmã (Danielle), fizeram durante esses quatro anos, choraram, sofreram, sorriram e festejaram comigo, de modo que essa graduação não pertence somente a mim. Sem jamais esquecer da minha querida e saudosa avó, que tanto se orgulhou de mim e das minhas conquistas.

À todos os meus professores do Instituto Federal de Alagoas - Campus Arapiraca, no qual cursei meu ensino médio, e que tanto me fortaleceu e inspirou para estar aqui hoje. Aos meus amigos de outros cursos e de fora da UFAL, Irla, Mônica, Vanessa, Seixas, Lucas, Israel, e todos os outros, obrigada por mesmo distante, devido a rotina, se manterem presentes.

Aos meus amigos, que juntos enfrentaram comigo essa batalha, Vitor, Ihathowyth, Regiane, Emanuel, Hérika, Samuel; aos meus parceiros de Residência, Evilásio e Jório; aos meus parceiros de laboratório, Ana, Taynah, Talles, João, André; aos que encontrei pelo caminho, Gutemberg, Célio, Marina, Yolanda, jéssica, Daniel, Rodrigo, Pedro, Déborah, Henrique, Werverton, Carlos; e muitos que não citei, mas que participaram dessa trajetória, agradeço por toda troca de experiências, por todos os perrengues que juntos vencemos, os grupos de estudos, as viagens, os projetos, e todo conhecimento que adquirimos durante esse percurso. Em especial, ao senhor Alisson Marques, por todo suporte e atenção, por se tornar meu ponto de paz e me transmitir segurança.

Ao médico veterinário Celso Westphalen, por toda assistência para que fosse possível a realização deste trabalho, desde as coletas de sangue até a disponibilização das amostras.

À todos os professores do curso de física, Prof. Lidiane (uma das minhas grandes inspirações), prof. Samuel (por todo apoio, e por tudo que me agregou), Prof. André (parceiro de eventos, meu professor de física 4, disciplina crucial para realização deste trabalho), Prof. Emerson (meu orientador, que me acolheu e tanto me ensinou), Prof. Willamys, Prof. Henrique, Prof. Jefferson, Prof. Ivanderson, sem esquecer dos professores da matemática, que represento aqui nas pessoas do prof. Moreno e Prof. Arnaldo, e a todos os outros professores que durante esses anos me instruíram.

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes. Isaac Newton.

Obrigada!

A vida não é fácil para nenhum de nós. Temos que ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos.

Marie Curie

RESUMO

Este trabalho é dedicado ao estudo da técnica de biospeckle aplicada no monitoramento da atividade de tecidos biológicos, especificamente no tempo de diminuição da atividade biológica do sangue e do plasma sanguíneo de equinos. A apuração se dá mediante a aquisição de imagens granuladas, chamadas de padrões de speckle. Quando uma luz coerente é incidida sobre a superfície de um material biológico ocorre o fenômeno óptico chamado de interferência, obtendo então o speckle dinâmico ou biospeckle. A técnica se dá a partir da identificação das características do material, através da computação de imagens, pela variação do padrão do speckle formado, tendo sido verificado que em sistemas onde existe algum tipo de atividade, como em sistemas biológicos, o padrão, formado por um pontilhado, se modifica ao longo do tempo, devido as estruturas responsáveis pelo espalhamento da luz estarem em movimentação. Para essa avaliação, foram utilizadas uma amostra de sangue de uma égua Mestiça de Quarto de Milha, e amostras de plasma sanguíneo de 10 éguas da raça Mangalarga Marchador pertencentes ao Haras Formoso 2S localizado na cidade de Cajueiro – AL. O sangue foi obtido por venopunção na veia jugular esquerda, através do uso do sistema de coleta em tubos à vácuo sem anticoagulante (Vacutainer®), porém em uma das análises (sangue puro) foi utilizado anticoagulante EDTA. Uma análise foi realizada com sangue puro e em outro momento, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, separando-se o plasma, e então foram avaliadas. Para avaliação do sangue em ambos os casos, foi incidido luz laser nas amostras, captando o padrão de speckle gerado por meio de uma câmera CCD (Charge-Coupled Device). Foi aplicado técnicas de processamento de imagens, tais como THSP (Time History Speckle Pattern), MDI (Módulo de Dispersão de Intensidades) para monitorar o tempo de coagulação. Os resultados apresentados mostram que existe uma correlação entre a evolução temporal do speckle e a atividade biológica do sangue e do plasma sanguíneo. Assim, os estudos em tecidos animais indicaram perspectivas extremamente propícias para o uso da técnica Biospeckle em situações clínicas, não somente em animais, como também em humanos.

Palavras-chave: Speckle. Biospeckle. Sangue.

ABSTRACT

This work is dedicated to the study of the biospeckle technique applied in monitoring the activity of biological tissues, specifically in the time of decrease in the biological activity of the blood and blood plasma of horses. The calculation takes place through the acquisition of grainy images, called speckle patterns. When a coherent light falls on the surface of a biological material, an optical phenomenon called interference occurs, obtaining the dynamic speckle or biospeckle. The technique is based on the identification of material characteristics, through image computation, by varying the pattern of the formed speckle, having been verified that in systems where there is some type of activity, such as in biological systems, the pattern, formed by a dotted line, changes over time, due to the structures responsible for spreading the light being in motion. For this evaluation, we used a blood sample from a Mestizo Quarter Horse, and blood plasma samples from 10 Mangalarga Marchador mares belonging to Haras Formoso 2S located in the city of Cajueiro - AL. The blood was obtained by venipuncture in the left jugular vein, using the collection system in vacuum tubes without anticoagulant (Vacutainer®), but in one of the analyzes (pure blood) an EDTA anticoagulant was used. An analysis was performed with pure blood and at another time, the samples were centrifuged for 10 minutes, separating the plasma, and then were evaluated. In order to assess blood in both cases, laser light was applied to the samples, capturing the speckle pattern generated by means of a CCD (Charge-Coupled Device) camera. Image processing techniques were applied, such as THSP (Time History Speckle Pattern), MDI (Intensity Dispersion Module) to monitor the clotting time. The results presented show that there is a correlation between the temporal evolution of the speckle and the biological activity of blood and blood plasma. Thus, studies in animal tissues have indicated extremely favorable perspectives for the use of the Biospeckle technique in clinical situations, not only in animals, but also in humans.

Keywords: Speckle. Biospeckle. Blood.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reflexão e Refração da Luz	12
Figura 2 – Esquema de raios refletidos	13
Figura 3 – Comparação dos espalhamentos Rayleigh e Mie	15
Figura 4 – Desenho esquemático do espalhamento geométrico em partículas	16
Figura 5 – Interferência construtiva e destrutiva	18
Figura 6 – Superposição de ondas: construtivas (regiões claras) e destrutivas (regiões escuras)	19
Figura 7 – Esquema do processo de formação do granulado óptico	20
Figura 8 – Padrões de uma mesma superfície observados de distâncias diferentes	21
Figura 9 – Padrão de speckle característico (esquerda), deformado (centro) e superposi- ção dos granulados característicos e deformado.	22
Figura 10 – Classificação dos Tecidos	24
Figura 11 – Tecido Sanguíneo	26
Figura 12 – Estrutura Sanguínea	27
Figura 13 – Representação da formação da THSP	29
Figura 14 – THSP em superfície estática e em processo de secagem de tinta	29
Figura 15 – Exemplo do calculo da MCO a partir da THSP estática (acima) e dinâmica (abaixo)	31
Figura 16 – THSPs e suas respectivas MCOs	32
Figura 17 – Aparato Experimental 1	33
Figura 18 – Aparato Experimental 2	35
Figura 19 – Gráfico do MDI do sangue puro	36
Figura 20 – Comparativo das MCOs do Sangue	37
Figura 21 – Gráfico do MDI de uma amostra do plasma sanguíneo	38
Figura 22 – Gráfico da média do MDI do plasma sanguíneo	39
Figura 23 – Comparativo das THSPs e suas respectivas MCOs do Plasma Sanguíneo	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
CCD	Charge-Coupled Device
MCO	Matriz de Co-ocorrência
THSP	Time History Speckle Pattern
MI	Momento de Inércia
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
MDI	Módulo de Dispersão de Intensidades

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	PRINCÍPIOS ÓPTICOS	12
2.1	REFLEXÃO E REFRAÇÃO	12
2.2	ESPALHAMENTO DA LUZ	14
2.2.1	Espalhamento Rayleigh	14
2.2.2	Espalhamento Mie	15
2.2.3	Espalhamento Geométrico	15
2.3	TRANSMITÂNCIA E ABSORBÂNCIA	16
2.4	INTERFERÊNCIA E COERÊNCIA	18
3	CARACTERIZAÇÃO DO SPECKLE	20
3.1	SPECKLE	20
3.2	SPECKLE DINÂMICO	22
3.3	BIOSPECKLE	23
3.4	TECIDOS BIOLÓGICOS	24
3.4.1	Tecido Conjuntivo	25
3.4.2	Tecido Sanguíneo	26
3.5	MÉTODOS DE ANÁLISES	28
3.5.1	THSP	28
3.5.2	MCO	30
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	33
5	RESULTADOS	36
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

É necessário que estejamos sempre preparados para lidar com a velocidade que os avanços tecnológicos acontecem e transformam a sociedade, a tecnologia e inovação estão totalmente interligadas e, por sua vez, causam uma revolução em conhecimento e evolução. A curiosidade humana impulsiona o crescimento científico, e com todas as ferramentas tecnológicas que temos ao nosso redor, nos leva a buscar meios ainda melhores para serem implementados.

Trabalhar em busca de técnicas menos invasivas, que não danifiquem as amostras usadas para o estudo, e que possam ser extensamente aplicadas, se torna de grande relevância para a ciência. A técnica conhecida como speckle atende essa expectativa e pode ser aplicada em pesquisas sobre verificação de atividade biológica em sementes ou em fungos, secagem de pinturas, entre outras análises.

Por sua vasta possibilidade de aplicação, conveniência na integridade da amostra e, além de tudo, um baixo custo de montagem, a técnica já vem sendo bastante estudada em diversos tipos de monitoramento, e foi justamente por todos esses motivos que resolvemos produzir uma investigação sobre a aplicação da técnica de speckle para caracterizar atividade em tecidos biológicos.

Investigar o tecido sanguíneo, desde o sangue puro até o plasma, observando processos de bioatividade, como coagulação, através da ferramenta chamada de biospeckle, foi nossa motivação para desenvolver esse trabalho de conclusão de curso. Aqui, analisamos amostras de sangue de uma égua Mestiça de Quarto de Milha, e amostras de plasma sanguíneo de éguas da raça Mangalarga Marchador pertencentes ao Haras Formoso 2S localizado na cidade de Cajueiro – AL.

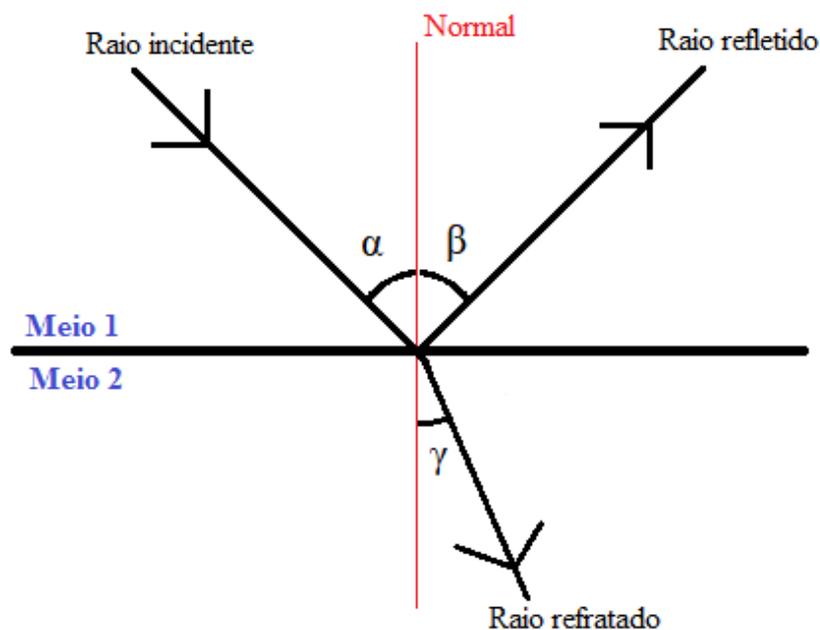
No capítulo 2 serão apresentados princípios ópticos com as definições necessárias para compreensão da técnica, que será caracterizada, de fato, no capítulo 3. Os resultados obtidos através desta investigação são descritos no capítulo 5, nele está exposto os dados de monitoramento da evolução do processo de desidratação das amostras, resultados que mostram que o biospeckle é uma ferramenta promissora, podendo ter futuramente utilização clínica.

2 PRINCÍPIOS ÓPTICOS

2.1 REFLEXÃO E REFRAÇÃO

Quando um feixe de luz atinge uma superfície lisa que separa dois meios, podem acontecer dois fenômenos distintos, sendo eles, reflexão da luz e refração da luz. Parte da luz retorna e se propaga para o meio do qual ela foi incidida, o que chamamos de reflexão da luz. Outra parte da onda incidida passa de um meio para outro, propagando-se, isto é, transmitida para outro material, o que chamamos de refração da luz.

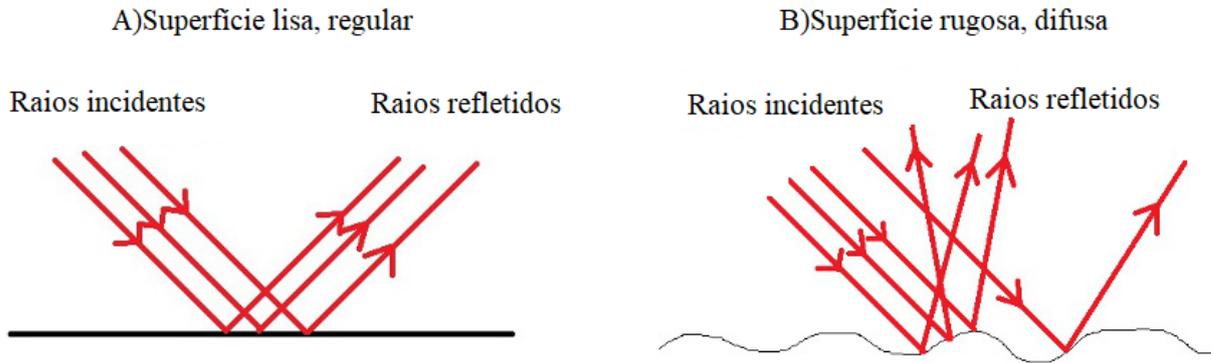
Figura 1 – Reflexão e Refração da Luz



Fonte: A autora (2020).

Na figura 1, temos uma descrição de raios incidente, refletido e refratado numa superfície lisa separando dois meios transparentes, e a relação que esses raios formam com a reta normal. Quando a superfície é rugosa, não temos um único ângulo de reflexão ou refração, pois os raios transmitidos e refletidos são espalhados em diversas direções. Temos então a reflexão difusa, em que a reflexão de luz a partir de uma superfície, acontece de tal forma que um raio incidente se reflete em muitos ângulos em vez de em apenas um ângulo (YOUNG et al., 2004).

Figura 2 – Esquema de raios refletidos



Fonte: A autora (2020).

Quando o ângulo refletido é exatamente igual ao ângulo de incidência, temos a lei da reflexão, observando a figura 1, teremos o ângulo refletido β , e o ângulo de incidência α :

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

Ainda analisando a figura 1, ao se tratar de um par de materiais diferentes, separados por uma interface, a razão entre o seno do ângulo α e o seno do ângulo γ , é igual ao inverso da razão entre os índices de refração dos meios, tendo os materiais a e b:

$$\frac{\text{sen}\alpha}{\text{sen}\gamma} = \frac{n_b}{n_a} \quad (2)$$

Podemos reescrever a eq. 2 da seguinte forma:

$$n_a \cdot \text{sen}\alpha = n_b \cdot \text{sen}\gamma \quad (3)$$

Esta última equação se trata da Lei de Snell, ou Lei da Refração. A compreensão dos fenômenos da luz sendo incidida em superfícies, seja ela lisa ou rugosa, agrega para que entendamos a superposição de ondas produzidas no padrão de speckle.

O speckle é consequência da interferência entre diversos feixes espalhados a partir de uma superfície rugosa, e por isso, para que seja compreendido é necessário um entendimento de algumas propriedades fundamentais da luz na condição de teoria ondulatória da luz. No próximo tópico será tratado outro fenômeno diretamente ligado a incidência de luz em um meio, chamado de espalhamento.

2.2 ESPALHAMENTO DA LUZ

No momento que olhamos para o céu, podemos ver a luz solar que foi absorvida e logo depois transmitida em diversas direções, chamamos esse fenômeno de espalhamento da luz. A distribuição da radiação depende de algumas características das partículas que compõem o meio no qual a radiação está se propagando, uma delas é a relação entre o tamanho da partícula espalhadora e o comprimento de onda da radiação incidente. O espalhamento da luz pode ser elástico, inelástico ou quasi-elástico (SILVA, 2007).

No espalhamento inelástico, a luz espalhada possui um comprimento de onda bem maior que a onda incidente, isso ocorre, entre outras coisas, pelo fato de elétrons excitados na interação decaírem para estados intermediários, e assim emitir fótons de energias menores, Esse tipo de espalhamento é muito aplicado na técnica de espectroscopia, e geralmente necessita do uso de fótons de energia superior ao do espectro visível, em especial ultra-violeta e raios X.

No espalhamento elástico, não há alteração do comprimento de onda da radiação, isso acontece quando os centros espalhadores são estáticos, mudando apenas a direção de propagação das ondas incidentes. A frequência de onda, no espalhamento quasi-elástico, é levemente diferente da onda incidente, e ocorre quando os centros espalhadores estão em movimento.

Na formação do granulado óptico, a interferências entre as ondas com frequências levemente distintas, provocam flutuações de intensidades vistas no speckle dinâmico, tratado adiante no tópico 3.2. A seguir será descrito alguns tipos de espalhamento.

2.2.1 Espalhamento Rayleigh

No espalhamento Rayleigh, os centros espalhadores apresentam dimensões menores que o comprimento de onda da radiação incidente, a radiação é espalhada em todas as direções. De acordo com a teoria, a intensidade da luz espalhada por uma partícula de índice de refração próximo da unidade e diâmetro da ordem 1/20 do comprimento de onda da radiação incidente, pode ser escrito:

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

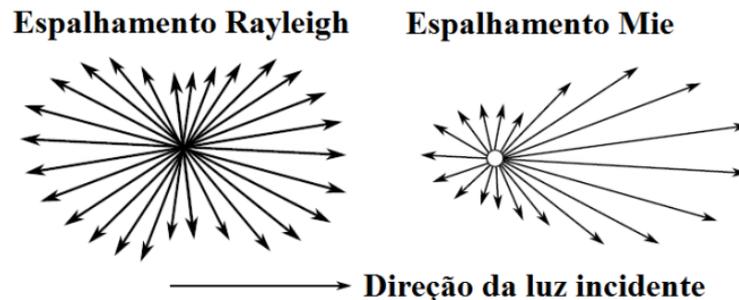
Em que, I é a intensidade medida a uma distância r da partícula, I_0 é a intensidade de radiação incidente não polarizada, de comprimento de onda λ , ϵ_0 é a permissividade elétrica e α é a polarizabilidade do material que forma a partícula. O ângulo θ é formado entre o feixe de radiação incidente e o feixe de radiação espalhada,

2.2.2 Espalhamento Mie

Quando os centros espalhadores apresentam dimensões da mesma ordem do comprimento de onda da radiação incidente, temos o espalhamento Mie. Foi descrito analiticamente por Mie em 1908, a partir das equações de Maxwell, deduzindo como as ondas eletromagnéticas de comprimento de onda λ são perturbadas ao interagirem com esferas homogêneas de raio r .

As diferenças de fase entre as ondas espalhadas são menores na direção da onda incidente, fazendo com que haja interferências construtivas mais intensas, e irradiâncias maiores nessa direção.

Figura 3 – Comparação dos espalhamentos Rayleigh e Mie



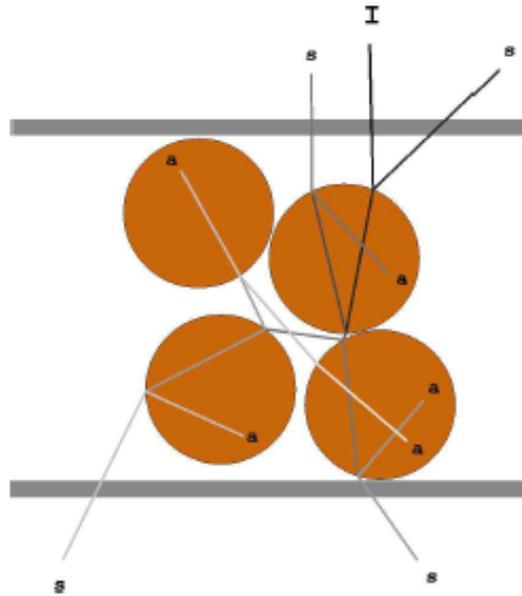
Fonte: Oliveira (2016).

2.2.3 Espalhamento Geométrico

O espalhamento é dito geométrico, na situação em que as dimensões dos centros espalhadores são grandes quando comparadas ao comprimento de onda, de modo que a luz penetra seu interior e sofre refrações e reflexões múltiplas.

Ao sofrer reflexões e refrações, desenvolve trajetórias que podem ser descritas pelas leis da óptica geométrica, entretanto a descrição dessas trajetórias torna-se complexas já que se trata de múltiplas, e a quantidade de parâmetros envolvidos é grande.

Figura 4 – Desenho esquemático do espalhamento geométrico em partículas



Fonte: Silva (2007).

Feita a apresentação desses três tipos de espalhamento, é possível determinar uma teoria adequada, de acordo com o meio de estudo e o comprimento de onda da luz incidente. Os tecidos biológicos apresentam estruturas, nas quais as dimensões variam de poucos nanômetros, até dezenas de micrômetros, sendo assim, as teorias mais utilizadas para descrever os espalhamentos em meios biológicos, são os espalhamentos de Mie e geométrico.

2.3 TRANSMITÂNCIA E ABSORBÂNCIA

Na ocasião em que um feixe de radiação monocromática atravessa uma solução, contendo uma espécie absorvente, parte dessa energia é absorvida e a outra parte é transmitida. Lambert em 1870, atentou a relação entre a transmissão de luz e a espessura da camada da solução absorvente. Ele percebe que no momento que um feixe de luz monocromática, atravessava um meio transparente homogêneo, cada camada deste meio absorvia igual a fração de luz que atravessava, independentemente da intensidade da luz que era incidida. Com base nisso foi declarada a seguinte lei: "A intensidade da luz emitida decresce exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente".

Essa lei pode ser expressa pela equação:

$$I = I_0 \cdot 10^{-xl} \quad (5)$$

Em que, I é a intensidade da luz transmitida, I_0 é a intensidade da luz incidente, x é a coeficiente de absorção que depende do meio, e l é a espessura do meio absorvente.

Para radiação monocromática, a absorvância é diretamente proporcional ao caminho ótico através do meio e a concentração das espécies absorventes. Beer em 1852, constatou a relação entre a transmissão e a concentração do meio onde passa o feixe de luz. A solução absorve a luz de acordo com a concentração molecular do soluto que nela encontra, isto é, "A intensidade de um feixe de luz monocromático decresce exponencialmente à medida que a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente". Essa lei pode ser expressa pela equação:

$$I = I_0 \cdot 10^{-kc} \quad (6)$$

Em que, I é a intensidade da luz transmitida, I_0 é a intensidade da luz incidente, k é a coeficiente de absorção que depende do meio, e c é a concentração do meio absorvente.

As leis de Lambert-Beer formam o princípio da espectrofotometria. Elas são tratadas em paralelo, processo no qual a quantidade de luz absorvida ou transmitida por uma determinada solução depende da concentração do soluto e da espessura da solução, a relação dessas leis pode ser expressa por:

$$T = e^{-a.l.C} \quad (7)$$

Em que T é a Transmitância, e é o logaritmo natural de Euler, a é uma constante, l é a espessura da solução e c é a concentração da solução. Convertendo a equação para forma logarítmica:

$$-\ln T = a.l.c \quad (8)$$

Neste trabalho, analisaremos meios/amostras transparentes, que se tratam do plasma sanguíneo, por isso é de suma importância que se compreenda como acontece o processo de transmissão da luz que será incidida sobre tal amostra. O próximo tópico inicia a explicação sobre a interferência que dá origem aos resultados da técnica aqui utilizada.

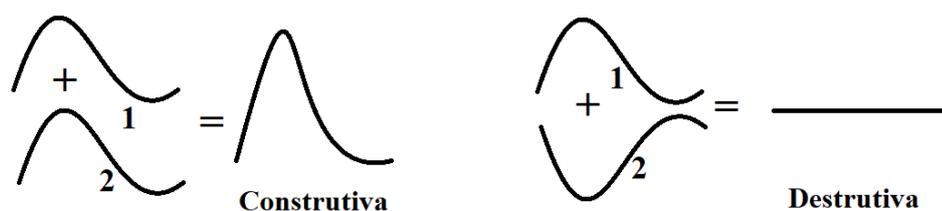
2.4 INTERFERÊNCIA E COERÊNCIA

Interferência é o fenômeno de combinação de ondas, isto é, a superposição de duas ou mais ondas em uma mesma região do espaço. Podemos imaginar uma corda na qual uma extremidade está presa em um ponto fixo e na outra extremidade realiza-se um movimento de sobe e desce, com isso veremos uma formação de ondas se propagando, se duas pessoas realizam o movimento de sobe e desce em cada extremidade da corda, veremos uma formação de ondas que se propagam no mesmo sentido, porém com direções opostas, a questão é que quando essas ondas se encontram acontece o fenômeno de interferência de ondas. Dessa forma, podemos entender que quando duas ou mais ondas se encontram em um mesmo ponto, temos então um fenômeno de interferência. No momento em que isso ocorre, gera uma onda resultante que é determinada pelo princípio da superposição, por exemplo, quando estamos em um show, as ondas sonoras dos instrumentos chegam simultaneamente em nossos ouvidos e a combinação dessas ondas gera uma melodia.

Os efeitos da interferência, de acordo com (YOUNG et al., 2004), podem ser estudados mais facilmente quando combinamos ondas senoidais com uma única frequência f e comprimento de onda λ . Quando as duas ondas se propagam em duas dimensões, as circunferências representam frentes de ondas circulares, (como uma perturbação em uma superfície de água), já quando as ondas são propagadas em três dimensões, as circunferências representam frentes de onda esféricas.

Supondo que serão produzidas, e propagadas no mesmo sentido em uma corda, duas ondas senoidais de mesmo comprimento de onda e amplitude, de acordo com o princípio da superposição (HALLIDAY et al., 1991), teremos as seguintes interferências:

Figura 5 – Interferência construtiva e destrutiva

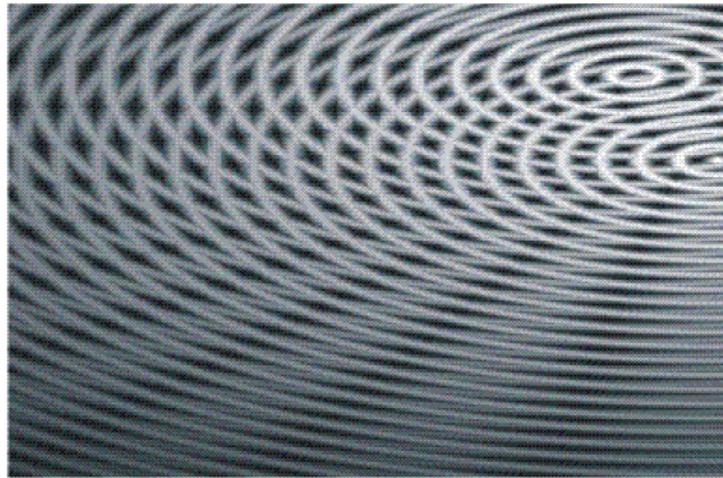


Fonte: A autora (2020).

A forma da resultante depende da fase relativa das duas ondas, de maneira que se as

ondas estão exatamente em fase, isto é, os picos e os vales das duas ondas estão alinhados, o deslocamento total será o dobro do que seria realizado por cada onda separadamente, chamamos esse efeito de interferência construtiva. Porém se as ondas estão totalmente defasadas, ou melhor, os picos e vales desalinhados, as ondas se cancelam, então chamamos o efeito de interferência destrutiva.

Figura 6 – Superposição de ondas: construtivas (regiões claras) e destrutivas (regiões escuras)



Fonte: Young *et al.*(2004).

Segundo (CAMPOS *et al.*, 2013), se duas fontes idênticas de ondas monocromáticas sofrem interferência, as duas fontes produzem ondas com a mesma amplitude e o mesmo comprimento de onda, além disso, as duas fontes estarão permanentemente em fase vibrando em sintonia. Tendo compreendido como acontece o processo de interferências de ondas, é chegada a hora de compreender como isso influencia no speckle e como ocorre a formação do mesmo.

3 CARACTERIZAÇÃO DO SPECKLE

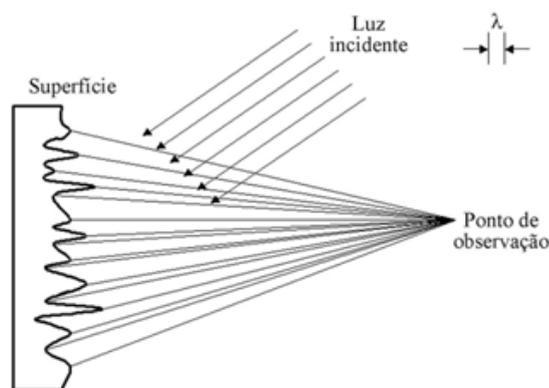
3.1 SPECKLE

A técnica chamada de speckle, trata-se da utilização de figuras formadas por um "granulado óptico" para avaliação da superfície em questão. A figura de aspecto granuloso, é formada por pontos claros e escuros devido a ocorrência do fenômeno de interferência, que acontece quando um feixe de luz coerente é transmitido ou espalhado por uma superfície com rugosidades (em escalas microscópicas), e assim causando interferências construtivas, sendo os pontos claros, e destrutivas sendo os pontos escuros.

Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation - LASER, que na língua portuguesa significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, se tornou uma ferramenta essencial para a técnica, o laser é uma radiação eletromagnética gerada com características particulares, é monocromática, isso quer dizer que possui frequência bem definida, é coerente, já que mantém uma relação de fase constante, além de ser colimada, se propagando como um feixe de baixa dispersão.

Conforme o princípio de Huygens-Fresnel, quando uma onda de luz incidente atinge uma superfície, cada ponto desta atua como um emissor de pequenas ondas secundárias, quando se trata de uma superfície rugosa, os centros espalhadores são distribuídos ao acaso, estas pequenas ondas são espalhadas variando aleatoriamente. Assim, ao incidir luz laser sobre uma superfície rugosa, as ondas refletidas sofrem interferência, ocasionando em um granulado óptico em um ponto de observação (fig 7).

Figura 7 – Esquema do processo de formação do granulado óptico



Fonte: Goodman (1975).

Foram muitos os estudos acerca do speckle, desde o século XIX, tal processo, a princípio foi visto como um ruído óptico, entretanto percebeu-se que o granulado portava informações sobre o objeto de estudo, e sendo associado a superfícies rugosas. Nos dias atuais, a técnica é aplicada em diversos ramos da atividade humana, inclusive na medicina.

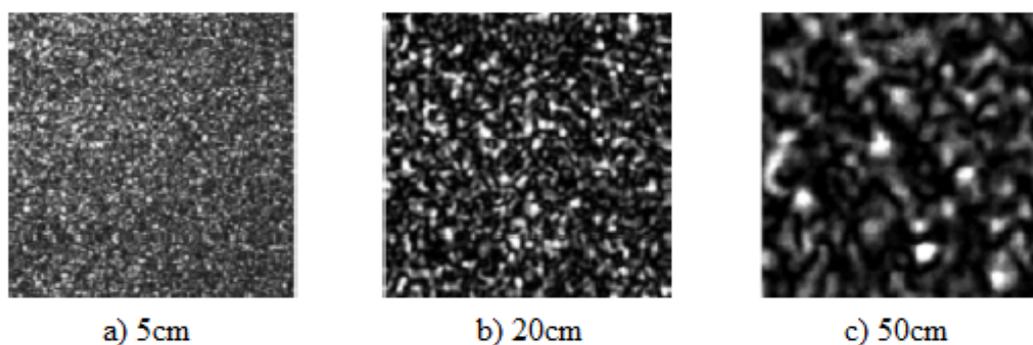
O grão do speckle muda de tamanho em função do comprimento de onda da luz incidente, da distância da observação e o diâmetro da área iluminada, dado por:

$$d = 2.44 \left(\frac{\lambda Z}{D} \right) \quad (9)$$

Em que d é o diâmetro do speckle, Z é a distância do observador até o granulado, λ é o comprimento de onda da luz incidente, o valor 2.44 é um fator de correção relacionado com a difração, e D é o diâmetro da área iluminada.

A figura apresenta padrões de uma mesma superfície, contudo observados de distâncias diferentes. A medida que a distância aumenta, também aumentam o tamanho dos grãos que formam o padrão.

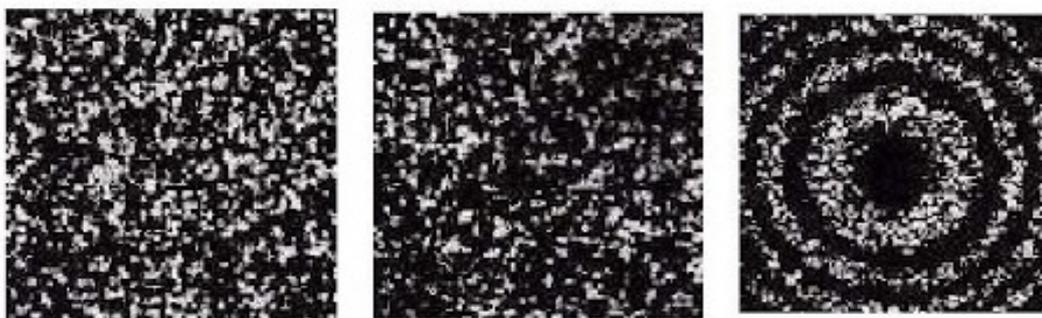
Figura 8 – Padrões de uma mesma superfície observados de distâncias diferentes



Fonte: Silva (2007).

A imagem do speckle pode ser analisada como uma espécie de fervilhamento, que pode ser observada adquirindo informações sobre a intensidade do movimento, o que será tratado no tópico 3.2. O agrupamento destes padrões de interferência, cujas intensidades também variam ao acaso, é usualmente conhecido como padrão de granulado ou speckle:

Figura 9 – Padrão de speckle característico (esquerda), deformado (centro) e superposição dos granulados característicos e deformado.



Fonte: Pires; Tagiaferri; Thaumaturgo (2002) .

Nos pontos de interferência construtiva ou destrutiva ocorre a formação de grãos claros e escuros, respectivamente, que são coletados pela câmera CCD.

Quando falamos a palavra padrão, isso nos remete a modelo ou protótipo, porém o mesmo material pode ter padrões diferentes, como trataremos na próxima seção, isso porque os materiais podem ter uma movimentação, não sendo somente estático.

3.2 SPECKLE DINÂMICO

Ao fazermos uma análise de uma mesa ou parede, por exemplo, estamos falando de materiais estáticos, no qual o padrão permanecerá o mesmo. Entretanto, se a mesa ou parede estiver recém pintada, irá ocorrer uma movimentação em sua superfície, isso acontece devido ao fato da tinta estar em processo de secagem, assim se analisarmos esse material poderemos ver a evolução temporal do mesmo, ou seja, como ocorrerá a intensidade do movimento no decorrer do tempo.

A medida que um corpo se deforma, a frente de onda emitida pelo objeto vai sendo alterada, em contra partida a onda do feixe de referência se mantém intacta. Ocasionalmente uma mudança de fase do feixe objeto, constatando-se um novo padrão de granulado. A partir da soma de padrões granulados registrados, antes e depois da deformação, e do cálculo da Transformada de Fourier sobre a superposição, chegamos em um padrão de franjas paralelas conhecidas como franjas de correlação, de acordo com a ilustração da Figura 9. Através do uso de algoritmos de computação, as franjas de correlação se tornam mapas de fase, e com base nisto se consegue determinar o deslocamento entre os dois padrões e, conseqüentemente, o deslocamento sofrido

pela amostra (RASTOGI, 1993).

3.3 BIOSPECKLE

Até aqui, foi apresentado o speckle, e o referencial teórico envolvido na formação do mesmo, abordou-se também o fato de que esse fenômeno óptico pode ser estático ou dinâmico, e que isso dependerá das condições da superfície que estamos analisando. A partir desta seção, iremos discorrer sobre a técnica propriamente dita e sua aplicação, que neste trabalho será na análise sanguínea. Mas, a princípio, por que *biospeckle*?

Quando o laser é incidido sobre uma superfície que contém algum tipo de atividade, o granulado gerado irá diferir no decorrer do tempo, o que se trata do speckle dinâmico, mas quando a superfície em questão se trata de um material biológico, onde se desenvolve um processo vivo, damos a esse fenômeno o nome de *biospeckle*.

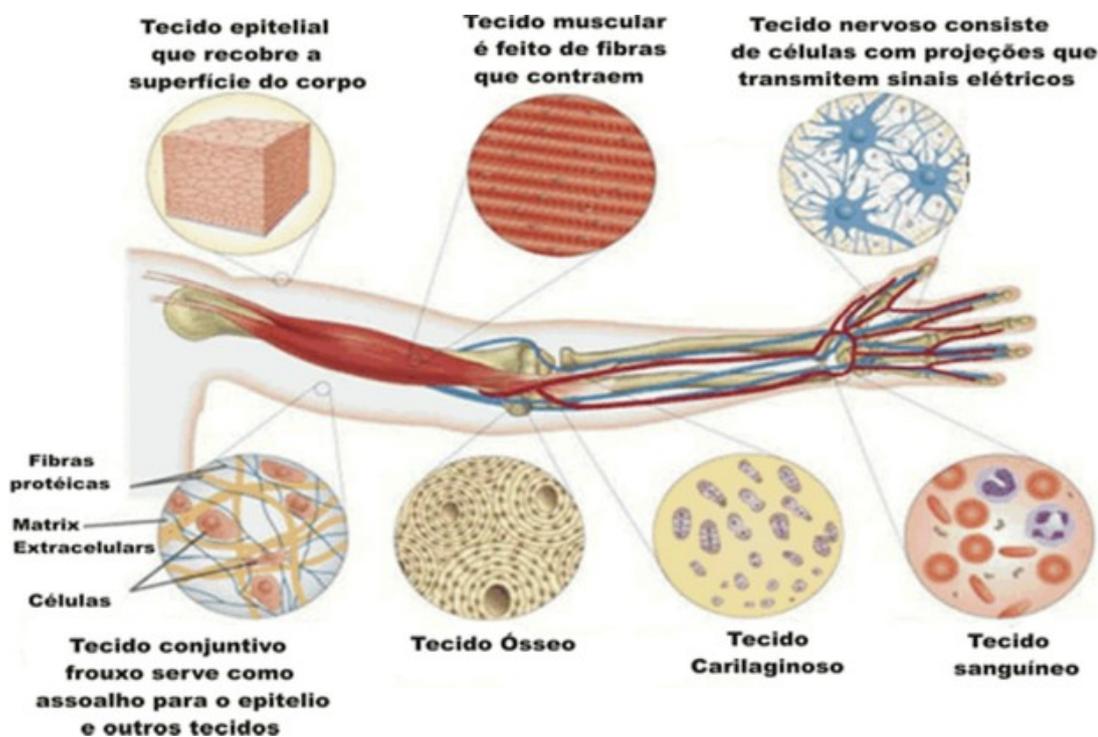
Muitos pesquisadores, desde a década de 80, vem buscando técnicas de análises não invasivas, e que não interfira no meio analisado. O Biospeckle é uma técnica que vem sendo muito estudada e aplicada em ramos como a medicina, como na atividade biológica, fluxo sanguíneo, parasitas, sêmen, entre muitas outras situações. De acordo com (BRIERS, 1975), quando incidimos a luz laser sobre uma entidade viva, tal como, uma fruta, o padrão do speckle é visto como flutuações, e o resultado dessas flutuações dependem do comprimento de onda da luz que está sendo utilizada, sendo assim, devemos incidir uma luz cuja frequência não interaja com o meio, para que não ocorra variação nos resultados devido essa interação. Melhor dizendo, se queremos analisar um tomate vermelho e iluminamos a amostra com um laser de comprimento de onda 637 nm (nanômetros), que no espectro visível corresponde a cor vermelha, maior parte dessa luz será dispersa, já que a amostra possui no interior de suas células cloroplastos vermelhos não ocorrerá absorção dessa luz, entretanto se usarmos a luz com comprimento de onda 514 nm, que corresponde a luz verde, os cloroplastos irão absorver a luz e parte dela retorna ao observador devido a reflexão na pele do tomate.

Ao ocorrer a movimentação do objeto difusor, o grão de speckle também se move, e dessa maneira as imagens que são geradas a partir da interferência da luz laser, nos dá informação sobre a amostra de acordo com a sua movimentação. Aqui, as formas de interpretação dos resultados obtidos através do speckle, se trata do método chamado Matriz de Co-Ocorrência (MCO), que se baseia no número de ocorrência da transição de intensidade em relação aos pixels vizinhos, e também da História Temporal de Padrões de Speckle (THSP), técnica que analisa a intensidade do pixel em uma sequência de imagens. Esses métodos serão detalhados no tópico 3.5.

3.4 TECIDOS BIOLÓGICOS

Tecidos biológicos se trata de um conjunto de células, iguais ou diferentes entre si, que pode ser separadas, ou não, por líquidos e substâncias intercelulares, que cumprem determinada função num organismo multicelular. Estando nas diferentes estruturas que compõem não somente o sistema locomotor, como também todos os outros sistemas, os tecidos apresentam propriedades específicas com capacidade de transformar suas estruturas diante das necessidades ambientais e funcionais (POHL et al., 2010). Existem quatro tipos de tecidos animais – epitelial, conjuntivo, nervoso e muscular – e cada um desses tipos principais apresenta variações.

Figura 10 – Classificação dos Tecidos



Fonte: Disponível em: <http://educacao.globo.com/biologia/assunto/genetica/tecidos-animais.html>. Acesso em: 30 jun. 2020.

Um órgão geralmente é composto por vários tipos de tecidos. Desse modo, a diferenciação dos tecidos é feita a partir da diferença na especificidade de cada conjunto de células. Assim sendo, todo material oriundo de um ser vivo é considerado como um tecido biológico, aqui trabalharemos diretamente com o tecido conjuntivo, grupo do qual o tecido sanguíneo faz parte.

3.4.1 Tecido Conjuntivo

Este, é um tecido que possui grande quantidade de matriz extracelular, a qual é uma rede estrutural complexa não celular, que circunda e suporta as células do tecido. Constituído de fibras com dois tipos de proteínas: o colágeno e a elastina, as funções do tecido conjuntivo consiste em: sustentação; o preenchimento, como a cicatrização; e o transporte de substâncias. A matriz extracelular, que é a substância entre as células, tem consistência variável, podendo ser gelatinosa (tecido conjuntivo frouxo e denso), líquida (sanguíneo), flexível (cartilaginosa) ou rígida (ósseo). Sendo assim, de acordo com (MOREIRA, 2015), podemos dividi-lo em tecido conjuntivo propriamente dito e em tecidos conjuntivos especializados: adiposo, cartilaginosa, ósseo e sanguíneo.

- Tecido conjuntivo propriamente dito:

Tecido conjuntivo frouxo: é composto de pouca matriz extracelular, com muitas células e poucas fibras, é encontrado em todo corpo envolvendo órgãos, ademais, serve de passagem para vasos sanguíneos, logo, importante na nutrição dos tecidos.

Tecido conjuntivo denso: dispõe de grande quantidade de matriz extracelular, predominando fibras colágenas, e poucas células, é encontrado abaixo do epitélio, na derme, concedendo resistência às pressões mecânicas, graças a grande quantidade de fibras. Além disso, é muito encontrado nos tendões.

- Tecidos conjuntivos especializados:

Tecido adiposo: é um composto de células capazes de acumular gordura, tem como principal função no organismo a de garantir o isolamento térmico do corpo. É onde se encontra aplicada a maior parte da energia do ser humano;

Tecido cartilaginosa: é um tecido flexível, de consistência firme, tem como função a sustentação e o revestimento de regiões como a orelha e o nariz. Não há nervos nem vasos sanguíneos nas cartilagens, desse modo, a nutrição das células desse tecido se dá por meio dos vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo adjacente;

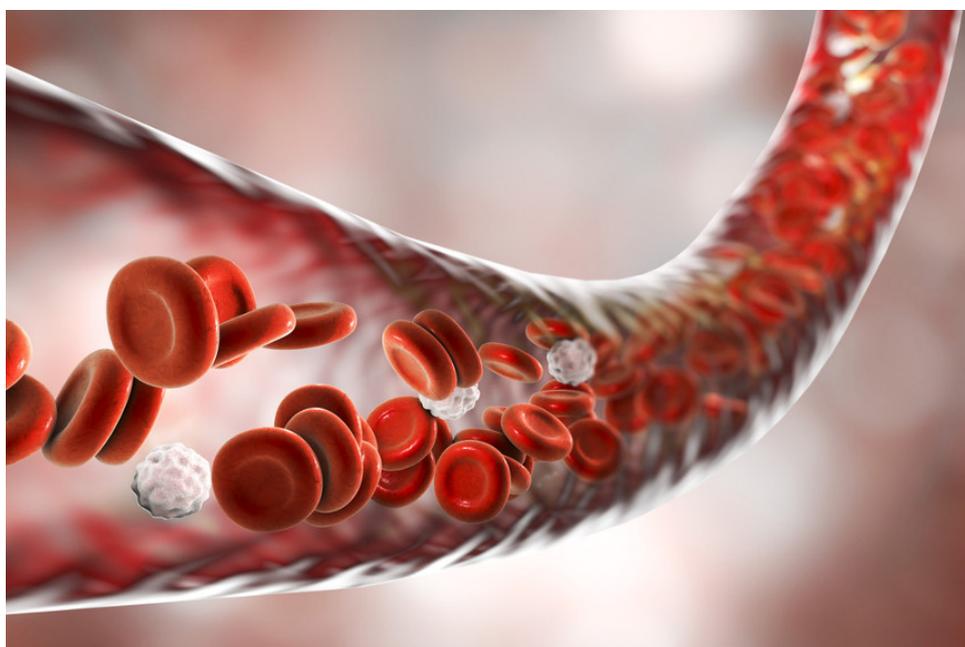
Tecido ósseo: é um tecido rígido singularizado por ser rico em sais minerais, cálcio e colágeno, o que confere aos ossos sua alta resistência, tem como função a sustentação do corpo.

O tecido sanguíneo trata-se do material que iremos analisar, por isso será detalhado no próximo tópico.

3.4.2 Tecido Sanguíneo

O tecido sanguíneo é um formado pela junção de vários tipos de células, este tecido possui em sua composição células como os eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e fragmentos celulares, denominados de plaquetas, a sua matriz extracelular é líquida e denominada de plasma. O plasma é constituído por água, sais e proteínas. Dentre as funções do tecido sanguíneo, podemos destacar o transporte de gases e nutrientes e a defesa do organismo.

Figura 11 – Tecido Sanguíneo



Fonte: Disponível em: <http://https://www.biologianet.com/histologia-animal/tecido-conjuntivo.htm>.
Acesso em: 1 jul. 2020.

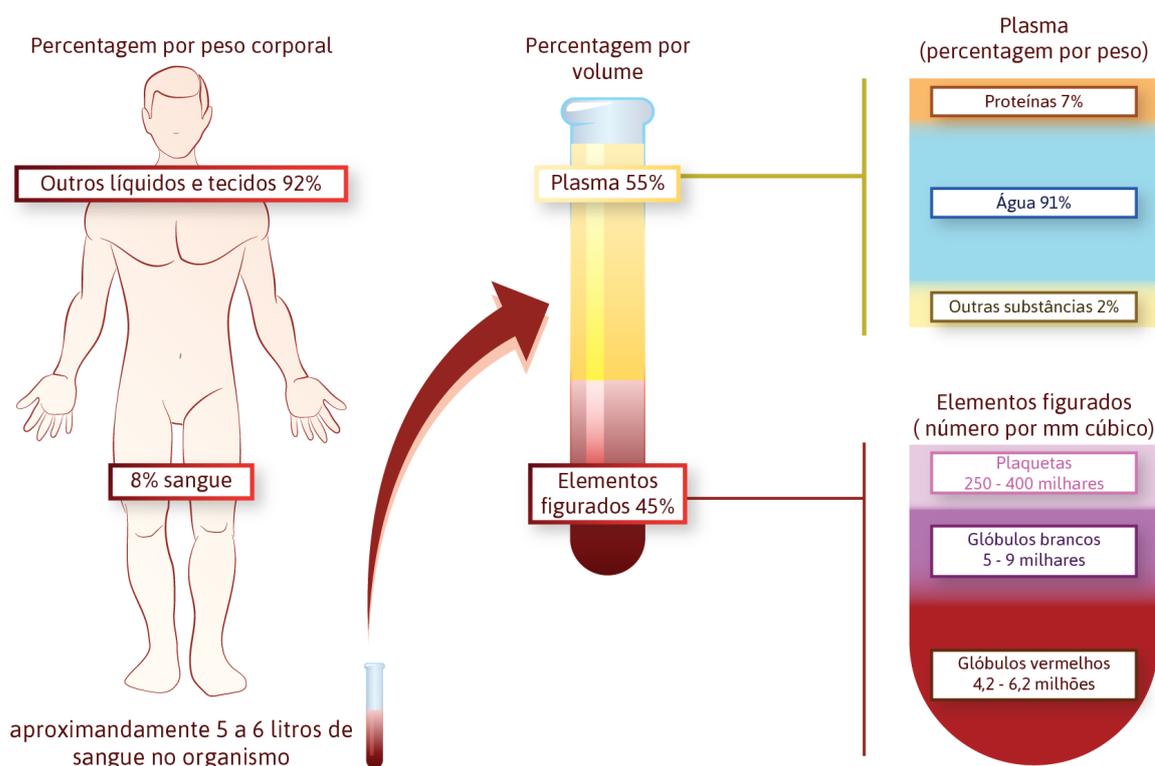
Sendo um tipo especial de tecido, o sangue realiza uma movimentação por todo o corpo, atuando como meio de transporte de materiais entre as células. Sua composição é 55% por uma parte líquida, a qual chamamos de plasma, e outros 45% por três células principais: as plaquetas; as células chamadas de eritrócitos ou hemácias, que são os glóbulos vermelhos; e os leucócitos também chamados de glóbulos brancos.

O plasma contém inúmeras substâncias, nele há aproximadamente 91% de água e 9% de sais, proteínas e outras substâncias (Na, Cl, Ca, etc.), glicose, aminoácidos, colesterol, ureia, hormônios, anticorpos etc. é justamente a grande quantidade de água que facilita o desempenho

das funções do plasma, que consiste no transporte das células sanguíneas pelo corpo e o transporte de substâncias nutritivas(CÂMARA, 2014).

Segundo (GONZALEZ; SCHEFFER, 2003) variações bioquímicas do plasma sanguíneo são reflexo da situação metabólica dos tecidos animais, podendo informar e avaliar lesões teciduais, adaptação do animal em situações de desequilíbrios metabólicos específicos.

Figura 12 – Estrutura Sanguínea



Fonte: Disponível em: <https://www.unidospelahemofilia.pt/o-sangue/o-que-e-o-sangue/>. Acesso em: 2 jul. 2020.

Plaquetas: consiste em pequenas células que têm uma função de extrema importância na coagulação sanguínea, visto que são responsáveis pela formação de um primeiro tampão que auxilia na suspensão da hemorragia de uma forma urgente.

Glóbulos brancos: existem vários tipos deles, os neutrófilos, os eosinófilos, os basófilos, os monócitos e os linfócitos. Como a maioria das células sanguíneas, os glóbulos brancos são produzidos na medula óssea, contudo, alguns tipos de glóbulos brancos terminam o seu desenvolvimento em tecidos fora da medula óssea. Os glóbulos brancos têm um papel muito importante na defesa do organismo, já que são as células mais numerosas do sistema imunitário.

Glóbulos vermelhos: a principal função destas células é tornar possível a chegada do oxigênio (presente no ar que inspiramos) até todas as células do nosso corpo e recolher o dióxido de carbono, produzido por elas, para ser libertado por meio da respiração. Para que isso seja possível, estas células tem na sua composição uma proteína chamada hemoglobina onde se liga o oxigênio e o dióxido de carbono às hemácias.

Para esta pesquisa, utilizamos o sangue de éguas, que possui a mesma estrutura do sangue humano, tendo isto, na próxima seção vamos tratar dos métodos que utilizamos para análise das amostras.

3.5 MÉTODOS DE ANÁLISES

Para que seja possível a descrição dos padrões de speckle gerados no processo de análise de bioatividade, são utilizados métodos estatísticos, as estatísticas de primeira e segunda ordem são usadas devido ao comportamento aleatório desses padrões (SILVA, 2007). Ao longo do processo experimental são utilizadas câmeras CCDs que captam e geram imagens que serão tratadas, esse tratamento de imagens nos dá informações como as matrizes THSP (Time History Speckle Pattern) e MCO (Matriz de Co-ocorrência), assim como, com o MI (momento de inércia) que corresponde a uma característica de textura obtido na matriz MCO.

Nessa seção, será exposto os princípios fundamentais para a compreensão do tratamento de imagens adquiridas ao logo do tempo de investigação da bioatividade sanguínea de equinos. Lidando com a evolução temporal dessas imagens através da THSP, e com o método de matrizes de Co-Ocorrências para analisar a alta e baixa atividade do sistema biológico. Ademais, é importante ressaltar que no decorrer do processo investigativo parâmetros como energia, entropia e homogeneidade são observados.

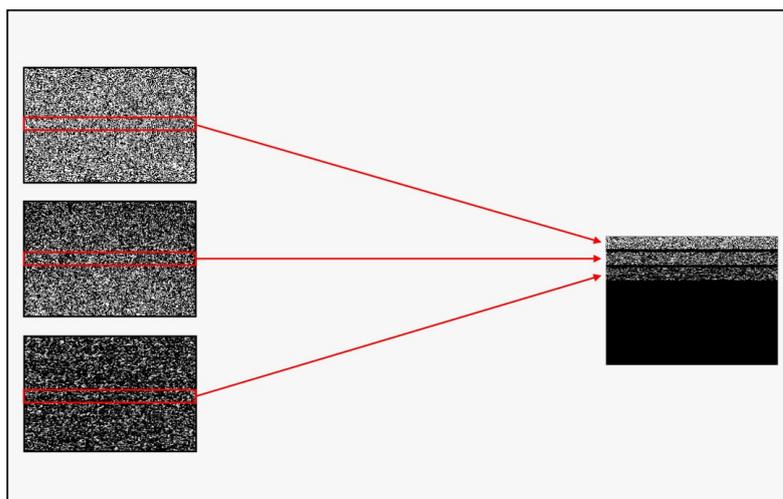
3.5.1 THSP

A THSP (Time History Speckle Pattern) ou História Temporal de Padrões de Speckle, possibilita a análise da intensidade do pixel de uma sequência de imagens, a THSP é um registro dessa história temporal e consiste na gravação de uma fileira de pixels em instantes sucessivos e na união dessas fileiras em uma única imagem. Deste modo, 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 de maneira a compor uma nova imagem em que registra essa evolução do padrão. Essa imagem gerada tem em sua horizontal

o conjunto de pixels que correspondem a distribuição espacial do padrão, e em sua vertical a evolução dos pixels no decorrer do tempo.

A figura 13 reproduz de forma ilustrativa o processo de composição da THSP, a linha foi escolhida arbitrariamente para representação, houve exagero nas dimensões para facilitar a visualização.

Figura 13 – Representação da formação da THSP

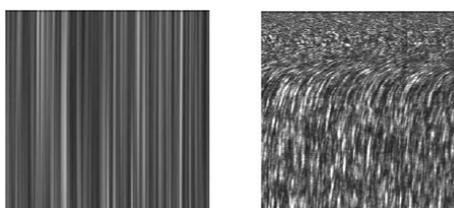


Fonte: A autora (2020).

A THSP vai variar de acordo com a superfície analisada, isso porque em superfícies estáticas o padrão apresenta pequenas variações de intensidade, porém em processos dinâmicos, é possível notar uma alta atividade e variações rápidas na intensidade dos pixels. Na figura 14 são mostradas THSPs em processos estáticos e dinâmicos, respectivamente.

Figura 14 – THSP em superfície estática e em processo de secagem de tinta

a) Superfície estática b) Secagem de tinta



Fonte: Silva (2007).

3.5.2 MCO

A matriz de Co-Ocorrência (ARIZAGA R.; TRIVI, 1999), ou simplesmente MCO, consiste em uma tabulação de quantas combinações diferentes de valores de intensidades dos pixels ocorrem em uma imagem. A matriz de Co-ocorrência é usada principalmente para descrever texturas em uma imagem, por meio de estatísticas para as ocorrências dos níveis de cinza em cada pixel.

A MCO analisa a relação entre dois pixels por vez, esses pixels são chamados de pixel de referência e pixel vizinho, a vizinhança não precisa ser exatamente de 1 pixel, pode assumir qualquer valor, pois cada pixel dentro da imagem torna-se o pixel referência, iniciando no canto superior esquerdo e procedendo até o inferior direito (SILVA, 2007).

De acordo com (CAMPOS et al., 2013), a MCO pode ser definida como uma função do tipo $P(i,j,d,e)$ que determina a probabilidade de ocorrência do valor da célula (i,j) , em que i e j são pixels vizinhos a uma distância d com relação a um ângulo e . Ou seja, cada pixel está localizado a um determinado ângulo com relação à posição do pixel de referência.

A MCO é computada sobre a THSP, podendo ser descrita como:

$$MCO = [N_{ij}] \quad (10)$$

Em que N_{ij} corresponde ao número de vezes que o valor de intensidade i é imediatamente seguido pelo valor de intensidade j na direção e sentido da evolução temporal, que ocorre na vertical para baixo. A forma normalizada da Matriz de co-ocorrência (eq. 11) é mais adequada para o uso. Para que possamos chegar nessa equação é preciso dividir cada elemento pelo somatório de todos os elementos da matriz, isso partindo da eq. 10, com a soma dos elementos sendo igual a 1:

$$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}} \quad (11)$$

Em que, cada elemento ij representa a probabilidade de um valor aparecer na matriz. Então, pode-se entender que a normalização é feita através da divisão do valor de cada célula da matriz, pelo somatório dos valores contidos nas células da matriz.

Para quantificar a dispersão dos pontos em torno da diagonal, podemos usar o cálculo do momento de inércia da matriz:

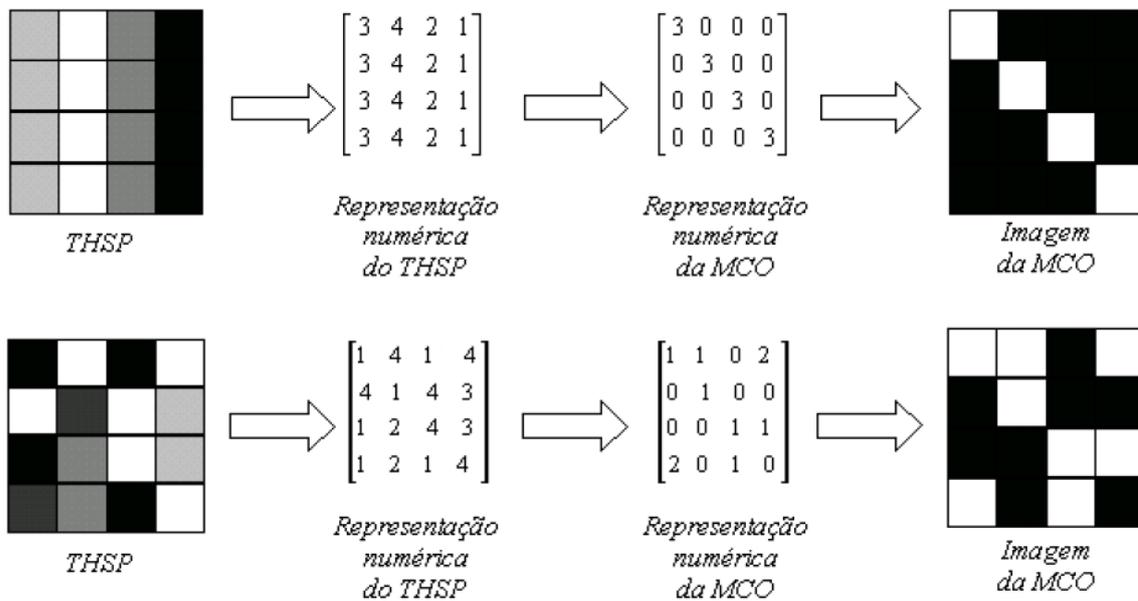
$$MI = \sum_{ij} M_{ij}(i - j)^2 \quad (12)$$

A forma assumida pelo índice calculado na eq. 12 possui uma grande semelhança com o momento de inércia (mecânica), assim, esse índice também recebe o nome de momento de intensidades. Esse indicador também é análogo a função estrutura utilizada na espectroscopia de foto-correlação (SILVA, 2007).

Na ocasião em que a superfície espalhadora é estática, ou seja, a THSP não apresenta variações de intensidade ao longo do tempo, somente a diagonal principal irá conter valores não nulos de ocorrências, entretanto, se a THSP apresenta alta atividade, os elementos não nulos estarão espalhados ao redor da diagonal principal, desse modo, quanto mais atividade na amostra maior a dispersão dos pontos ao redor da diagonal.

Na figura 15, é usado um exemplo de (SILVA, 2007) em que supõe uma situação em que a codificação dos tons de cinza foram feitas com 2 bits, obtendo uma matriz 4x4.

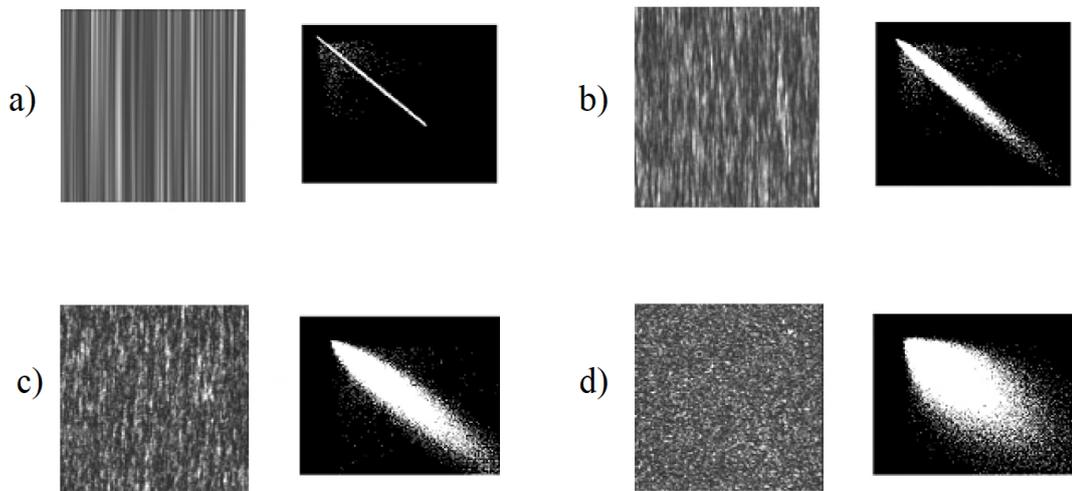
Figura 15 – Exemplo do calculo da MCO a partir da THSP estática (acima) e dinâmica (abaixo)



Fonte: Silva (2007).

Foi adotado na situação, que a cor 1 equivale ao preto, a cor 2 equivale ao cinza escuro, a cor 3 ao cinza e a cor 4 ao branco. Na ocasião em que a numeração tem forma aleatória, revela que houve mudança de intensidade dos pixels das imagens. A figura 16 apresenta a MCO correspondente a cada THSP:

Figura 16 – THSPs e suas respectivas MCOs



Fonte: Silva (2007).

Após a apresentação da técnica de Biospeckle, e do meio biológico no qual vamos trabalhar, neste capítulo também abordou-se quais os métodos utilizados para análises dos dados obtidos através da interação da luz com a amostra em questão. Tendo isto, no próximo capítulo partiremos para o procedimento experimental propriamente dito.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

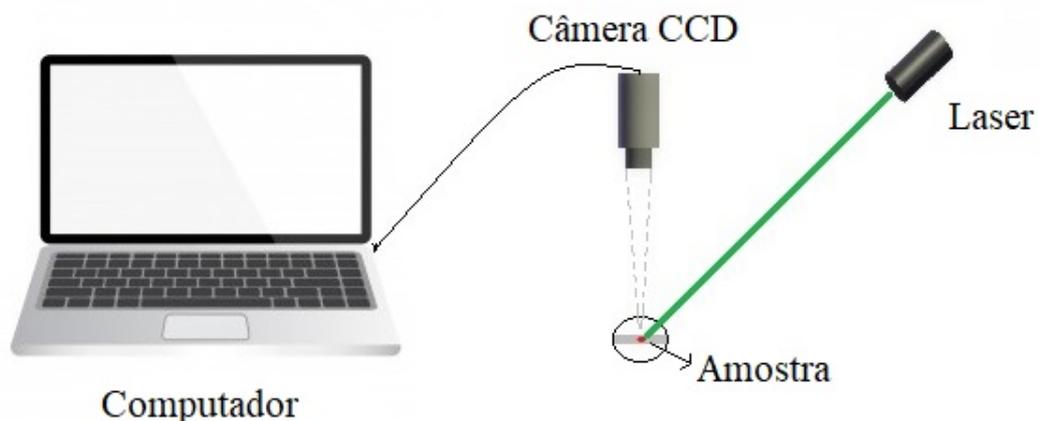
Os experimentos se deram em duas partes, na primeira parte, foi feita a análise de amostras de sangue puro, e na segunda, foram analisadas amostras de plasma sanguíneo, com a finalidade de observar a funcionalidade da técnica em ambas as situações.

Parte 1:

A princípio, foi utilizada a amostra de uma égua Mestiça de Quarto de Milha, o sangue foi obtido por venopunção na veia jugular esquerda, através do uso do sistema de coleta em tubos a vácuo com anticoagulante EDTA, e logo em seguida levadas aos testes no Laboratório de Espectrofotometria e Biospeckle do Núcleo de Ciências Exatas - NCEX (UFAL - Campus Arapiraca). Todas as coletas foram feitas por um profissional da medicina veterinária, que foi de suma importância para realização deste trabalho.

Com o auxílio de uma pipeta, parte da amostra (uma gota) foi deposta sobre uma lâmina e levada ao aparato experimental, composto por um laser de diodo operando no modo CW com comprimento de onda 532 nm (verde) e potência de 3mW, uma lâmina com a amostra, e uma câmera CCD (charge-coupled device) acoplada a um computador. Após colocada no aparato, incidiu-se luz laser sob a amostra, e as imagens dos padrões de speckle foram captadas e gravadas por 50 minutos, em seguida foi feito o tratamento do padrão do speckle gerado.

Figura 17 – Aparato Experimental 1



Com a finalidade de realizar um monitoramento eficaz da bioatividade, foram gravados vídeos minuto a minuto, o que totalizou 50 vídeos gravados de 1 minuto cada. Cada um dos 50 vídeos gerados foi fragmentado em frames, utilizando-se o Prompt de Comando da ferramenta FFMPEG, gerando-se em torno de 300 imagens para cada minuto.

As imagens dos padrões gerados captadas pela câmera, foram analisadas/tratadas utilizando um aplicativo computacional desenvolvido pelo laboratório de biospeckle. Esse programa caracteriza a evolução temporal do speckle, e por meio desses dados monta a matriz de co-ocorrência e nos fornece informações do processo evolutivo da amostra. Com esse dados, foram feitos gráficos para interpretação dos resultados.

Parte 2:

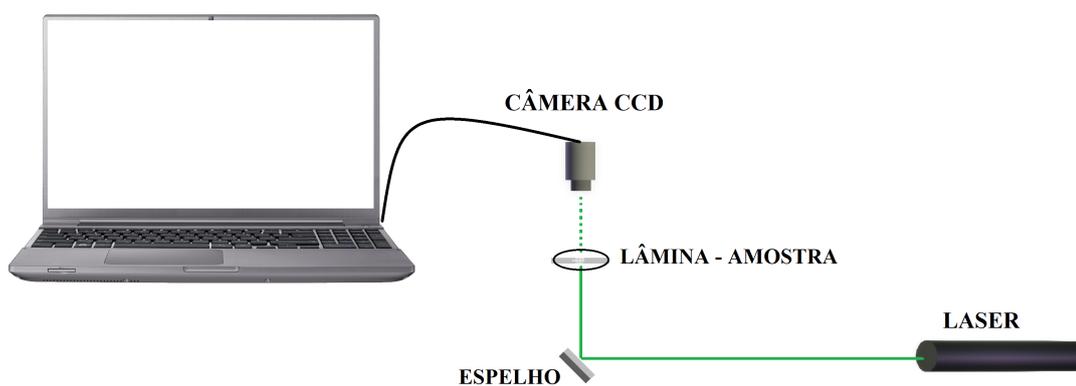
Na segunda parte, foram utilizadas 10 amostras de plasma sanguíneo de um grupo de éguas da raça Mangalarga Marchador. O sangue foi obtido por venopunção na veia jugular esquerda, através do uso do sistema de coleta em tubos à vácuo sem anticoagulante (Vacutainer®), as amostras foram levadas para o Laboratório de Fisiologia e Parasitologia Animal da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) - Campus Arapiraca, em caixa térmica hermeticamente fechada com temperatura em torno de 5°C.

As 10 amostras foram centrifugadas ao mesmo tempo durante 10 minutos, sendo 40 segundos de aceleração e 60 segundos de frenagem automática, a 3600RPM, gerando uma força de 2561g, separando-se o plasma para posterior análise. Em seguida, as amostras de plasma foram colocadas em micro tubos tipo Eppendorf de 1 ml, e encaminhadas nas mesmas condições de armazenamento, em caixa térmica já mencionadas, para o laboratório de Biospeckle do Núcleo de Ciências Exatas - NCEX (UFAL - Campus Arapiraca).

Com o auxílio de uma pipeta, parte de cada amostra (uma gota) foi deposta sobre uma lâmina e levada ao aparato experimental, composto por um laser de diodo operando no modo CW com comprimento de onda 532 nm (verde) e potência de 3mW, uma lâmina com a amostra, um espelho refletor e uma câmera CCD acoplada a um computador.

Após colocada no aparato, incidiu-se luz laser em direção ao espelho, que refletiu a luz na amostra, e através do processo de transmitância as imagens dos padrões de speckle foram captadas e cada amostra foi gravada por 45 minutos, em seguida foi feito o tratamento do padrão do speckle gerado.

Figura 18 – Aparato Experimental 2



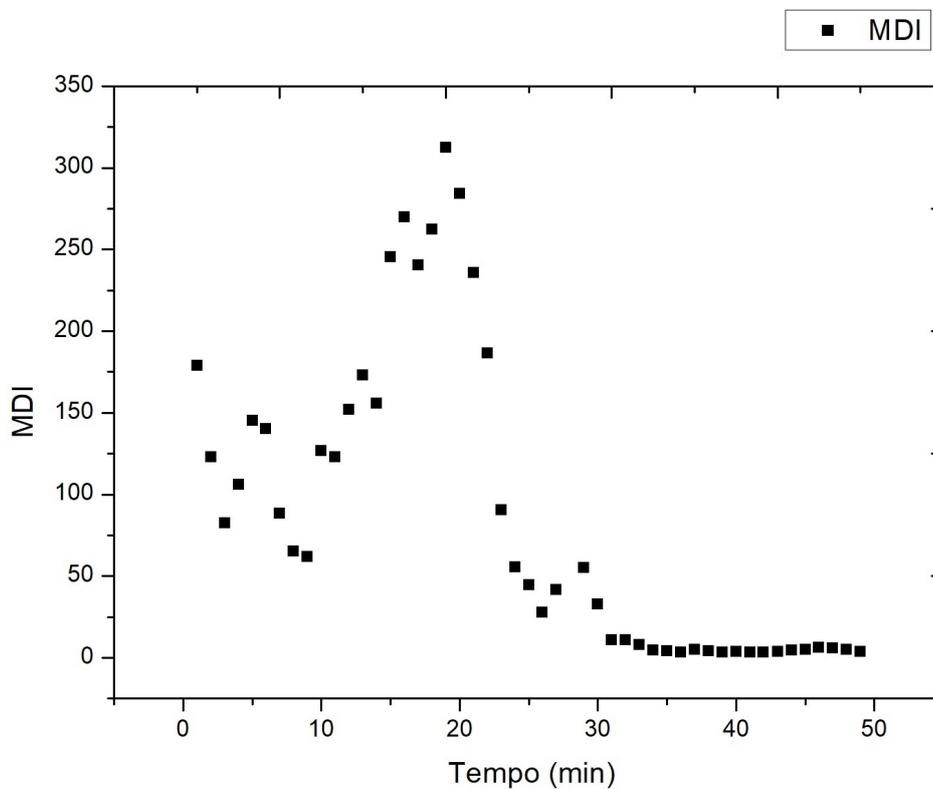
Fonte: A autora (2020).

Nesse processo, também com a finalidade de realizar um monitoramento eficaz da bioatividade, foram gravados vídeos minuto a minuto, o que totalizou 450 vídeos de 1 minuto cada. Cada um dos 450 vídeos gerados foi fragmentado em frames, utilizando-se o Prompt de Comando da ferramenta FFMPEG, gerando-se em torno de 450 imagens para cada minuto. As imagens dos padrões gerados captadas pela câmera, também foram analisadas/tratadas utilizando o aplicativo computacional desenvolvido pelo laboratório de biospeckle, e por meio desses dados, foram feitos gráficos para interpretação dos resultados.

5 RESULTADOS

Na primeira parte do processo de análise, a amostra de sangue puro que foi gravada por 50 minutos, nos forneceu o gráfico da figura 19, nele temos a evolução temporal do descritor de MDI (Módulo de Dispersão de Intensidades), que dispõe de informações a respeito da mudança do speckle, diante de uma variação do grau de agitação dos centros espalhadores da superfície. O gráfico foi produzido a partir dos resultados do momento de inércia em cada minuto:

Figura 19 – Gráfico do MDI do sangue puro



Fonte: A autora (2020).

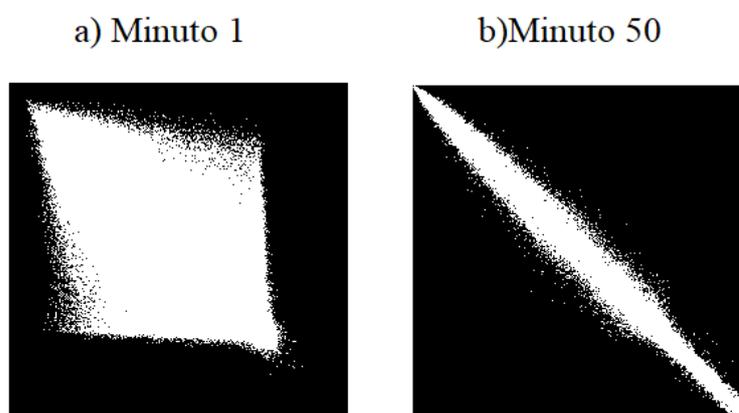
Podemos notar que no início da análise, ocorre uma movimentação considerável, esse fato está ligado a acomodação da amostra na lâmina. Após esse processo, a amostra segue uma curva progressiva entre 10 minutos e 20 minutos, onde atinge o pico máximo, e a partir desse ponto, começa o processo de decaimento da atividade, até praticamente cessar.

Podemos correlacionar a curva crescente inicial com o fato de que ao desidratar a amostra, que vai secando, pode abrir pequenas crateras, um tipo de craquelado, em que possibilita um

acesso interno do laser, onde há maior atividade, ou simplesmente uma reestruturação do sistema, devido a presença de substâncias bioativas. Da mesma forma que podemos associar essa queda de atividade com o fato de que a medida que a amostra vai secando, ocorrem mudanças, principalmente pela perda de líquido e pela deterioração de componentes.

O MDI é relacionado com a atividade biológica da amostra, comprovando que ao passar do tempo, nesse caso, a mostra sanguínea desidrata. Na figura 20, podemos ver o comparativo das matrizes de co-ocorrência (MCOs) no minuto inicial e final da análise.

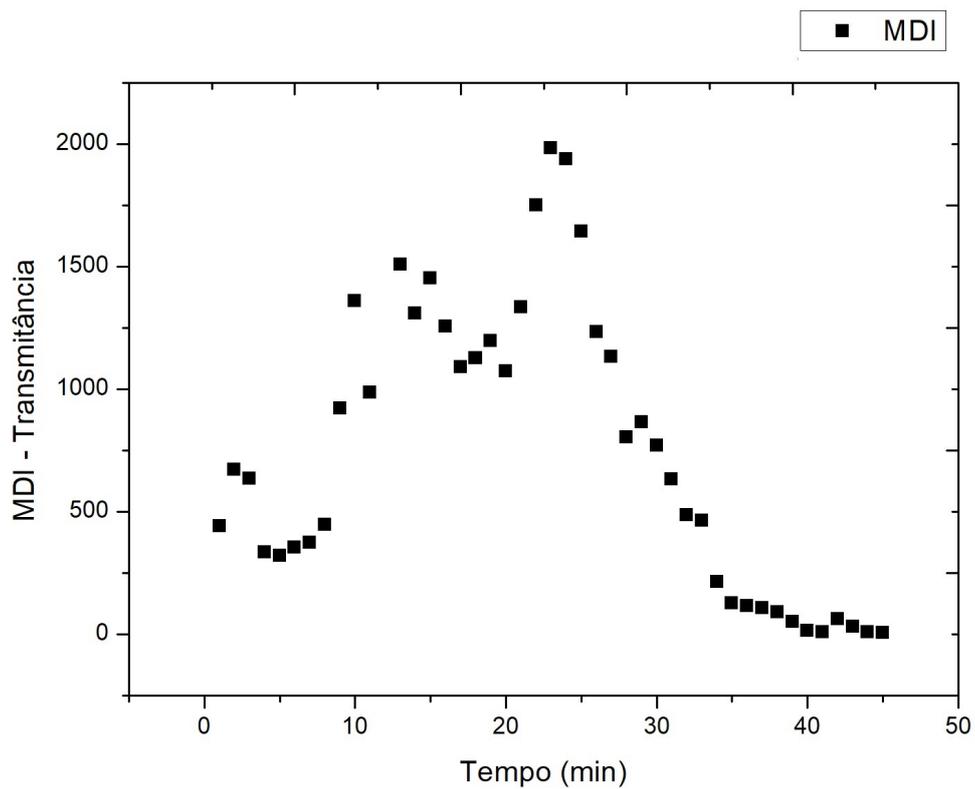
Figura 20 – Comparativo das MCOs do Sangue



Fonte: A autora (2020).

Na segunda parte do processo de análise, as 10 amostras de plasma sanguíneo que foram gravadas por 45 minutos. No gráfico da figura 21, temos a evolução temporal do descritor de MDI de uma das amostras que, como já dito, fornece informações a respeito da mudança do speckle. O gráfico foi produzido a partir dos resultados do momento de inércia em cada minuto:

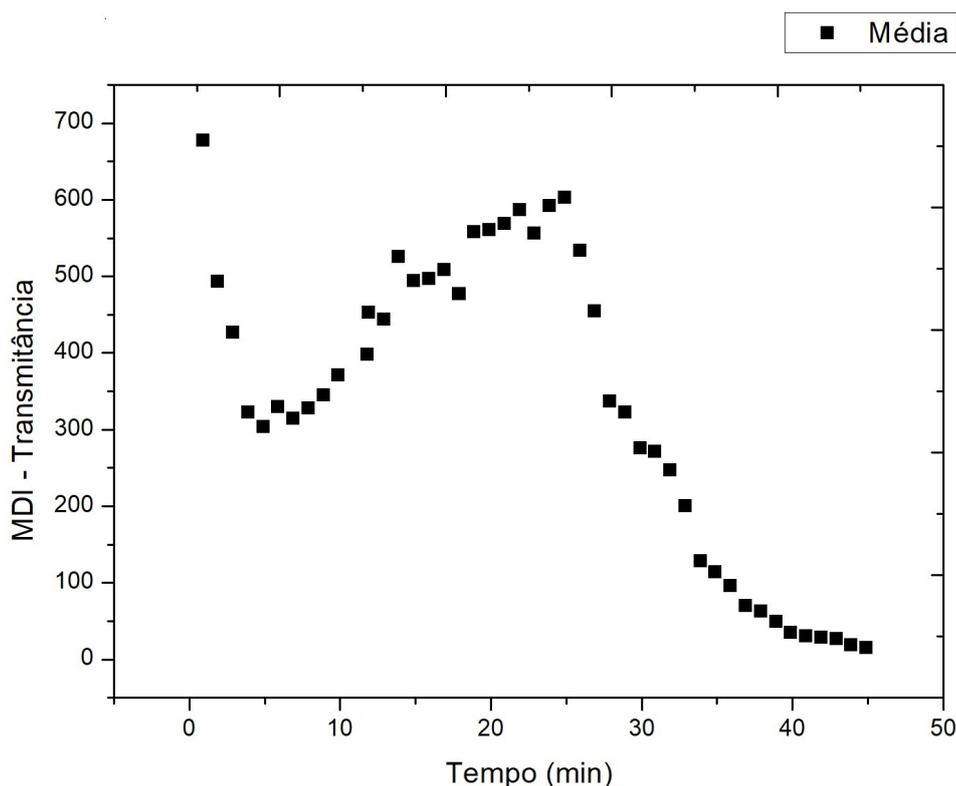
Figura 21 – Gráfico do MDI de uma amostra do plasma sanguíneo



Fonte: A autora (2020).

Após ver o comportamento dessa única amostra, foi feito um gráfico geral para o grupo analisado. No gráfico da figura 22, temos a média da evolução temporal do descritor de MDI, para produzi-lo, foi feita a média (10 amostras) dos valores do momento de inércia em cada minuto:

Figura 22 – Gráfico da média do MDI do plasma sanguíneo



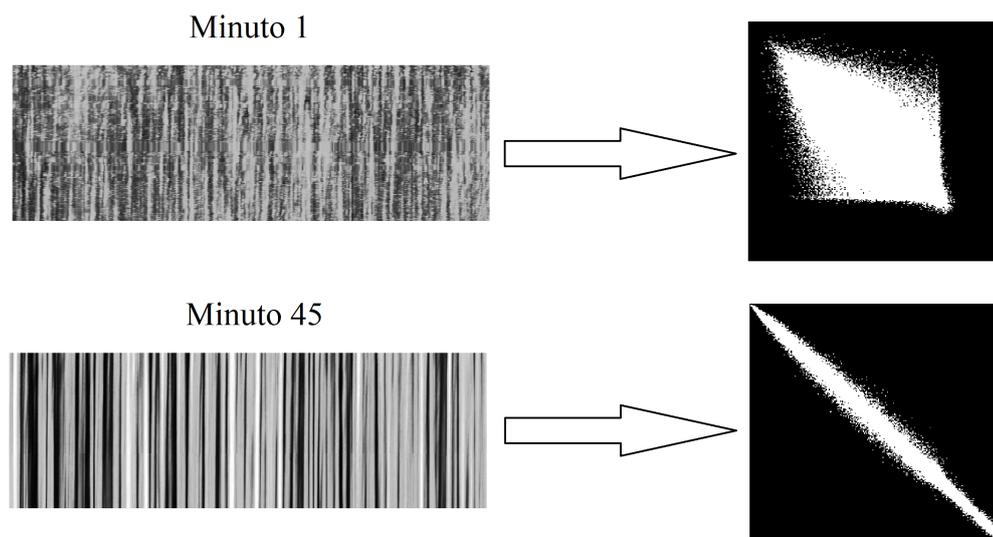
Fonte: A autora (2020).

Podemos notar que seguem o mesmo padrão, no início da análise, ocorre uma movimentação considerável, que como já falado, está ligada a acomodação da amostra na lâmina. Seguindo uma processo progressivo entre 10 min e 25 min, onde atinge o pico máximo, a partir desse ponto, começa o processo de decaimento, até praticamente cessar no minuto 45.

Aqui também podemos correlacionar a curva crescente inicial com uma reestruturação do sistema, devido a presença de substâncias bioativas, nesse caso não se trata apenas da superfície, já que temos um processo de transmissão. Da mesma forma, podemos associar a queda de atividade com o fato de que a medida que a amostra vai secando, ocorrem mudanças, pela perda de líquido e pela deterioração de componentes.

Para melhor visualizar o comportamento temporal da amostra, na próxima figura, podemos ver o comparativo das matrizes de co-ocorrência (MCOs), e suas respectivas THSPs, no minuto inicial e final da análise.

Figura 23 – Comparativo das THSPs e suas respectivas MCOs do Plasma Sanguíneo



Fonte: A autora (2020).

Portanto, de acordo com a História Temporal de Padrões de Speckle, e com a matriz de Co-Ocorrência, nossas amostras foram perdendo atividade no decorrer do tempo, assim sendo, por diminuir a movimentação do objeto difusor, também ocorre a diminuição de movimentação do grão de speckle.

6 CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho, foram apresentados os padrões de speckle e os mais importantes métodos de análises para interpretação do granulado óptico. Voltamos a nossa atenção para o biospeckle, devido ao fato de estarmos analisando tecidos biológicos, e diante dos resultados apresentados, é visto que podemos aplicar a técnica para monitoramento de atividade biológica de amostras de sangue, já que a mesma mostrou-se eficaz na avaliação do processo de coagulação.

Observamos também que em uma janela de tempo, houve processos internos de reestruturação do sistema, tais processos podem ser de origem metabólica e hormonal, como (NETO et al., 2019) trata em sua análise de fases gestacional de éguas usando a mesma técnica.

Dentre muitos aspectos positivos dá técnica aqui utilizada, podemos destacar a simplicidade do arranjo experimental, o que torna o método acessível, ressaltando o fato de não ser invasivo, detalhe extremamente importante quando se trata de análises de sistemas biológicos. A técnica fornece resultado eficaz na caracterização da evolução temporal dos padrões de speckle, então nota-se que as possibilidades de uso são diversas, podendo ser ferramenta utilizada para análise de situações de alteração de padrão bioquímico, que podem ser proveniente de doenças, não somente em equinos, como também em amostras de tecido humano.

REFERÊNCIAS

- ARIZAGA R.; TRIVIM.; RABAL H. Speckle time evolution Characterization by the co-occurrence matrix alyzing. **Optics and Laser Technology**, v. 31, p. 163–169, 1999.
- BRIERS, J. Dependência do comprimento de onda das flutuações de intensidade nos padrões de manchas de laser de amostras biológicas. **Comunicações Ópticas**, v. 13, p. 324–326, 1975.
- CÂMARA, M. **Anatomia e fisiologia humana**. Salvador, BA: Instituto Formação, 2014. Apostila.
- CAMPOS, B. S. **Avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana através da técnica de biospeckle**. 2013. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.
- GONZALEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. L. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. *In*: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1., 2003, Porto Alegre. **Anais [...]**. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2003.
- GOODMAN, J. W. Statistical properties of laser speckle patterns. *In*: DAINTY, J. C. (ed.). **Laser speckle and related phenomena**. Berlin: Springer, 1975. p. 9–75.
- HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de física v. 2**. Rio de Janeiro: LTC, 1991.
- MOREIRA, C. Tecido conjuntivo. **Revista de Ciência Elementar**, Casa das Ciências, v. 3, n. 1, jan./mar. 2015.
- WESTPHALEN NETO, C. W. **Avaliação do plasma sanguíneo de éguas em diferentes fases reprodutivas pela técnica de biospeckle**. 2019. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Alagoas, Unidade Educacional de Viçosa, Viçosa, 2019.
- OLIVEIRA, D. C. F. d. S. **Caracterização e classificação das propriedades ópticas de aerossóis na atmosfera de Natal, Brasil**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.
- PIRES, G.; TAGIAFERRI, A.; THAUMATURGO, C. Interferometria óptica para ensaios não destrutivos. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 21, 2002.
- POHL, H. H.; REUTER, É. M.; VIEIRA, F. M.; JOST, R. T.; MONTEGRO, R. B. Tecidos biológicos e suas formas de adaptação. **Cinergis**, v. 11, n. 1, 2010.
- RASTOGI, P. K. Techniques of displacement and deformation measurements in speckle metrology. **Optical Engineering**. New York: Marcel Dekker Incorporated, v. 38, p. 41, 1993.
- SILVA, E. R. da **Estudo das propriedades do biospeckle e suas aplicações**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- YOUNG, H. D. *et al.* **Sears e Zemansky física IV: ótica e física moderna**. São Paulo: Pearson, 2004.