

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

**BELIATO SANTANA CAMPOS**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA  
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE BIOSPECKLE**

**Maceió- AL**

**2013**

**BELIATO SANTANA CAMPOS**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA  
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE BIOSPECKLE**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Tereza de Araujo

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

Maceió-AL

2013

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

C198a Campos, Beliato Santana.  
A avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana através da técnica de biospeckle / Beliato Santana Campos. – 2013.  
71 f. : il.

Orientadora: Maria Tereza de Araujo.  
Co-orientador: Valentim dos Santos.  
Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Alagoas.  
Instituto de Física. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 67-71.

1. Biospeckle. 2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. 3. Padrão de speckle. 4. Imagens. I. Título.

CDU: 53.08



**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**

***“Avaliação da Eficácia da Terapia Fotodinâmica***  
***Antimicrobiana através da Técnica de Biospeckle”.***

por

***Beliato Santana Campos***

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), Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Marcelo Costa Oliveira, do Instituto de Computação da Universidade Federal de Alagoas, e Paulo César Oliveira, do Departamento de Física da Universidade Federal da Paraíba consideram o candidato aprovado com grau “ A ”.

Maceió, 22 de fevereiro de 2013

  
Prof. Dra. Maria Tereza de Araujo

  
Prof. Dr. Pedro Valentim dos Santos

  
Prof. Dr. Marcelo Costa Oliveira

  
Prof. Dr. Paulo César Oliveira

## **FAMÍLIA**

pela credibilidade em meus estudos.

À minha noiva Naiara Fonseca  
que mesmo distante, sempre me apoiou.

## AGRADECIMENTOS

A minha Orientadora Professora Maria Tereza que serei grato eternamente, 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 meu amigo e irmão Robenilson pela parceria e companheirismo, sempre me apoiando em momentos difíceis;

Ao meu amigo Henrique, amizade que levo pra vida toda, sempre solícito e companheiro nos estudos e nas “resenhas”;

Ao amigo Francisco “Chico” pelas contribuições sempre disposto a ajudar em tudo que precisei;

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

A professora Cristina Delgado por fazer a parceria durante nossa pesquisa no laboratório de microbiologia;

Aos Professores Cristina Kurachi e Vanderlei S. Bagnato por nos ceder a Curcumina;

As meninas Juliana e Amália que são meninas abençoadas por Deus, e que contribuíram muito para meu trabalho. Sou muito grato a vocês;

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

Aos ilustríssimos amigos Job, Ana, Paulo Borges, André, Wesley, Núccia, por sempre estarem à disposição para ajudar tanto nas disciplinas quanto no laboratório;

Ao amigo Jefferson pela grande contribuição nessa dissertação;

Ao amigo da Bat-Caverna Marlon pelas discussões, e aos amigos Pedro, Fábio, Zé Maria. Bem como as amigas Flavia e a Waléria companheiras de grupo;

Ao professor Elton Malta pessoa fundamental antes e durante o mestrado, a Sybelle pela boa vontade e receptividade, pessoas que realmente fizeram a diferença para que eu hoje estivesse fazendo o curso de mestrado na UFAL;

Aos mestres pelos ensinamentos durante as disciplinas;

Ao professor Ítalo sempre dando apoio;

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

## RESUMO

Este trabalho tem como tema principal a investigação à bioatividade de meio biológico sujeito à aplicação de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT - Antimicrobial Photodynamic Therapy). A investigação se dá mediante a aquisição de imagens granuladas chamadas padrões de speckle. Quando uma luz coerente (laser) incide sobre uma superfície de um meio biológico, ocorre um fenômeno óptico de interferência chamado *biospeckle* ou *speckle* dinâmico. Num meio biológico que está em atividade, as ondas incidentes sobre os centros espalhadores sofrem várias interferências. É possível obter informações desse sistema, tanto espacial quanto temporal, através do biospeckle. Para investigar a ativação e a inativação do microrganismo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), foram utilizados métodos de análise de imagens do tipo Correlação de Pearson, na 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. Além disto, o Momento de Inércia (MI) foi utilizado para quantificar a medida de dispersão dos pontos em torno da diagonal principal da matriz MCO. Foi realizado um estudo detalhado do comportamento desse meio antes, durante e depois da Terapia Fotodinâmica (PDT – Photodynamic Therapy), usando um arranjo experimental para obter o padrão de speckle por reflexão no monitoramento da cepa de bactéria. Para tanto fizemos uma discussão relacionada com o microrganismo estudado, apresentamos as propriedades da técnica de inativação PDT, do *biospeckle*, das ferramentas THSP, MCO e MI e alguns conceitos ópticos. Finalizando, mostramos nossos resultados, analisando os gráficos e figuras das matrizes obtidas na ativação e na inativação antes durante e após a aplicação da aPDT. No monitoramento durante 24 horas constatamos a ativação do *S. aureus* observando a modificação do grau de similaridade através da correlação de Pearson e da dispersão de ocorrências em torno da diagonal nas matrizes THSP e MCO, como também pelo alto valor de MI (37,574) obtido. Durante e após a aplicação da aPDT, observamos a inativação das bactérias usando os mesmos métodos descritos anteriormente onde bons resultados foram constatados. É esperado que, a partir destes resultados, a técnica *biospeckle* possa se tornar uma ferramenta de acompanhamento dos danos provocados pela aPDT.

Palavras-chaves: *Biospeckle*. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Padrão de *speckle*.

## ABSTRACT

This study has as a main focus the investigation of the bioactivity of biological media under the action of Antimicrobial Photodynamic Therapy. The investigation is based upon the acquisition of granulated images known as speckle patterns. When coherent light (laser) is directed towards a surface of a biological medium, an optical interference phenomenon called *biospeckle* or *dynamic speckle* occurs. In a live and full-activity biological medium, the waves incident on the scattering centers suffer multiple interference. It is possible to obtain information of this system, either spatial and temporal, through the biospeckle technique. In order to investigate the activation and inactivation of the microorganism *S. aureus*, imaging analysis methods such as Pearson Correlation, in which the degree of similarity between the collected images, the THSP matrices (Temporal History of the Speckle Pattern) and the COM (Co-occurrence Matrix) were used to determine the probability of the occurrence of intensities. Furthermore, the Moment of Inertia (MI) - to quantify the extent of scattering of the points around the main diagonal of a matrix - was used. It was performed a detailed study of the behavior of this medium before, during and after PDT, using the experimental arrangement to obtain the Speckle patterns for reflection in the monitoring of strain of bacteria. In this context, we will discuss the data with respect to the studied microorganism (*S. aureus*), will also present the properties of the inactivation PDT technique, the biospeckle, the THSP, MCO and MI analysis methods and some optical concepts. Finally, we show our results by analyzing the graphics and figures of matrices, obtained in activation and inactivation before during and after the application of the aPDT. In the monitoring during 24 hours we verify a activation of the *S. aureus* observing the modification of the degree of the similarity through of the Pearson Correlation and of dispersion occurrence around the main diagonal of matrixes THSP and MCO, with also by high value of MI (37,574) obtained. During and after the application of the aPDT, we observing a inactivation the bacteria using the same methods described above where good results were verified. It is expected that, based on the results, that the Biopesckle technique becomes an analysis tool to monitor the damage induced by Antimicrobial PDT.

Keywords: Biospeckle. Antimicrobial Photodynamic Therapy. Speckle Pattern.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema do processo de formação do granulado óptico com propagação em espaço livre. ....	14
Figura 2 - Padrão de <i>speckle</i> visualizado ao variar-se a distância de observação de 5 cm (a) e de 20 cm (b).....	16
Figura 3- <i>Speckle</i> dinâmico de semente de milho com fervilhamento .....	16
Figura 4- No arranjo (a) a técnica é analisada por reflexão e no arranjo (b) a técnica é analisada por perfusão .....	17
Figura 5- Arranjo experimental para medição de rugosidade por CAS .....	17
Figura 6- Imagem de lasers em vários comprimentos de onda. ....	18
Figura 7- Esquema de níveis de energia para a emissão estimulada .....	19
Figura 8- Refração da luz nos meios ar e água .....	20
Figura 9- Esquema de raios refletidos por uma superfície lisa (reflexão especular) (a) e por uma superfície rugosa (reflexão difusa) (b)... ..	20
Figura 10- Arranjo experimental básico utilizado em medidas de espalhamento da luz. ....	22
Figura 11- Espalhamento Mie para centros espalhadores diferentes... ..	23
Figura 12- Espalhamento geométrico .....	24
Figura 13- Superposição de ondas formando interferências construtivas (regiões claras) e interferências destrutivas (regiões escuras).. ..	26
Figura 14- Representação do experimento de Young, contendo duas fendas (a) e padrão formado no anteparo com franjas claras e escuras (b) .....	26
Figura 15- Diagrama de Jablonski .....	31
Figura 16- Açafroeira (a), raiz do açafrão e extrato em pó contendo curcumina como principal pigmento (b) .....	33
Figura 17- Fórmulas estruturais dos curcuminóides .....	33
Figura 18- Espectro de Absorção do sal de Curcumina .....	34
Figura 19- Morfologia do microrganismo pertencente ao gênero <i>Staphylococcus</i> spp.....	36

<b>Figura 20- Correlações lineares, positiva e negativa .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 21- Correlação entre X e Y .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 22- Representação de como montar uma THSP selecionando a linha 100.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 23- Superfície espalhadora estática .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 24- Superfície espalhadora com atividade .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 25- a) baixa atividade; b) média atividade; c) alta atividade .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 26- Fotografia do aparato experimental. (1) termopar; (2) laser em 637 nm; (3) filtro espacial; (4) sistema de aquecimento, iluminação para TFD com LEDs em 450 nm, filtro OG515 e webcam; (5) sistema de aquisição e tratamento de dados (PC+placa de aquisição de imagens).....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 27- Arranjo Experimental para investigação da bioatividade do S. aureus (1) usando termopar (2), LED (círculos azuis) para a aPDT e laser (linhas vermelhas) para a geração do padrão de <i>speckle</i>. A aquisição das imagens se dá através de uma webcam (3) com um filtro OG 515 (4) .....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 28- Aplicação da aPDT usando sal de curcumina e LED em 450 nm em Staphylococcus aureus .....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 29- Monitoramento da ativação de S. aureus através de correlação usando a estatística de Pearson .....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 30- Ativação do S. aureus. (a) THSP; (b) MCO. Monitoramento do 1<sup>o</sup> dia .....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 31- Monitoramento apresentado no Momento de Inércia .....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 32- Monitoramento do S. aureus, após a aPDT .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 33- Momento de Inércia Temporal após aPDT .....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 34- a) THSP; b) MCO.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 35- Monitoramento da correlação de imagens dos padrões de <i>speckle</i> durante a aplicação da aPDT por 5 minutos em S. aureus .....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 36- a) THSP; b) MCO, durante aplicação de luz por 5 minutos .....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 37- (a) THSP; (b) MCO, aplicação de luz 30 minutos .....</b>	<b>60</b>

<b>Figura 38- Momento de inércia ao longo de 30 minutos de aPDT .....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 39- a) THSP; b) MCO, resultado durante 30 minutos de aPDT .....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 40- Correlação de imagens durante os 30 minutos de aPDT .....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 41- Espectros de Absorção do meio biológico para as diversas configurações estudadas .....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variáveis X e Y .....	41
Tabela 2 - Momento de Inércia das MCOs .....	48

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1 A Técnica do Granulado Óptico – <i>Speckle</i></b> .....	13
<b>1.2 Laser</b> .....	18
<b>1.3 Reflexão e Refração</b> .....	20
<b>1.4 Espalhamento da luz</b> .....	22
1.4.1 Espalhamento Rayleigh .....	22
1.4.2 Espalhamento Mie .....	23
1.4.3 Espalhamento Geométrico .....	24
<b>1.5 Interferência e coerência</b> .....	24
<b>1.6 <i>Biospeckle</i></b> .....	27
1.6.1 Características do <i>biospeckle</i> .....	29
<b>1.7 Terapia Fotodinâmica – TFD</b> .....	29
<b>1.8 O Sal de Curcumina</b> .....	32
<b>1.9 Bactéria <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	35
<b>2 METODOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DO <i>BIOSPECKLE</i></b> .....	37
<b>2.1 Correlação de Pearson</b> .....	37
2.1.1 Calculando a correlação de Pearson .....	41
<b>2.2 História Temporal do Padrão de <i>speckle</i> (THSP)</b> .....	43
<b>2.3 Matrizes de Co-Ocorrência (MCO)</b> .....	44
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
<b>3.1 Investigação da inibição de <i>staphylococcus aureus</i> via apdt usando <i>biospeckle</i></b> .....	49
<b>4 RESULTADOS</b> .....	53
<b>4.1 Investigação da ativação do microrganismo <i>S. aureus</i> através de padrões de <i>speckle</i></b> .....	53

<b>4.2 Investigação da bioatividade do microrganismo <i>S. aureus</i> através de padrão de <i>speckle</i> após aplicação da aPDT .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3 Investigação da Inibição do crescimento do Microrganismo <i>S. aureus</i> através de Padrões de Speckle durante Aplicação da aPDT.....</b>	<b>58</b>
<b>4.4 Medidas de Absorção do Meio Biológico para as diversas configurações Investigadas .....</b>	<b>63</b>
<b>5 CONCLUSÃO/PERSPECTIVA .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A ciência tecnológica e a informação são peças fundamentais da vida humana na sociedade interligada globalmente. A aceleração com que os avanços tecnológicos vêm acontecendo é enorme, e a busca por técnicas mais apuradas que possam ser aplicadas a investigações diversas se torna essencial numa sociedade emergente, ou seja, em pleno crescimento. Trabalhar na investigação de uma técnica que seja menos invasiva, que não cause danos à amostra em estudo e que tenha aplicações em várias áreas e diversos meios, torna-se interessante e viável. Análise da atividade biológica em sementes ou em fungos, investigação do fluxo sanguíneo e secagem de pinturas, monitoramento de géis, espumas e corrosão de chapas, dentre outras, são aplicações da técnica conhecida como *speckle*.

Investigar o meio biológico em tempo real à aplicação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e, com isso, observar o processo de inativação das bactérias, foi a nossa motivação para desenvolver este trabalho de dissertação. Sendo assim, nossos objetivos foram centrados em utilizar técnicas (*speckle*) para investigar o meio biológico de interesse (*Staphylococcus aureus*) e analisar a ação da Terapia Fotodinâmica, observando ativação e inativação deste meio. Nesta introdução geral serão apresentadas definições, teorias e aplicações sobre *speckle* e suas particularidades.

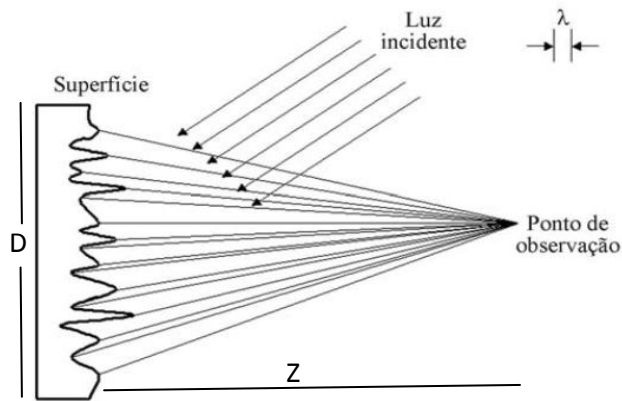
### 1.1 A Técnica do Granulado Óptico - *Speckle*

A técnica *speckle* faz uso de uma figura de aspecto granuloso (granulado óptico), formada por uma alternância de pontos claros e escuros devidos a interferências predominantemente construtivas ou destrutivas da luz coerente espalhada por uma superfície rugosa. Em 1976 Goodman [1] 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.

De início o fenômeno de speckle foi visto como um ruído óptico [2], no entanto logo se percebeu que o granulado era portador de informações sobre o objeto espalhador, o que podia ser associado a uma superfície rugosa. Ao ser incidido luz laser em uma superfície rugosa as ondas refletidas sofrem interferência formando o granulo óptico num ponto de observação (fig. 1).

**Figura 1- Esquema do processo de formação do granulado óptico com propagação em espaço livre.**



Fonte: Goodman JW, 1984 [2]

Historicamente, as tentativas para compreender o *speckle* observado estão relacionadas com a estrutura característica de um sistema espalhado, os primeiros estudos foram dados pela interação luz – matéria, tendo como pioneiros Goodman e Dainty entre 1960 e início de 1980 [3].

Os padrões de *speckle* são produzidos por uma superfície sob diferentes condições de iluminação. Ao ser incidido uma luz laser sobre uma superfície rugosa os raios refletidos interferem uns com os outros ao serem espalhados formando, assim, pontos claros e escuros.

A interferência é o fenômeno de superposição de ondas numa mesma região do espaço. Como resultado desta superposição de campos, ocorrem variações espaciais na intensidade resultante. Estas variações de intensidade são chamadas



de franjas de interferência. Quando há uma mudança na superfície iluminada, mudam-se também os caminhos ópticos entre cada ponto da superfície examinada e cada ponto do anteparo onde se forma o padrão de *speckle*. Sendo assim, os pontos de interferência são alterados formando um novo padrão de pontos claros e escuros captados por uma câmera CCD [4-7].

O padrão de *speckle* observado é resultante da superposição de dois diferentes padrões, sendo estes, os *speckles* grandes, provenientes do espalhamento superficial os quais dependem do ângulo de incidência e são modulados por *speckle* pequenos, produzidos pela luz que vem do interior do material, os quais apresentam uma dependência muito fraca do ângulo de incidência [8,9].

O tamanho do grão de um *speckle* estacionário corresponde ao diâmetro local luminoso circular de alta irradiância conhecido como disco de Airy [10] dado por:

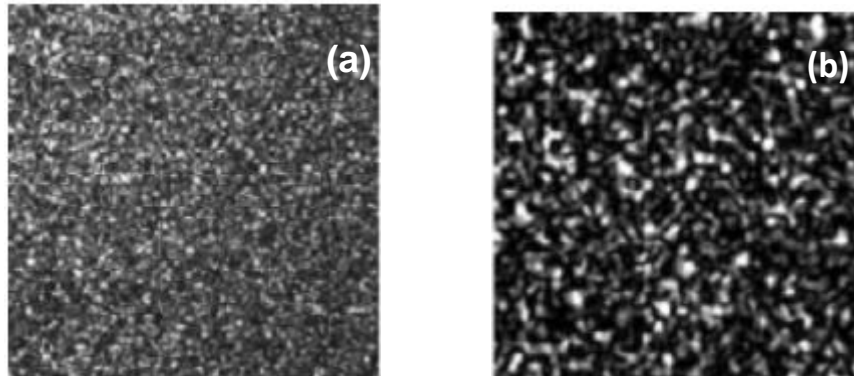
$$d = 2.44 \left( \frac{\lambda z}{D} \right) \quad (1)$$

onde  $d$  é o diâmetro do *speckle*,  $z$  a distância do observador até o granulado,  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz incidente, o valor 2.44 é um fator de correção e está relacionado com a difração e  $D$  é o diâmetro da área iluminada. Sendo assim, na propagação em espaço livre, o tamanho do grão de *speckle* muda em função do comprimento de onda da luz incidente, da distância de observação e do diâmetro da área iluminada. Na figura 2 podemos observar a variação no tamanho do grão ao variar-se a distância de observação.

A imagem do *speckle* também pode ser observada como um efeito de ferverilhamento, que pode ser analisado por diversas ferramentas matemáticas e estatísticas obtendo-se informações numéricas ou visuais da intensidade do movimento. As medições observadas pelas diversas ferramentas de análise, apresentam uma relação do nível de atividade como um resultado da soma de fenômenos causados pelo efeito Doppler da luz espalhada [11-14], um exemplo disso é o meio biológico, apresentando grande número de dispersores, a medida

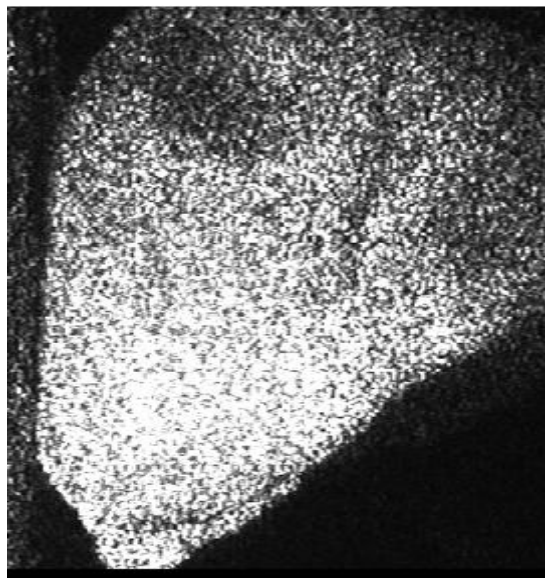
que esse meio está em alta atividade o efeito de ferverilhamento fica mais intenso (fig. 3).

**Figura 2 - Padrão de *speckle* visualizado ao variar-se a distância de observação de 5 cm (a) e de 20 cm (b).**



Fonte: DRAIJER M. 2009 [7]

**Figura 3 – *Speckle* dinâmico de semente de milho com ferverilhamento.**

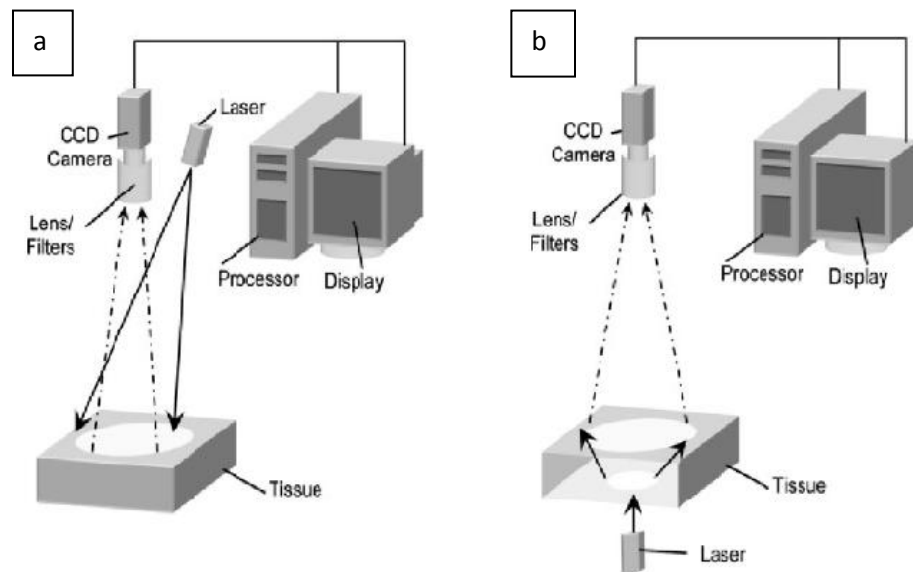


Fonte: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Speckle\\_din%C3%A2mico](http://pt.wikipedia.org/wiki/Speckle_din%C3%A2mico), 2012.

Padrões de *speckle* podem ser produzidos gerando interferência não só pela superposição das ondas refletidas pela superfície, mas também através da superposição de ondas que atravessam o meio investigado. Na figura 4 mostramos os arranjos experimentais usados para analisar as articulações de um dedo com o

intuito de identificar certa patologia, onde os padrões de *speckle* analisados foram gerados por interferência de ondas refletidas (fig. 4a) e transmitidas (fig. 4b) [15-17]. Esses tipos de arranjos experimentais podem ser utilizados em diversas investigações dependendo do interesse em questão.

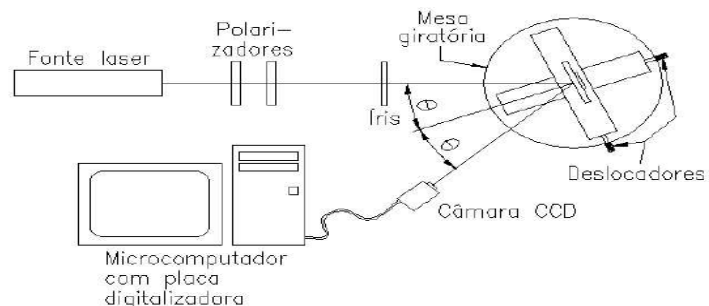
**Figura 4 - No arranjo (a) a técnica é analisada por reflexão e no arranjo (b) a técnica é analisada por perfusão.**



Fonte: DUNN, J. F. et al 2011. [17]

Outra forma de analisar uma superfície é usando a técnica da correlação angular de *speckle* (CAS), variando em ângulo a superfície que será analisada e mantendo o feixe do laser fixo (fig. 5). A técnica foi usada em monitoramento de corrosão de chapas de aço laminadas a frio para indústria automobilística e em estudo de modelo de corrosão de superfícies dentais de materiais utilizados em restaurações e próteses [18,19].

**Figura 5 – Arranjo experimental para medição de rugosidade por CAS.**



Fonte: PAIVA, Jr. R. D, MARAMATSU, M. 2004. [18]

Estudar os padrões de *speckle* em meio biológico é o objeto de investigação deste trabalho. Nas seções seguintes vamos tratar da fonte de iluminação usada e dos fenômenos que são a base da imagem granulada chamada *speckle*.

## 1.2 Laser

Uma descoberta importante para o estudo do *speckle* se deu na década de 60 com o advento do laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) descoberto por Theodore Maiman, o qual se tornou uma ferramenta essencial no uso dessa técnica e de várias outras aplicações. Essa radiação eletromagnética é gerada com características muito especiais: é monocromática, ou seja, tem frequência bem definida; é coerente, pois possui relações de fase bem definidas, além de ser colimada propagando-se como um feixe com baixa dispersão. Na figura 6 está explícito a monocromaticidade e a colimação de uma fonte de luz laser.

**Figura 6 - Imagem de lasers em vários comprimentos de onda.**



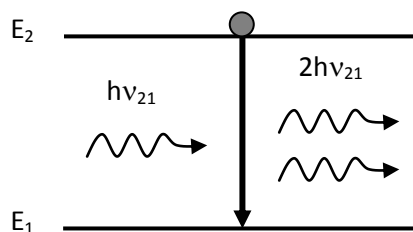
Fonte: <http://www.laserfast.org/laser/pictures.cfm>, 2012.

A luz laser advém de alguns aspectos da interação da radiação com os átomos ou moléculas que constituem os meios materiais, com sua emissão ocorrendo quando os elétrons decaem de seus níveis mais energéticos de forma estimulada. Basicamente, um laser é composto por uma cavidade óptica contendo dois espelhos em suas extremidades (um deles 100% refletor), um meio ativo (gasoso, sólido ou líquido) e uma fonte de alimentação ou bombeamento (fonte de corrente ou outra fonte de luz). O laser é uma fonte de intensa radiação eletromagnética que emite no intervalo de comprimentos de onda desde o

ultravioleta até o infravermelho e para sua existência é necessário que condições tais como inversão de população e emissão estimulada, sejam satisfeitas.

Suponha um fóton de energia  $h\nu_{21}$  que induz um átomo a realizar uma transição de um estado energético excitado de energia  $E_2$  para um estado de menor energia  $E_1$ , onde esse átomo passa a emitir um segundo fóton que, além da frequência, leva em sua “memória” outras características como: direção, fase e polarização, idênticas ao do fóton indutor. O surgimento desse segundo fóton é originado de um acoplamento entre a onda incidente e o sistema atômico, como ocorre nas ressonâncias durante um fenômeno ondulatório. O sistema atômico age como um amplificador de radiação, pois gera um fóton a partir da indução de um primeiro fóton dando início ao processo de emissão estimulada, gerando dois fótons idênticos. Estes dois fótons idênticos podem estimular outros dois, que agora, somados são quatro fótons idênticos e assim continuar o processo até formar uma enorme quantidade de luz uniforme emergindo do sistema (fig. 7) [20].

**Figura 7- Esquema de níveis de energia para a emissão estimulada**



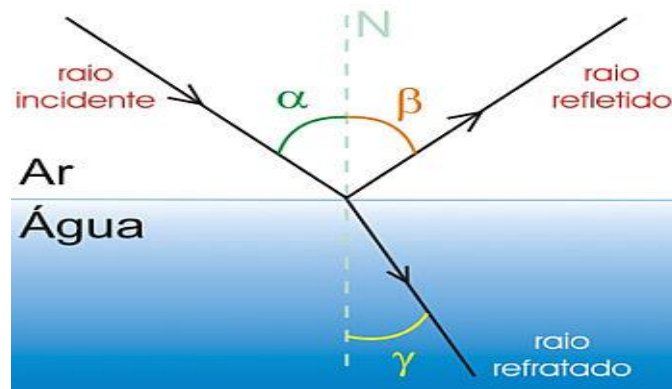
Fonte: Autor, 2013.

As áreas de aplicação da radiação laser são várias, como exemplos: estudos espectroscópicos; telecomunicações; na indústria por permitir cortes, alinhamento de máquinas e leituras precisas; na medicina trazendo uma série de benefícios como a laser-terapia, um dos importantes aplicativos da óptica moderna, em diversos tipos de cirurgias, diagnósticos e tratamentos; na odontologia; na oftalmologia e em tantas outras áreas mais que deixamos de citar. Nesta dissertação o uso do *laser* é de fundamental importância por aplicarmos uma técnica interferométrica que necessita de iluminação com radiação coerente para a devida formação dos padrões de *speckle*.

### 1.3 Reflexão e Refração

Quando uma onda de luz atinge uma superfície lisa separando dois meios transparentes, em geral a onda é parcialmente refratada (transmitida) para o outro material (fig. 8).

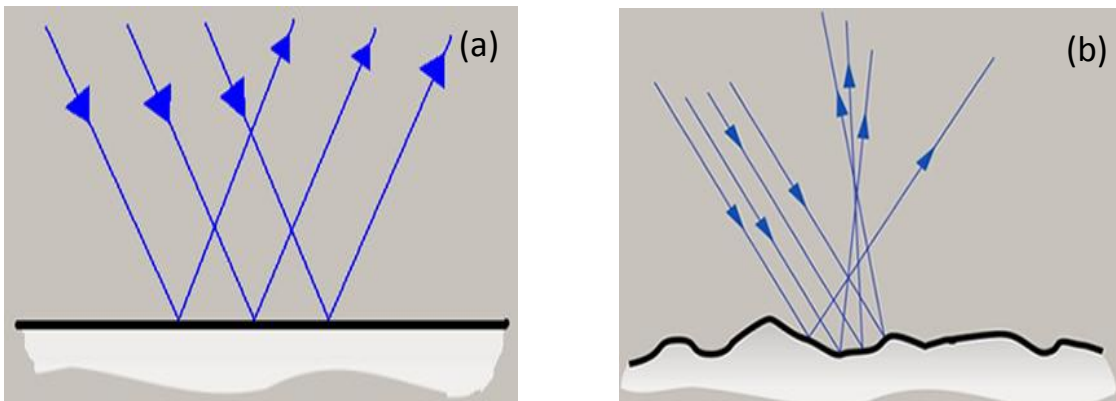
**Figura 8 - Reflexão e Refração da luz nos meios ar e água.**



Fonte: [www.fisicamoderna.uol.br](http://www.fisicamoderna.uol.br), 2012.

Na figura 8 mostramos uma descrição de raios incidente, refletido e refratado numa superfície lisa separando dois meios transparentes em relação aos ângulos que esses raios formam com a normal à superfície no ponto de incidência. Quando a superfície é rugosa, os raios transmitidos e refletidos são espalhados em diversas direções (fig. 9) e não existe um único ângulo de reflexão ou de refração [21].

**Figura 9 - Esquema de raios refletidos por uma superfície lisa (reflexão especular) (a) e por uma superfície rugosa (reflexão difusa) (b).**



Fonte: <http://www.alunosonline.com.br>.



Quando o ângulo de reflexão  $\beta$  é igual ao ângulo de incidência  $\alpha$  para todos os comprimentos de onda e para qualquer par de materiais, temos a lei da reflexão:

$$\beta = \alpha$$

Para luz monocromática e para um dado par de materiais, a e b, separados por uma interface, a razão entre o seno do ângulo  $\alpha$  e o seno do ângulo  $\gamma$  (fig. 8) é igual ao inverso da razão entre os dois índices de refração dos meios:

$$\frac{\text{sen}\alpha}{\text{sen}\gamma} = \frac{n_b}{n_a}, \text{ ou ainda, } n_a \text{sen}\alpha = n_b \text{sen}\gamma$$

Que é a Lei da refração de Snell. O conhecimento dos fenômenos associados à luz incidente numa superfície nos permite entender a superposição de ondas que gera o padrão de *speckle*.

Outro fenômeno que descreve os raios de luz incidentes em um meio é o espalhamento. Quando se olha para o céu, o que se vê é a luz solar que foi absorvida e depois retransmitida em várias direções, esse fenômeno denomina-se espalhamento de luz. As nuvens contêm uma concentração elevada de gotículas de água e de pequenos cristais de gelo que também espalham a luz. Por isso, a luz que passa através das nuvens possui mais centros de espalhamento de tipos diferentes do que no caso do céu sem nenhuma nuvem. Quando a luz passa por essas nuvens, com todos os comprimentos de onda, é espalhada em todas as direções o que faz as nuvens parecerem brancas [21]. Caso não houvesse atmosfera o céu seria negro, só conseguiria ver o sol se olhasse diretamente para ele. As cargas elétricas de cada molécula do ar atmosférico oscilam por causa da ação do campo elétrico da luz solar. Como a luz é uma onda transversal, a direção do campo elétrico de qualquer componente do feixe de luz solar permanece sobre um plano e o movimento das cargas deve ocorrer sobre esse plano.

O padrão de espalhamento não ocorre de forma aleatória, isto é, a distribuição da radiação emergente em diferentes orientações depende de algumas características das partículas que constituem o meio no qual a radiação se propaga. Uma dessas características é a razão entre o tamanho da partícula espalhadora e o

comprimento de onda da radiação incidente. Descreveremos, a seguir, alguns tipos de espalhamento para um melhor entendimento.

#### 1.4 Espalhamento da luz

Células biológicas compreendem um tamanho de escala que vão desde submicrométricas até mais de 20 micrometros, portanto elas podem ser menores ou maiores que o comprimento de onda de luz. O espalhamento Rayleigh, onde mesmo um composto subcelular (organela) pode ser um centro espalhador, é de particular interesse na interação luz-matéria [22]. A seguir descreveremos alguns espalhamentos de interesse ao investigarmos meios túrbidos.

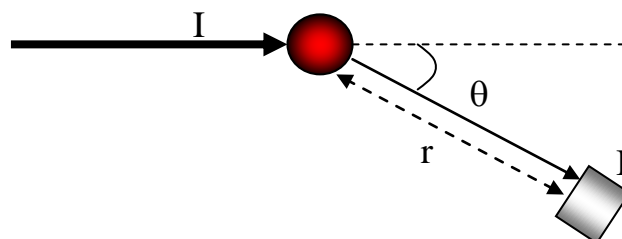
##### 1.4.1 Espalhamento Rayleigh

Para o espalhamento Rayleigh os centros espalhadores apresentam dimensões inferiores ao comprimento de onda da radiação incidente. De acordo com a teoria [23], 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 escrita como:

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

onde  $I_0$  é a intensidade da radiação incidente não polarizada, de comprimento de onda  $\lambda$ , que incide sobre a partícula,  $\epsilon_0$  é a permissividade elétrica e  $\alpha$  é a polarizabilidade do material que forma a partícula. O ângulo  $\theta$  é aquele formado entre o feixe de radiação incidente e o feixe da radiação espalhada, sendo que a intensidade  $I$  é medida a uma distância  $r$  da partícula de acordo com a figura 10.

**Figura 10 - Arranjo experimental básico utilizado em medidas de espalhamento da luz.**



Fonte: Autor, 2013.



A intensidade da luz espalhada em um ângulo  $\theta$ , por um número  $N_p$  de partículas por unidade de volume é dada por:

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{9\pi^2 (n_1^2 - n_0^2)^2}{2\lambda^4 r^2 (n_1^2 + 2n_0^2)^2} v^2 N_p (1 + \cos^2 \theta), \quad (3)$$

Onde  $v$  é o volume de uma partícula. Nessa equação, os termos  $1$  e  $\cos^2\theta$  refere-se, respectivamente, às componentes polarizadas vertical e horizontalmente da luz espalhada.

#### 1.4.2 Espalhamento Mie

O espalhamento causado por uma partícula esférica de tamanho arbitrário foi descrito analiticamente por Mie, a partir das equações de Maxwell, em 1908, deduzindo como ondas eletromagnéticas de comprimento de onda  $\lambda$  são perturbadas ao interagirem com esferas homogêneas de raio  $r$ . No espalhamento Mie as dimensões dos centros espalhadores são da mesma ordem do comprimento de onda da luz incidente. Esse tipo de espalhamento é muito utilizado para descrever a interação das partículas de aerossol e gotas de nuvens com a radiação eletromagnética, em particular, no espectro solar [24]. Esse tipo de espalhamento explica a questão das nuvens serem brancas, o comprimento de onda da luz visível é da mesma ordem das gotículas de água.

Pode-se chamar também espalhamento elástico provocado por espalhadores da mesma ordem do comprimento de onda da luz incidente. Espalha, preferencialmente, para frente, como na figura 11. Este modelo resulta das equações de Maxwell para esferas homogêneas.

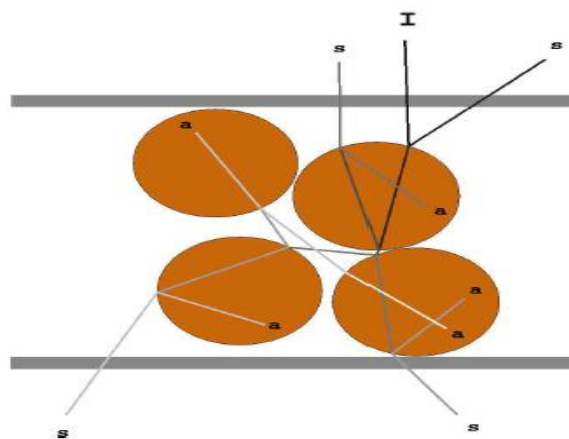
**Figura 11 - Espalhamento Mie para centros espalhadores diferentes.**



### 1.4.3 Espalhamento Geométrico

No espalhamento geométrico as dimensões dos centros espalhadores são grandes quando se compara com o comprimento de onda  $\lambda$  da luz incidente. Esse espalhamento é caracterizado por acontecer várias reflexões e refrações no interior da partícula (fig. 12), de modo que a óptica pode ser descrita pela óptica geométrica, daí o nome de espalhamento geométrico [25].

**Figura 12 - Espalhamento geométrico.**



Fonte: Silva, ER. 2007 [75].

Com esses três tipos de espalhamento apresentados, pode-se definir uma teoria adequada, dependendo do meio em estudo e do comprimento de onda da luz incidente. Os tecidos biológicos apresentam estruturas com dimensões que variam pouco da casa dos nanômetros para dezenas de micrômetros, com isso, as teorias mais utilizadas para descrever espalhamentos em meios biológicos são os espalhamentos Mie e o geométrico.

### 1.5 Interferência e coerência

O termo interferência indica a superposição de duas ou mais ondas na mesma região do espaço. Quando isso ocorre, a onda resultante em qualquer ponto em um dado instante é determinada pelo princípio da superposição, ou seja, quando duas ou mais ondas se superpõem, o deslocamento resultante em qualquer ponto em um dado instante pode ser determinado somando-se os deslocamentos instantâneos de cada onda como se estivesse presente sozinha.

De acordo com Freedman e colaboradores [21], os efeitos de interferência podem ser estudados com mais facilidade quando combinamos ondas senoidais com uma única frequência ( $f$ ) e comprimento de onda  $\lambda$ .

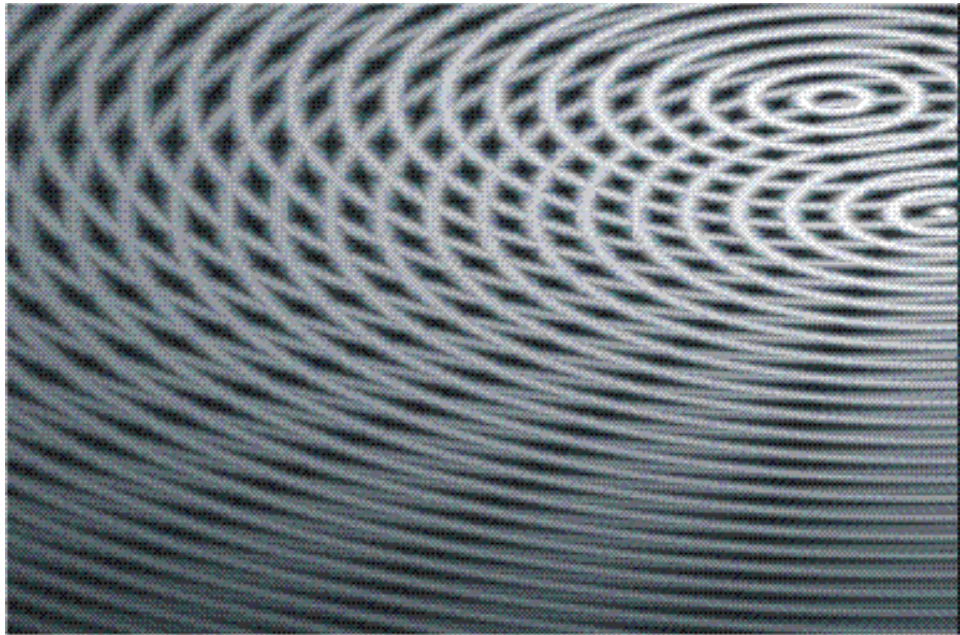
Quando as duas ondas se propagam em duas dimensões, como ondas na superfície de um líquido, as circunferências representam frentes de ondas circulares, e quando as ondas se propagam em três dimensões, as circunferências representam frentes de onda esféricas que se espalham para fora a partir de uma fonte. Se duas fontes idênticas de ondas monocromáticas sofrem interferência, as duas fontes produzem ondas com a mesma amplitude e o mesmo comprimento de onda  $\lambda$ , além disso, as duas fontes estarão permanentemente em fase vibrando em sintonia. Elas poderiam ser produzidas por dois agitadores sincronizados em um tanque de ondas, por dois alto-falantes impulsionados pelo mesmo amplificador, por duas antenas alimentadas pelo mesmo transmissor ou por dois pequenos orifícios ou fendas em um anteparo opaco iluminado pela mesma fonte de luz monocromática. Dizemos que duas fontes monocromáticas com a mesma frequência são coerentes quando há relação de fase constante entre elas (as duas fontes não precisam estar necessariamente em fase).

Se ondas provenientes de duas ou mais fontes chegam a um ponto em fase, a amplitude resultante é a soma das amplitudes das ondas individuais, esse efeito constitui a interferência construtiva. Se as amplitudes das ondas individuais são iguais e a amplitude resultante é igual a zero, esse cancelamento completo ou parcial das ondas individuais é chamado de interferência destrutiva (fig. 13).

Na Figura 14 representamos esquematicamente o caso de uma frente de onda plana atravessando duas fendas e o padrão formado em um anteparo a uma distância  $D$  das fendas, a distância típica entre as fendas é da ordem de alguns milímetros, ao passo que a distância entre o anteparo e as fendas costuma ser da ordem de metros. Assim a diferença de caminho é dada por:  $r_2 - r_1 = d \sin \theta$ .

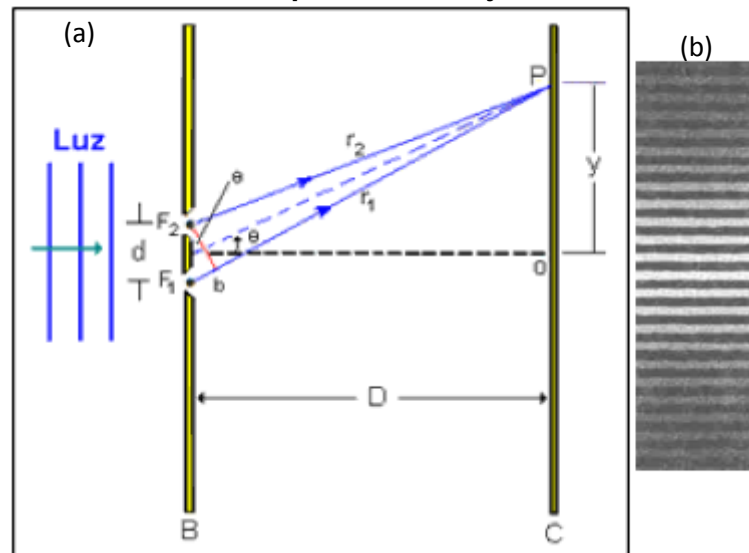
Para uma interferência construtiva,  $r_2 - r_1 = m\lambda$ , onde ( $m=0, \pm 1, \pm 2, \dots$ ) e as ondas estão em fase. No caso de interferência destrutiva,  $r_2 - r_1 = (m + \frac{1}{2})\lambda$ , onde ( $m=0, \pm 1, \pm 2, \dots$ ) e as ondas não estão em fase.

Figura 13 - Superposição de ondas formando interferências construtivas (regiões claras) e interferências destrutivas (regiões escuras).



Fonte: Young, 2004 [21].

Figura 14 - Representação do experimento de Young, contendo duas fendas (a) e padrão formado no anteparo com franjas claras e escuras (b).



Fonte: Young, 2004 [21].

Para se obter a formação de claros e escuros num experimento utilizando duas fendas, utilizamos as seguintes equações, assim,

$$d \sin \theta = m \lambda, \quad (4)$$

com ( $m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$ ) para interferência construtiva temos o seguinte,

$$d \sin \theta = \left( m + \frac{1}{2} \right) \lambda \quad (5)$$

com  $(m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots)$  para interferência destrutiva.

## 1.6 *Biospeckle*

Várias são as propostas para analisar um sistema biológico de forma que essa análise não venha a interferir no meio em estudo. Desde a década de 80 pesquisadores tem buscado encontrar métodos de diagnóstico não invasivos [5, 22]. Uma técnica que está sendo muito utilizada é o *biospeckle* ou *speckle* dinâmico, que se baseia em um fenômeno óptico de interferência que ocorre quando uma luz coerente (laser) incide sobre uma superfície onde se desenvolve um sistema em movimento.

Essa técnica de *biospeckle* tem sido muito estudada e são muitas as propostas para medir, por exemplo, a atividade de espécimes biológicos, fluxo sanguíneo e outras aplicações estudadas pela medicina [26].

Segundo Briers [4], 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.

O fenômeno de interferência da luz laser em uma superfície em plena atividade pode ser observado em sementes, fungos, frutos, fluxo sanguíneo, parasitas, filmes biológicos, raízes e sêmen. Quando o objeto difusor se move o grão

de *speckle* também se move, assim essa imagem produzida pela interferência da luz laser nos dá informações sobre o movimento do objeto, esse fenômeno é bem parecido a um líquido em ebulição ou a um fervilhamento quando esse meio está em plena atividade.

Com essa variedade de aplicações muitos trabalhos propõem formas de interpretar os resultados obtidos através do *speckle*, como Asakura e colaboradores [26] que mede o tempo de vida do grão do *speckle*, esse processo tem como objetivo determinar o instante onde a função de autocorrelação da história temporal do *speckle* atinge metade do valor máximo. Em 1999 Rabelo e colaboradores [27] trabalharam com o método cumulantes estatísticos para caracterizar a atividade do padrão de *speckle* que varia com o tempo.

Neste trabalho, utilizaremos um método bastante interessante (matriz de Co-Ocorrência) já estudado por ARIZAGA e colaboradores [28] para caracterizar a evolução temporal do *speckle* baseado no número de ocorrências da transição de intensidade de elementos com relação aos pixels vizinhos na imagem do *speckle*.

Encontramos a aplicação do método matriz de Co-Ocorrência em simulações numéricas de *speckle*, em que o arranjo experimental se deu na análise de secagem de pinturas em placas metálicas. Para fazer a comparação entre as imagens na secagem de pinturas, foi usado um método já estabelecido denominado medidas gravimétricas, o qual utiliza processos ópticos para medição da perda de peso de uma amostra. Na secagem de pinturas também se usa muito técnicas relacionadas ao *biospeckle*, encontramos relatos de que técnicas como a do contraste do *biospeckle* são alternativas que permitem caracterizar quão rápido é esse processo de secagem e que a aplicação de procedimentos usando essa técnica permite um estudo bem detalhado do sistema de interesse [29].

Quando se faz um estudo em um meio que não seja biológico, a superfície deve conter rugosidade, para que as ondas refletidas sofram sucessivas interferências, para daí se obter alguma informação sobre a superfície em estudo, nesse caso o estudo será espacial e não temporal, pois a superfície não está mudando com o tempo. Para um meio biológico que está em atividade, os centros espalhadores fazem essas ondas sofrerem várias interferências e podemos obter

informações desse sistema tanto espacial quanto temporal, pois com o passar do tempo esse meio se modifica.

### 1.6.1 Características do *biospeckle*

Quando a luz atinge uma superfície cada ponto funciona como um emissor de ondículas secundárias [21]. No caso em que a superfície tenha características de rugosidade com seus centros espalhadores distribuídos ao acaso, suas fases iniciais varia aleatoriamente, daí essas ondas fazem caminhos distintos para cada ponto no plano de observação, e a superposição dessas ondas gera interferência, cujas intensidades também vão variar ao acaso formando os padrões de speckle. Esses processos traz um caráter estatístico com o grânulo óptico, sendo que quando o meio está se movimento o parâmetro tempo é levado em consideração dando caráter ao speckle dinâmico, de forma que sua análise segue tratamento semelhante ao passeio aleatório no plano complexo [30].

Outra característica é a configuração do aparato experimental, quando não se coloca algum tipo de artefato óptico entre a superfície espalhadora e o sensor para captar as imagens, chamamos de propagação em espaço livre e dizemos que temos um padrão de *speckle* objetivo. Quando se coloca uma lente entre a superfície espalhadora e a câmera CCD, chamamos de speckle subjetivo.

Neste trabalho, o meio utilizado foi um microrganismo vivo, onde se investigou a ativação e a inativação via Terapia Fotodinâmica (TFD) da cepa de bactéria *in vitro*. Nessa análise foi utilizada a técnica de *biospeckle*, tema central desta dissertação, daí a necessidade de compreender essa técnica e conhecer melhor os trabalhos da literatura.

## 1.7 Terapia Fotodinâmica – TFD

A Terapia Fotodinâmica (TFD) do inglês, *Photodynamic Therapy*, ou PDT é uma promissora modalidade de tratamento do câncer e doenças não oncológicas. Caracteriza-se por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorre após a administração de compostos fotossensibilizantes que apresentam maior afinidade por tecidos neoplásicos (doentes), seguido pela irradiação com luz



visível [31,32]. Para aplicação da PDT são necessários três fatores: o fotossensibilizador, a fonte de luz e o substrato biológico.

Com relação ao mecanismo, a base da terapia fotodinâmica consiste na interação da luz com comprimento de onda adequado com um composto não tóxico, denominado fotossensibilizador (FS), e oxigênio (fig. 15). O FS no estado fundamental ( $S_0$ ) absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um nível eletrônico de maior energia (estado excitado singleto), do qual aquele agente pode retornar ao estado fundamental por processos radiativos (fluorescência ou fosforescência) ou não radiativos (conversão interna, cruzamento intersistemas ou relaxações vibracionais). Dentre estes processos de decaimento energético, o cruzamento intersistema é fundamental para a terapia fotodinâmica (transição proibida por spin, onde o fotossensibilizador no estado eletrônico excitado singleto ( $S_1$ ) sofre uma transição para o estado excitado tripleto ( $T_1$ )).

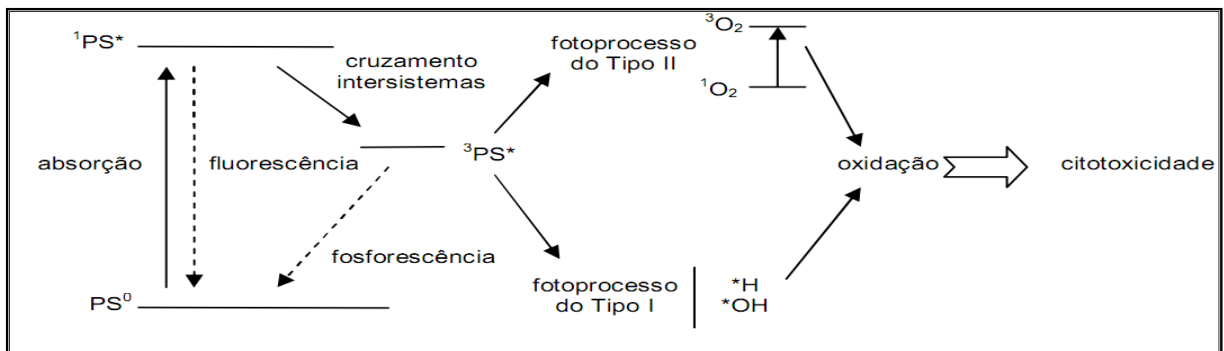
Na reação do tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado pode agir removendo um átomo de hidrogênio de uma molécula do substrato biológico (fosfolípidios, proteínas, colesterol entre outros) ou transferindo elétrons, gerando íons radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental resultando em produtos oxidados responsáveis pela cadeia de radicais livres gerados, como radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e radical hidroxila (OH), capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas [33].

A reação do tipo II é iniciada quando o FS no estado excitado singleto decai para o estado excitado tripleto, por meio do cruzamento intersistema. Assim o FS, neste estado (tripleto), pode transferir energia ao oxigênio molecular no estado fundamental (tripleto), via um processo de transferência de energia durante uma colisão, produzindo oxigênio singleto. O oxigênio singleto é uma forma altamente reativa de oxigênio e é considerado o principal mediador do dano fotoquímico causado à célula por muitos fotossensibilizadores. O oxigênio singleto possui tempo de vida em água de aproximadamente 4  $\mu s$  e em sistemas biológicos esse tempo é extremamente baixo, inferior a 0,04  $\mu s$ . Em função disso, seu raio de ação é extremamente reduzido (<0,02  $\mu m$ ), atuando apenas onde é produzido, fato muito importante para a PDT que se baseia no efeito fotodinâmico localizado [34].



A eficiência do processo fotodinâmico aumenta quando o rendimento quântico, o tempo de vida do estado tripleto do fotossensibilizador e do estado singleto do oxigênio ( $^1\text{O}_2$ ) aumentam [35]. O rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) pode ser definido como a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número total de fótons absorvidos, ou seja, de moléculas excitadas. O rendimento quântico ( $\Phi$ ) pode também ser analisado pela razão entre o número de partículas danificadas pelo número de fótons absorvidos [36], na figura 15 um diagrama ilustra essas reações citadas.

**Figura 15 - Diagrama de Jablonski**



Fonte: Adaptado NIEMZ, 2003 [33].

Em 1976 Wainwright [37], postulou que o oxigênio no seu estado excitado (singleto), gerado pela transferência de energia via colisão do agente fotossensibilizador no estado excitado (tripleto) para o oxigênio molecular no estado fundamental (tripleto), era o agente citotóxico responsável pela desativação de células tumorais (fotossensibilização do tipo II mostrada na figura 15).

Atualmente, além dos efeitos fotoquímicos serem usados para tratamento de cânceres, há vários outros métodos fotodinâmicos de indicações médicas já em uso ou em estudos experimentais, tais como em dermatologia, oftalmologia, gastroenterologia e cardiologia. Além disso, microrganismos tais como bactérias, fungos, leveduras e vírus também podem absorver o fotossensibilizador e serem inativados por luz visível apropriada, em um processo denominado Inativação Fotodinâmica (em inglês, *Photodynamic Inactivation* - PDI), Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (em inglês, *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*

- PACT), ou ainda, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (em inglês, *Antimicrobial Photodynamic Therapy* aPDT ).

A primeira publicação da ação de corantes em terapia fotodinâmica ocorreu em 1900 por Oscar Raab [38], na qual esse autor descreveu que a acridina juntamente com a luz atuava sobre *Paramecia*, e provocava a morte desse organismo unicelular.

Um mecanismo importante na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é a aplicação da luz que pode ser de uma lâmpada, um *LED* (diodo emissor de luz) ou um *laser*. Os *LEDs* vêm sendo muito utilizados em Terapia Fotodinâmica por apresentarem um baixo componente térmico, os custos serem menores e por apresentarem uma pequena largura de banda espectral em relação às lâmpadas convencionais de tungstênio. Com o advento do laser a TFD sofreu uma nova transformação, pois o *laser* passou a substituir as demais fontes de luz devido a sua densidade de energia poder ser melhor controlada, assim como, sua pequena área de irradiação produzindo efeitos locais.

O mecanismo de ação da terapia fotodinâmica propriamente dito decorre primariamente da excitação eletrônica do corante pela luz de comprimento de onda adequado. Nesse processo fotofísico deve haver ressonância entre a luz e o fotossensibilizador, ou seja, o comprimento de onda da luz necessária para promover a foto-excitação tem que estar na mesma faixa de absorção do agente sensibilizante. Em nosso trabalho usou-se um fotossensibilizador conhecido como sal de curcumina para inativação da bactéria *Staphylococcus aureus*. Na seção a seguir, apresentaremos algumas características desse fotossensibilizador.

### **1.8 O Sal de Curcumina**

Conhecida como Açafrão da Índia (*Curcuma longa* L.) (fig. 16), a curcumina apesar de não ser uma planta nativa do Brasil, é muito utilizada na medicina popular, e também como tempero ou como corante alimentício. A Curcumina, em concentrações específicas, quando irradiada por alguns comprimentos de onda, tem um grande efeito fototóxico em bactérias Gram positivas [39,40].

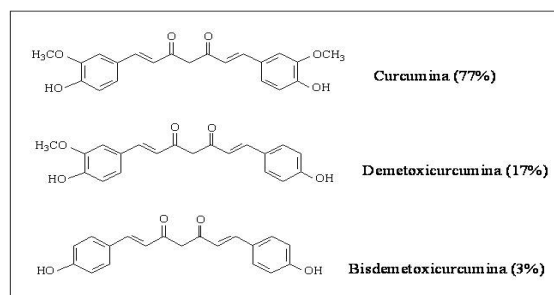
**Figura 16 – Açafroeira (a), raiz do açafirão e extrato em pó contendo curcumina como principal pigmento (b).**



Fonte: [www. lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com) (acesso em 15/10/2012).

A curcumina é um pigmento que compõe um dos princípios ativos da *Curcuma longa L.* É utilizado como um corante natural para alimentos, com o código de aditivo alimentar E100. Foi isolada pela primeira vez por Vogel em 1842, é um pó insolúvel em água e em éter etílico, mas solúvel em etanol e no DMSO (dimetilsulfóxido). Sua estrutura química foi descrita por Lampe e Milobedeska em 1910 [41]. O corante comercial encontrado no mercado contém três curcuminóides que lhe conferem a cor amarelo alaranjada típica: a curcumina (77%), a demetoxicurcumina (17%) e a bisdemetoxicurcumina (3%). A curcumina apresenta uma banda de absorção numa pequena região do espectro eletromagnético com máxima absorção entre 420 a 425 nm, e tem como fórmulas estruturais as representadas na figura 17.

**Figura 17 - Fórmulas estruturais dos curcuminóides.**

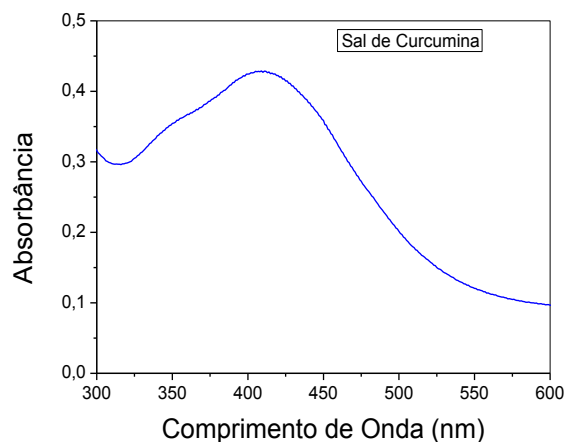


Fonte: Milobedeska J, 1910 [41].

A curcumina atua como corante e também tem sido descrito em vários estudos como um potencial agente antioxidante, antimicrobiano e antiinflamatório. Alguns registros do uso da curcumina na Terapia Fotodinâmica são encontrados na literatura em aplicações do tipo tratamento de câncer de pele e efeito antimicrobiano sobre bactéria gram positivas e gram negativas [42, 43, 44, 45].

O sal de curcumina usado como fotossensibilizador, foi produzido pela PDTPharma de Riberão Preto, possui os mesmos curcuminóides apresentados na figura 17 e foi diluído em água (H<sub>2</sub>O). O fotossensibilizador apresenta duas bandas de absorção, uma em torno de 350 nm, o surgimento desse pico é devido à solubilidade em água o que pode indicar que a curcumina e este solvente adotam múltiplas conformações como resultado de interações polares e a outra banda de absorção é em torno 420 nm (fig. 18) [46].

**Figura 18 - Espectro de Absorção do sal de Curcumina.**



Fonte: Autor, 2012.

De acordo com Di Mario e colaboradores [47], tem sido demonstrado a capacidade da curcumina inativar várias bactérias gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus epidermidis* que causam infecções, tais como doenças de pele, pneumonia, meningite e infecções do trato urinário de seres humanos. Além disso, a curcumina, em combinação com a lactoferrina, N-acetilcisteína e pantoprazol tem capacidade de reduzir significativamente os sintomas causados pela infecção por *Helicobacter pylori* em humanos. Por funcionar como um bom agente antimicrobiano é que utilizamos

nesse trabalho o sal de curcumina para inativar a bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

### 1.9 Bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

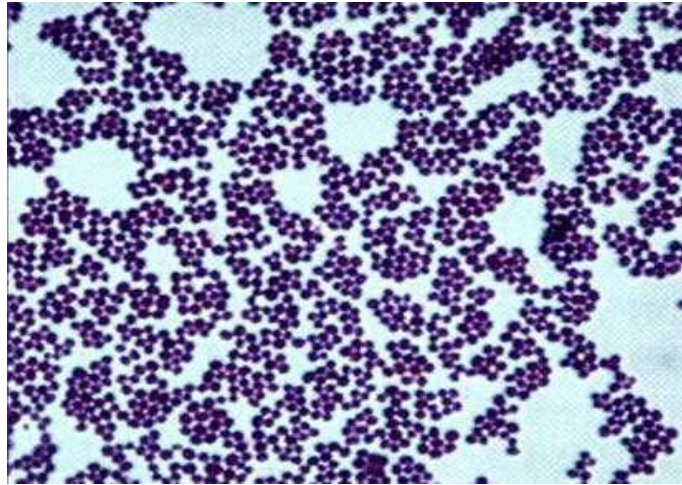
Neste trabalho, os padrões de biospeckle investigados foram do meio biológico *Staphylococcus aureus*. Investigamos através do *biospeckle* a ativação e a inativação dessa bactéria antes, durante e após a aplicação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana. Vamos, então, descrever esse microrganismo no decorrer desta seção.

A primeira descrição de bactérias do gênero *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas, e “*cocos*” = grão) foi realizada por Ogston em 1880, que relatou *coccus* em formato de cacho de uva, como a causa de um grande número de doenças piogênicas [48].

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram positivos (GP) encontrados como organismos comensais ou patógenos bacterianos tanto em humanos como em animais. São imóveis, com diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 µm, não formadoras de esporos podendo aparecer de forma isolada, em pares, cadeias curtas ou em cachos. Essas bactérias são formadoras de colônias pigmentadas (fig. 19), em geral não capsuladas e apresentam características bioquímicas de catalase e termonuclease positivas e coagulase positivas ou negativas.

O habitat primário de *S. aureus* em humanos é a mucosa da nasofaringe, onde a bactéria existe como um membro persistente ou transitório da microbiota normal sem causar quaisquer sintomas podendo, entretanto, ser encontrado regularmente em outros sítios anatômicos. Portadores assintomáticos são principal fonte de infecção por *S. aureus*, podendo causar doenças adquiridas tanto no ambiente hospitalar como na comunidade [49].

**Figura 19 - Morfologia do microrganismo pertencente ao gênero *Staphylococcus* spp.**



Fonte: <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/gpstaph.html>. 2012.

O microrganismo *S. aureus* é responsável por um espectro muito difundido de infecções em humanos e em diferentes espécies animais. Constitui o mais comum agente etiológico da mastite bovina contagiosa, com perdas economicamente relevantes para a indústria leiteira causando redução na qualidade do leite e direcionando a perda em produção e uso elevado de drogas e serviços veterinários [49]. Essa bactéria apresenta temperatura de crescimento na faixa de 7 °C a 48,5 °C (com temperatura ótima de 35 a 37 °C) e são tolerantes à concentração de 10% a 20% de cloreto de sódio e nitratos. O crescimento desse microrganismo está dentro de uma escala compreendida entre os valores de pH 4,0 e 9,8, sendo o pH ótimo compreendido entre 6,0 e 7,0 [50, 51].

Com essas características o *S. aureus* cresce numa grande variedade de alimentos que requerem manipulação durante o processamento, incluindo produtos alimentícios fermentados, tais como queijo e outros dessa natureza. Por ela estar presente em certos alimentos e por ter como um reservatório natural o ser humano é que tornou-se importante estudar a inativação dessa bactéria, já que pode trazer sérias consequências para o ser humano, além do mais esse tipo de bactéria tem grande resistência a antibióticos.

Um estudo detalhado de teorias e técnicas de análise de imagens, resultados e discussões, serão apresentados nos próximos tópicos desta dissertação.

## 2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DO BIOSPECKLE

Métodos estatísticos são aplicados para descrever os padrões de speckle gerados durante um estudo de bioatividade. Devido ao comportamento estocástico desses padrões, as estatísticas de primeira e segunda ordem são usadas para explicar as propriedades ponto a ponto, a frequência de variação, o tamanho do grânulo óptico e a distribuição desses grânulos no padrão de speckle [52-57].

Tanto a velocidade quanto o puro movimento dos espalhadores em um padrão de *biospeckle* são medidos através da estatística de segunda ordem. Durante os procedimentos experimentais para investigação desses padrões, câmeras CCDs são usadas gerando imagens em uma ou duas dimensões que serão tratadas e nos permitirá trabalhar com as matrizes THSP (Time History Speckle Pattern) e MCO (Matriz de Co-ocorrência), assim como, com o MI (momento de inércia) que é um atributo de textura obtido na matriz MCO. Mesmo fazendo uso dessas matrizes e do MI para visualizar e investigar a bioatividade do *S. aureus*, não vamos nos deter, neste trabalho, em detalhar as estatísticas de primeira e segunda ordem. Partiremos para as definições e aplicações das matrizes e do MI.

Neste capítulo será apresentado o embasamento necessário ao tratamento de imagens adquiridas ao longo do tempo de investigação da bioatividade em *S. aureus*, usando o método de correlação e fazendo uma comparação para estabelecer o grau de similaridade entre essas imagens. Além disso, fazendo a evolução dessas imagens através da THSP, uma figura bidimensional que codifica informações espaciais e temporais das intensidades é obtida. Será explorado, também, o método de matrizes de Co-Ocorrências para investigar alta e baixa atividade de sistemas biológicos.

### 2.1 Correlação de Pearson

É comum atribuir exclusivamente a Karl Pearson o desenvolvimento dessa estatística. Segundo Stanton [58], a correlação é uma medida de associação bivariada do grau de relacionamento entre duas variáveis. Para Moore [59], a correlação mensura a direção e o grau da relação linear entre duas variáveis quantitativas. A associação e a linearidade são conceitos importantes na análise de

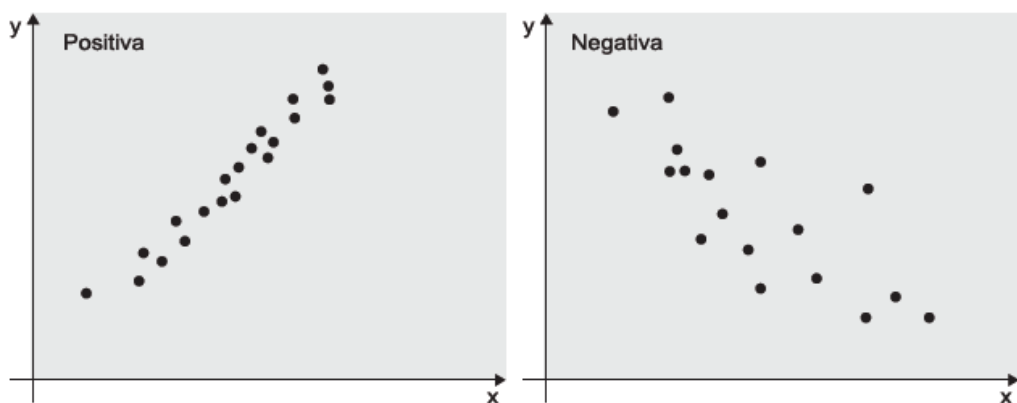


correlação, em termos estatísticos, duas variáveis se associam quando elas guardam semelhanças na distribuição de seus escores. Elas podem se associar a partir da distribuição das frequências ou pelo compartilhamento de variância. A correlação de Pearson é uma medida da variância compartilhada entre duas variáveis e a variação tem que ser distribuída linearmente [60-63].

A medida da variação conjunta das variáveis ou co-variação observada em um diagrama de dispersão é a correlação entre as duas variáveis. Essa medida é realizada numericamente por meio dos coeficientes de correlação que representam o grau de associação entre duas variáveis contínuas. As medidas genéricas de correlação, frequentemente são designadas por  $\rho$ , são adimensionais e variam entre -1 e +1. No caso de  $\rho = 0$ , não existe correlação entre as duas variáveis. Quando  $\rho > 0$ , a correlação é positiva e uma variável aumenta quando a outra cresce. A correlação é negativa,  $\rho < 0$ , quando as variáveis variam em direções opostas.

É importante salientar que variáveis altamente correlacionadas *não* apresentam necessariamente qualquer relação de causa e efeito. A correlação representa simplesmente a tendência que as variáveis apresentam quanto à sua variação conjunta. Assim, a medida da correlação não indica necessariamente que há evidências de relações causais entre duas variáveis. As evidências de relações causais devem ser obtidas a partir do conhecimento dos processos envolvidos [61]. As correlações positivas e negativas podem ser ilustradas da seguinte forma (fig. 20):

**Figura 20 - Correlações lineares, positiva e negativa.**



Fonte: Adaptado de Henão R, 1997 [64].



O coeficiente de correlação linear, também chamado de covariância normalizada é representado por  $\rho$  (eq. 2.1), expresso por:

$$\rho_{xy} = \frac{\sigma_{x,y}}{\sigma_x \sigma_y} \quad (2.1)$$

onde  $\sigma_{x,y}$  é a covariância entre  $x$  e  $y$ ,  $\sigma_x$  e  $\sigma_y$  são os desvios-padrão das variáveis  $x$  e  $y$ , respectivamente. Podemos escrever ainda da seguinte forma (eq.2.2):

$$\rho_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (2.2)$$

onde  $x_1, x_2 \dots x_n$  e  $y_1, y_2 \dots y_n$  são valores medidos de ambas as variáveis.  $n$  é o número de quantidade de medidas, fazendo uma relação com imagens, os valores de  $x_1$  são valores de tons em cinza correspondentes aos pontos da imagem de referência (cuja média  $\bar{x}$ ) e  $y_i$  são valores de tons de cinza correspondentes aos pontos da imagem do padrão alterado (a média desses valores  $y_i$ ).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad e \quad \bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad (2.2.1)$$

A equação 2.2.1, acima, mostra as médias aritméticas de ambas as variáveis. Podemos ainda fazer uma analogia com o produto escalar normalizado, ou seja, fazendo uma interpretação geométrica, sendo as duas séries de valores  $X(x_1, x_2 \dots x_n)$  e  $Y(y_1, y_2 \dots y_n)$  podem ser considerados como vetores em um espaço de  $n$  dimensões:

$$X(x_1 - \bar{x} \dots x_n - \bar{x}) \quad e \quad Y(y_1 - \bar{y} \dots y_n - \bar{y}) \quad (2.3)$$

Sendo assim podemos escrever esses dois vetores (eq. 2.3) em termos do cosseno do ângulo  $\alpha$  entre os vetores  $X$  e  $Y$  na forma de produto escalar normalizado:

$$\cos(\alpha) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (2.4)$$

Comparando a equação (2.2) com a (2.4), obtemos a equação 2.5

$$\rho = \cos(\alpha) \quad (2.5)$$

Nesse caso se  $\rho = 1$ , o ângulo  $\alpha = 0$ , os dois vetores são colineares (paralelos). Se  $\rho = 0$ , o ângulo  $\alpha = 90^\circ$ , os dois vetores são ortogonais; e se  $\rho = -1$ , o ângulo  $\alpha = 180^\circ$ , os dois vetores são colineares com sentidos opostos.

Moore e McCabe [62] destacaram algumas propriedades para análise com relação à correlação de Pearson, uma delas diz que o coeficiente de correlação de Pearson não diferencia entre variáveis independentes e variáveis dependentes. Dessa forma, o valor da correlação entre  $x$  e  $y$  é o mesmo entre  $y$  e  $x$ . Outra propriedade é que o valor da correlação não muda ao se alterar a unidade de mensuração das variáveis. Por se tratar de uma medida padronizada, o valor da correlação entre quilos e litros é o mesmo que utilizar toneladas e mililitros, a padronização torna possível a comparação entre diferentes variáveis no que diz respeito a sua magnitude e dispersão.

Ainda dentro das propriedades mencionadas no parágrafo anterior, podemos dizer que o coeficiente de correlação tem um caráter adimensional, ou seja, ele é desprovido de unidade física que o defina. Não faz sentido interpretar uma correlação de 0,3 como sendo 30%, por exemplo. Além disso, ele não se refere à proporção. A correlação exige que as variáveis sejam quantitativas (contínuas ou discretas), não faz sentido usar a correlação de Pearson para dados categóricos já que é impossível calcular o desvio padrão da variável sexo, por exemplo. Faz-se necessária a independência das observações, ou seja, a ocorrência de uma observação  $x_1$  não influencia a ocorrência de outra observação  $x_2$ . Essas são algumas das condições para fazer uma interpretação da correlação de Pearson.

### 2.1.1 Calculando a correlação de Pearson

Conhecendo as diversas formas de fazer a interpretação dessa correlação, vamos calcular um exemplo de uma correlação para entender melhor esse processo.

Vamos tomar os valores das duas variáveis X e Y da tabela 1, para obter o valor da correlação. Vamos fazer esse cálculo por partes.

**Tabela 1- Variáveis X e Y**

Observações	X	Y
1	29	0,49
2	40	1,59
3	54	1,69
4	55	1,82
5	72	3,10
Média	50	1,74

Fonte: autor, 2012

As médias que se encontram na tabela 1, calculamos da seguinte forma:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = 50 \quad \bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i = 1,74$$

onde  $n=5$  e  $x_i$  e  $y_i$  são os cinco valores de X e Y da tabela. Resolvendo os outros termos da eq. 2.3, encontramos:

$$\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} = 32,65 \text{ e } \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = 1,86.$$

Assim, substituindo os valores encontrados na equação 2.2 temos:

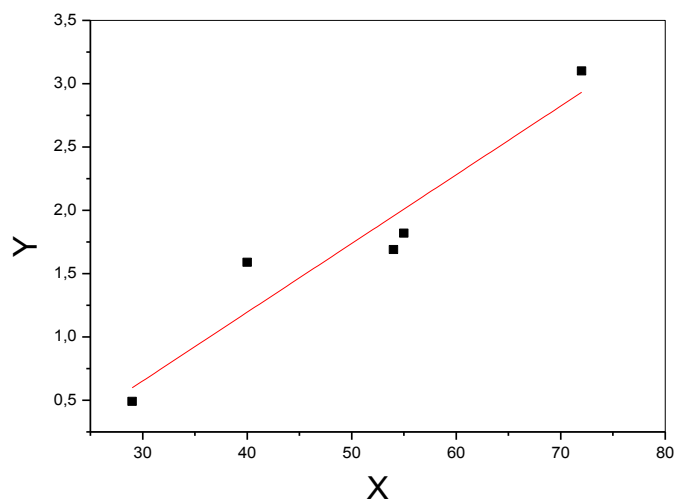
$$\rho_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{57,87}{(32,65) \cdot (1,86)} = 0,953,$$

ou seja, existe uma relação forte e positiva entre X e Y. Na prática não precisa fazer esses cálculos, existem vários programas com esses pacotes prontos para calcular

essa correlação de Pearson. No entanto consideramos importante entender todos os procedimentos dessa equação.

O gráfico da figura 21 apresenta a correlação entre X e Y, indicando uma ascendência nos valores, ou seja, uma correlação positiva. Neste trabalho serão avaliadas várias imagens evoluindo no tempo fazendo a correlação entre elas e analisando o grau de similaridade.

**Figura 21 - Correlação entre X e Y**



Fonte: autor, 2012

Para obter os valores da correlação de Pearson, todas as imagens geradas são convertidas em uma tabela de valores de tons de cinza (uma escala que vai de 0 a 255), essas imagens são transformadas em uma matriz, dessa matriz é gerada uma tabela com três colunas (X,Y,Z), em que a coluna Z de uma imagem é usada para fazer a correlação com a coluna Z de outra imagem, pois contém informações sobre as intensidades. Quando são comparadas as duas imagens e obtém-se a correlação 1, significa dizer que essas imagens são idênticas. Quando o grau de similaridade de duas imagens for se modificando a correlação vai diminuindo pra valores menores do que 1, sendo que quando essas imagens forem totalmente diferentes a correlação terá valor 0.

## 2.2 História Temporal de Padrões de *Speckle* (THSP)

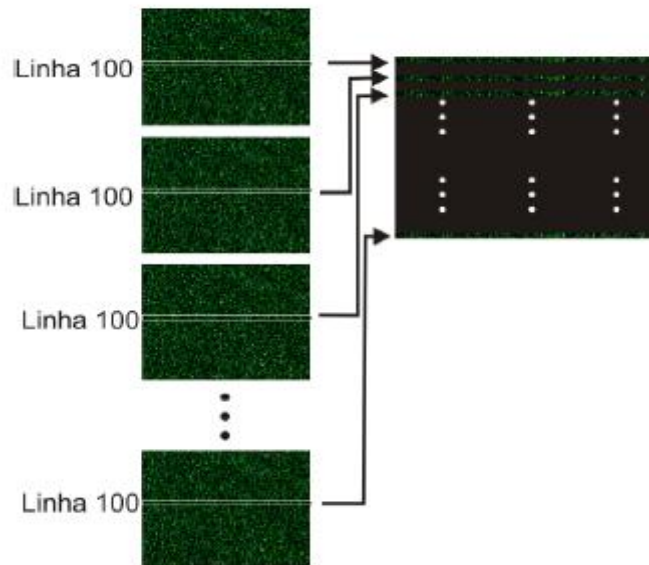
A História Temporal de Padrões de *Speckle* (THSP) é uma técnica que permite a análise das intensidades do pixel de uma sequência de imagens. Foi proposta por Xu e colaboradores [63] para medir a variação temporal do *speckle* de espécimes botânicos. Os autores extraíram uma figura bidimensional que continha informações tanto espaciais como temporais das intensidades dos pixels [63, 64].

De acordo com Bergkvist [10] muitos métodos têm sido utilizados para medir a atividade em materiais, mas a maioria deles tem limites que tornam difícil a obtenção de uma descrição precisa do objeto. Medir essas flutuações temporalmente não é uma tarefa trivial, mesmo porque o movimento de centros espalhadores se dá de forma aleatória em um meio que está em atividade. Como o padrão de *speckle* muda de forma aleatória, ou seja, as linhas mudam aleatoriamente, usa-se apenas uma linha deste, de forma que estatisticamente seja possível caracterizar toda a movimentação.

De acordo com Gonzalez e Woods [65], embora não seja fácil definir textura, pode-se considerar a THSP como uma, pois, podem ser observados padrões na distribuição dos pixels que a compõe, isso ocorre devido à disposição dos centros espalhadores que formam o material analisado. São muitas as definições para textura, ela pode ser vista como um conjunto de variações de intensidade dos pixels que formam certos padrões repetitivos [56,66, 67].

A THSP é uma imagem bidimensional montada pegando sempre a mesma linha numa sequência de imagens registradas temporalmente, ou seja, a primeira linha do 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 22).

**Figura 22. Representação de como montar uma THSP selecionando a linha 100.**



Fonte: DAVID, JFL, TCC. 2012 [77].

### 2.3 Matrizes de Co-Ocorrências (MCO)

A matriz de Co-Ocorrência (MCO) atua sobre a matriz THSP. A MCO é uma tabulação de quantas combinações diferentes de valores de intensidades dos pixels em tons cinza ocorrem em uma imagem. O uso principal da Matriz de Co-ocorrência 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 diferentes direções. A Matriz de Co-ocorrência de textura considera a relação entre dois pixels por vez, um chamado de pixel referência e o outro de pixel vizinho [28]. 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.

A MCO pode ser definida como uma função do tipo  $P(i,j,d,\theta)$  que determina a probabilidade de ocorrência do valor da célula  $(i,j)$ , onde  $i$  e  $j$  são pixels vizinhos a uma distância  $d$  com relação a um ângulo  $\theta$ , ou seja, cada pixel está localizado a um determinado ângulo com relação à posição do pixel de referência.

O que define o número de linhas e colunas da matriz MCO é o número de níveis de cinza da imagem. Para  $n$  números de cinza da imagem a matriz terá  $n$  linhas e  $n$  colunas, logo essa matriz deve ser quadrada ( $n \times n$ ), e representa em

cada elemento de matriz  $a_{ij}$  o número de vezes que ocorre a transição do nível cinza  $Z_i$  para o nível cinza  $Z_j$ , considerando a distância  $d$  entre os pixels vizinhos  $i$  e  $j$  [68,69].

A equação 2.6 define a MCO

$$MCO_{[i,j]} = N_{i,j} \quad (2.6)$$

onde  $N_{ij}$  é o número de ocorrência de intensidade e  $i,j$  são as intensidades sucessivas.

De acordo com Vasconcelos [70] para se chegar à forma normalizada da MCO é necessário dividir cada elemento pelo somatório de todos os elementos da matriz, ou seja, a MCO pode ser escrita como matriz quadrada de probabilidade  $P_{ij}$  dada pela equação (2.7).

$$P_{[i,j]} = \frac{m_{[i,j]}}{\sum_{i,j=0}^{n-1} (m_{[i,j]})}, \quad (2.7)$$

onde cada elemento  $(i; j)$  representa a probabilidade de um valor aparecer na matriz. A eq. 2.8 é calculada analogamente pela equação 2.6, de forma normalizada.

$$MCON_{[i,j]} = \frac{MCO_{[i,j]}}{\sum_{i,j=0}^{N-1} (MCO_{[i,j]})}, \quad (2.8)$$

onde  $i$  é o número da linha e  $j$  é o número da coluna da matriz; MCO é o conteúdo da célula  $(i,j)$ ;  $N$  é o número de linhas ou de colunas, pois MCO é uma matriz quadrada. Simplificando, a normalização é feita através da divisão do valor de cada célula da matriz pelo somatório dos valores contidos nas células da matriz.

Além da THSP e da matriz de co-ocorrência, neste trabalho utilizamos mais um elemento, o Momento de Inércia (MI), para nos ajudar na interpretação dos resultados. O Momento de Inércia, pode ser entendido como um descritor correlacionado com o dinamismo impresso nas imagens do speckle, pode ser relacionado com a atividade biológica, ou seja, valores altos de MI equivalem a alta

atividade do meio e valores baixos de MI mostram baixa atividade biológica. A utilização da estatística de segunda ordem fornece por meio do momento de Inércia (MI) uma medida da frequência de ocorrências de mudanças bruscas de intensidade de um grão de speckle. Fazer a correlação dos valores do MI em um meio que tem sua atividade variando no tempo é fundamental [71,72].

Uma maneira de quantificar a medida da dispersão dos pontos em torno da diagonal da matriz é através do cálculo do momento de inércia da matriz dado pela eq. 2.9.

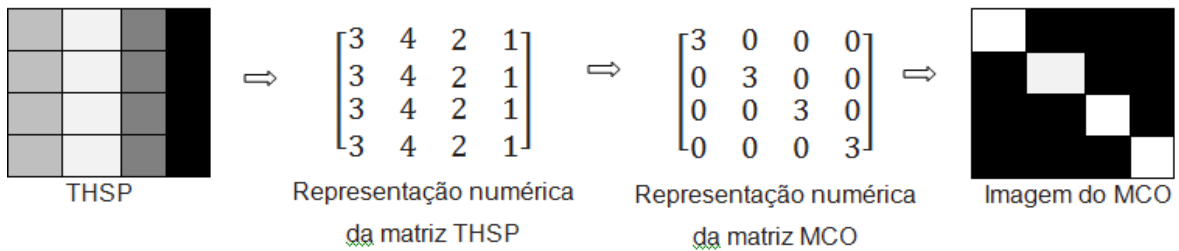
$$MI = \sum_{i,j} MCO(i,j) * (i - j)^2 \quad (2.9)$$

Na equação 2.9 MCO é a matriz de Co-ocorrência. O nome momento de inércia se deu pela analogia com o momento de inércia conhecido em mecânica, ou podemos também chamar de momento das intensidades. MI classifica a atividade do meio através de um número adimensional.

Para facilitar o entendimento dessas teorias vamos apresentar dois exemplos, um representando uma superfície estática, no qual a THSP praticamente não apresenta variações de intensidade ao longo do tempo, logo a matriz MCO apresenta valores não nulos na diagonal principal e no outro exemplo a THSP apresenta grande atividade, e a matriz MCO apresenta valores não nulos ao redor da diagonal principal, esses valores podem ser chamados de ocorrências. No decorrer desta dissertação usamos a resolução de 8 bits e as matrizes de co-ocorrência obtidas foram de 256 X 256. Para os dois exemplos descritos a seguir (fig. 23 e 24), simulamos uma situação em que a codificação dos tons de cinza foram realizados com 2 bits, obtendo-se uma matriz 4X4.

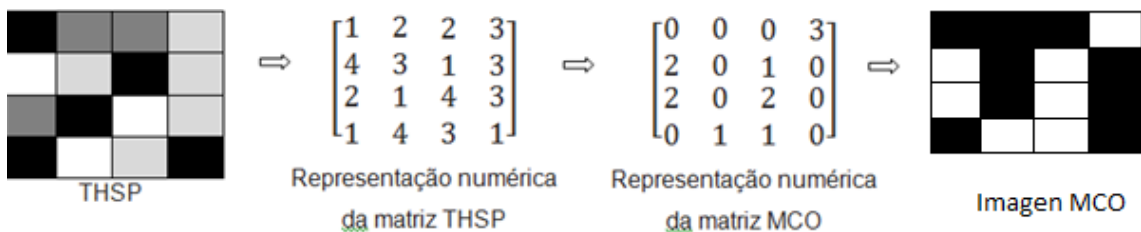


**Figura 23 - Superfície espalhadora estática.**



Fonte: autor, 2012.

**Figura 24 - Superfície espalhadora com atividade.**



Fonte: autor, 2012.

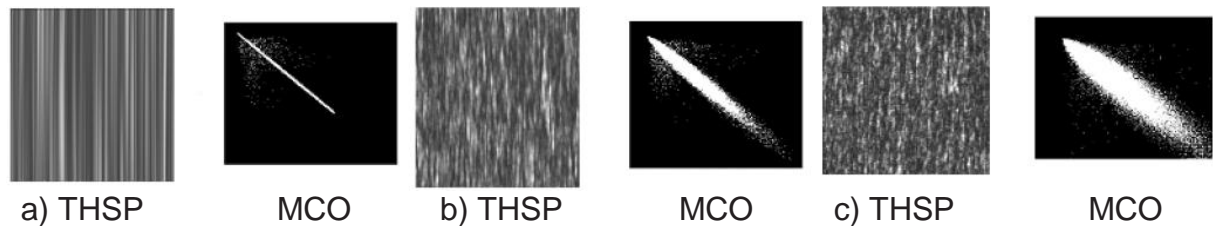
Na figura 23 temos uma situação em que a superfície permanece estática sem variação temporal, observamos que a evolução (vertical) da matriz não muda e os números permanecem os mesmos. Adotamos o número 1 com a cor preta, 2 com a cor cinza escuro, 3 com a cor cinza e 4 cor branco. Quando essa numeração se altera de forma aleatória significa dizer que houve uma mudança na intensidade dos pixels das imagens subsequentes, como podemos verificar na figura 24 da matriz numérica THSP.

Para formar a matriz numérica MCO, que são as ocorrências, observamos quantas ocorrências tivemos, por exemplo, da cor preta representada pelo número 1 e da cor cinza representada pelo número 4. Analisando toda matriz THSP na vertical de cima para baixo, obtivemos 3 ocorrências, sendo que os valores das ocorrências colocamos na linha 1 da coluna 4, ou seja, aproveitando a numeração das cores para serem representadas como matriz (fig. 24).

Os exemplos mostrados na figura 25 (as THSP e as MCO) foram obtidos da referência 75 citada anteriormente. Os valores associados aos MI dispostos na

tabela 2 foram adotados como valores de referência para as análises dos nossos resultados, pois não foi encontrada nenhuma referência na literatura mostrando a atividade do microrganismo aqui estudado, utilizando a técnica de momento de inércia.

**Figura 25 - a) baixa atividade; b) média atividade; c) alta atividade.**



Fonte: Silva ER, 2007 [75].

**Tabela 2 - Momento de Inércia das MCOs.**

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

Fonte: Silva ER, 2007 [75].

Para formar a representação das imagens MCO, foram adotados alguns procedimentos como, acontecendo no mínimo uma ocorrência será pintado de branco; e quando não tiver ocorrências pintar de preto. Na THSP da figura 24 foi observado que as cores estavam de forma aleatória, isso indica mudança no pixel da imagem posterior como havia supracitado, havendo várias ocorrências acontecendo em torno da diagonal principal na imagem da MCO. Isso nos remete a pensar em uma superfície que está se modificando com o passar do tempo, sendo identificada nessa técnica observando as imagens geradas pelo programa (STMD - *Speckle* – THSP - Matriz de co-ocorrência - Descritores de textura), pois o procedimento adotado para gerar as figuras é análogo ao exemplo apresentado.

### 3 MATERIAS E MÉTODOS

Com a aplicação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (*aPDT*), foi usada a técnica de *biospeckle* para investigar a atividade biológica do microrganismo *Staphylococcus aureus*, conhecido por apresentar resistência a antibióticos e ser facilmente encontrado em ambientes hospitalares e em alimentos como é o caso do queijo coalho muito consumido na região Nordeste do Brasil. A investigação experimental da inibição de *S. aureus* ocorreu em dois momentos, no primeiro fazendo o monitoramento durante as 24 horas na ativação da cepa das bactérias (crescimento de colônias). E no segundo momento o monitoramento foi feito durante a aplicação da luz led em 450 nm (inibição das colônias), ou seja, na aplicação da *aPDT*. Foram captadas imagens de meios biológicos através de uma *webcam* (25 frames por segundo, resolução de 288x352 pixels) e essas imagens foram tratadas com a intenção de analisarmos a bioatividade do microrganismo. Diluição e ativação das cepas, manuseio do meio de cultura e armazenamento dos microrganismos em estufas, foram realizados como procedimentos básicos de microbiologia antes da investigação experimental através de *biospeckle*. Medidas de absorção e fluorescência do fotossensibilizador (sal de curcumina) foram necessárias para a escolha do comprimento de onda que seria usado durante a *aPDT*.

Nas seções a seguir mostraremos o desenvolvimento, os resultados e as análises do trabalho experimental desta dissertação.

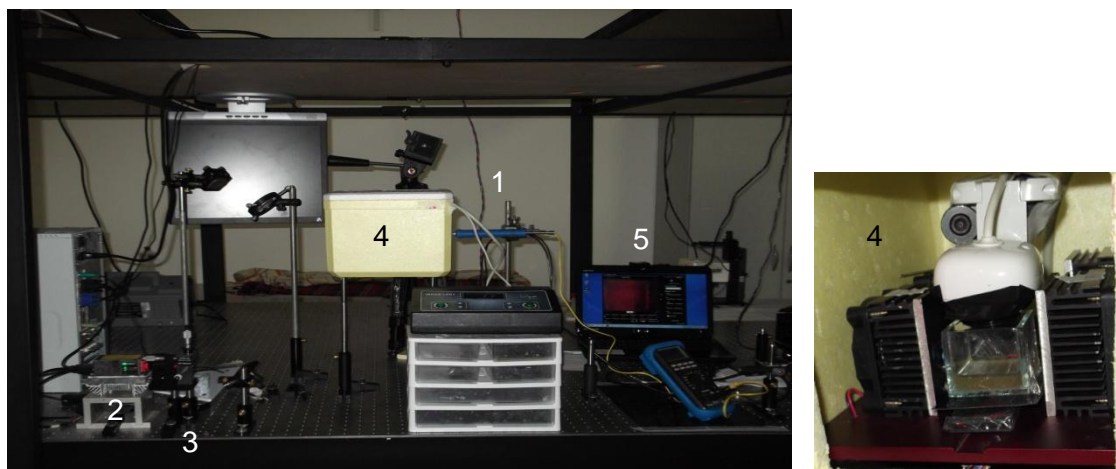
#### 3.1 Investigação da inibição de *staphylococcus aureus* via *aPDT* usando *biospeckle*

O procedimento básico da manipulação do *S. aureus* foi realizado no laboratório de microbiologia da Faculdade de Nutrição (FANUT) da UFAL, com a participação ativa de alunas do referido laboratório e com a supervisão da professora Maria Cristina Delgado da Silva (pesquisadora da FANUT/UFAL). Para a preparação da cepa em meio líquido, colocamos em um recipiente 3 mL de BHI (*Brain Heart Infusion Broth*), 3 mL de H<sub>2</sub>O estéril e 0,1 mL de bactéria (cepa padrão *S. aureus* ATCC 25922 - Laborclin – Paraná). Misturamos o líquido contido no tubo usando o equipamento vortex (Type 16700 Mixer 120 V – Modelo 16715- U.S.A.) e dessa solução retiramos 5 mL que foi colocado num recipiente de volume 27 cm<sup>3</sup>. É

válido salientar que os procedimentos foram realizados com os devidos cuidados, evitando qualquer tipo de contaminação aos experimentadores, pois estávamos trabalhando com bactérias e qualquer descuido poderia trazer sérias consequências a nossa saúde, como também, normas de microbiologia foram seguidas para não haver contaminação da solução com outros microrganismos existentes no ambiente e assim mascarar nossos resultados.

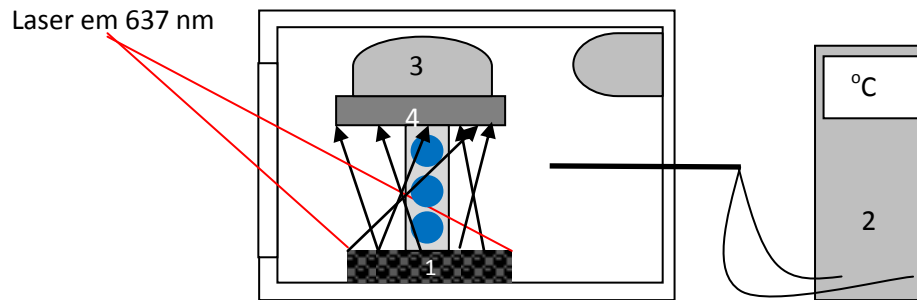
O recipiente com a solução de bactérias foi vedado e levado para o laboratório de física, sendo então colocado em um aparato (Fig. 26, 27) que permitia a manutenção do sistema experimental à temperatura de 36°, assim como, a aplicação da luz LED (para a aPDT) e a aquisição das imagens de *speckle* (oriundas da interferência dos feixes de luz laser espalhados pela superfície do meio biológico). O monitoramento da bioatividade durante a ativação das cepas foi realizado durante 24 horas, sendo que a cada 60 minutos era feito um vídeo de 20 segundos para depois analisarmos essas imagens que foram transformadas em várias fotos por um programa de livre acesso e uso (virtualDub status). A metodologia adotada se deu pelo fato de que essas bactérias têm um crescimento em torno de 24 horas, daí era mais conveniente fazer filmes pequenos durante esse período.

**Figura 26- Aparato experimental. (1) termopar; (2) laser em 637 nm; (3) filtro espacial; (4) simulação de uma estufa com sistema de aquecimento, iluminação para TFD, filtro OG515 e webcam; (5) sistema de aquisição e tratamento de dados (PC+placa de aquisição de imagens). No detalhe à direita mostramos o interior da estufa.**



Fonte: autor, 2012.

**Figura 27 - Arranjo Experimental para investigação da bioatividade do *S. aureus* (1) usando termopar (2), LED (círculos azuis) para a aPDT e laser (linhas vermelhas) para a geração do padrão de *speckle*. A aquisição das imagens se dá através de uma *webcam* (3) com um filtro OG 515 (4).**



Fonte: Autor, 2012

Após as primeiras 24 horas, fizemos mais um monitoramento de 24 horas com a mesma solução de bactérias só que acrescentando o fotossensibilizador sal de curcumina (PDTPharma – Ribeirão Preto) diluído em água destilada numa concentração de 750 mg/L. Nos primeiros 5 minutos aplicamos a luz LED em 450 nm e potência de 258 mW (IRRAD-LED2 - Biopdi – São Carlos) (Fig. 28), monitorando a ação da aPDT. Após a aplicação da luz azul continuamos fazendo vídeos de 20 segundos intercalados de 2 horas até completar o total de 24 horas. Os vídeos de antes e após a aPDT foram registrados apenas com a iluminação do laser em 637 nm (COHERENT CUBE, 637 nm, 25mW California) que gera o padrão de *speckle*, enquanto que a aquisição das imagens durante a aPDT foram obtidas, também, com a iluminação em 450 nm do LED responsável pela Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT). Vale salientar que mantivemos um filtro OG515 na frente da webcam durante todas as medidas, bem como a lâmpada usada para aquecimento das cepas de bactérias que era desligada nos momentos das medidas.

**Figura 28 - Aplicação da aPDT usando sal de curcumina e LED em 450 nm em *Staphylococcus aureus*.**



Fonte: Santos RF, 2013 [78].

Em outro momento repetimos todas as medidas, só que dessa vez com as bactérias ativadas por 24 horas na estufa do laboratório de microbiologia. Colocamos em dois recipientes as bactérias acrescidas da solução de sal de curcumina e em seguida aplicamos luz azul no intervalo de tempo de 5 minutos em um dos recipientes e durante 30 minutos no outro recipiente. A filmagem durante o tempo de 5 minutos foi realizada de forma contínua e no tempo de 30 minutos fizemos vídeos curtos de 20 segundos até completar este período.

Para ter um parâmetro a mais na análise dos resultados, medidas de absorção foram realizadas. Uma das medidas foi realizada usando somente a solução de bactérias diluídas e acrescidas do meio de cultura, outra medida foi realizada usando essa solução e o sal de curcumina na concentração de 750 mg/L numa proporção de 1:1, outra absorção foi feita com a solução de bactérias e sal de curcumina após a mistura ser iluminada por 5 minutos com a luz em 450 nm. E na última medida variamos apenas o tempo de exposição à luz azul para 30 minutos. Nossa intenção era monitorar o meio biológico através de medidas de absorção e confrontar essas medidas com os resultados da bioatividade do meio obtidos através da técnica de *biospeckle*.

## 4 RESULTADOS

Nas seções a seguir serão apresentados os resultados da aplicação da aPDT em *S. aureus* com sua atividade biológica sendo monitorada através da técnica de *biospeckle*.

### 4.1 Investigação da Ativação do Microrganismo *S. aureus* através de Padrões de Speckle.

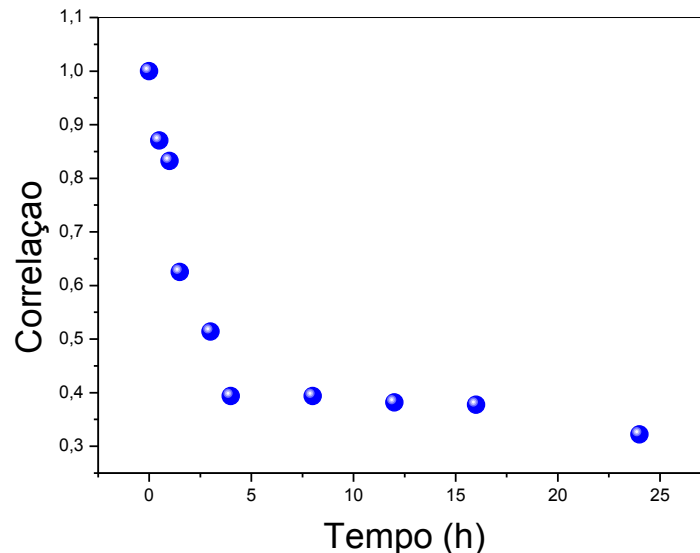
Incidimos sobre o meio biológico radiação no comprimento de onda de 637 nm e com potência de saída de aproximadamente 9 mW de um laser de semiconductor (COHERENT CUBE, 637 nm, 25mW California). O feixe laser passou por um filtro espacial para tornar a incidência de luz mais uniforme, sofreu algumas reflexões por espelhos de alumínio e foi, finalmente, ampliado por uma lente biconvexa de forma a iluminar toda a solução contida no recipiente (27 cm<sup>3</sup>). O laser foi usado para obter o padrão de speckle. A aproximadamente 6 cm acima da amostra foi colocado uma *webcam* (MICROSOFT, LIFE CAM VX – 800, 25 f/s – 288x352 *pixels*) conectada a um computador para fazer a aquisição dos vídeos através de um *software* livre (Dell Webcam Central). Para simular a estufa, usada no laboratório de microbiologia, utilizamos uma caixa de isopor com uma abertura para a passagem do feixe laser e uma lâmpada incandescente de 60W para mantermos a temperatura do ambiente em 36 °C. Monitoramos a temperatura com um termopar para que a amostra não sofresse grandes variações de temperatura e com isso interferisse nas investigações.

O resultado a seguir (Fig. 29) está relacionado com o monitoramento por 24 horas do primeiro dia de ativação das bactérias. A cada 30 minutos era feito um vídeo com duração de 20 segundos que foram transformados em várias imagens. Escolhemos a foto de número 100 em cada vídeo ao longo das 24 horas para ser feito o estudo de correlação usando a estatística de Pearson. A escolha da imagem de número 100 foi proposital, pois as fotos iniciais poderiam vir associadas a erros ao iniciar o processo de filmagem, pois levava alguns segundos para a acomodação do sensor da câmera.



O comportamento dos pontos no gráfico da figura 29 nos mostra que, depois de 24 horas, o grau de semelhança entre as imagens diminuiu cerca de 80 por cento, isso indica que houve ativação considerável.

**Figura 29 - Monitoramento da ativação de *S. aureus* através de correlação usando a estatística de Pearson.**



Fonte: autor, 2012.

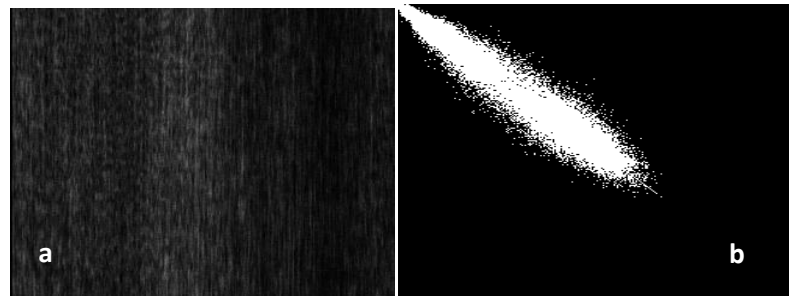
Utilizamos outro método de análise com o intuito de ter uma confiabilidade maior do resultado da ativação da bactéria *S. aureus*. Usamos um programa (STMD) [77] para gerar as matrizes THSP e a matriz de co-ocorrência e observar se houve atividade no meio. Uma análise semelhante usando os mesmos métodos foi feita em 2004 por Enes e colaboradores [79], em sementes de feijão observando diferentes níveis de atividades. Vimos no resultado da figura 29 que houve atividade do meio e para medir o grau dessa dispersão, que indica as ocorrências de variações nas intensidades, buscamos o valor para o momento de inércia encontrado pelo programa que gera os resultados, esse valor para MI foi de 37,574 [73].

Para gerar as matrizes escolhemos imagens nos intervalos de uma em uma hora durante as 24 horas. Com uma hora de monitoramento fizemos um vídeo de 20 segundos, desse vídeo coletamos 25 imagens, e assim sucessivamente até o final das 24 horas. Observamos que ao fazer a análise de vídeos curtos havia atividade, porém uma atividade baixa observando cada momento separadamente. No entanto, o valor do Momento de Inércia estava em ascensão ao longo das 24 horas, o que



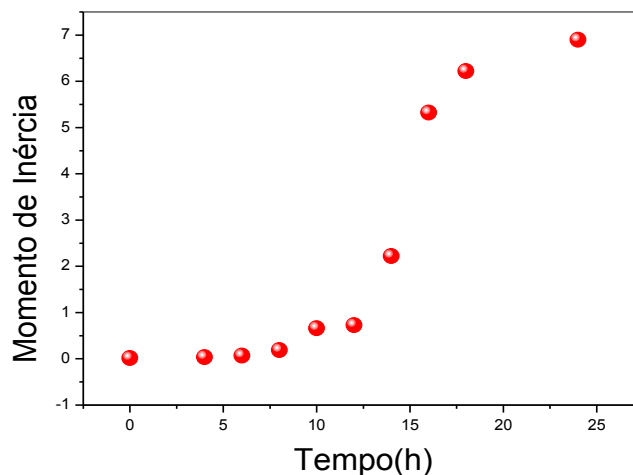
era de se esperar, pois se tratava da ativação das bactérias (Figuras 30 e 31). Na referência 28 foi observado que o momento de inércia atingia valores mais altos para amostras vivas de material biológico e baixos valores para um material biológico morto, concordando com nossos resultados.

**Figura 30 – Ativação do *S. aureus*. (a) THSP; (b) MCO. Monitoramento do 1<sup>o</sup> dia.**



Fonte: autor, 2012.

**Figura 31 - Monitoramento apresentado no Momento de Inércia**



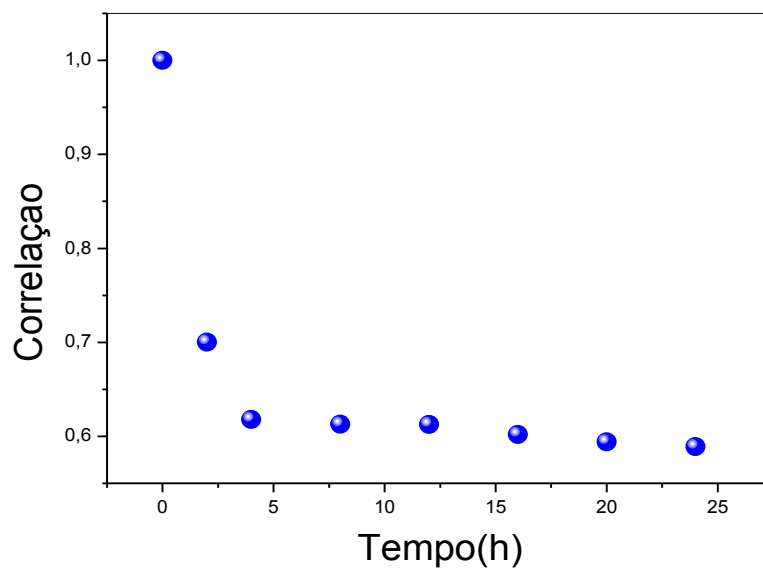
Fonte: autor, 2012.

Embora os gráficos do primeiro dia de ativação (Figuras 29 e 31) tivessem comportamentos diferentes para a correlação e o MI, os dois demonstram o mesmo resultado, só que um analisa o grau de similaridade entre as imagens temporalmente e o outro representa a dispersão das ocorrências com relação às intensidades nas imagens, também temporalmente. E como relatamos anteriormente, o comportamento do MI (Fig. 31) é crescente, mostrando atividade.

## 4.2 Investigação da bioatividade do Microrganismo *S. aureus* através de Padrões de *Speckle* após Aplicação da aPDT.

Após a ativação das cepas nas primeiras 24 horas, adicionamos o fotossensibilizador às bactérias e aplicamos a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana incidindo por 5 ou 30 minutos (duas investigações distintas) luz em 450 nm. A investigação durante a aPDT requer uma análise mais detalhada, então reservaremos a próxima seção para mostrarmos essa bioatividade (ou inativação, inibição), mostraremos a seguir o resultado do que ocorre após a aPDT através de medidas de correlação usando a estatística de Pearson (Fig. 32).

Figura 32 - Monitoramento do *S. aureus*, após a aPDT



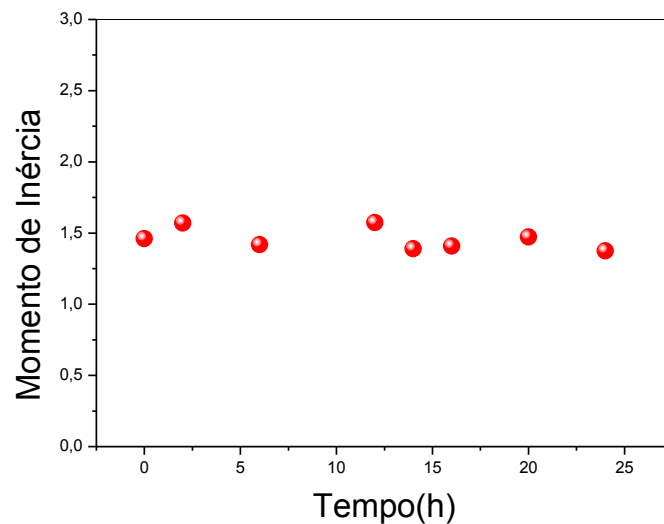
Fonte: Autor, 2012.

Na figura 32 observa-se que o comportamento para a correlação ficou constante em torno 0,6, o que de certa forma também é um bom resultado, pois após a aplicação da aPDT durante 5 ou 30 minutos a tendência é que haja inativação da bactéria, isso justifica uma baixa atividade do sistema. No gráfico observamos também uma grande variação do primeiro ponto com relação ao segundo mostrando um decaimento, mas isso se deve ao fato de sempre fazermos

a correlação inicial da primeira imagem com ela mesma, sendo, portanto igual a um, pois as imagens são as mesmas, não significa atividade.

A figura 33 apresenta a dispersão das intensidades em torno da diagonal principal da matriz MCO. O monitoramento foi realizado após 5 minutos de aplicação da luz LED (aPDT) de forma a se obter uma inativação da bactéria *S. aureus* e o resultado apresenta justamente isso, pois o comportamento desse gráfico é uma constante em torno 1,5, valor do momento de inércia. Montamos a matriz THSP e MCO, novamente fazendo o mesmo processo anterior pegando uma quantidade de imagens ao longo das 24 horas. O resultado está representado na figura 34.

**Figura 33 - Momento de Inércia Temporal após aPDT**



Fonte: Autor, 2012.

**Figura 34 - a) THSP; b) MCO**



Fonte: Autor, 2012.

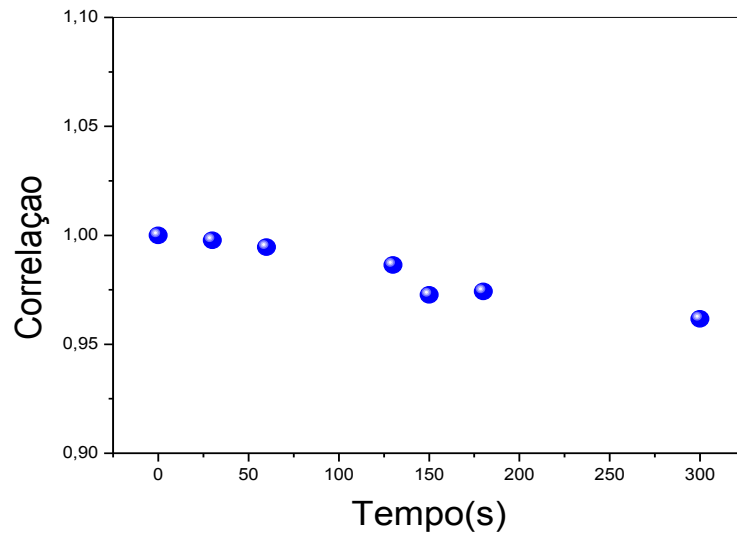
Esse resultado ao longo do tempo, após fazer a aplicação de luz led (aPDT), apresentou uma baixa atividade, tendo como momento de inércia o valor 2,477, como já apresentamos anteriormente quanto menor o valor do momento de inércia menor é a dispersão das intensidades. Na literatura encontramos análise da umidade em sementes para investigação, e foi usado o método do momento de inércia para estabelecer a qualidade da semente observando o grau de atividade. Segundo Botega (2009), **MI** é o método mais utilizado quando se deseja uma quantificação das informações requeridas da mudança do padrão de *speckle* formado durante uma observação [28,74].

#### **4.3 Investigação da Inibição do crescimento do Microrganismo *S. aureus* através de Padrões de *Speckle* durante Aplicação da aPDT.**

Observar o que ocorre com microrganismos durante a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é o tema central desta dissertação. Realizar investigação em tempo real da aplicação desta técnica usando padrões de *speckle* nos dará noções da atividade biológica que surge do uso combinado de uma luz, um fotossensibilizador e o oxigênio molecular presente no meio, de uma forma não invasiva. Realizamos a filmagem ao mesmo tempo em que aplicávamos luz em 450 nm em dois intervalos de tempos distintos: 5 e 30 minutos. O experimento é equivalente ao da seção anterior com o diferencial da incidência de luz. Um filtro OG515(luz com comprimentos de onda abaixo de 515nm são bloqueados) foi adicionado para que a luz em 450 nm não interferisse no padrão de *speckle* adquirido, pois a luz utilizada para formar o padrão de *speckle* tem comprimento de onda 630 nm.

A ativação das bactérias foi realizada no laboratório de microbiologia durante 24 horas na estufa a 36 °C. A solução de *S. aureus* foi acrescida da solução de sal de curcumina e seguida da aplicação de luz em 450 nm. Imagens foram adquiridas via webcam e tratadas por software específico. No experimento com exposição à luz por 5 minutos, o vídeo foi contínuo e no experimento com luz incidente por 30 minutos, os vídeos tiveram duração de 1 minuto, intercalados de 5 minutos, até completar o intervalo temporal total. Com o monitoramento da cepa de bactéria, geraram-se imagens e usando a estatística de Pearson para fazer as correlações entre essas imagens traçamos o gráfico relacionando a correlação versus tempo que é mostrado na figura 35.

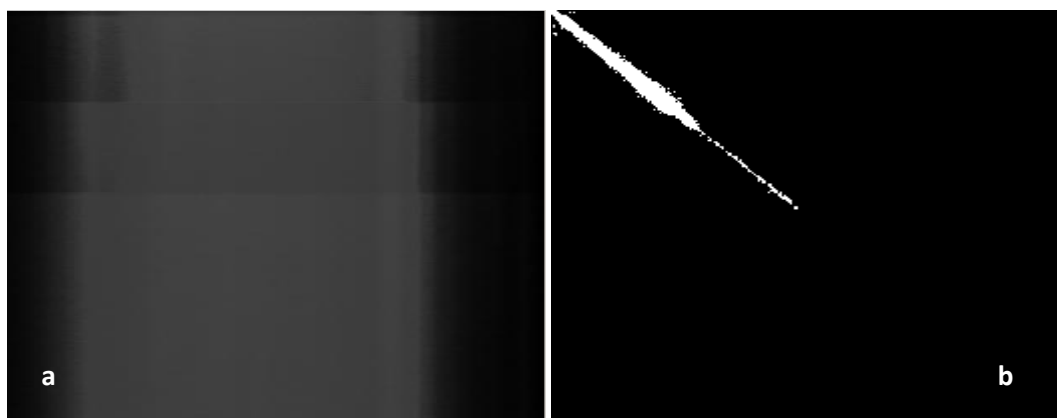
**Figura 35 - Monitoramento da correlação de imagens dos padrões de speckle durante a aplicação da aPDT por 5 minutos em *S. aureus*.**



Fonte: Autor, 2012.

Observa-se uma queda tímida nos valores de correlação das imagens durante todo o tempo de incidência da luz. Mais uma vez construímos as matrizes THSP e a MCO, para tentar tirar mais informações com relação a esse experimento e os resultados estão mostrados na figura 36.

**Figura 36 - a) THSP; b) MCO, durante aplicação de luz por 5 minutos.**



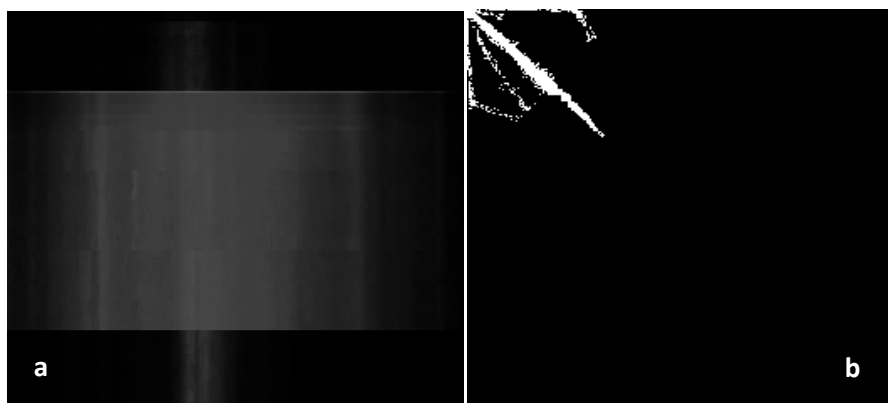
Fonte: Autor, 2012.

Na figura 36, podemos analisar a figura da matriz de co-ocorrência. No início começa com uma atividade bem discreta, e logo depois a parte branca se afina na diagonal principal, isso indica não haver mais atividade, e o valor do momento de inércia encontrado via programa de análise de imagens é de 0,586, ou seja, muito baixo comparado com o valor do momento de inércia na ativação da bactéria *S. aureus* (37.574) e indicando uma inativação dessa bactéria com o uso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

Assim como no experimento anterior construímos também as matrizes THSP e a MCO, para o caso de aPDT durante 30 minutos. Como nesse intervalo foram feitos vídeos de 1 minuto ao longo dos 30 minutos totais de incidência de luz, de cada vídeo pegamos uma quantidade de imagens para analisar e obtivemos o resultado descrito na figura 37. Observa-se no início certa dispersão na figura 37 (b), depois desaparece ficando uma linha branca na diagonal principal, indicando uma queda brusca na dispersão, havendo uma redução nas ocorrências de mudança das intensidades, ou ausência delas. O momento de inércia teve como valor total 9,271.

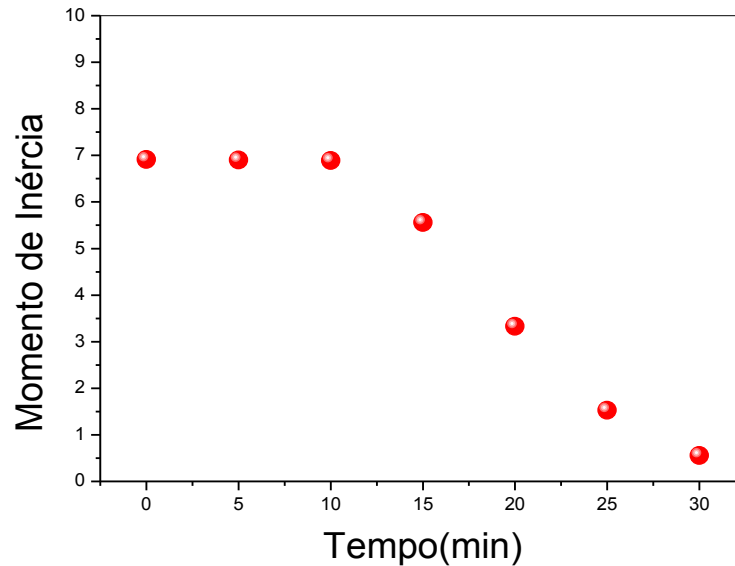
Como os vídeos foram adquiridos ao longo de 30 minutos e a cada 5 minutos foram feitos vídeos de 1 minuto, também analisamos a evolução do momento de inércia nesses pequenos vídeos ao longo do tempo. O comportamento é mostrado na figura 38 a seguir.

**Figura 37 – (a) THSP; (b) MCO, durante aplicação de luz 30 minutos.**



Fonte: Autor, 2012.

**Figura 38 - Momento de inércia ao longo de 30 minutos de aPDT.**



Fonte: autor, 2012.

Os estudos de aplicação desse fenômeno óptico (*biospeckle*) levaram os pesquisadores a desenvolverem um grande número de técnicas auxiliares, que combinadas com o MI possibilitam extrair informações adicionais dos materiais biológicos, aumentando a precisão do método, bem como sua gama de aplicações [26,27,28].

O comportamento do momento de inércia na figura 38 é obtido no decorrer dos 30 minutos de aplicação da aPDT onde observa-se uma queda acentuada após os 5 minutos iniciais de aplicação da luz em 450 nm. E para ter mais um parâmetro de análise construímos as matrizes para analisar se havia alguma atividade biológica ou não após os 30 minutos de aplicação da luz. Na figura 39 (b) a MCO apresenta-se com uma atividade quase que nula, tendo como momento de inércia o valor de 0.021.

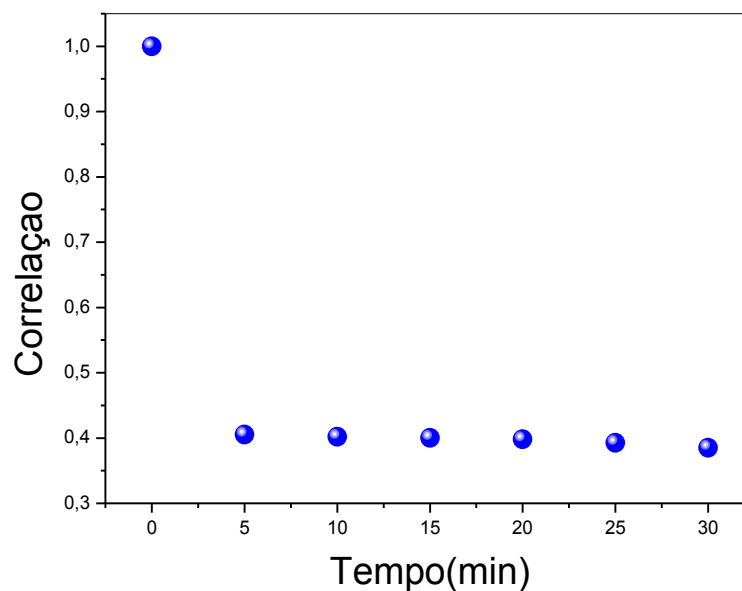
Figura 39 - a) THSP; b) MCO, resultado após 30 minutos de aPDT.



Fonte: Autor, 2012.

Na correlação de imagens apresentada na figura 40, houve uma queda brusca após os 5 minutos iniciais de aplicação da luz, a partir daí o comportamento segue constante.

Figura 40 - Correlação de imagens durante os 30 minutos de aPDT.



Fonte: Autor, 2012

Durante a investigação experimental observamos “visualmente” que depois de passados alguns minutos o “fervilhamento” da imagem granulada foi diminuindo, e

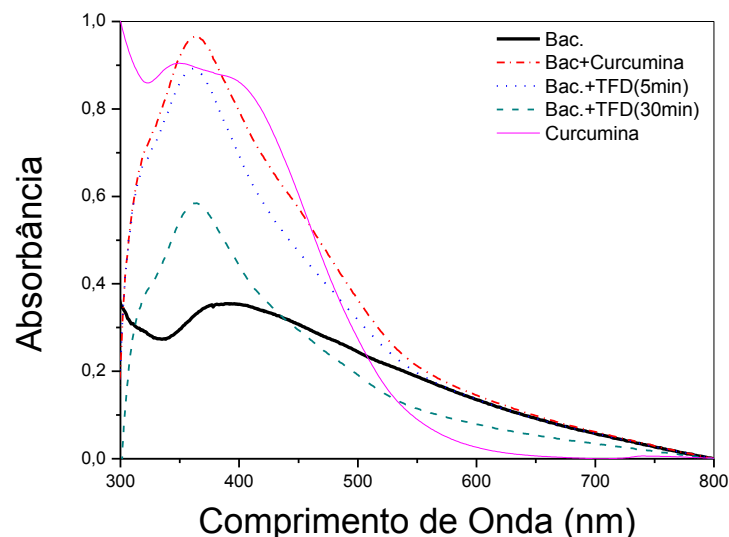


no recipiente onde se encontrava a amostra biológica, também, observamos uma sedimentação semelhante a uma decantação de resíduos no fundo do recipiente.

#### 4.4 Medidas de Absorção do Meio Biológico para as diversas configurações Investigadas.

Para obtermos um parâmetro a mais nas análises, fizemos medidas de absorção nas amostras usando: somente a solução de bactérias diluídas e acrescidas do meio de cultura; usando essa solução e acrescentando o sal de curcumina; usando a solução de bactérias e sal de curcumina após a mistura ser iluminada por 5 minutos com a luz em 450 nm e, por fim, variando o tempo de exposição da luz para 30 minutos. A figura 41 mostra o comportamento dos espectros de absorção no intervalo de 300 a 800 nm.

**Figura 41 - Espectros de Absorção do meio biológico para as diversas configurações estudadas.**



Fonte: Autor, 2012.

Na figura 41 mostramos a absorção para cada configuração do meio investigado. Percebemos a ação da PDT com a diminuição da intensidade de absorção tanto para aplicação da luz em 5 minutos quanto para 30 minutos, com maior evidência para o caso de 30 minutos. Na curva em preto (só bactéria) observamos um valor maior para a absorção em torno de 380 nm, mas essa banda se estende até a região do infravermelho próximo.

Ao adicionarmos a curcumina, um pico em aproximadamente 360 nm torna-se evidente, mas a curva segue até 800 nm com amplitude considerável. O pico em 360 nm, provavelmente tem uma contribuição tanto da bactéria, quanto da curcumina, mas a amplitude observada no intervalo de 500 a 800 nm é unicamente devido à bactéria, já que o espectro de absorção da curcumina (curva em rosa) mostra-se quase nulo nessa região. Então, quando as curvas devido à aplicação de PDT têm suas amplitudes diminuídas, nas duas regiões mencionadas, significa que a luz está atuando na curcumina (consumindo) e na bactéria (inativando).

Essas observações estão de acordo com os resultados de biospeckle apresentados pelas imagens das MCOs (figuras 34, 36, 37 e 39). Os resultados mostrados nesta seção são mais uma forma de analisar a eficácia da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e mostrar que a técnica de biospeckle é interessante para avaliar a sua ação.

## 5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho discutimos sobre a técnica de *speckle*, em que um granulado óptico traz informações sobre a superfície em estudo. As formas dos arranjos experimentais de análise apresentam-se por reflexão, perfusão ou variação angular. Em nosso trabalho o arranjo experimental foi disposto de forma que houvesse reflexão do laser. Fizemos uma discussão teórica da correlação de Pearson para análise do grau de similaridade ao longo do tempo, discutimos teorias sobre as matrizes THSP e MCO, bem como quantificamos a média da dispersão dos pontos em torno da diagonal principal da MCO usando o Momento de Inércia (MI).

No monitoramento durante as 24 horas, constatamos a ativação da bactéria *S. aureus*, pois observamos através da correlação de Pearson que o grau de similaridade foi se modificando com o passar do tempo. No resultado da figura da matriz de ocorrências para este caso, na diagonal principal ocorreu uma dispersão considerável das intensidades, concordando com a afirmação de estar ocorrendo ativação do meio biológico. A análise em relação ao momento de inércia indicou também uma ativação por parte desse microrganismo, pois no decorrer do tempo teve um aumento considerável com o valor total de 37.574. Se recorrermos aos valores descritos na tabela 2, esse valor é considerado satisfatório, estando entre média e alta atividade.

Na aplicação da Terapia Fotodinâmica, após 5 minutos de incidência de luz em 450 nm, verificamos uma inativação do microrganismo, pois os pontos experimentais do momento de inércia descreveram um comportamento constante em torno de 1,5. Esse valor (tabela 2) mostra uma baixa atividade do meio, ou seja, a aniquilação das bactérias.

Após a aplicação da TFD notamos que houve uma inativação da bactéria analisando, também, através da correlação de imagens, em que no primeiro momento houve uma mudança brusca entre essas imagens e com o passar do tempo o comportamento ficou constante, o que já era esperado, pois a morte do microrganismo não ocorre instantaneamente e, usando essas ferramentas de análise, validamos ainda mais a ação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

Nosso maior interesse foi investigar a eficiência dessa técnica em tempo real, ou seja, durante a aplicação da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana em 5 e 30 minutos. No período de 5 minutos já se verificou a “morte” desse microrganismo, mas o grau de similaridade foi se modificando ao longo do tempo de forma suave, já nos 30 minutos houve uma queda brusca no início e após 5 minutos o comportamento foi constante, o que nos fez pensar que o microrganismo “morre” após esse tempo de 5 minutos. Para ter uma confiabilidade maior na inativação, obtivemos o valor do momento de inércia, que foi de 0,586, ou seja, muito baixo mostrando a inativação desse meio.

Na análise feita após 30 minutos da aPDT, o resultado foi melhor ainda. A inativação ocorreu de maneira eficaz, com o valor do momento de inércia quase nulo, apenas de 0,021, não apresentando variações nas atividades.

Em relação ao grau de similaridade após 5 minutos de análise, as imagens eram praticamente idênticas, ou seja, se não havia mudanças nos pixels das imagens nos remete a pensar que houve uma inativação de quase 100%.

É válido salientar que na literatura não encontramos algo dessa natureza, ou seja, em que a investigação fosse feita em microrganismos do tipo de bactérias *S. aureus* através dessas técnicas de análise de imagens. Em nossa análise tivemos uma boa eficiência nas técnicas, pois a correlação de Pearson juntamente com as matrizes THSP e a MCO nos mostrou resultados satisfatórios na investigação desse meio biológico.

Concluindo, mostramos que investigações como as descritas neste trabalho, só vêm a contribuir na interface física/microbiologia propondo parcerias satisfatórias entre essas áreas de estudo e, com isso, fortalecendo a interdisciplinaridade.

Como perspectivas futuras podemos citar o desenvolvimento de simulações computacionais usando as estatísticas de primeira e segunda ordem para comparar com nossos resultados. Outros meios biológicos podem ser investigados. Outros métodos de análise como o Fuji e o LASCA dentre outros, também, podem ser usados para comparar e corroborar com o nosso trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Dainty JC, Ennos AE, Françon M, Goodman JW, Parry G. Laser speckle and related phenomena. London: Springer-Verlag; 1975.
2. Goodman JW. Statistical Properties of Laser Speckle Patterns. In: Dainty JC. Laser Speckle and related phenomena. London: Springer-Verlag. 1984. p.9-75.
3. Dinh-Vo T. Biomedical Photonics Handbook. Tennessee-USA: Crc Press; 2003.
4. Briers JD. Wavelegth Dependence of Intensity Fluctuations in Laser Speckle Pattern From Biological Specimens. Optics communications. 1975;13: 324-326.
5. Goodman JW. Some fundamental properties of speckle. J Opt Soc Am. 1976;11:1145-1150.
6. Idell PS, Goodman RS, Fienup JR. Image synthesis from nonimaged laser-speckle patterns. Opt Lett. 1987;12:858-860.
7. Draijer M, Hondebrink E, Leeuwen TV, Steenbergen W. Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion. Laser Med Sci. 2009;24: 639-651.
8. Goodman JW, Parry G. Laser Speckle and related phenomena. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1984
9. Webster S, Briers JD. Time-integrated speckle for the examination of movement in biological systems. In: Cerullo LJ, Heiferman KS, et al. Clinical applications of modern imaging technology II. Spie;1994.p. 444- 452.
10. Bergkvist A. Biospeckle-based study of the line profile of light scattered in strawberries [Master Thesis]. La Plata, Argentina: Centro de Investigaciones Opticas (CIOP), Universidad Nacional de La Plata;1997.
11. Brezinski ME. Optical Coherence Tomography: Principles and Applications. Aca. 2006.
12. Howarth MS, Stanwood PC. Tetrazolium staining viability seed test using color image processing. Transactions of the ASAE. 1993; 36:1937-1940.
13. Bray R, Forrester K, Leonard C, McArthur R, Tulip J, Lindsay R. Laser Doppler imaging of burn scars: a comparison of wavelength and scanning methods. Burns. 2003;29:199–206.
14. Ulyanov SS, Tuchin VV. Use of low-coherence speckled speckles for bioflow measurements. Appl Opt. 2003;39:6385– 6389.
15. Briers JD. Speckle fluctuation and biomedical optics: implications and applications. Optical Engineering, Redondo Beach. 1993; 32:277-283.

16. Braga Jr RA, et al. Detecção de fungos em grãos pelo laser biospeckle técnica. *Biosyst Engenh.* 2005;91:465-469.
17. Dunn JF, Forrester KR, Martin L, Tulip J. Bray RC. A transmissive laser speckle image technique for measuring deep tissue blood flow: An example application in finger joints. *Laser in Surg and Medi.* 2011;43:21-28.
18. Paiva Jr RD, Muramatsu M. Desenvolvimento de um rugosímetro a laser. *Revista de física aplicada e instrumentação.* 2004;17:60-70.
19. Paiva Jr RD, et al. Study of the electron-erosion process by the analysis of speckle correlation. *Insight.* 2001;43:235-240.
20. Mallet H. *O Laser princípios e técnicas.* São Paulo: Manoli;1987.
21. Sears e Zemansky Huag D. Young, Roger A. Freedman; *Física IV: ótica e física moderna.* 10ª ed. São Paulo: Addison Wesley; 2004.
22. Prasad PN. *Introduction to Biophotonics.* New Jersey. Wiley Interscience, 2003.
23. Everett DH. *Basic principles of colloid science.* Royal society of chemistry. London. 1988.
24. Pecora R. *Dynamic light scattering application of photon correlation spectroscopy.* New York: Plenum Press;1985.
25. Nussenzveig HM. *Curso de física básica 4: Óptica, Relatividade e Física quântica.* São Paulo: Edgar Blücher; 1998.
26. Asakura T, Takai N. Dynamic laser speckles and their application to velocity measurements of the diffuse object. *Journal of Applied Physics.* 1981;25:179-194.
27. Rabelo GF, Braga RA, Nascimento AL. Desenvolvimento de um modelo para o biospeckle na análise de semente de feijão. *Cienc Agrotec.* 2007;31:456- 461.
28. Arizaga R, Trivi M, Rabal H. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. *Optics & Laser Technology.* 1999;31:163-170.
29. Arizaga R, Grumel EE, Cap N, Trivi M. Following the drying of spray paints using space and time contrast of Dynamic speckle. *Journal of Coating Technology.* 2006; 3:295-296.
30. Briers JD. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow. *Applied Optics.*2007;37:1-5.
31. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J. Nat. CancerInst.* 1998;90:889–905.
32. Hamblin MR, Hasan, T. Photodynamic Therapy: A new antimicrobial approach to infections disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004;3:436 - 450.

33. Niemz MH. Laser-Tissue Interactions: Biological and medical physics, biomedical engineering. 3<sup>a</sup> ed. Springer, 2003.
34. Bangnato VS. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. São Paulo: Livraria da Física; 2008.
35. Akhmanov SA, Cherniaeva EB. Photodynamic action of laser emission on biomolecules and cells. The mechanisms of photodynamic action at the molecular and cell levels. Modern problems of laser physics. 3<sup>o</sup> ed. 1990.
36. Hultén LM, et al. Harmful singlet oxygen can be helpful. Free Rad Biol Med. 1999;27:1203-1207.
37. Wainwright M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998;42: 13-28.
38. Raab O. Ueber die Wirkung fluorizierender Stoffe auf Infusorien. Z. Biol.1900;39:524-546.
39. Sthal F. et al. Light Emitting Diode (LED) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. Biomaterials. 2000;21:1379-1385.
40. Dahl T. A. et al. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. Arch. Microbiol.1989;151:183–185.
41. Milobedeska J, Kostanescki SV, Lampe V. Zur Kenrtris des curcumins. Berichte der deutschen chemischen gesellscha. 1910;43:2163-2170.
42. Wen HC, Jung HW, Jornal of cellular biochewistry, 2004:92-200.
43. Kun P, Lee JH, Oncology Reports, 2007:17-537.
44. Haukvik T, Brzell E, Kristonsen S, Tonnesen HH, Phomazie, 2009: 64-666.
45. Ellen M B, Marisbak E, Tonnesen H H, Photochem. Photobiol, Sci. 2005: 4-523.
46. Mukerjee A et al. J. Phys. Chem. B, 2010.
47. Mario D. F, et al. A curcumin-based 1-week triple therapy for eradication of Helicobacter pylori infection: something to learn from failure? Helicobacter. 2007;12:238–243.
48. Baird-Parker AC. The Staphylococci: an introduction. Journal for Applied Bacteriology Symposium Supplement. New York. 1990:1-8.
49. Fueyo JM. et al. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam. 2005; 243:447-454.

50. Frazier WC, Westhoff DC. Microbiologia de los Alimentos. 4ª ed. aragoza:Acribia, 2000.
51. Franco BDGM, Landgraff M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2000.
52. Achen CH. Measuring representaiton:Perfil of the correlation coeffivient. Americ Journ of political sci. 1977;21:805-815.
53. Blyth S. Karl Person and the correlation curve. Intern Stat Review. 1994;62:393-403.
55. Muddapur MV. A simple test for correlation coeficiente in a bivariante normal distribution. The Indian Journ of Statict. 1988;50:60-68.
56. Tuceryan M, Jain A, Chen CH, Pau LF, Wang PSP. Texture Analysis, Handbook Pattern Recognition and Computer Vision. Singapore: World Scientific ;1993.
57. Rabelo GF. Avaliação da aplicação do speckle dinâmico no monitoramento da qualidade de laranja [Tese]. Campinas: UNICAMP;2000.
58. Stanton JM. Galton Pearson and the peas: A brief history of linear regression for statistics instructors. Journal of Statistical Education. 2001; 9.
59. Moore DS. The Basic Practice of Statistics. New York: Freeman;2007.
60. Dalson BFF, Silva JA. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson. Revist Polit Hoje.2009;18:
61. Naghettini M, Pinto EJA. Correlação e Regressão.In:Naghettini M, Pinto EJA.Hidrologia Estatística. Belo Horizonte: CPRM;2007.p.355- 399.
62. Moore DS, McCabe G. Introduction to the practice of statistics. New York: Freeman; 2004.
63. Xu Z, Joenathan C, Khorana BM. Temporal and spatial properties of the time-varying speckle of botanical specimens. Opt Eng Redondo Beach.1995;34:1487–1502.
64. Henão R, Rabal HJ, Tagliaferr A, Torroba R. Determination of the zero-order fuige position in digital speckle pattern interferometry. Applied Opt. 1997;36:2066-2069.
65. Gonzalez RC, Woods RE. Digital image processing. 3ª ed.Addison-Wesley.1993
66. Coggins JM. A framework for texture analysis based on spatial filtering [Master's thesis]. Computer Science Depatament, Michigan State University; 1982.
67. Gonzalez RC, Woods RE. Processamento de imagens digitais. Blucher. 2000.



68. Haralick RM. Statistical and structural approaches to texture. Proc. IEEE. 1979;786-804.
69. Schneider BO. Apostila de Computacao Gra\_ca (com enfase em síntese de imagens).Universidade Federal de Lavras. 2001.
70. Vasconcelos S. Matrizes de co-ocorrências [Acesso 17 nov 2012]. Disponível em: [www.ic.uff.br/aconci/coocorrencia.pdf](http://www.ic.uff.br/aconci/coocorrencia.pdf).
71. Oulamara A, Tribillon G, Duvernoy J. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. Journal of Modern Optics. 1989;36:165-179.
72. Zachary JM, Iyengar SS. Content based image retrieval systems. MIEEE Symposium on Application - Specific Systems and Software Engineering and Technology.1999.
73. Doni FL.; Amaral, L.; Cervi, P.H. Métodos para testar o poder germinativo das sementes de Araucaria angustifolia (Bert) O. Ktze. Revista Brasileira de Sementes, Londrina, v. 7, n. 2, 1985, p.113-124.
74. Braga Júnior, RA. *BioSpeckle*: uma contribuição para o desenvolvimento de uma tecnologia aplicada à análise de sementes. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
75. Silva, ER. Estudo das propriedades do *Biospekle* e suas aplicações. 2007. Dissertação (Mestrado em Física) Universidade de São Paulo, São Paulo.
76. Observatório Nacional, As cores do céu. 2ª ed. Rio de Janeiro. 2011.
77. Lucena DJF, Ferramenta para o cálculo dos descritores de textura a partir de um volume de speckle's [TCC]. Arapiraca UFAL, 2012.
78. Santos RF, Ivestigação In vitro de parâmetros da terapia fotodinâmica antimicrobiana aplicada a Staphylococcus aureus, [Dissertação]. Maceió, 2013.
79. Enes, A. M. Análise de resposta em frequência do *biospeckle* laser. [Dissertação], Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2006.