



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

JOSÉ FRANCISCO FERREIRA DE OLIVEIRA

**MONITORAMENTO INVESTIGATIVO *IN VITRO* DOS
FUNGOS *ASPERGILLUS NIGER* E *PENICILLIUM* EM SUAS
PRIMEIRAS HORAS DE INCUBAÇÃO APLICANDO A
TÉCNICA DE *BIOSPECKLE* A LASER**

CAMPINAS

2018

JOSÉ FRANCISCO FERREIRA DE OLIVEIRA

**MONITORAMENTO INVESTIGATIVO *IN VITRO* DOS
FUNGOS *ASPERGILLUS NIGER* E *PENICILLIUM* EM SUAS
PRIMEIRAS HORAS DE INCUBAÇÃO APLICANDO A
TÉCNICA DE *BIOSPECKLE* A LASER**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
Agrícola da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do
Título de Doutor em Engenharia Agrícola, na área de
Máquinas Agrícolas.

Orientador: Inácio Maria Dal Fabbro

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO JOSÉ
FRANCISCO FERREIRA DE OLIVEIRA E
ORIENTADA PELO PROF. DR. INÁCIO MARIA DAL
FABBRO.

Campinas

2018

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

OL4m Oliveira, José Francisco Ferreira de, 1958-
Monitoramento investigativo in vitro dos fungos *Aspergillus Niger* e *Penicillium* em suas primeiras horas de incubação aplicando a técnica de biospeckle a laser / José Francisco Ferreira de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Inácio Maria Dal Fabbro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. Fungos. 2. Speckle. 3. Momentos de inércia. 4. *Aspergillus*. 5. *Penicillium*.
I. Dal Fabbro, Inácio Maria, 1944-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigative monitoring in vitro of fungi *Aspergillus Niger* and *Penicillium* within first hours of incubation applying the biospeckle laser technique

Palavras-chave em inglês:

Fungi
Speckle
Moments of inertia
Aspergillus
Penicillium

Área de concentração: Máquinas Agrícolas

Titulação: Doutor em Engenharia Agrícola

Banca examinadora:

Inácio Maria Dal Fabbro [Orientador]
Juliana Aparecida Fracorelli
Ariovaldo José da Silva
Luis Roberto Batista
Antonio Carlos Loureiro Lino

Data de defesa: 17-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Agrícola

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5412-9051>

- Currículo Lattes do autor: CV: <http://lattes.cnpq.br/7839589523311846>

Este exemplar corresponde à redação final da **Tese de Doutorado** defendida por José Francisco Ferreira de Oliveira, aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de agosto de 2018, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

FEAGRI

Prof. Dr. Prof. Dr. Inácio Maria dal Fabbro – Presidente e Orientador

FEAGRI/UNICAMP

Prof. Dr. Juliana Aparecida Fracarolli – Membro Titular

FEAGRI/UNICAMP

Faculdade de
Engenharia Agrícola
Unicamp

Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva – Membro Titular

FEAGRI/UNICAMP

Prof. Dr. Luís Roberto Batista – Membro Titular

UFLA/Lavras

Prof. Dr. Antonio Carlos Loureiro Lino – Membro Titular

IAC/Campinas

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Inácio Maria Dal Fabbro, pela oportunidade e confiança e todo apoio nos momentos mais intrincados durante esta jornada.

À Prof.^a Dra. Eliane A. Benato da Silva do Instituto Biológico (CEIB), pelas fundamentais orientações durante o processo de qualificação, com certeza fizeram toda a diferença.

À Prof.^a Dra. Juliana Aparecida Fracarolli (FEAGRI/UNICAMP), pela disposição em ajudar, sua contribuição no início do projeto de pesquisa foi de grande valia.

Ao Prof. Dr. Roberto Braga por ter disponibilizado os laboratórios de *Biospeckle* para realização de parte substancial da pesquisa, mas também por estar junto, assim como toda a sua equipe do CEDIA.

Ao Prof. Dr. Luís Roberto Batista por acreditar e dispor de toda sua equipe, contribuindo com considerável apoio, cedendo o Laboratório de Micologia com os fungos e com todo material necessário para a realização da pesquisa. Os conhecimentos absorvidos no convívio durante a disciplina PCA 543 foram de imensuráveis valias.

Ao Prof. Dr. Prof. Dr. Antônio Carlos Loureiro Lino pelo apoio colaborativo em todo o processo formativo durante na pós graduação.

Ao Prof. Dr. Júlio S. de S. Bueno Filho meus maiores e sinceros agradecimentos pela Análise Estatística da atividade da imagem ao longo do tempo desta pesquisa.

À UFLA pela acolhida em um momento crucial da pesquisa, em especial aos amigos do CEDIA, pela ajuda em todo e qualquer momento.

À UNICAMP, pelos conhecimentos compartilhados nas disciplinas da pós-graduação e pela utilização dos laboratórios de Pós-colheita e Óptica. Aos colegas de pós (turma do Inácio) que, sempre dinâmicos, nos mostraram o caminho do conhecimento.

Ao IFSP pela oportunidade de cursar o doutorado e aos colegas, principalmente da mecânica, pelo apoio incondicional. Ao Prof. Dr. Eduardo Bock pela força na revisão da pesquisa e em especial ao amigo de décadas, o companheiro Henrique Linares, *in memoriam*, quem deixou muitas saudades do seu convívio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos meus pais, *in memoriam*, Prof. Eduardo de Oliveira, pela luz e legado pela luta por um mundo melhor, e Deise Anastácio Ferreira de Oliveira, pelo significado das palavras compartilhamento, amor e solidariedade.

Aos meus irmãos: Carlos Eduardo, Marcos Aurélio, Regina Maria, Plínio Alberto, Tatiana, por sempre apoiarem meus sonhos.

A minha esposa Débora Rosa pelo incentivo, apoio incondicional, repreensões, carinho e pelo cuidado com a nossa família em minhas ausências.

Aos meus filhos Jorge Lutuli, Akil Babatunge, Tuako Hamadi e Damany Ayô pela certeza da continuidade da batalha por um mundo livre de discriminação. E ao meu primeiro neto, Thomas Babatunge, que Oxalá o ilumine e lhe dê sabedoria e saúde.

RESUMO

A detecção e o monitoramento de fungos, nos últimos anos, passaram a dispor de métodos computacionais de análises livres, de fácil implementação, reduzindo custos e possibilitando processos não destrutivos. Este trabalho propõe analisar as alterações obtidas no Biospeckle ao monitorar fungos em suas primeiras horas de inoculação. O padrão *Biospeckle* surge ao incidir o raio *laser* em uma superfície em processo dinâmico, e observar o fenômeno de fervilhamento, isto é, quando tal superfície demonstra alguma atividade biológica. Para este fim, foram utilizados três índices de atividades Biospeckle – Momento de Inércia (IM), Diferenças dos Valores Absolutos (AVD) e *Speckle* Espaço-Tempo (STS) – das imagens geradas por diferentes fungos nos primeiros dias de sua incubação, evoluindo para as primeiras horas. Os resultados obtidos foram animadores quanto ao monitoramento dos fungos em suas primeiras horas após a inoculação. A partir do isolamento dos fungos, seguido do repique em placas de Petri, observou-se o seu crescimento em diversas etapas. Na primeira etapa da pesquisa, investigou-se o crescimento dos fungos durante a sua primeira semana de incubação, a curva desse desenvolvimento mostrou-se bastante coerente com o seu crescimento. Aplicou-se a seguir a distribuição gaussiana, obtendo a correção dessa curva. Na sequência realizou-se a comparação entre os fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, na primeira semana após a incubação, e as curvas corroboraram muito para desenvolvimento da pesquisa. Procedeu-se, assim, a investigação para as primeiras horas de incubação com o fungo *Aspergillus*, comprovando os resultados obtidos no experimento inicial. As análises estatísticas dos índices utilizados demonstraram a consistência dos dados obtidos através de sua curva de normalidade, mostrando-se bastante profícuas e demonstrando que a essa técnica se revelou como um bom instrumento de monitorização na primeira semana de crescimento para ambos os fungos, principalmente nas 24 horas de desenvolvimento. Neste sentido, o presente trabalho de pesquisa reconhece que seja possível disponibilizar o *Biospeckle* como ferramenta para identificar a atividade biológica de fungos e ambiciona contribuir para disponibilizar informações sobre a viabilidade da inoculação de fungos em suas primeiras horas, sendo um excelente método rápido, não destrutivo e de baixo custo, de fácil aplicação e exequível aplicado para identificar e conservar esse grupo importante de organismos diversos e complexos, como são os fungos.

Palavras-chave: Fungos, *Biospeckle*, Momento de Inércia, *Aspergillus*, *Penicillium*, AVD, STS

ABSTRACT

The detection and monitoring of fungi, in recent years, have now available computational methods of free analysis, easy implementation, reducing costs and enabling non-destructive processes. This work proposes to analyze the changes obtained in the Biospeckle pattern, which arises when the laser beam is incident on a surface in a dynamic process, and observe the phenomenon of seizure, that is, when such surface demonstrates some biological activity. For this purpose, three activity indexes - Moment of inertia (IM), Differences of Absolute Values (AVD) and Space Time Speckle (STS) - were used for the images generated by different fungi in the first days of their incubation, evolving into the first hours. The results obtained were encouraging for the monitoring of fungi in their first hours after inoculation. From the isolation of the fungi, followed by the peel in Petri dishes, their growth was observed in several stages. In the first stage of the research, it was investigated the growth of fungi during their first week of incubation, the curve of this development showed to be quite coherent with their growth. The Gaussian distribution was then applied, obtaining the correction of this curve. A comparison between the *Aspergillus* and *Penicillium* fungi was carried out in the first week after incubation, and the curves corroborated much for the development of the research. The investigation was carried out for the first hours of incubation with the fungus *Aspergillus niger*, proving the results obtained in the initial tests. The applied indices statistical analysis demonstrated the consistency of the obtained data through its normality curve, proving to be quite profitable as well as demonstrating that this technique proved to be an adequate monitoring tool for the first week of growth for both fungi, 24 hours of development. In this sense, the present research recognizes that it is possible to indicate the *biospeckle* technique available as a tool to identify the biological activity of fungi, aiming to contribute to provide information on the fungi inoculation during its first growing hours, being an extra tool among others applied to identify this important group of diverse and complex organisms, such as fungi.

Key words: Fungi, Biospeckle, Moment of Inertia, *Aspergillus*, *Penicillium*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da formação da THSP bidimensional.....	24
Figura 2 – THSP com níveis distintos de atividade biológica.....	24
Figura 3 – THSP com níveis distintos de atividade dinâmica.....	25
Figura 4 – Matriz de Ocorrência (MOC) gerada pelo modelo de baixa atividade	26
Figura 5 – Matriz de Ocorrência (MOC) gerada pelo modelo, média atividade.....	26
Figura 6 – Matriz de Ocorrência (MOC) gerada pelo modelo, alta atividade.....	27
Figura 7 – Método Fujii em destaque (semente de milho).....	29
Figura 8 – Comparação de imagens de <i>Biospeckle</i> e da luz branca.	35
Figura 9 – Diagrama esquemático da configuração experimental	36
Figura 10 – Configuração do experimento	37
Figura 11 – Cladograma – esquema não enraizado de filogenia dos principais grupos do domínio Eukaria.	39
Figura 12 – Classificação de fungos.....	42
Figura 13 – Métodos de Detecção de fungos	46
Figura 14 – <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	47
Figura 15 – Tipos de ramificações em espécie de <i>Aspergillus</i> bisseriado.....	48
Figura 16 – <i>Aspergillus niger</i> utilizado no experimento (placas 4, 6 e 7).....	49
Figura 17 – <i>Aspergillus niger</i> utilizado no experimento	49
Figura 18 – Micrografias eletrônicas de varredura de vários tipos de <i>penicilli</i> , mostrando a relação entre o diâmetro dos tipos e os outros elementos do <i>penicillus</i>	51
Figura 19 – Placa de Petri com os fungos <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> ,.....	53
Figura 20 – Estrutura para obtenção do <i>Biospeckle</i> Lab. 3 CEDIA	53
Figura 21 – Ensaio <i>Biospeckle</i> , configuração básica com retroiluminação.	54
Figura 22 – Base superior do dispositivo de posicionamento para medição <i>Biospeckle</i> na configuração básica de retroiluminação das amostras.....	55
Figura 23 – Dispositivo de montagem (base superior e base inferior).....	56
Figura 24 – Foto 1 do dispositivo de montagem	57
Figura 25 – <i>Software Speckle Tool</i> v1.2 (livre), utilizado nas análises das imagens nos experimentos.....	58

Figura 26 – <i>Software Speckle Tool</i> v1.2(livre), utilizado nos experimentos com histograma .	58
Figura 27 – <i>Software</i> DinoCapture2.0 utilizado análise das imagens nos experimentos	59
Figura 28 – <i>Octave software</i> de processamento de imagem, livre.	59
Figura 29 – Deslocamento do foco na placa de Petri aplicando a distribuição gaussiana.	60
Figura 30 – Foto do terceiro experimento – Fungo <i>Aspergillus</i> – Laboratório CEDIA.....	62
Figura 31 – Placas de petri em detalhe (a).....	62
Figura 32 – Placas de petri em detalhe (b)	63
Figura 33 – Placas de petri em detalhe (c).....	63
Figura 34 – Placas de fungos <i>Aspergillus</i> após uma semana.	65
Figura 35 – Estatístico antes de depois, desprezando duas informações como “outliers”	66
Figura 36 – Curva de normalidade para os três índices propostos: AVD, IM e STD	67
Figura 37 – Momento de Inércia (IM1) obtido para o experimento no segundo dia	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Crescimentos dos fungos <i>Aspergillus</i> (I) e <i>Penicillium</i> (II), do primeiro ao quarto dia, 96 horas.....	69
Gráfico 2 – Curva após o deslocamento do foco.....	70
Gráfico 3 – Curva após o deslocamento do foco.....	71
Gráfico 4 – Comparação do crescimento entre AVD MI e STD primeira semana.....	72
Gráfico 5 – Comparação de 2 a 8 horas após a inoculação – parâmetros IM, STD e AVD	72
Gráfico 6 – Comparação de 20 a 24 horas após a inoculação – parâmetros IM, STD e AVD	73
Gráfico 7 – Comparação de 30 a 35 horas após a inoculação – parâmetros IM, STD e AVD	73
Gráfico 8 – Três métodos de detecção de crescimento - <i>Biospeckle</i> , AVD, STD, IM.....	74
Gráfico 9 – Comportamento dos fungos nas primeiras oito horas após a inoculação.....	75
Gráfico 10 – Curva média do comportamento dos fungos da segunda à oitava horas após a inoculação.....	76
Gráfico 11 – Fungos da vigésima à vigésima quarta horas após a inoculação.....	77
Gráfico 12 – Curva média do comportamento dos fungos da vigésima à vigésima quarta horas após a inoculação.....	78
Gráfico 13 – Comportamento dos fungos da quadragésima quinta hora até a quinquagésima hora após a inoculação.....	79
Gráfico 14 – Curva média do comportamento dos fungos da quadragésima quinta a quinquagésima hora	79
Gráfico 15 – Comportamento dos fungos nas três etapas: de 2 a 8, 20 a 24 e de 45 a 50 horas	80
Gráfico 16 – Comportamento dos fungos da sétima hora até a décima terceira hora	81
Gráfico 17 – Comportamento médio da sétima à décima terceira hora.	82
Gráfico 18 – Comportamento dos fungos da vigésima à vigésima sexta hora.....	82
Gráfico 19 – Comportamento médio do crescimento dos fungos da vigésima à vigésima sexta hora	83
Gráfico 20 – Comportamento médio do crescimento dos fungos da vigésima à vigésima sexta hora	84
Gráfico 21 – Comportamento médio do crescimento dos fungos da vigésima à vigésima sexta hora	84
Gráfico 22 – Curva comparativa do crescimento do 4º experimento	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenho experimental 3 – Fungo <i>Aspergillus</i>	65
Tabela 2 – IM1, IM2 para os fungos (I) <i>Aspergillus</i> e (II) <i>Penicillium</i>	69
Tabela 3 – Momento de Inércia para as primeiras 8 horas	75
Tabela 4 – Momento de Inércia para 20 a 24 horas após a inoculação.	77

LISTA DE EQUAÇÕES

(1) $MOC = N_{ij}$	25
(2) $F_{jix,y} = k = 1/N_{IKx,y-1K} + 1_{x,y} 1_{Kx,y} + 1K + 1_{x,y}$	29
(3) $DG = k.i. 1_{kx,y-1k} + 1_{x,y}$	30
(4) $Sd^2(x,y) = i = 1/N_{1x,y,i} - \mu_{x,y,i}, 2N$	30
(5) $SD_{x,y} = SD^2_{x,y} \max SD. 255$	30
(6) $MI = i,j MOC_{ij} * i-j^2 \text{normalization}$	31
(7) $AVD = ij COM_{i,j} * i-j$	32
(8) $AC-C_{ij} = k = 1/N_{1k, 1k,i} + jk = 1/N_{12k, iK} = 1/N_{12k, i} + j12$	32
(9) Coeficiente de correlação $C_j = i = 1/m^2 c_{ij}$	33
(10) $P(x = x_i) = \lambda x_i x_i! . e^{-\lambda}$	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Autocorrelação de sinais
AVD	Método Diferenças dos Valores Absolutos
BSL	<i>Biospeckle Laser</i>
CCD	<i>Charge Coupled Detector</i>
CEDIA	Centro de Desenvolvimento de Instrumentação aplicada à Agropecuária
DG	Diferença Generalizada
DRB	Detecção Rápida Bacteriana
ESPI	<i>Electronic Speckle Pattern Interferometry</i>
MDI	Módulo de Dispersão de Intensidade
MEA	Ágar Extrato de Malte
MI	Momento de Inércia
MOC	Matrizes de Ocorrências Modificadas
MOM	Matriz de Ocorrência Modificada
PCR	Reação em cadeia de polimerase
SD	Desvio Padrão
STS	<i>Space Time Speckle</i>
THSP	<i>Time History Speckle Pattern</i>
WGD	Diferença Generalizada Ponderada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Justificativa.....	20
1.2 Objetivos.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Conceitos básicos do <i>biospeckle</i>	22
2.2 Histórico do Biospeckle.....	22
2.3 Métodos aplicados na análise do Biospeckle	27
2.3.1 Métodos gráficos	28
2.3.2 Métodos numéricos	31
2.4 Aplicações com <i>Biospeckle</i>	33
2.4.1 <i>Biospeckle</i> e os microrganismos.....	35
2.5 Fungos	38
2.5.1 Revisão	38
2.5.2 Histórico	40
2.5.3 Característica e diversidade	41
2.5.4 Classificação dos fungos	42
2.5.5 Reprodução dos fungos.....	43
2.5.6 Detecção de fungos em alimentos	44
2.5.7 Fungos utilizados nos experimentos.....	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.1 fungos Micoteca	52
3.2 Obtenções do <i>Biospeckle</i>	53
3.3 Experimentos	60
3.3.1 Isolamento dos fungos	60
3.3.2 Experimento 1 – Aplicação da distribuição gaussiana	60

3.3.3 Experimento 2 – Momento de Inércia para fungos <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	61
3.3.4 Experimento 3 – Atividade da imagem ao longo do tempo Fungo <i>Aspergillus</i>	61
3.3.5 Experimento 4 – Imagem ao longo do tempo <i>Aspergillus</i>	65
3.4 Material e modelo de análise	65
3.4.1 Estatísticas descritivas	66
3.4.2 Material Analisado	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
4.1 Cálculos do Momento de Inércia (IM1)	71
4.2. Segundo experimento	71
4.3 Terceiro experimento.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICES	92
APÊNDICE A – ANÁLISE DO EXPERIMENTO	93
APÊNDICE B – TABELAS E GRÁFICOS PARCIAIS	105
ANEXO – CONSULTORIA EM ESTATÍSTICA.....	112

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de se obter uma identificação de fungos e bactérias de forma rápida e segura está cada vez mais sendo requisitada, pois as consequências de uma identificação imprecisa podem ser extremamente prejudiciais à subsistência humana. A detecção e o monitoramento de fungos, contribuindo para a sua preservação nos últimos anos, passaram a dispor de métodos computacionais de análises livres, de fácil implementação, reduzindo custos e possibilitando processos não destrutivos.

Para Rodriguez et al. (2015), é necessária a detecção precoce de fungos filamentosos em matérias-primas ou alimentos pré-processados, seguidos de ações corretivas, para evitar riscos associados à acumulação de micotoxinas ou deterioração de alimentos, embora a presença toxigênica ou a deterioração de fungos filamentosos nem sempre indique a produção de micotoxinas ou a deterioração dos alimentos. De acordo com Maciel (2013), novas ferramentas emergentes estão sendo utilizadas na identificação de fungos, acredita-se que a combinação de diversas ferramentas de identificação, como se aplica em uma abordagem polifásica, torna-se cada vez mais relevante. Para Fracorolli (2014), novos métodos estão sendo propostos e pesquisados, dentre estes destacam-se aqueles que se baseiam nas técnicas de processamentos de imagens.

Nesse contexto, propomos com o nosso trabalho de pesquisa disponibilizar um método voltado para a monitorização e identificação de fungos em seus primeiros horas de inoculação. Para tanto, aplicamos o *Biospeckle*, que se caracteriza por ser um fenômeno óptico de interferência que carrega informações sobre o material iluminado por uma fonte coerente.

Acompanhou-se a evolução do crescimento dos fungos *Aspergillus negir* e *Penicillium*, por serem estes microrganismos muito interessantes, não só em termos de aplicação biotecnológica, mas também para a economia, devido a suas propriedades metabólicas (MONTEIRO, 2012). Os fungos foram incubados em placas de Petri em nossos diversos experimentos realizados nos laboratórios da Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e do Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada à Agropecuária (CEDIA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

O escopo de análise foi a detecção de crescimento de fungos em ambiente ágar-ágar em sua primeira semana e em seguida nas primeiras horas após a incubação. O substrato aplicado nos experimentos foi Ágar Extrato de Mate (MEA), pois é indicado quando se objetiva observar o crescimento de fungos. O desenvolvimento destes foi comprovado de forma eficaz pelo *Biospeckle*. A observação do crescimento dos fungos foi realizada tendo-se como parâmetro de análise os índices: Diferença dos Valores absoluto (AVD), Momento de Inércia (MI) e Desvio Padrão (STD).

A possibilidade de aplicação do *Biospeckle* como ferramenta de análise da atividade biológica amplia-se a cada dia. Este método consiste em incidir um feixe de *laser*, monocromático, colimado e coerente, sobre uma superfície opticamente rugosa, áspera, ou seja, com rugosidades da ordem de comprimento de onda da luz incidente. De acordo com o princípio de Huygens, quando um raio de luz atinge uma superfície, cada ponto desta atua como emissor de pequenas ondículas secundárias, havendo a formação de uma estrutura granular no espaço, denominada de *Speckle* (SILVA, 2007).

O surgimento do *Biospeckle* só foi possível pela descoberta da geração de luz *laser*, obtida por emissão estimulada, a qual tem como característica algumas propriedades, tais como: alta coerência, quase monocromaticidade, alta direcionalidade e alta intensidade. Essas propriedades impulsionaram uma série de aplicações, proporcionando um avanço tecnológico nas pesquisas científicas.

Afirma Silva (2007) que, se a superfície observada demonstra alguma atividade biológica, passa a ser denominada de *Biospeckle*. Quando tal superfície for, por exemplo, de tecidos biológicos que exibam atividade biológica ou fisiológica, o padrão *Speckle* também se modifica com o tempo, sendo conhecido como *Speckle* dinâmico ou *Biospeckle*.

Ao incidir o *laser* em processo dinâmico, observa-se o fenômeno de fervilhamento, isto é, quando essa superfície demonstra alguma atividade biológica, passa a ser denominada de *Biospeckle* (BRAGA JUNIOR, 2000).

Para Braga Júnior (2017), após a publicação dos primeiros trabalhos de pesquisas científicas voltadas para indústria, em 1960, houve vários avanços e o conhecimento do *Biospeckle* se expandiu em diversas áreas da agricultura. A partir de 1970, esses avanços passaram a se estender a áreas relacionadas (da biologia à medicina). A possibilidade de novas aplicações do *Biospeckle* contando com modernas ferramentas de análise das atividades biológicas vislumbra a possibilidade de ampliar-se a cada dia.

Por outro lado, para Peluque (2014), os fungos são importantes por diversas razões, pois assim que crescem nos alimentos ocasionam mudanças indesejáveis, tanto na composição química quanto nas estruturas e aparências. Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* estão relacionados a diversas *commodities* agrícolas, devido a sua primordial importância na deterioração de alimentos; à medicina e à biotecnologia, tanto quanto a outros campos de aplicações industriais. Segundo Medeiros et al. (2012), as micotoxinas são produzidas pelo metabolismo secundário de várias espécies de fungos e podem ser encontradas em quase 25% das *commodities* agrícolas.

O presente trabalho de pesquisa propõe possibilitar o *Biospeckle* como uma ferramenta para detecção da atividade biológica de fungos e ambiciona contribuir para disponibilizar informações sobre a viabilidade da inoculação de fungos em suas primeiras horas de incubação. Por ser um método de baixo custo, não destrutivo e de montagem simples, tem demonstrado ser capaz de contribuir para monitorar, caracterizar e analisar as atividades biológicas. Assim sendo, uma primorosa ferramenta, dentre as várias existentes, aplicada para identificar esse grupo diverso e complexo de microrganismos.

1.1 Justificativa

A identificação correta dos microrganismos, através de métodos de baixo custo e eficientes, e com uma resposta rápida é de fundamental importância para os sistemas microbianos que são indispensáveis à sobrevivência humana.

A técnica do *Biospeckle laser* torna-se cada vez mais um consenso em diversas áreas de aplicações científicas voltadas à agricultura devido a sua implementação poder ser realizada de forma simples.

As pesquisas com fungos filamentosos, os mais frequentemente presentes na natureza, estão se tornando cada vez mais importantes devido à frequência e diversidade de infecções causadas por esses microrganismos.

1.2 Objetivos

O objetivo deste trabalho é analisar as alterações obtidas no padrão *Biospeckle* geradas por diferentes fungos nas primeiras horas após a inoculação.

Sendo assim, os objetivos específicos são:

- Gerar mapa da aplicação de *Biospeckle laser* na detecção de duas diferentes espécies de fungos de comum ocorrência em frutos.
- Identificar padrões diferentes de atividades biológicas, em suas primeiras horas de inoculação.
- Correlacionar a aplicação de *Biospeckle laser* para identificar e quantificar atividades biológicas geradas por fungos em ambiente de ágar-ágar.
- Procurar demonstrar a possibilidade que o *Biospeckle* pode contribuir para a preservação e manutenção de materiais biológicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Conceitos básicos do *biospeckle*

De acordo com Rabelo (2000), o *Biospeckle* ou *Speckle* dinâmico surge como uma forma de avaliação de atividade biológica e baseia-se em um fenômeno óptico de interferência que ocorre quando o *laser* incide sobre uma superfície onde se desenvolve um processo dinâmico. Conforme Braga Junior (2000), *Biospeckle* é definido como uma figura de interferência formada ao incidir o *laser* em uma superfície exibindo algum processo dinâmico, sendo possível observar o fenômeno do ferverilhamento. O *Biospeckle* é aplicado no monitoramento das atividades biológicas em diversos ramos de pesquisas visando obter a máxima informação quanto ao movimento da estrutura do material iluminado.

Devido a sua eficiente coerência viabilizou o registro de construções de frentes de ondas nos processos holográficos, porém, por outro lado, fez suscitar de forma inevitável o surgimento de uma estrutura granular no espaço, o *Speckle*.

Interessante notar que, a princípio, essa interferência foi interpretada como um ruído óptico indesejado, debruçaram-se então esforços no sentido de eliminá-lo, mas logo se descobriu que esse ruído é detentor de informações valiosas referentes à superfície a qual está sendo iluminada.

Segundo Silva (2007), no discurso proferido na entrega do prêmio Nobel em Física de 1971, “por sua invenção e desenvolvimento do método holográfico”, Dennis Gabor comenta: “... Na verdade [*Speckle*] não é ruído, é informação que não desejamos, informação (...) na qual não estamos interessados...”.

2.2 Histórico do *Biospeckle*

Segundo Braga Junior (2017), o conhecimento do *Speckle* originou-se na pesquisa proposta e desenvolvida por Briers (1975) demonstrando sua importância nas pequenas alterações em espécimes botânicas monitoradas. Rabelo (2000) comenta que Briers (1993) afirma que o padrão *Speckle* observado é resultante da superposição de dois diferentes padrões grandes e pequenos provenientes do espalhamento da luz que vem do interior do material. Passa a ser conhecido como *Speckle* dinâmico ou *Biospeckle a laser* (BSL) por Aizu e Asakura (1991) quando aplicado em material biológico (BRAGA JUNIOR, 2017).

O conhecimento da tecnologia de aplicação *Biospeckle* em biosistemas é creditado a Rabal e Braga (2008). O *Biospeckle* torna-se conhecido também na literatura médica por meio de Aizu e Asakura (1991), Fujii et al. (1995); na agricultura por Oulamara, Tribillon e Duvernoy (1998), Zdunek et al. (2014), observando e mensurando diversos atributos de amostras. Assim, a complexidade dos tecidos biológicos ou células representa desafio para identificar ou isolar o fenômeno principal responsável pelo efeito de fervilhamento nas mudanças de *Speckle* (CARDOSO et al., 2011; BRAGA et al., 2007).

Nessa linha de pesquisa, Oulamara et al. (1989), demonstrando o *speckle* como meio de investigação da dinâmica de amostra biológica, credenciaram, com o seu trabalho de pesquisa anterior ao de Xu et al. (1995), estabelecer formas de se quantificar a atividade biológica do *Biospeckle*, através de análise numérica, demonstrando a sua eficácia através de experimento com laranja e maçã. Não obstante, a qualificação do fenômeno e o mapa das atividades, fundamentados nos trabalhos novamente de Fujii et al. (1985), no de Briers e Webster (1996) e no de Arizaga et al. (2002) demonstram o *Biospeckle* de forma gráfica.

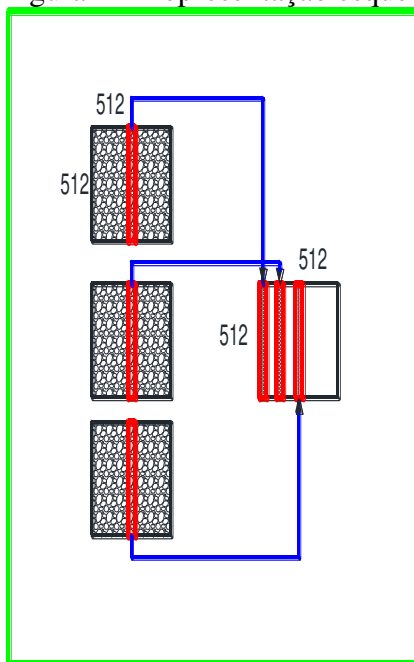
A análise numérica e/ou gráfica é adotada por quase todos os pesquisadores que almejam o monitoramento das atividades das imagens biológicas no domínio do tempo e da frequência da técnica do *Biospeckle*. No entanto, pesquisas voltadas para um protocolo alternativo para avaliar a informação do *Biospeckle* apresentando associação entre as saídas gráficas e numéricas das imagens sob o domínio espectral foram comunicadas (BRAGA et al., 2012).

Oulamara et al. (1989) propuseram a primeira aproximação para caracterizar a evolução ao longo do tempo de um grão de *Speckle*. A este respeito, Rabelo (2000) descreve este método de monitorar as variações temporais da seguinte forma:

[...]. Esse processo se inicia com a aquisição de 512 imagens sucessivas da amostra iluminada, de forma que somente a coluna central de cada imagem é selecionada. Com essas colunas constrói-se uma nova imagem de 512x512 elementos denominados: padrão da história temporal do “*Speckle*” THSP. O THSP ou STS pode ser entendido como uma matriz onde as linhas representam pontos diferentes dos objetos, ou seja, a parte espacial da imagem, e as colunas representam sua intensidade em todos os instantes amostrados, ou seja, a parte temporal da imagem. (RABELO, 2000)

Na Figura 1, por exemplo, é mostrado o processo de retirada da coluna central de cada imagem para a construção de uma nova imagem contendo todas as variações das atividades biológicas ao longo do tempo.

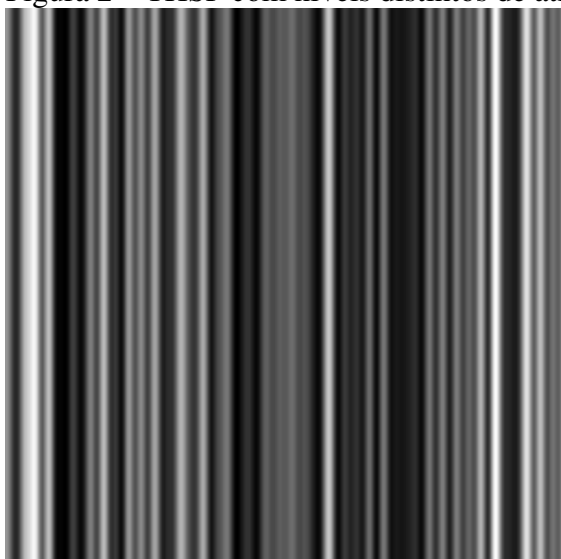
Figura 1 – Representação esquemática da formação da THSP bidimensional



Fonte: Adaptada de Silva (2007)

As duas imagens a seguir representam a THSP construída a partir de manchas dispersas das superfícies com níveis distintos de atividade biológica. A primeira espécime (Figura 2) possui baixa atividade estática.

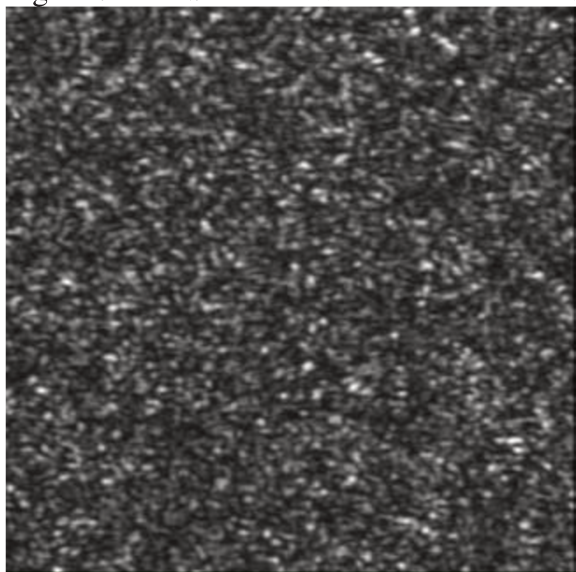
Figura 2 – THSP com níveis distintos de atividade biológica.



Fonte: Silva et al. (2008).

A segunda espécime (Figura 3) possui uma elevada atividade biológica (dinâmica), mostrando um *Speckle* (fervilhamento).

Figura 3 – THSP com níveis distintos de atividade dinâmica.



Fonte: Silva et al. (2008).

A Matriz de Ocorrência (MOC), definida por Arizaga, Trivi e Rabal (1999), determina o grau de intensidade do *Biospeckle* da imagem obtida, através da posição dos bits.

$$(1) \text{ MOC} = |N_{ij}|$$

O fator N_{ij} corresponde ao número de ocorrências de um valor de intensidade i , seguido por um valor de intensidade j , ao se deslocar pela linha do THSP. As entradas são números de ocorrência de um valor 8 bits (0-255) de intensidade i e seguido por um valor de intensidade j presente no THSP (ARIZAGA; TRIVI e RABAL, 1999).

Neste contexto a MOC de um experimento preliminar, realizado com limão no Laboratório de Óptica da FEAGRI, é posta na sequência, observa-se que existe baixa dispersão dos pontos em torno da diagonal principal, caracterizando baixa atividade biológica.

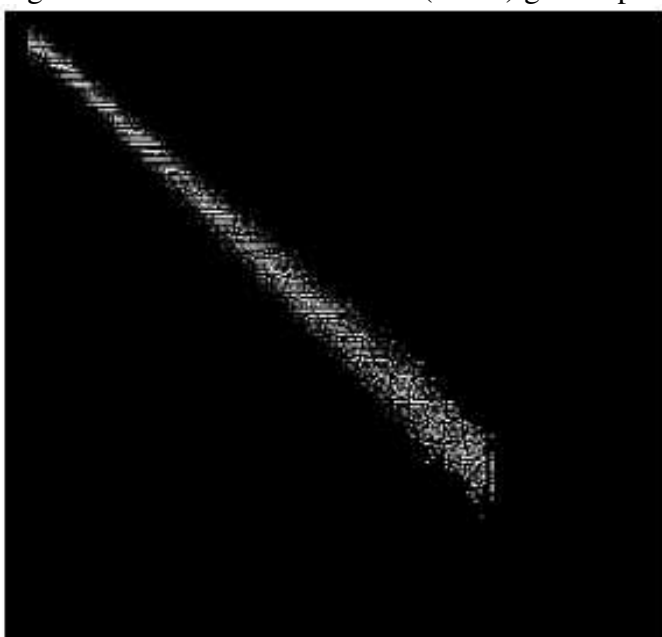
A Figura 4 apresenta uma MOC gerada pelo modelo de baixa atividade. Foi obtida de forma experimental, em ensaio realizado para ajuste metodológico no Laboratório da FEAGRI, com um limão, para observar seu processo de envelhecimento. Posicionando-se o limão em um local fixo de iluminação do raio laser, foram feitas filmagens rápidas, de aproximadamente um segundo cada, num período de 6 horas. Feito um processamento das imagens para se obter o grau de atividade biológica.

Figura 4 – Matriz de Ocorrência (MOC) gerada pelo modelo de baixa atividade



A Figura 5 apresenta imagens geradas por um modelo de média atividade.

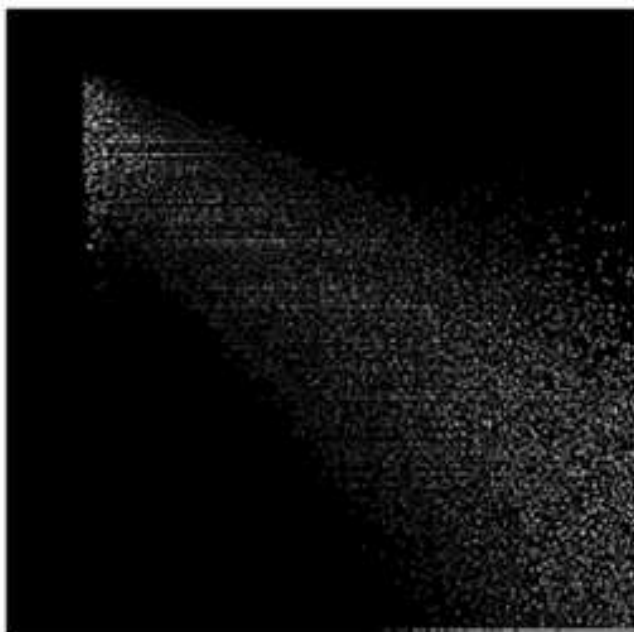
Figura 5 – Matriz de Ocorrência (MOC) gerada pelo modelo, média atividade



Fonte: Alves (2012).

A Figura 6 mostra um modelo com alta atividade, com dispersão em torno da diagonal principal.

Figura 6 – Matriz de Ocorrência (MOC) gerada pelo modelo, alta atividade



Fonte: Alves (2012).

As diferenças entre essas duas amostras podem ser observadas comparando seu grau de atividade biológica, que está relacionado à sua intensidade. Em outras palavras, quanto mais espalhada em torno da diagonal principal da matriz, mais dinâmica é a amostra; por outro lado, quanto mais estática, menor é o espalhamento em torno da diagonal principal, conseqüentemente, menor é sua intensidade.

2.3 Métodos aplicados na análise do Biospeckle

O biospeckle é medido através de um índice que é um número adimensional que retorna após o processamento de sinal digital que representa ou descreve uma ou mais características do Biospeckle. A relação entre o biospeckle e essas características pode ser linear ou não, mas é desejável que eles tenham uma correspondência biunívoca (Rivera, Braga Júnior, 2017).

A escolha da melhor técnica a ser aplicada na análise do *Biospeckle* necessita considerar as especificidades de cada espécime a ser pesquisada, para alcançar os objetivos. As variáveis envolvidas no processo requerem a correta adequação em função do conjunto de metodologias e montagens do experimento existente e aplicados ao longo dos anos de desenvolvimento do *Biospeckle*, algumas escolhas podem induzir naturalmente ao erro, suscitando dúvidas quanto a sua aplicação.

Conforme Moreira (2013), o sucesso dessa técnica está associado à correta escolha das ferramentas para processar as imagens, assim como a disposição dos equipamentos para a sua aquisição. Esse autor demonstra essa preocupação buscando identificar as principais técnicas de análise do *Biospeckle*, implementando-as em funções de programas matemáticos de livre acesso.

Enes (2011) observa que as principais técnicas empregadas para o estudo do fenômeno *Speckle* levam em consideração as variações das histórias temporais dos dados estatísticos de primeira e segunda ordem, *space time speacke* (STS), assim como as Matrizes de Ocorrências Modificadas (MOM) que possibilitam o desenvolvimento de mapas de atividades, tais como o Diferença Generalizada (DG), o método Fujii e a técnica do Momento de Inércia (MI) que é responsável por determinar a quantificação desse fenômeno.

Entretanto, ressalta Ribeiro (2011) que as análises gráficas, apesar de serem extremamente importantes, são subjetivas e revelaram-se errôneas e limitadas, podendo induzir a interpretações incertas, tornando necessárias análises numéricas para a sua sustentação.

Conforme Enes (2011) e Fracarolli (2014), a aquisição de informação sobre a atividade biológica de um material através do *Biospeckle* pode ser interpretada por diferentes métodos. De acordo com Moreira (2014), existem métodos de análise do *Biospeckle* os quais fornecem resultados visuais, expressados de forma gráfica, como é o método Fujii, Diferenças generalizadas (DG) e Desvio Padrão (SD). Há também métodos que geram resultados numéricos, tais como Momento de Inércia (MI), Diferenças dos Valores Absolutos (AVD) e Autocorrelação. Comenta ainda que outras análises como história temporal do padrão *Speckle* (THSP) e a Matriz de Ocorrência (MOC), podem ser classificadas com numéricas e gráficas.

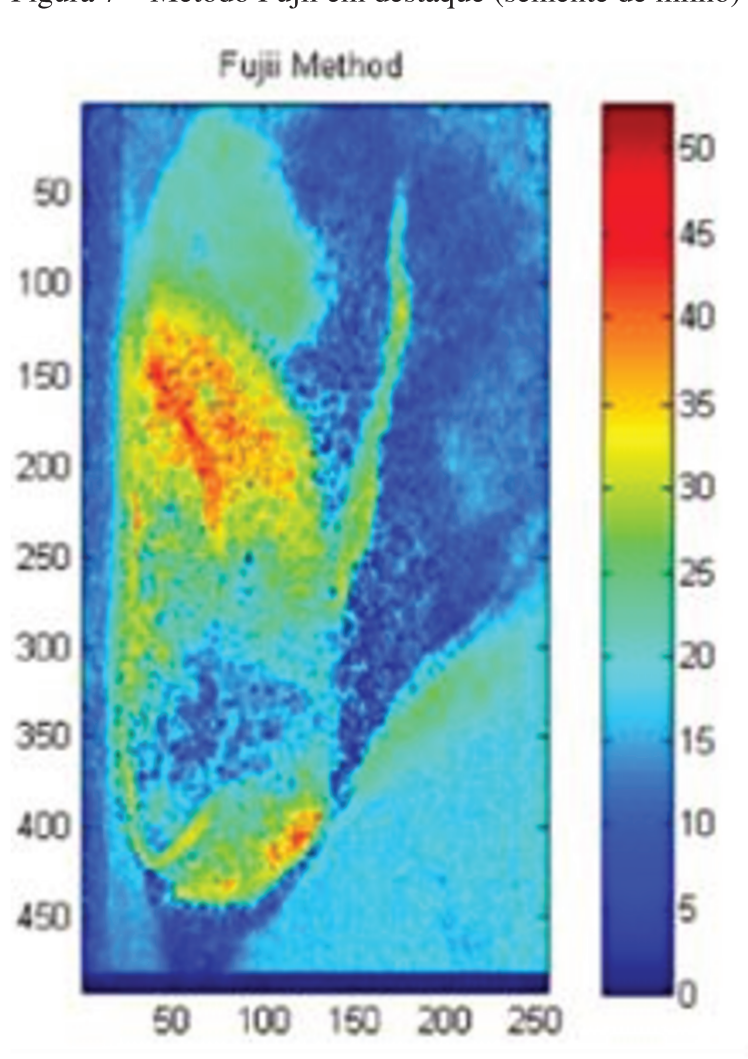
2.3.1 Métodos gráficos

Método Fujii

Método atribuído a Fujii et al. (1987) é aplicado quando se deseja obter informações de diferentes áreas de atividades do objeto iluminado, relacionado à mudança de padrão do *Speckle*, obtido através de uma ponderação na qual as diferenças das imagens consecutivas são divididas pela soma das mesmas – fator de ponderação (AIZU e ASAKURA, 1991).

Na Figura 7 é mostrado um exemplo do comportamento das rotinas numéricas sob o ponto de vista da frequência, utilizando resultados gráficos para o método Fujii (BRAGA JÚNIOR, 2017).

Figura 7 – Método Fujii em destaque (semente de milho)



Fonte: Braga Júnior (2017)

Os autores do método demonstram que, a partir da equação que relaciona a intensidade e a posição dos pixels, uma nova imagem é construída. O resultado será uma matriz entre os valores 0 e 1, em que 0 (zero) representa a cor preta e 1 (um) representa a cor branca (MOREIRA, 2014). Sua fórmula é:

$$(2) \text{Fujii}(x, y) = \sum_{k=1}^N \left| \frac{I_K(x, y) - I_{K+1}(x, y)}{I_K(x, y) + I_{K+1}(x, y)} \right|$$

Onde N corresponde ao total de imagem gravadas e $I_K(x, y)$ é valor de intensidade na posição (x,y) na imagem K.

Método de Diferenças Generalizadas (DG)

Esse método permite indicar as áreas que apresentam diferentes níveis de atividades biológicas relacionadas às mudanças de fases do padrão *Speckle*. Apresentado por Arizaga, Trivi e Rabal (1999); Arizaga (2002) como uma alternativa ao método Fujii, o método das diferenças generalizadas não possui o fator de ponderação e as diferenças entre as intensidades dos *pixels* foram generalizadas, todo o conjunto de imagens capturadas. Sua equação é descrita por:

$$(3) DG = \sum_k \cdot \sum_i \cdot I_k(x, y) - I_{k+1}(x, y)$$

sendo K número de Padrão, I intensidade e x, y pixel subsequente.

As zonas com menor atividade biológica aparecem no mapa mais escuras em relação àquelas regiões com maior variação de intensidade observadas ao longo do tempo.

Método de Desvio Padrão

Método utilizado para quantificar os níveis de cinza de uma imagem. Assim como um histograma da imagem resultante do desvio padrão baixo representa imagens homogêneas, isto é, com pouca variabilidade, o desvio padrão alto representa imagens heterogêneas, isto é, com grande variabilidade (NEVES e PELAES, 2001).

O método é realizado *pixel a pixel*, aplicando desvio padrão da intensidade do tempo. Sua fórmula é:

$$(4) Sd^2(x, y) = \sum_{i=1}^N \frac{[I(x, y, i) - \mu(x, y, i)]^2}{N}$$

em que I é o nível de cinza da coordenada (x, y) para cada imagem i, em N quadros e μ é o valor médio de cada pixel no tempo (representado por N).

As saídas normalizadas de acordo com a equação a seguir:

$$(5) SD(x, y) = \left(\frac{SD^2(x, y)}{\max(SD)} \right) \cdot 255$$

2.3.2 Métodos numéricos

Momento de Inércia

Enfatiza Rodrigues (2007) que o método mais preconizado para identificar atividades biológicas homogêneas, dentre os principais pesquisadores interessados na quantificação do fenômeno, é aplicado quando a espécie mantém o mesmo nível de atividade por toda a sua superfície. Rabelo (2000) aplicou, para medir característica da variação do *Speckle*, os cumulantes estatísticos e o momento de segunda ordem, o que é conhecido na literatura como Momento de Inércia. O grau de atividade biológica analisado através de uma imagem pode ser entendido por suas diversas variações da intensidade do material iluminado. Desta forma é conseguido através do método proposto por Oulamara et al. (1989) na manipulação das imagens, sendo na maioria das vezes uma taxa de aquisição padrão de 512 fotos, retira-se uma linha ou uma coluna de pixels em instantes sucessivos de cada imagem, formando assim uma nova imagem de 512 linhas X 512 colunas que constituirá a estória temporal do *Speckle* observado, a STS (*Spatial Temporal Speckle*) também designada por diversos autores como THSP (*Time History Speckle Pattern*) (SILVA, 2007; RODRIGUES, 2007).

Arizaga et al. (1999) relata que para extrair um número que represente ou quantifique a medida da dispersão dos valores em torno da diagonal principal da MOC (Fig. 3), propuseram calcular o Momento de Inércia (MI) a partir da Matriz de Ocorrência Modificada (MOM), analogamente ao sistema mecânico, como se a dispersão da matriz fosse análoga a uma massa (FRACAROLLI, 2014). Neste sentido Rabelo (2000) em seu trabalho utilizou como medida de caracterização da variação temporal do “*Speckle*” os cumulantes estatísticos e o momento de segunda ordem, também referido na literatura como Momento de Inércia. Sua fórmula pode ser dada pelo somatório do produto das ocorrências (MOC) pelo quadrado da diferença das posições de cada ocorrência. Arizaga, Trivi e Rabal (1999) basearam-se na normalização para uma Matriz de Ocorrência, com o objetivo de forçar cada linha do somatório, da seguinte maneira:

$$(6) \text{ MI} = \sum_{i,j} \frac{MOC_{ij} * (i-j)^2}{normalization}$$

onde i e j consiste na intensidade de cada linha nas posições de cada ocorrência.

Método Diferenças dos Valores Absolutos (AVD)

Este método é um momento de primeira ordem estatística, proposto por Braga Junior et al. (2012) como uma alternativa ao método Momento de Inércia. É baseado no princípio de que o somatório das diferenças é a informação principal buscada, e que a operação quadrada realizada no método Momento de Inércia pode ampliar as variações no THSP de forma distorcida nas altas frequências. Sua equação é dada por:

$$(7) \quad AVD = \sum_{ij} \{COM[i, j] * |i - j|\}$$

No entanto, existem variações da Equação 7 para o cálculo da Diferença dos Valores Absolutos, denominado de AVD por Arizaga et al. (1999), que representam a normalização de cada linha em que o valor de *normalization* será a soma das ocorrências por linha.

A normalização feita por Cardoso et al. (2011) realiza a *normalization* de todas as ocorrências da matriz MOC.

Método Autocorrelação

Para Silva (2007), a análise de autocorrelação é a maneira de comparar dois sinais a fim de estabelecer um grau de similaridade entre eles. Na autocorrelação, um determinado sinal é comparado consigo mesmo em pontos ou instantes distintos com o objetivo de se avaliar o comportamento de sua evolução no espaço ou no tempo.

Desenvolvido para análise do *Speckle* dinâmico, a autocorrelação dos sinais existentes entre um ponto e o seguinte em uma matriz espaço-tempo (STS) é demonstrada por Xu et al. (1995), e sua equação é dada por:

$$(8) \quad AC - C_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^N I(k, i) I(k, i+j)}{[\sum_{k=1}^N I^2(k, i) \sum_{k=1}^N I^2(k, i+j)]^{1/2}}$$

onde o termo C_{ij} representa o coeficiente de correlação da distribuição de uma intensidade de uma dada linha sendo que i e j estão relacionados aos tempos de ocorrência ($t_0 + i\Delta t + j\Delta t$). A intensidade $I(x, y)$ é referente ao pixel (x, y) do padrão STS do tamanho $M \times N$.

Para reduzir a flutuação de C_{ij} , implementa-se a média de C_{ij} , e obtém-se o coeficiente C_j , ao longo do tempo, definido pela equação:

$$(9) \text{ Coeficiente de correlação } C_j = \sum_{i=1}^{m/2} c_{ij}$$

Destaca Cardoso (2011) que, na comparação entre o método Fujii e Diferenças Generalizadas com a técnica do método do Desvio Padrão, este último consegue obter uma melhora da qualidade das imagens e um tempo menor de processamento. Para imagens testadas, esta nova técnica proporcionou melhor qualidade do que o método Fujii, e foi significativamente mais rápida do que o método Diferenças Generalizadas. A alta qualidade de imagem obtida e o baixo tempo de processo asseguram que SD (Desvio Padrão) é técnica adequada para a análise do *Biospeckle*.

2.4 Aplicações com *Biospeckle*

O *Biospeckle* ou *Speckle* dinâmico como ferramenta de inovação tecnológica encontra-se presente em diversas áreas do conhecimento. Esta técnica tem se apresentado como alternativa, com diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais, nos mais diversos campos do conhecimento. A preocupação em desenvolver um modelo para descrever a formação do *Biospeckle* foi proposta por Nascimento et al. (2007) a partir de hipótese simples de como tecido biológico difrata luz laser que coerente e qual o efeito da atividade biológica sobre a difração. O resultado real da comparação computacional e o resultado obtido com sementes em três diferentes condições de umidade foram satisfatórios, o modelo, de forma simples, reproduziu qualitativamente bem as curvas de autocorrelação do padrão *Speckle*.

Em outras áreas do conhecimento também é usufruída esta tecnologia: na Odontologia, para determinar a deformação em nível de colar de implantes com conexão interna (cone Morse), (SIZO, 2011); na Tecnologia nuclear, para detectar frentes de ondas (SILVA, 2011); no setor industrial, para determinar o ponto de secagem de tintas (AMALVY et al. 2001). Interessante também é o estudo sistemático das propriedades estatísticas do *Speckle* dinâmico com apresentação dos principais métodos empregados na sua análise (SILVA, 2007). A análise da vitalidade em tecidos vivos por meio de um modelo estocástico foi proposta por Rodrigues (2007). Alguns esforços têm contribuído para superar um dos maiores entraves à aplicação deste método, ou seja, a relação entre o ajuste da configuração experimental e sua monitoração em tempo real, como o trabalho proposto por Godinho (2012).

Na metrologia óptica, é apresentada a medida do coeficiente linear de dilatação térmica do alumínio, usando o interferograma obtido através da transformação de Fourier sobre a soma de duas imagens de *Speckle* deslocadas (SILVA e MURAMATSU, 2007). Através da metrologia a *laser*, em outra pesquisa, o destaque é para a possibilidade de medição do deslocamento de superfície pela geração de padrões de franja de interferência (SAITO, 2010).

A monitorização de fenômenos biológicos, através das análises das imagens e desenvolvimento de um protocolo para separar tecidos diferentes num mesmo material biológico pela assinatura da frequência por meio da associação de resultados numéricos e gráficos obtidos com a aplicação do *Biospeckle*, foi proposta para separar embrião e endosperma de semente de milho e de células com tumores de tecido normal em animais, com sucesso, por Braga Júnior et al. (2011).

Apesar de diversos trabalhos de pesquisas já relatados demonstrarem a relação entre o *Biospeckle* e as atividades biológicas de diversos espécimes, o desafio de se demonstrar a atividade observada permanece. Alves et al. (2013) deparam com muita complexidade para a monitorização e, em sua pesquisa, compara os métodos analíticos tradicionais com o *Biospeckle*, examinando a perda de massa, o teor de umidade e a taxa de respiração. Estes foram alguns dos objetivos alcançados nesse seu trabalho.

Na Agricultura, onde se concentra parte significativa das pesquisas, essa técnica é aplicada para a determinação do potencial germinativo de sementes do ipê-roxo (FRACAROLLI, 2011).

O *Biospeckle* foi também aplicado na análise do vigor e viabilidade das sementes, podendo ser mais um método alternativo para acessar a atividade do embrião na semente de milho e, de acordo com dos dados obtidos em Vivas et al. (2014), através de imagens processadas com *wavelets*, foi possível distinguir o local com maior atividade biológica, diferenciando a atividade biológica do embrião e a do endosperma.

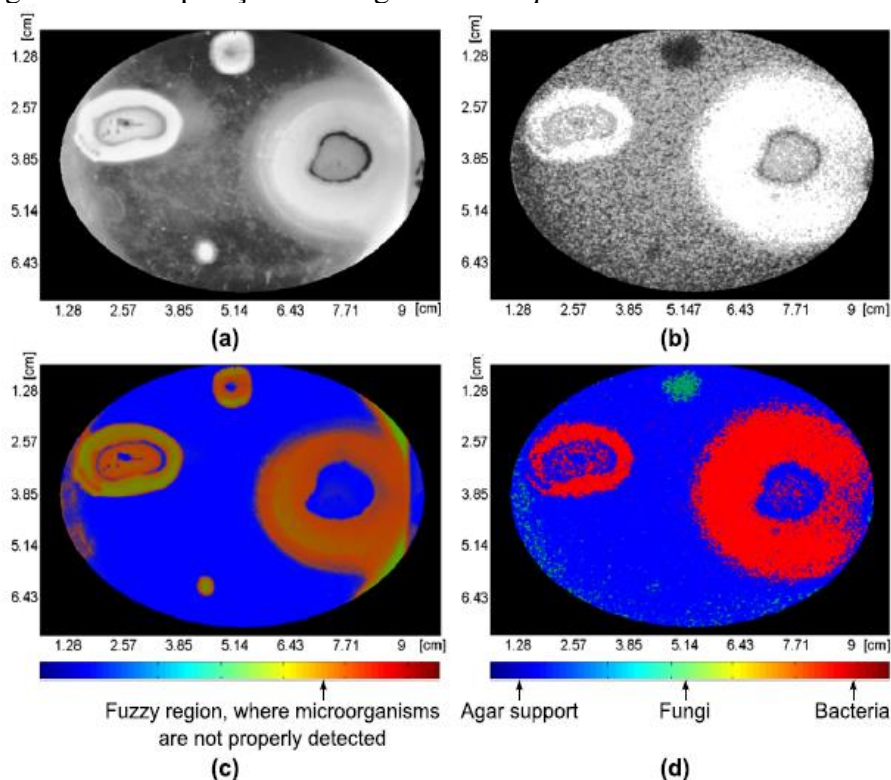
Comenta Braga Jr. (2017) que a busca por superação dos desafios - o rompimento dos limites impostos dessa técnica fora dos laboratórios - é incessante. A influência da luz externa e a vibração são ótimos exemplos dessas barreiras. A padronização dos procedimentos para manter a repetitividade, a portabilidade e a acessibilidade são levados a cabo neste trabalho.

2.4.1 *Biospeckle* e os microrganismos

A possibilidade da detecção de fungos em sementes de feijão aplicando a técnica de *Biospeckle* foi demonstrada por Bueno et al. (2005), sua pesquisa apresenta resultados satisfatórios ao investigar a presença de fungos em grãos de feijão. Três espécies de fungos foram inoculadas em algumas sementes de feijão, tais sementes inoculadas apresentaram atividade diferente daquelas não inoculadas demonstrando que o método era capaz de identificar padrões diferentes de atividades biológicas em sementes de feijão inoculadas, contribuindo com os esforços no estudo da melhora da qualidade de sementes.

Murialdo et al. (2012) apresentara um método aplicando o *Speckle* dinâmico para que se possa de forma simples discriminar fungos filamentosos de bactérias móveis em superfícies macias, em placa de ágar, como é mostrado na Figura 8. Essa pesquisa demonstra a detecção e a discriminação entre fungos e bactérias mais rapidamente que técnicas convencionais, podendo esse método ser aplicado em diversas pesquisas biológicas e biomédicas, na análise de tecido infectado e tratamentos hospitalares.

Figura 8 – Comparação de imagens de *Biospeckle* e da luz branca.



Fonte: Murialdo et al. (2012)

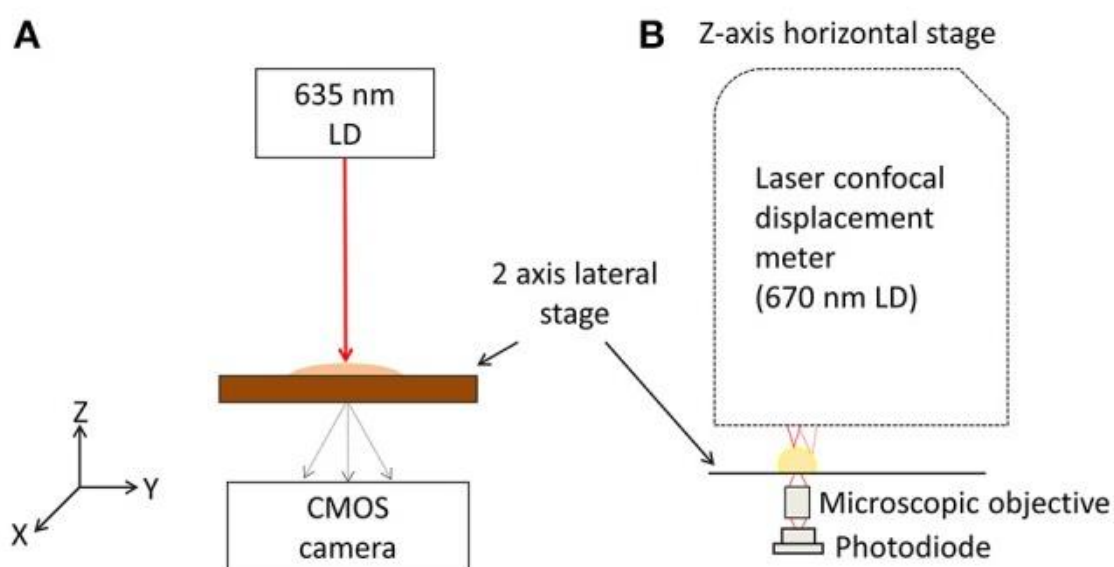
- (a) Fotografia de luz branca de uma placa de Petri inoculada com bactérias e fungos,
- (b) energia equalizada das imagens de manchas filtradas,
- (c) probabilidade de discriminação RGB da fotografia de luz branca (a), e

(d) probabilidade de discriminação RGB a imagem processada do *Speckle* (b).

A tecnologia de fenotipagem de colônias bacterianas isenta de etiqueta denominada BARDOT (Detecção Rápida usando Tecnologia de Espalhamento Óptico), desenvolvida por Kim et al. (2014), forneceu uma classificação bem-sucedida de várias bactérias diferentes do gênero, espécie e nível de sorovar¹. Esses autores apresentaram um modelo teórico explicando o mecanismo subjacente da formação do *Speckle* pelas colônias de espécies de bacilos.

Na Figura 9 é mostrado o diagrama esquemático da configuração experimental dessa tecnologia de fenotipagem de colônias bacterianas.

Figura 9 – Diagrama esquemático da configuração experimental



Fonte: Kim et al. (2014)

(A) – Diagrama esquemático do instrumento BARDOT, diodo *laser* (LD) com comprimento de onda de 632nm é usado como fonte de luz e, colidindo diretamente com a colônia bacteriana única, cultiva em uma placa de ágar. A luz espalhada espacialmente é capturada por um detector 2-D.

(B) – Diagrama esquemático da ICMA², morfologia *in situ* mapa da densidade óptica da unidade de medição de colônia bacteriana.

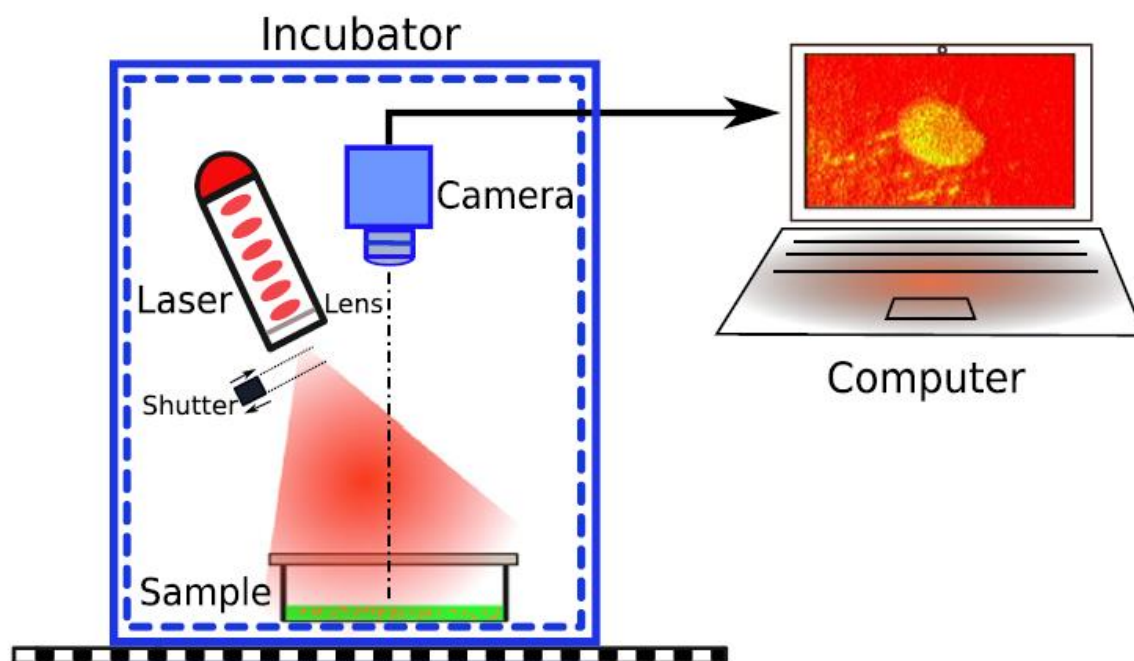
¹ Diferente variedade de uma determinada espécie de bactéria, tendo como especificidade imunológica de determinados componentes da superfície da célula como os da parede celular ou do flagelo.

² ICMA – Analisador morfológico de colônia integrado.

Ramires-Miquet (2017) propôs que o crescimento de bactérias e a atividade de parasitas em placas de ágar são afetados por um medicamento, o que foi constatado por monitoramento através do padrão *Speckle*. O crescimento bacteriano do patógeno nas atividades de parasitas, na presença e na ausência de um fármaco, aponta para fornecer uma nova ferramenta para avaliação em tempo real de patógenos e uma plataforma para testar a suscetibilidade de parasitas para drogas específicas, gerando uma potencial aplicação em microbiologia.

A Figura 10 demonstra como as imagens e vídeos são gravados pela câmera e registrados em um computador. A incubadora e o obturador são usados no experimento somente com bactérias.

Figura 10 – Configuração do experimento



Fonte: Ramires e Miquet (2017)

2.5 Fungos

2.5.1 Revisão

Na década de 1990, uma reviravolta no conceito de Reino e novas evidências bioquímicas, de estrutura, mas principalmente de biologia molecular, levaram os cientistas a propor outros sistemas de classificação dos fungos.

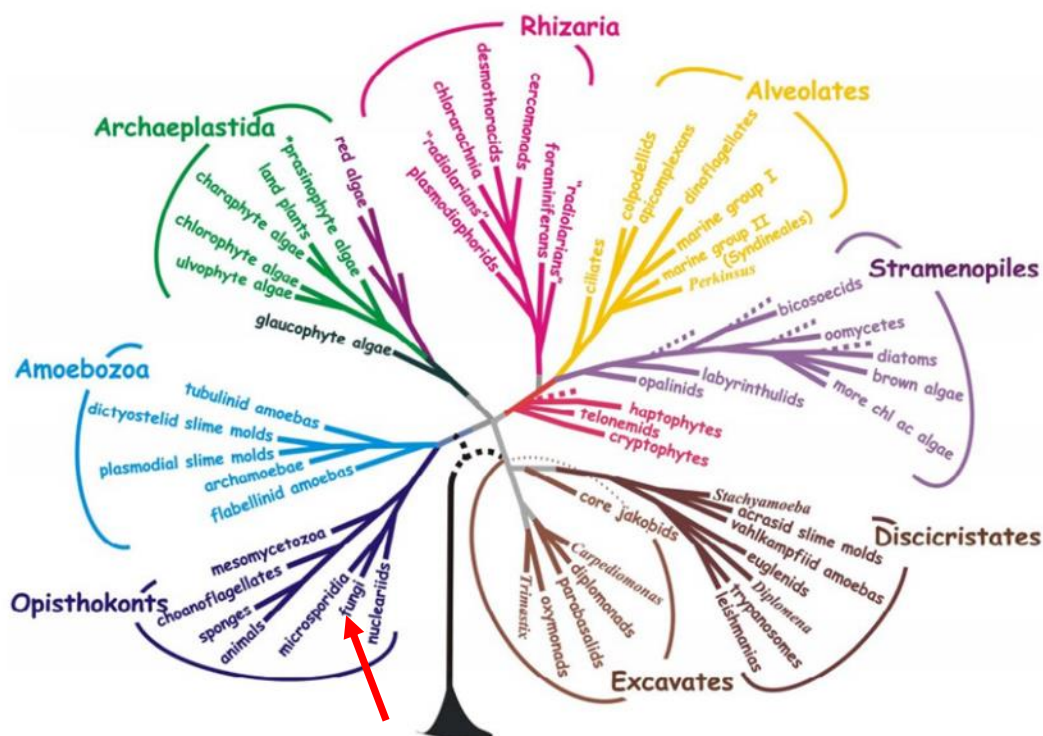
No cladograma proposto por Fheling, Stoecker e Bauldaf (2007), os fungos pertencem à linhagem dos opistocontes, os quais incluem animais, fungos e alguns grupos de eucariontes unicelulares.

[...] Dados paleontológicos, morfológicos, e moleculares sugerem que toda a linhagem dos opistocontes derivou de ancestrais com flagelos com inserção posterior, daí o nome. Os fungos surgiram a partir dos mesmos ancestrais que originaram os animais. Embora a maioria dos fungos não possuam flagelos, essa estrutura está presente na linhagem basal de fungos (quitrídios) (LOPES et al., 2014, p. 17).

Lopes et al. (2014) afirmam que a utilização de reconstrução filogenética para a formulação da classificação é atualmente o método mais aceito. Porém, ao longo dos tempos, muitos pesquisadores propuseram classificações artificiais, ou seja, classificações que não refletem padrões evolutivos, mas que se baseiam em outros tipos de parâmetros arbitrários.

No cladograma proposto por Fehling, Stoecker e Bauldaf (2007), os animais e os fungos aparecem na linhagem dos opistocontes, conforme Figura 11. Observa-se que nesse tipo de árvore, todos os ramos partem de um ponto central (LOPES et al., 2014).

Figura 11 – Cladograma – esquema não enraizado de filogenia dos principais grupos do domínio Eukaria.



Fonte: Lopes et al. (2014).

Algum tempo atrás havia um entendimento que os fungos guardavam mais semelhanças com as plantas do que com os animais, mas, com os avanços das pesquisas evolutivas, sabe-se atualmente que os fungos e os animais possuem maior semelhança. Na verdade, os fungos apresentam um conjunto de características próprias que os diferem das plantas e outras que os aproximam dos animais, por exemplo, pode-se mencionar a substância quitinosa na parede celular, que possui glicogênio como material de reserva - na planta a substância de reserva é o amido (LOPES et al., 2014).

Segundo Hawksworth (2012), estimativas recentes indicam que o número global de espécies de fungos (tido como 1,5 milhão) é muito baixo, pois números até de 5,1 milhão foram propostos nestes últimos anos. Para Hawksworth (2015), os fungos são um dos maiores grupos de organismos da Terra, com pelo menos 1,5 milhão e provavelmente 3 milhões de espécies. O nome científico é a chave que abre acesso a todo conhecimento acumulado de um organismo. Uma identificação errada pode resultar em riscos que não são apreciados, ou em ações desnecessárias e onerosas (HAWKSWORTH, 2015).

Para Hawksworth (2011) e Hibbett e Taylor (2013), o sistema de nomenclatura para espécie fúngica surgiu no século XIX, influenciado pelo uso da morfologia sexual na classificação Linneana das plantas. Creditava que as morfologias das estruturas reprodutivas sexuais fossem

superiores às das assexuadas até no final da década de 80 quando o **PCR** (Reação em cadeia de polimerase) permitiu a variação do DNA acessível aos sistemas micológicos.

Segundo Prado et al. (2011), a Sessão de nomenclatura é o principal foro de discussão e votação de proposta de alteração do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB). Ela acontece a cada seis anos na semana do Congresso Internacional de Botânica.

Desde a realização do Congresso Internacional de Botânica, ocorrido em 1954, em Paris, comenta Hawksworth (2011) que o comitê não havia enfrentado um número tamanho de propostas para alteração das regras que norteiam como os fungos são nomeados. O Congresso de junho de 2011 em Melbourne propõe uma campanha, “Um fungo um nome”, em função das descobertas dos metagenômicos, e propõe mudanças na sistemática de classificação taxonômica, não sendo mais necessário diferenciar os organismos através de sua forma reprodutiva (HIBBETT e TAYLOR, 2013).

2.5.2 Histórico

A importância dos fungos para nossa alimentação só ganhou destaque na Idade Média, quando uma quantidade elevada de mortes se sucedeu, até que descobrissem a sua função, sendo provavelmente estes os responsáveis por mais de 40 mil mortes ocorridas por intoxicação na França no ano de 943 a.C, por exemplo. Entendia-se que os fungos eram seres eucariontes, unicelulares ou pluricelulares, heterotróficos e aeróbios ou anaeróbios facultativos (leveduras). Sua reprodução pode ser sexuada ou assexuada (JAY et al., 2005).

De acordo com Tortora et al. (2012), desde os tempos de Aristóteles os organismos vivos eram classificados de duas maneiras: como planta ou como animais. Em 1735, o botânico sueco Carolus Linnaeus apresentou um sistema formal de classificação dividindo os organismos vivos em dois reinos – *Plantae* e *Animalia*. Os nomes científicos eram latinizados, devido à linguagem corrente entre os cientistas da época de sua descoberta. Esse sistema é denominado nomenclatura binomial, o nome do gênero é sempre letra maiúscula e é sempre um substantivo. O nome da espécie é sempre gravado em letra minúscula e é geralmente um adjetivo.

Os fungos foram classificados em seu próprio reino em 1959, a distribuição de fungos entre os vários nichos ecológicos da biosfera parece ser infinita. De acordo com Gherbawy e Voigt (2010), as estimativas sugerem um total de 1,5 milhão de espécies de fungos, apenas menos da metade foi descrita ainda. Isso implica uma demanda acumulada, que vem acompanhada de uma crescente importância das novas técnicas para detecção e identificação rápida e inequívoca de fungos para explorar a diversidade de fungos como um todo coerente.

Neste sentido, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013), os fungos por suas características peculiares constituíram um reino à parte, o Fungi, na década de 1960. Por se tratar de um grande grupo de organismos eucariotas, incluíram microrganismos como bolores e leveduras e a família do cogumelo. Podem ser encontrados dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água, embora sejam estimadas em 250 mil espécies, menos de 150 mil foram descritas como patógenos aos seres humanos.

Os fungos filamentosos crescem em forma de filamentos multicelulares chamados de hifas. Uma rede conectada dessas ramificações tubulares, hifas, forma o micélio e tem múltiplos genes com núcleos geneticamente idênticos e é considerado um único organismo (MURIALDO et al., 2012).

2.5.3 Característica e diversidade

De acordo com Lopes et al. (2014), após o desenvolvimento do microscópio, no século XVI, foi possível a observação de seres diminutos, desta forma o conhecimento dos fungos passa a dar-se de forma sistemática. No século XX houve maior aprofundamento desses estudos devido aos avanços da bioquímica, genética, biologia molecular e biotecnologia que trouxeram maior entendimento desse grupo de organismos. As novas informações advindas dessas novas tecnologias fazem surgir uma nova filogenia, desafiando as classificações tradicionais baseadas somente na morfologia.

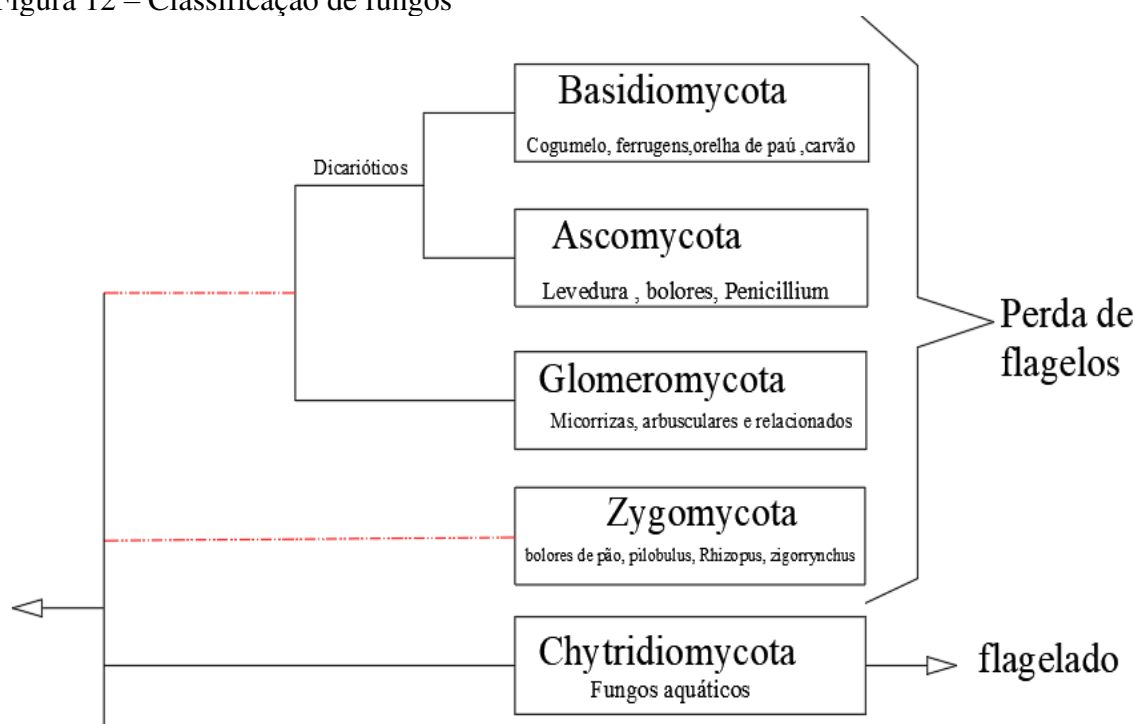
Os fungos desenvolveram uma grande diversidade de características morfológicas, que são compartilhadas com muitos microrganismos semelhantes a eles. Por exemplo, determinada espécie de fungo pode produzir várias micotoxinas, mas nem todos os fungos as produzem. Além disso, o tipo e a quantidade de determinada micotoxina estão associados a cepas específicas, enquanto as condições ambientais e os nutrientes disponíveis são determinantes para o crescimento do fungo e sua produção de micotoxinas.

2.5.4 Classificação dos fungos

Segundo Galli et al. (1978), os fungos se subdividem em duas divisões, a primeira relativamente pequena, representada por organismos que possuem estruturas somáticas desprovidas de parede celular, é denominada Myxomycota ou Mixomicetos, e a segunda, que reúne a maioria dos fungos, é denominada Eumycota ou Eumicetos.

Apesar de sua classificação ser bastante controversa, existe atualmente um consenso, entre os micólogos e a maioria dos pesquisadores, que os fungos podem ser considerados em cinco grandes grupos (Figura 12):

Figura 12 – Classificação de fungos



Fonte: Adaptado de Lopes et al. (2014).

Algumas das principais características desses cinco grupos é presença de hifas septadas dicarióticas nos Basidimycotas e Ascomycotas e de hifas cenocíticas, plasmogamia e cariogamia nos Glomeromycotas, Zygomycota e Chytridiomycota. Outra característica dos cinco grandes grupos considerados de fungos é a perda de flagelo dos Basidiomycota Ascomycotas, Glomeromycota e Zygomycota; os ancestrais do Chytridiomycota apresentam a presença do flagelo (HO, 2012).

2.5.5 Reprodução cos fungos

Quanto à estrutura somática, os fungos podem ser unicelulares, mas a maioria possui hifas que são talos vegetativos de forma tubular que podem ser profundamente ramificados. A reprodução de um fungo é regulada geneticamente. Quando não há um fator de incompatibilidade, essa reprodução pode ocorrer entre hifas do mesmo micélio, entretanto, quando há incompatibilidade, a reprodução sexual só pode ocorrer entre núcleos geneticamente diferentes provenientes de micélios diferentes (GALLI et al., 1978).

[...] Além de seus esporos sexuais, ascosporos, ascomicetes geralmente produzem esporos assexuados. Formados após a divisão nuclear mitótica, esses esporos são carregados sozinhos ou em cadeias, na maioria dos gêneros de interesse aqui de estruturas de hifas mais ou menos especializadas. O termo geral para este tipo de esporo é conídium (plural, conídia), mas existem outros termos mais especializados para tipos específicos de conídios. Ao longo do processo evolutivo, alguns Ascomycetes com estádios assexuados bem-sucedidos perderam a capacidade de produzir ascosporos e dependem inteiramente de conídios para dispersão. Conidia, e as hifas especializadas de que são carregadas, são surpreendentemente diversas em aparência. O tamanho, a forma e a ornamentação dos conídios e a complexidade das estruturas que os produzem (GALLI et al., 1978).

Os fungos filamentosos se desenvolvem sobre todos os substratos e ambientes imagináveis, tais com rochas, materiais em processo de decomposição, outros seres vivos e papéis, por exemplo. Esses organismos apresentam estruturas microscópicas e macroscópicas e seus principais representantes são: bolores, mofos, levedos, cogumelo-de-chapéu (conhecidos popularmente como Champignon).

Segundo Taniwaki et al. (1996), nos alimentos processados termicamente, a sobrevivência de um simples esporo fúngico pode resultar em crescimento e desenvolvimento de colônia visível ou em produção de enzimas suficientes para causar a deterioração. Portanto, o monitoramento da presença de fungos termos resistentes na matéria-prima suscetível é extremamente importante e requer o desenvolvimento de técnicas especiais.

Para Jay (2005), os bolores ou mofos são fungos filamentosos que se desenvolvem na forma de massa disforme, podendo se espalhar de forma bastante veloz em pouco tempo. Os bolores, principais fungos deterioradores, filamentosos, formados por hifas que, em conjunto, formam o micélio, têm diversas funções, tais como fixação e reprodução, e são responsáveis pelo aspecto característico das colônias que se formam. Dentre os cogumelos, podemos destacar o *shiitake* (cogumelo em japonês), o interesse por esse fungo é atribuído às suas ricas propriedades nutricionais

e medicinal, e pelo seu apreciável sabor, tornando-se o segundo cogumelo mais consumido no mundo.

2.5.6 Detecção de fungos em alimentos

O controle de doenças de plantas é antecedido necessariamente pela detecção e pela identificação correta de fitopatógenos. Para disparar ações preventivas ou curativas é indispensável haver métodos que consigam um diagnóstico rápido, preciso e sensível para detectar e identificar fungos patógenos (RAMIRO, 2015; CAPOTE et al., 2012).

Doenças fúngicas pós-colheita constituem uma das principais causas de perdas durante a fase de comercialização de frutos tropicais. Para Dantas et al. (2003), ocorre uma grande diversidade de doenças em frutos de mamão, onde as incidências variam entre 39,71% e 0,07%, com maior nível para podridão peduncular. Ao índice de perda pós-colheita, soma-se ainda a falta de adoção de soluções eficientes ao longo da cadeia produtiva, que constituem os principais desafios para o desenvolvimento do setor.

Os fungos são de natureza ubíqua (onipresente) e evoluíram ao longo do tempo para colonizar uma ampla gama de ecossistemas, de acordo com Dijksterhuis e Samson (2007) parte deste processo de evolução tem sido o desenvolvimento da capacidade de produzir uma gama de metabólicos extracelulares conhecidos. Conforme Maziero e Bersot (2010), as micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por alguma espécie de fungos toxigênicos, passíveis de causarem efeitos tóxicos em humanos e animais.

Para Rodrigues et al. (2015), a detecção de fungos filamentosos na produção de micotoxinas em alimentos por técnicas convencionais de cultivo exige, em primeiro lugar, um processo de múltiplas etapas compostas por isolamento e identificação por métodos micológicos.

a) Principais métodos de detecção de fungos

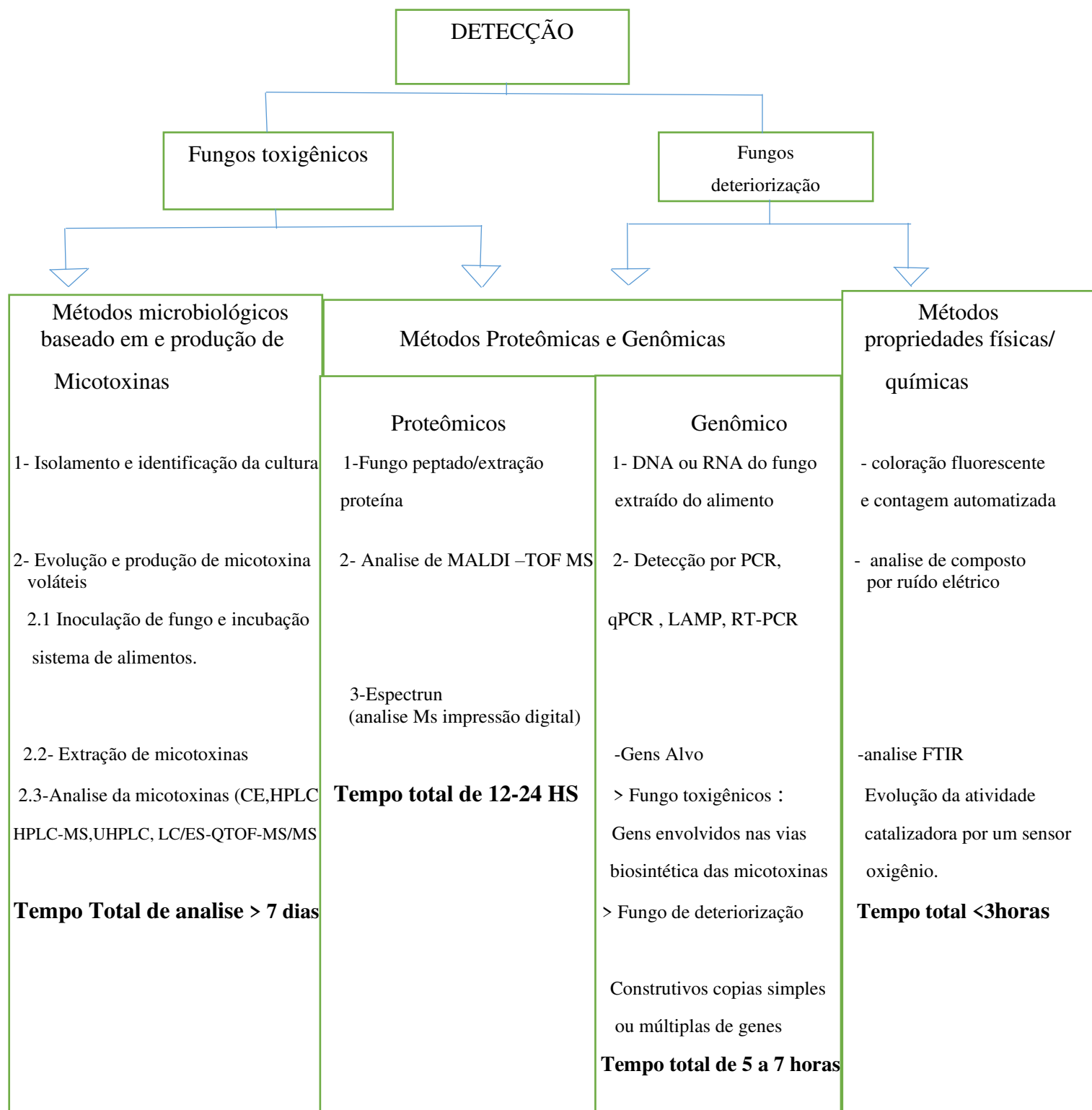
A identificação de caracterização de fungos contaminantes em alimentos é primordial para a segurança alimentar, a possibilidade de detectar os fungos produtores de metabólitos secundários, como as micotoxinas, por meio de métodos rápidos, eficientes e baratos, tornará a nossa alimentação mais segura, contribuindo de forma ímpar no sentido de se obter uma melhor qualidade de vida para todos.

As técnicas moleculares, particularmente a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR), revolucionaram a biologia molecular e o diagnóstico molecular de fungos.

[...] A incorporação de técnicas moleculares no que tradicionalmente foi considerado como taxonomia baseada em morfologia de fungos nos ajuda na diferenciação de espécies e variedades de fungos as bases de dados de genomas e marcadores genéticos utilizados como fontes para códigos de barras moleculares estão sendo criadas e o mundo dos fungos está em andamento a ser revelado com a ajuda de ferramentas de bioinformática (GHERBAWY e VOIGT, 2010).

Conforme Rodríguez et al. (2015), potencialmente, a produção de micotoxinas em alimentos pode ser detectada por métodos micológicos convencionais e por técnicas proteômicas e genômicas (Figura 13). Esses autores comentam ainda que esse processo é composto por múltiplas etapas: por cultura, isolamento e identificação por métodos micológicos. Esses métodos são demorados, levam de 5 a 7 dias, e requerem sobretudo testes morfológicos e mão de obra altamente especializada.

Figura 13 – Métodos de Detecção de fungos



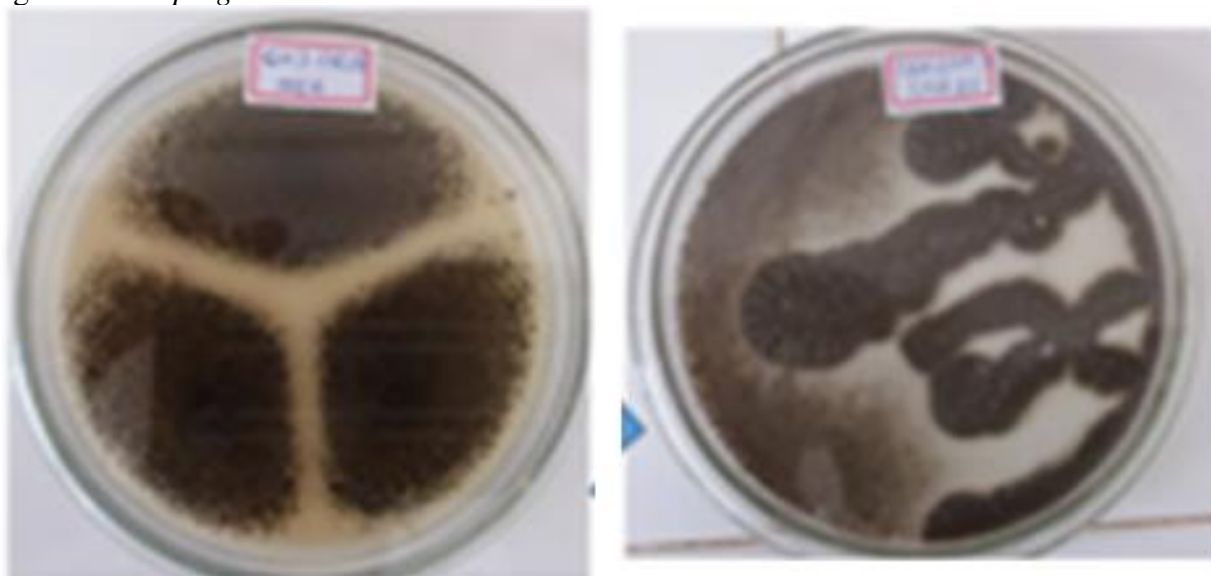
Fonte: Adaptado Rodriguez et al. (2015).

2.5.7 Fungos utilizados nos experimentos

Os fungos têm sido amplamente explorados como fonte de enzimas industrialmente importantes há muitos anos e os principais fungos utilizados são os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (KAVANAGH, 2005). Os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são causadores de degradação em alimentos, biodeterioração e patógenos ao homem e animais, entretanto, conforme relata Monteiro (2012), esses microrganismos são muito interessantes, não só em termos de aplicação biotecnológica, mas também para a economia, devido a suas propriedades metabólicas. Relatos da literatura apontam que a potencialidade de produzir a micotoxina Ocratoxina A está associada a dois gêneros de fungos: *Aspergillus* e *Penicillium* (BOZZA, 2010).

A Figura 14 mostra o fungo *Aspergillus*, utilizado em testes no laboratório.

Figura 14 – *Aspergillus* e *Penicillium*



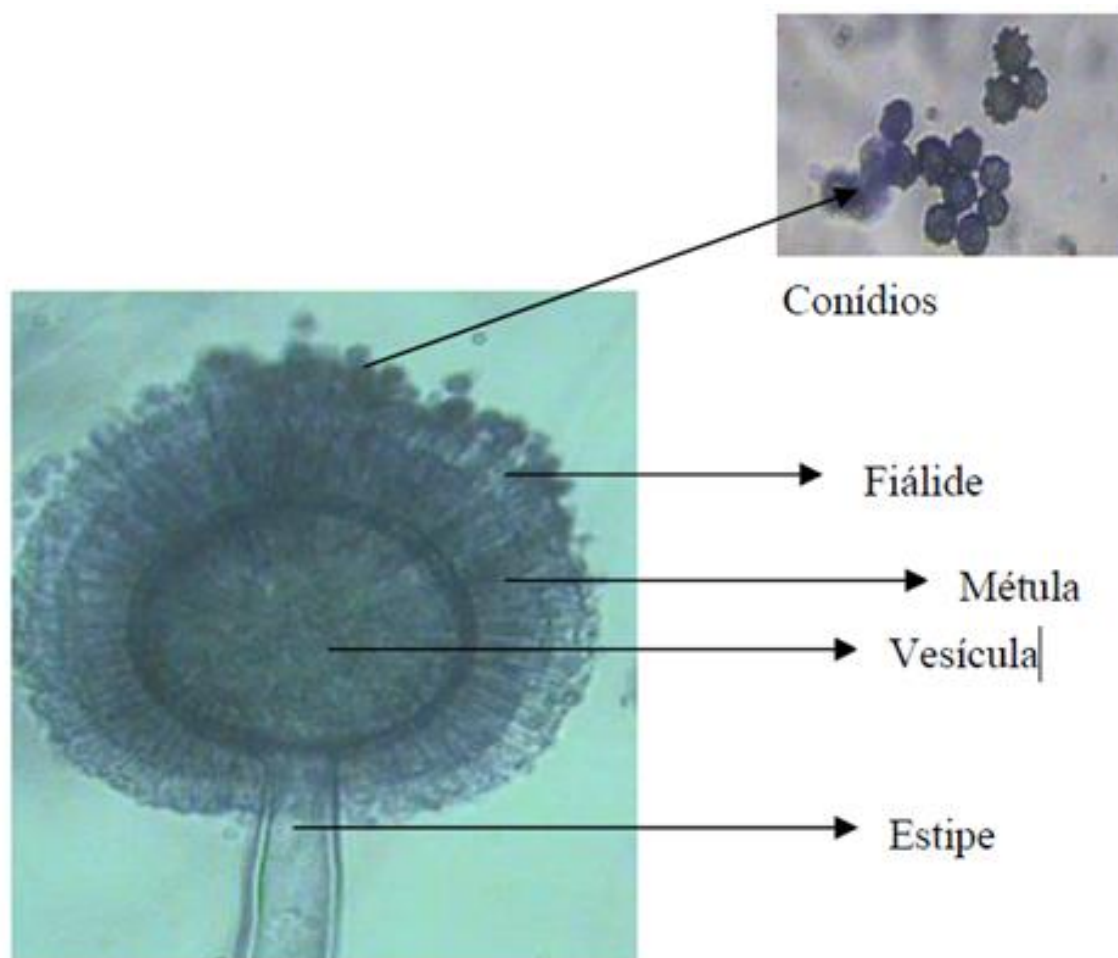
a) *Aspergillus niger*

[....] As espécies de *Aspergillus* pertencentes à seção *Nigri* são caracterizadas pela cor negra da maioria das colônias. A identificação destas espécies é complexa devido à alta diversidade genética. As características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, moleculares e espectrais são ferramentas que podem ser utilizadas na identificação polifásica. *Aspergillus Negri* é a espécie da seção *Nigri* mais utilizada na indústria. (MACIEL, 2013).

O fungo *Aspergillus* foi descrito primeiramente em 1729, pelo padre Pier Antônio Michelli, biólogo e também micologista, após a observação de suas estruturas em microscópio. O fungo recebeu esse nome devido a sua semelhança com o *Aspergillum* (borrifador/aspergidor de água benta).

A Figura 15 mostra as características do fungo *Aspergillus*.

Figura 15 – Tipos de ramificações em espécie de *Aspergillus* bisseriado.



Fonte: Silva (2009).

As Figuras 16 e 17 mostram as placas do fungo *Aspergillus* que se desenvolveram sem nenhum tipo de contaminante.

Figura 16 – *Aspergillus niger* utilizado no experimento (placas 4, 6 e 7)

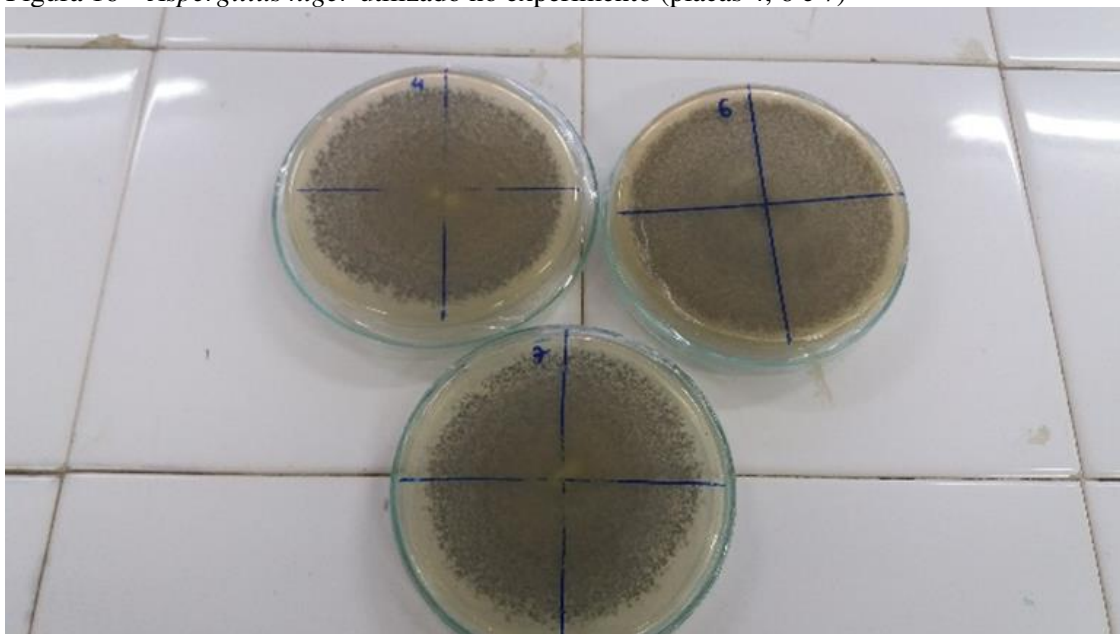
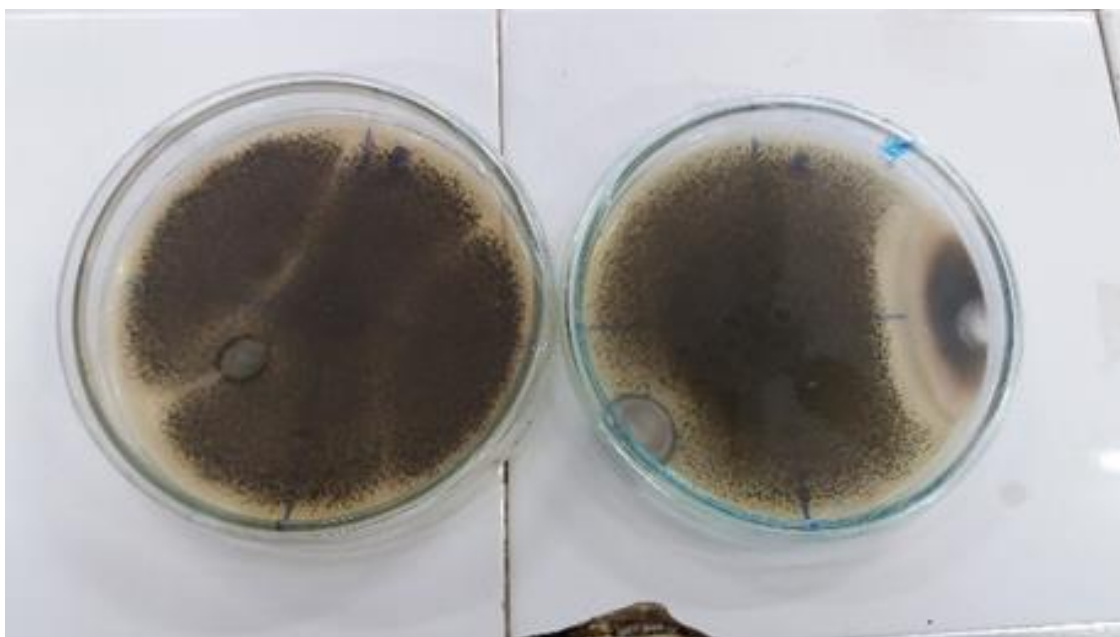


Figura 17 – *Aspergillus niger* utilizado no experimento



De acordo com Silva (2009), as espécies do gênero *Aspergillus* representam um gênero de relevante importância econômica, pois são aplicados em diversos processos industriais responsáveis pela deterioração de alimentos e produção de micotoxinas.

O ácido cítrico é o principal ácido orgânico encontrado em frutas cítricas. Conforme Kavanagh (2005), para atender as recentes demandas é produzido a partir da matéria-prima de carboidratos pela fermentação com os fungos, por exemplo, *Aspergillus niger* e levedura do gênero

Cândida. Diversos fungos e leveduras têm sido utilizados ao longo dos anos para a produção de ácido cítrico, mas o *Aspergillus niger* continua sendo o organismo de fermentação preferido para a produção comercial.

Conforme destaca Silva (2009), embora haja aspectos econômicos positivos relacionados à espécie de *Aspergillus*, muitas espécies estão relacionadas à contaminação e à degradação de produtos alimentares. Afirma ainda que muitos alimentos são suscetíveis ao crescimento de fungos devidos às condições inadequadas de secagem, armazenamento e transporte.

Nesse contexto, afirma Freire et al. (2007) que as micotoxinas são metabólitos secundários aparentemente sem qualquer função no metabolismo normal dos fungos. Elas são produzidas, ainda que não exclusivamente, à medida que o fungo atinge a maturidade. Comentam ainda que as micotoxinas são produzidas por uma variedade de fungos, principalmente por espécies do gênero *Aspergillus*, *Fusarium*, e *Penicillium*.

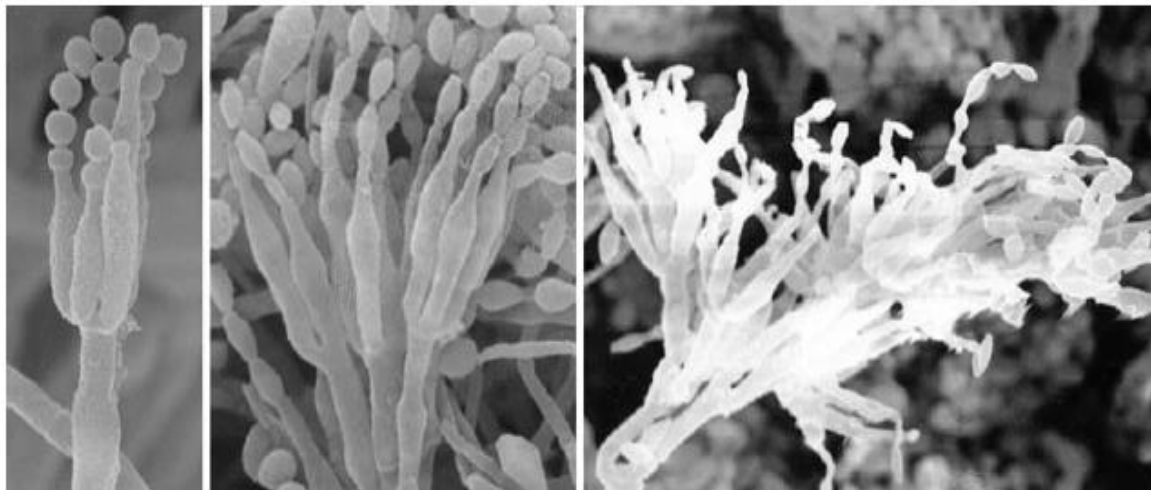
b) *Penicillium*

[...] talvez uma das descobertas mais importantes sobre o uso benéfico de fungos para os seres humanos foi a identificação em 1928 por Sir Alexander Fleming que um isolado de *Penicillium notatum* produziu uma substância capaz de matar Grão + bactérias. Este composto foi posteriormente identificado como penicilina e foi o primeiro membro da classe de antibióticos b-lactâmicos a ser descoberto. Estes compostos funcionam inibindo a síntese de peptidoglicano em bactérias e a sua utilização reduziu a importância das bactérias Gram + como causa da doença. (KAVANAGH, 2005).

Conforme Pit e Hockin (2009), alguns fungos, como o *Penicillium*, só entram na cultura quando pequenas feridas estão presentes, mas o dano que esses fungos podem causar nas plantações é devastador, enquanto as feridas são quase sempre afligidas na cultura após o manuseio ou pela ação de insetos. Perdas devido à infecção em laranjas e maçãs por espécies de *Penicillium* são enormes.

A Figura 18 mostra micrografias de varredura do *Penicillium*.

Figura 18 – Micrografias eletrônicas de varredura de vários tipos de *penicilli*, mostrando a relação entre o diâmetro dos tipos e os outros elementos do *penicillus*.



Fonte: Pit e Hockin (2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentado e discutido a metodologia apresentada. Descrevemos a métodos de análise do biospeckle adotado para a obtenção, descrevemos como os as imagens obtidas dos fungos inoculados foram obtidas e analisadas. Descrevemos como os índices utilizados traduzem as atividade biológica dos fungos estudados. Finalizamos mostrando três experimento que comprovam a capacidade do biospeckle em detectar as atividade biológicas nas primeiras horas de inoculação dos fungos estudados

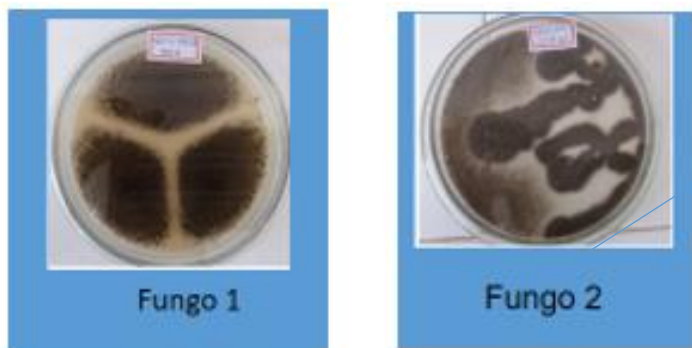
Todos os procedimentos da pesquisa experimental *in vitro* foram realizados no Laboratório de Micologia da Faculdade de Alimentos (FEA/UFLA) e no Laboratório de Óptica (FEAGRI/UNICAMP). Os fungos foram cedidos pela micoteca da Coleção de Cultura de Microrganismo do Departamento de Ciência do Alimento (CCDCA), da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Essa micoteca foi oficializada em 2010 pelo Prof. Dr. Luís Roberto Batista, e localiza-se no Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

As análises do *Biospeckle* para estes experimentos realizaram-se no Centro de Desenvolvimento de Instrumentação aplicada à Agropecuária (CEDIA) também da Universidade Federal de Lavras, e, por se tratar de uma pesquisa *in vitro*, o trabalho não necessitou ser submetido ao conselho de ética.

3.1 fungos Micoteca

Os fungos utilizados no trabalho de pesquisa foram do gênero *Aspergillus* , fungo 1) e fungo *Penicillium* fungos 2), cedidos gentilmente pela micoteca da coleção de cultura e microrganismo. Os fungos são mostrados na Figura 19.

Figura 19 – Placa de Petri com os fungos *Penicillium* e *Aspergillus*,



3.2 Obtenções do *Biospeckle*

Nesta etapa, para a análise do *Biospeckle*, os fungos foram iluminados com *laser* diodo vermelho, 632 (Nm) de comprimento de onda e de 10mw de potência de forma indireta e uma câmera digital compatível com a configuração do PC, conforme Figura 20.

Figura 20 – Estrutura para obtenção do *Biospeckle* Lab. 3 CEDIA

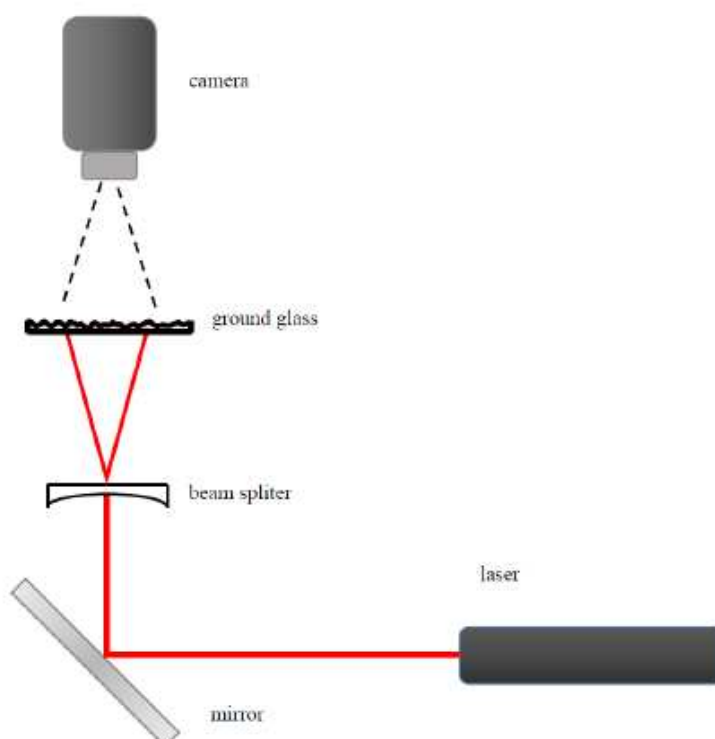


A evolução das placas de Petri com os fungos inoculados foi captada através de imagens feitas por uma câmera CCD, dispositivo de Carga acoplada (*Charge-Coupled Device*), usando a

configuração experimental descrita abaixo. De acordo com Murialdo et al. (2012), a imagem fotográfica muitas vezes é o meio mais simples de registrar e documentar esses fenótipos comportamentais.

A Figura 21 apresenta a disposição básica do *Biospeckle* aplicado nos experimentos.

Figura 21 – Ensaio *Biospeckle*, configuração básica com retroiluminação.



Fonte: Braga Junior et al. (2016).

A retroiluminação só é possível em amostras transparentes, como placas de Petri, utilizadas nos experimentos, por exemplo. Como se observa, *laser* incide em uma lente divergente direcionada para a amostra e é capturado pela câmera. As imagens capturadas pela câmera CCD, com resolução de 640x480 pixels ficam armazenadas no *software* livre *Speckle Tools* v 1.2. Essa ferramenta *on-line* detém diversas funções de análise. O vídeo, produzido pelas imagens, é salvo em disco no formato “avi” e é decomposto em uma sequência de 128 imagens, por exemplo, com uma extensão “bmp”.

Conforme Rivera, Braga Júnior (2017) em relação à análise do *Biospeckle*, existem muitos tipos de índices (índices de *Biospeckle*) que usam a intensidade da luz retornada das amostras padrões de *Speckle* (sinal de *Biospeckle*), para medir indiretamente o nível de atividade de um material biológico (atividade biológica). Um índice de *Biospeckle* é um número retornado após a

execução de um processamento de sinal, e representa ou descreve uma ou mais características do sinal do *Biospeckle*.

A principal ideia para monitorar a atividade biológica através do *Biospeckle* é a criação de índices, que indiretamente pode ser combinado com os movimentos biológicos, químicos e físicos de dispersores em amostras iluminadas (BRAGA JÚNIOR, 2017).

Existem dois arranjos de configurações básicas para se obter tais índices. A escolha da configuração básica retroiluminação se deu principalmente por ser esta forma possível de ser aplicada em amostras transparentes e opacas. Desta forma desenvolveu-se um dispositivo de posicionamento que permitisse a projeção do *laser* trazer informações do interior das amostras.

Para tanto desenvolveu-se um dispositivo que pudesse abarcar as condições de obter os três índices AVD, STD, e Momento de Inercia utilizados no projeto de pesquisa no laboratório. As Figuras 22, 23 e 24 apresentam o detalhe do dispositivo.

Figura 22 – Base superior do dispositivo de posicionamento para medição *Biospeckle* na configuração básica de retroiluminação das amostras

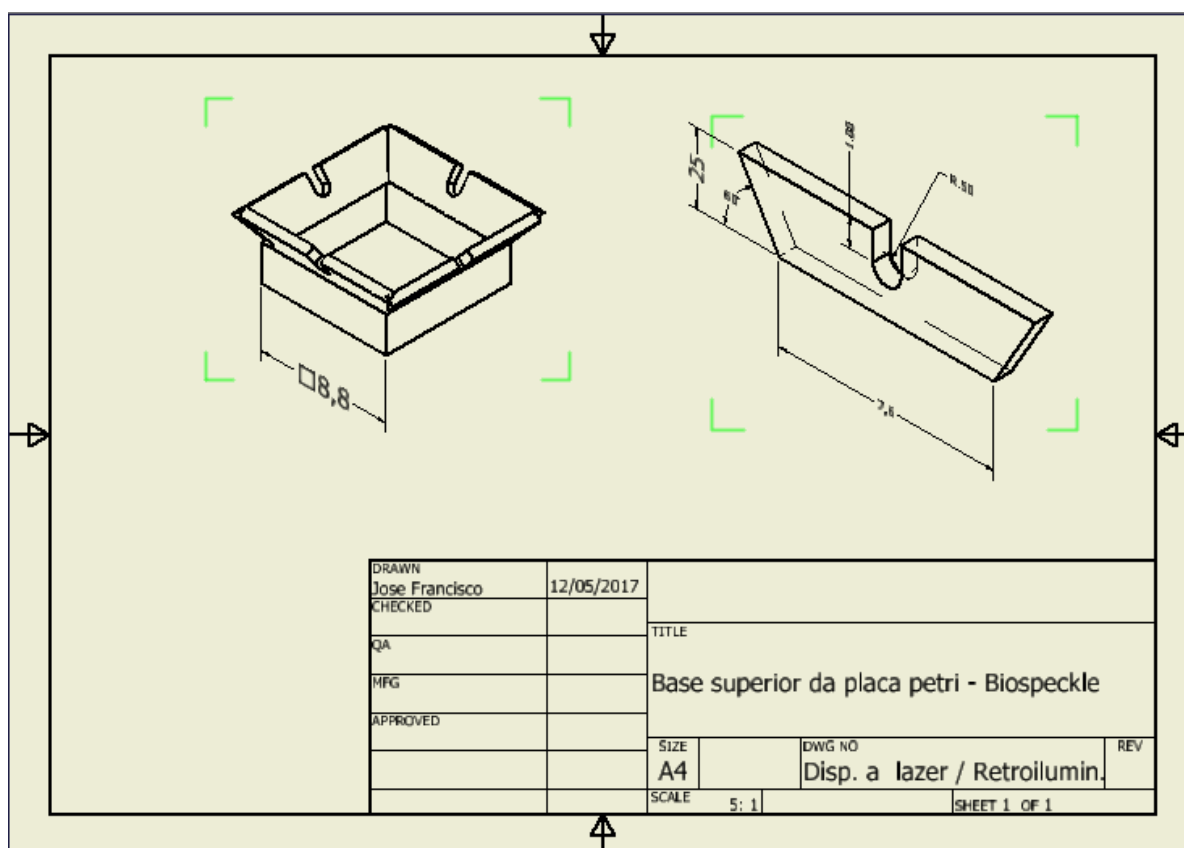
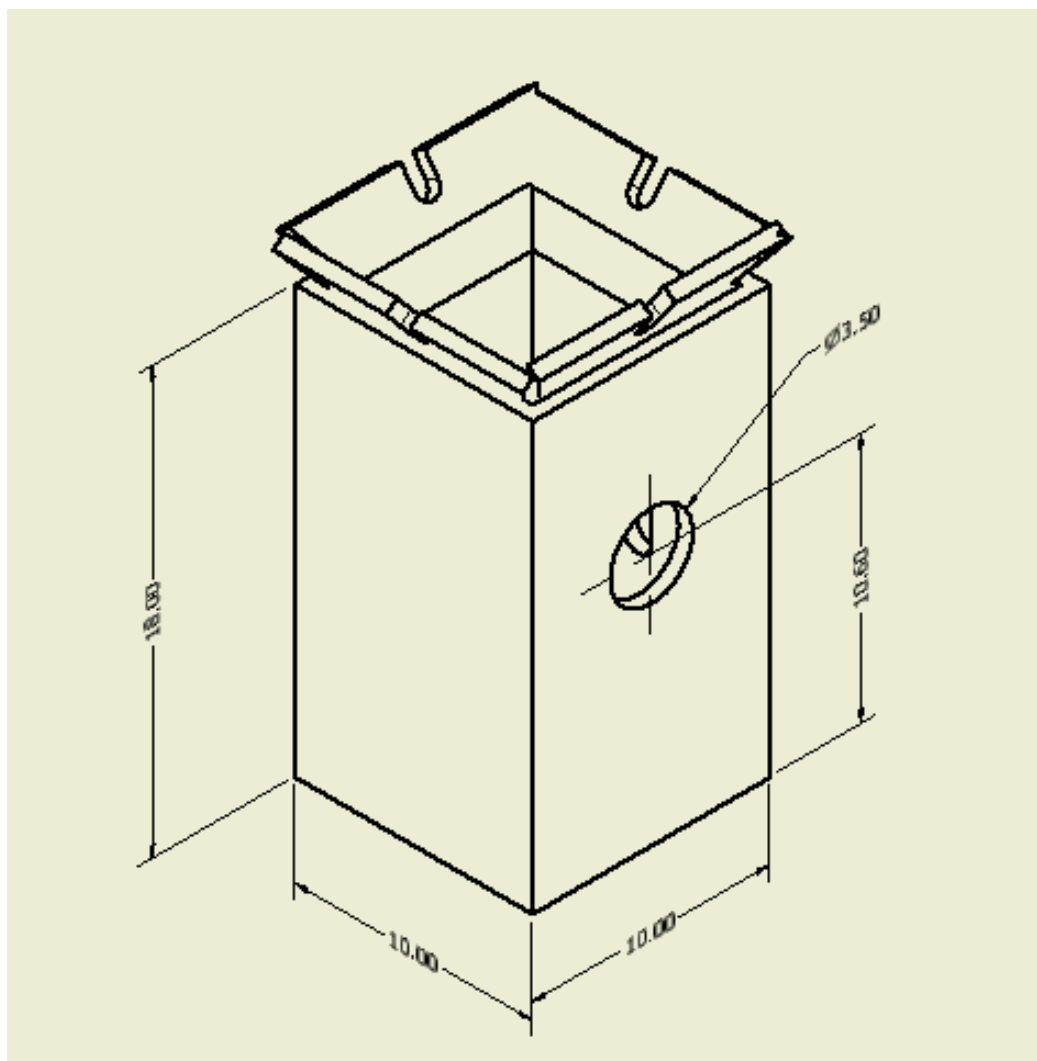


Figura 23 – Dispositivo de montagem (base superior e base inferior)



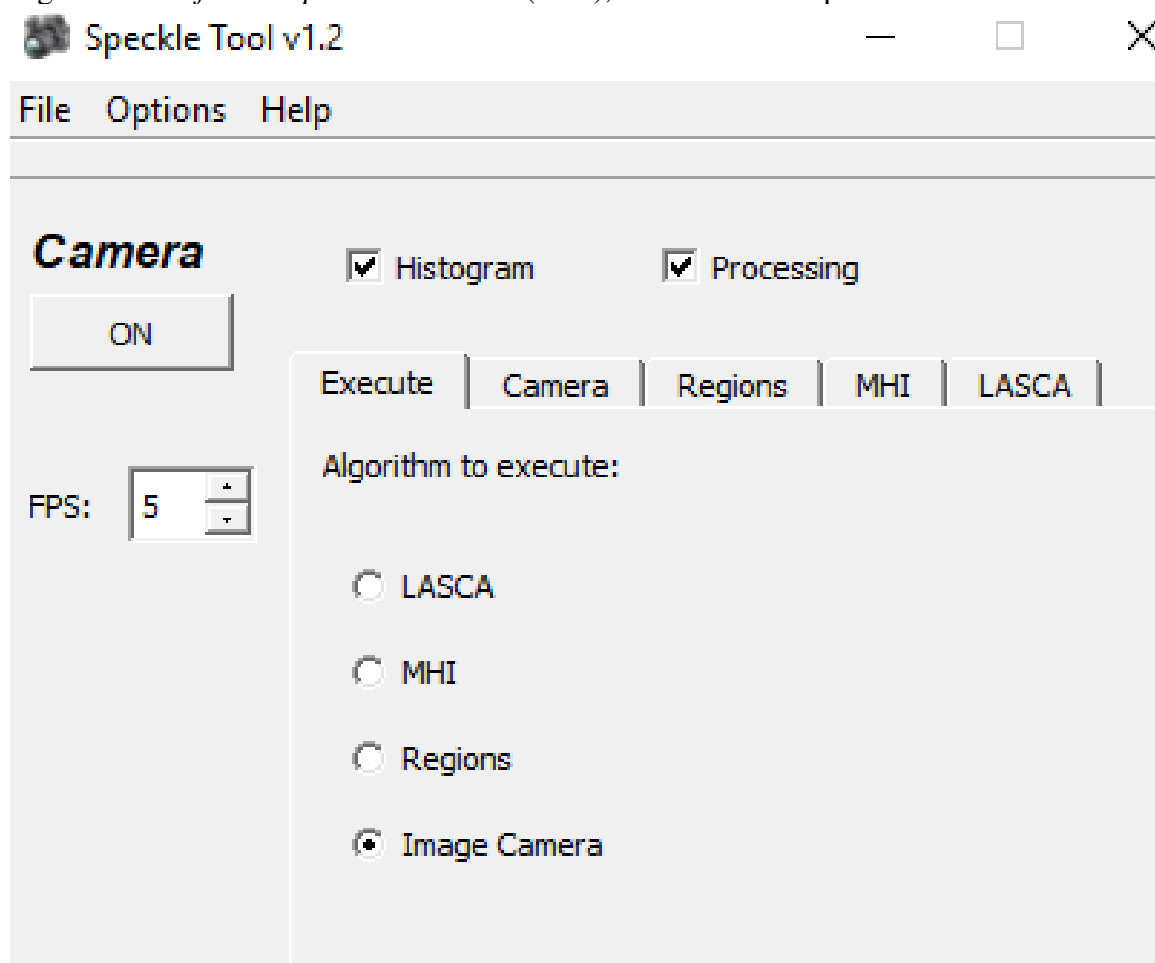
As Figuras 24 mostra a foto no Laboratório CEDIA, da aplicação do *Biospeckle* na amostra para a obtenção dos índices utilizados nos experimentos

Figura 24 – Foto 1 do dispositivo de montagem



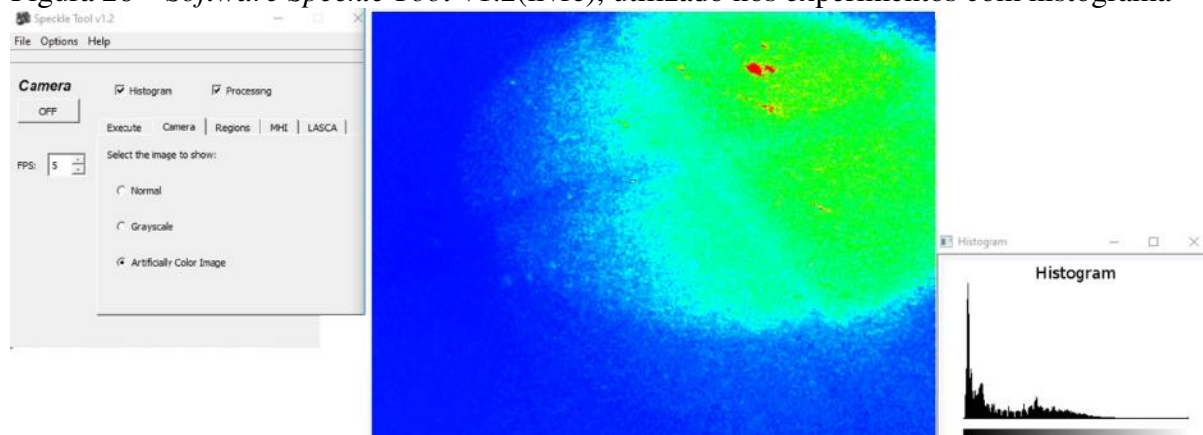
A Figura 25 apresenta a tela do *software Speckle Tool V1.2*, uma ferramenta livre de aquisição de imagens para o fenômeno *speckle* dinâmico, desenvolvida pelo Departamento de Engenharia no Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada na Agricultura (CEDIA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) que foi aplicado nos experimentos para se obter os índices analisados. Nesta tela é possível observar a taxa de aquisição das imagens da câmera de 5 *frames* por segundo.

Figura 25 – *Software Speckle Tool v1.2* (livre), utilizado nos experimentos



Na Figura 26 mostra-se o histograma de uma placa de petri, por exemplo, utilizada no experimento com a representada pela cor artificial da imagem.

Figura 26 – *Software Speckle Tool v1.2*(livre), utilizado nos experimentos com histograma



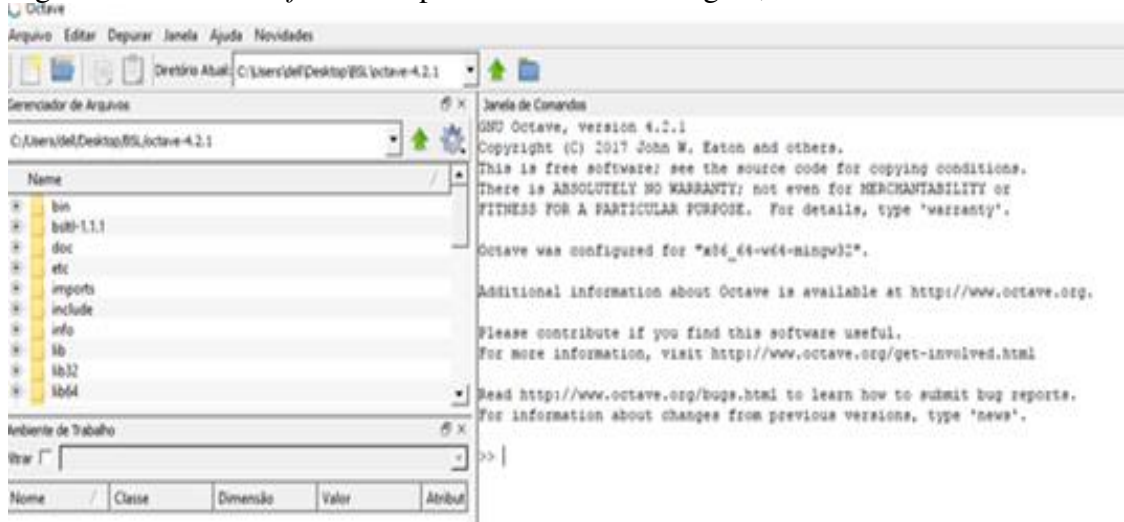
Pode-se utilizar simultaneamente o *software* livre “DinoCapture 2.0”, da câmera CCD usada no experimento, quando o interesse é destacar áreas com níveis de atividades diferenciadas, este é conectado via USB ao PC durante o processo de filmagens. A Figura 29 apresenta um exemplo de imagem captada pelo *software*, na qual se nota com nitidez a observação das áreas com diferentes níveis de atividade biológica.

Figura 27 – *Software* DinoCapture2.0 utilizado nas análises das imagens nos experimentos



Uma vez em posse dessas sequências de imagens, realiza-se o processamento dessa batelada de informações, pelos diversos métodos de análise, e isto é levado a cabo através do *software* também livre Octave-4.2.1. A Figura 30 apresenta a página inicial do Octave, uma ferramenta matemática bastante eficiente, integrada com plotagem e visualização, que roda nas plataformas GNU/Linux, macOS, BSD e Windows.

Figura 28 – Octave *software* de processamento de imagem, livre.



3.3 Experimentos

A forma de condução da pesquisa foi no sentido obter os resultados que pudessem auxiliar na aplicação do *Biospeckle* em diversos estágios de incubação dos fungos, mas principalmente nas suas primeiras horas.

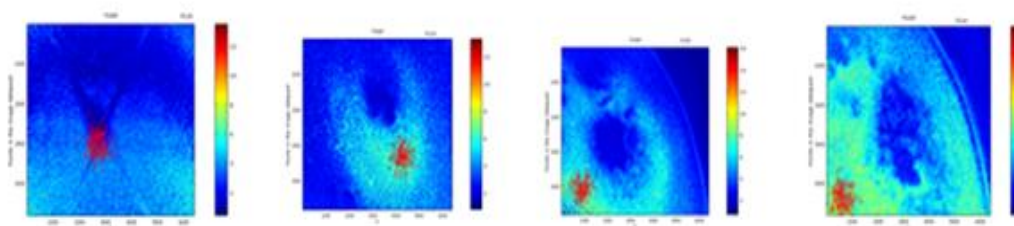
3.3.1 Isolamento dos fungos

O isolamento de todos os fungos filamentosos no meio de cultura, utilizado no trabalho de pesquisa, foi realizado sob condições assépticas na capela de segurança fluxo laminar vertical. Segundo Batista et al. (2016), o repique contínuo, também chamado de subcultivo ou repicagem periódica, é uma das técnicas mais antigas de conservação.

3.3.2 Experimento 1 – Aplicação da distribuição gaussiana

Pode-se inferir que os fungos inoculados em placas de Petri se desenvolvem radialmente em seus primeiros dias. Em seguida, há um decréscimo natural por não ter mais o substrato com nutrientes para o seu crescimento, então se inicia o processo de autofagia, com aumento perceptível da atividade biológica. Esse processo pode ser bem observado, aplicando a técnica de distribuição de pontos selecionados aleatoriamente seguindo uma distribuição gaussiana, metodologia de análise proposta por Papoulis (1984), que possibilita apresentar uma nova correção na curva de crescimento. Portanto, é possível acompanhar o deslocamento do núcleo da atividade biológica pelo deslocamento do foco, aplicando a distribuição gaussiana, como visto na Figura 31.

Figura 29 – Deslocamento do foco na placa de Petri aplicando a distribuição gaussiana.



3.3.3 Experimento 2 – Momento de Inércia para fungos *Aspergillus* e *Penicillium*

Para esta pesquisa, foram repicados os fungos em 12 placas de Petri, sendo duas testemunhas, uma para cada fungo, o meio de cultivo vertido nas placas foi o Ágar Extrato de Malte (MEA: malte 20 g/L, glicose 20 g/L, peptona 1 g/L, ágar 20 g/L), a 25° C, adequado quando o interesse é somente observar o crescimento dos microrganismos. Aquece-se o substrato com 50% da potência no micro-ondas, por 6 min. Logo após verte-se o substrato nas placas de Petri, utiliza-se a repicagem palito (com um ponto central) e aguarda-se pelo menos 20 min para o resfriamento.

3.3.4 Experimento 3 – Atividade da imagem ao longo do tempo Fungo *Aspergillus*

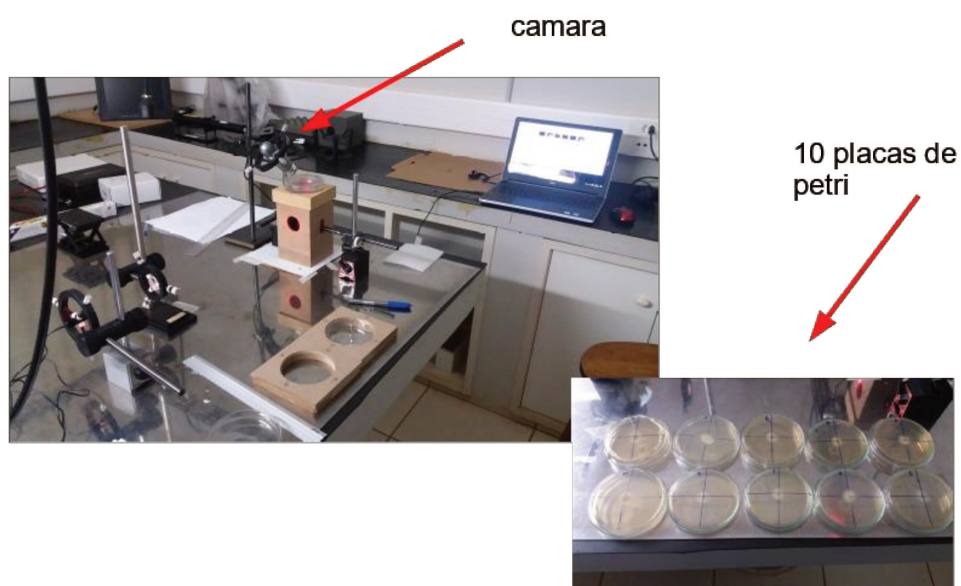
Para este experimento, repica-se o fungo em 12 placas de Petri, sendo duas testemunhas de controle, o meio de cultivo Ágar Extrato de Malte (MEA): malte 20 g/L, glicose 20 g/L, peptona 1 g/L, ágar 20 g/L). As testemunhas são amostras sem fungo, também conhecidas como controle, ou seja, possuem somente o meio de cultura. O preparo da testemunha foi feito seguindo um mesmo padrão de procedimento conhecido, a saber: armazenar em placas com tampa fechada e com a mesma concentração no Ágar.

Ao abrir mão de novos métodos de análise do *Biospeckle* percebe-se a ampliação do campo de atuação junto a diversas áreas do conhecimento, a utilização dessa nova ferramenta de análise possibilita observar o crescimento dos fungos, nas suas primeiras horas após a inoculação, aplicando além do método o tradicional Momento de Inércia (MI), o Valor Absolutos da Diferenças (AVD) e o Desvio Padrão (STD) simultaneamente.

Neste terceiro experimento (Figura 32) realizado determinou-se que o tempo de análise das amostras passaria a ser monitorado a partir da segunda hora de inoculação, este procedimento não ultrapassaria 2 horas até próxima análise.

Figura 30 – Foto do terceiro experimento – Fungo *Aspergillus* – Laboratório CEDIA

Monitoramento do crescimento de fungo



As Figuras 31, 32 e 33 mostram as dez placas de petri em detalhe.

Figura 31 – Placas de petri em detalhe (a)

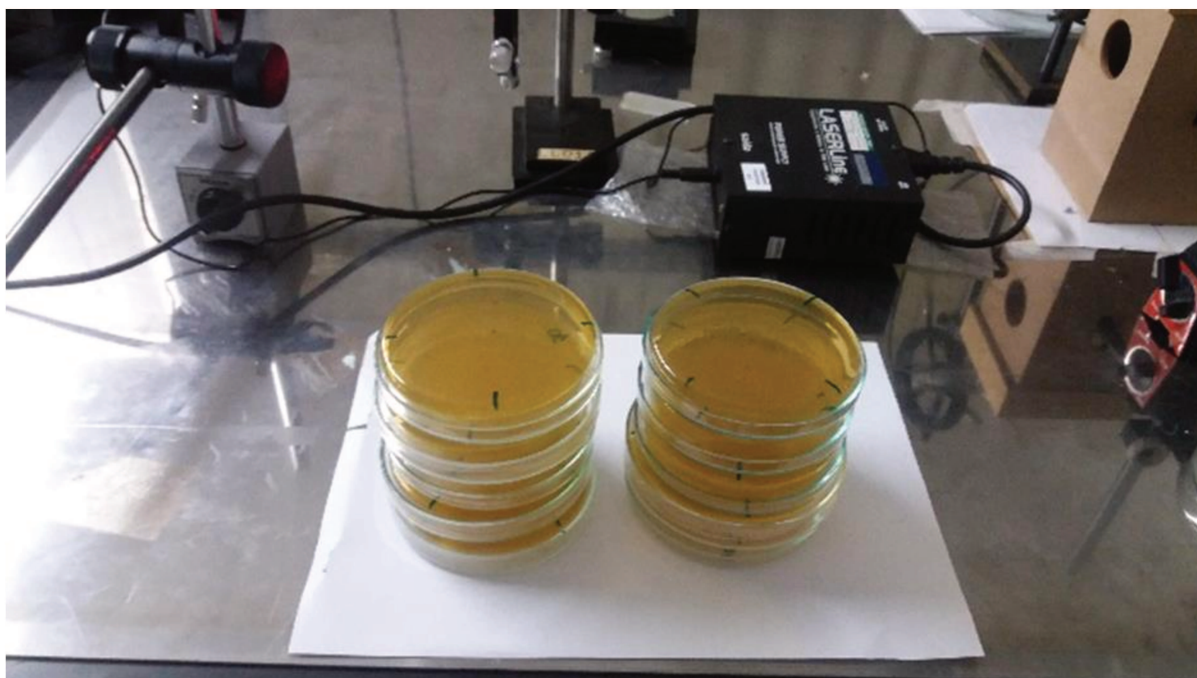


Figura 32 – Placas de petri em detalhe (b)

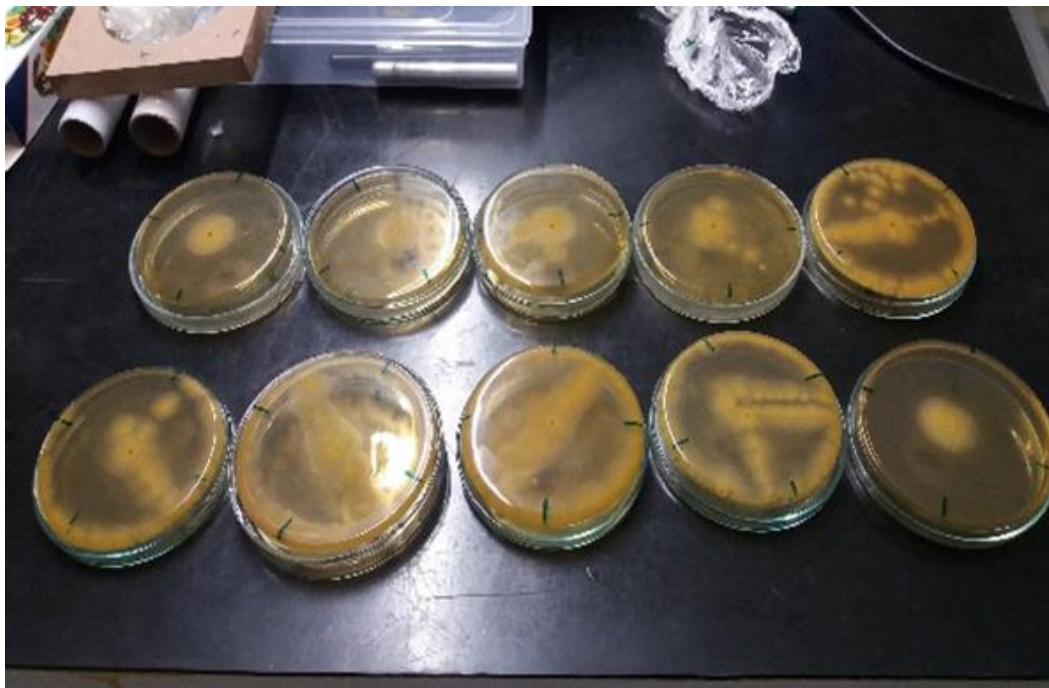
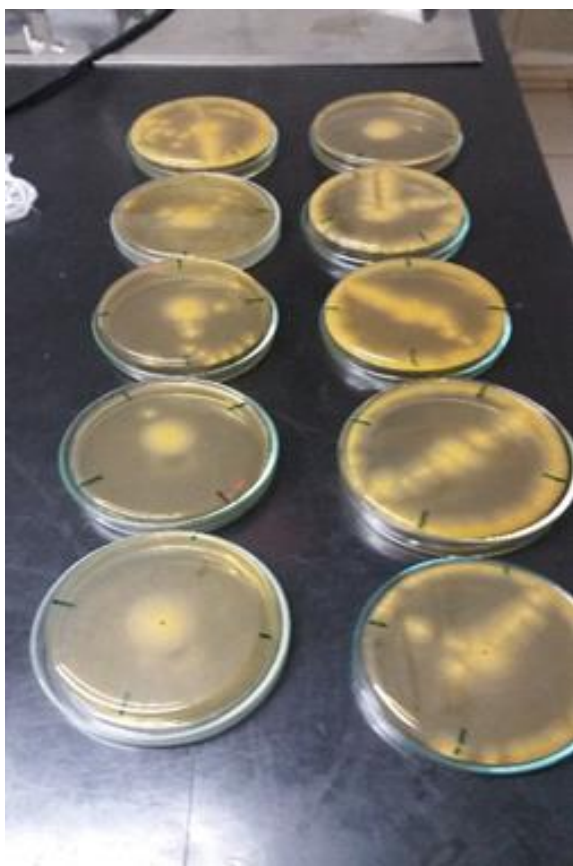


Figura 33 – Placas de petri em detalhe (c)



Com o intuito de se obter mais parâmetros de análise que corroborem a observação do crescimento dos fungos, avaliou-se o tradicional método MI (ARIZAGA, TRIVI e RABAL, 1999; CARDOZO e BRAGA, 2014), e se fez o cálculo do AVD (Valor Absoluto das Diferenças), proposto por Braga et al. (2011), e o STD (Desvio Padrão), proposto por Nothdurft e Yao (2005).

Iniciaram-se os procedimentos na segunda-feira, portanto, a análise prosseguiu nos dias subsequentes da semana, de terça a sexta-feira. Procedeu-se a análise com metodologia de observar três placas de cada fungo a cada 24 horas. O tratamento dos fungos ocorreu no Laboratório de Micologia da UFLA. O desenho do experimento é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Desenho experimental 3 – Fungo *Aspergillus*.

P = Placa de Petri com o mesmo fungo e o mesmo substrato
10 Repetições (P); 15 tratamentos; 3 variáveis.

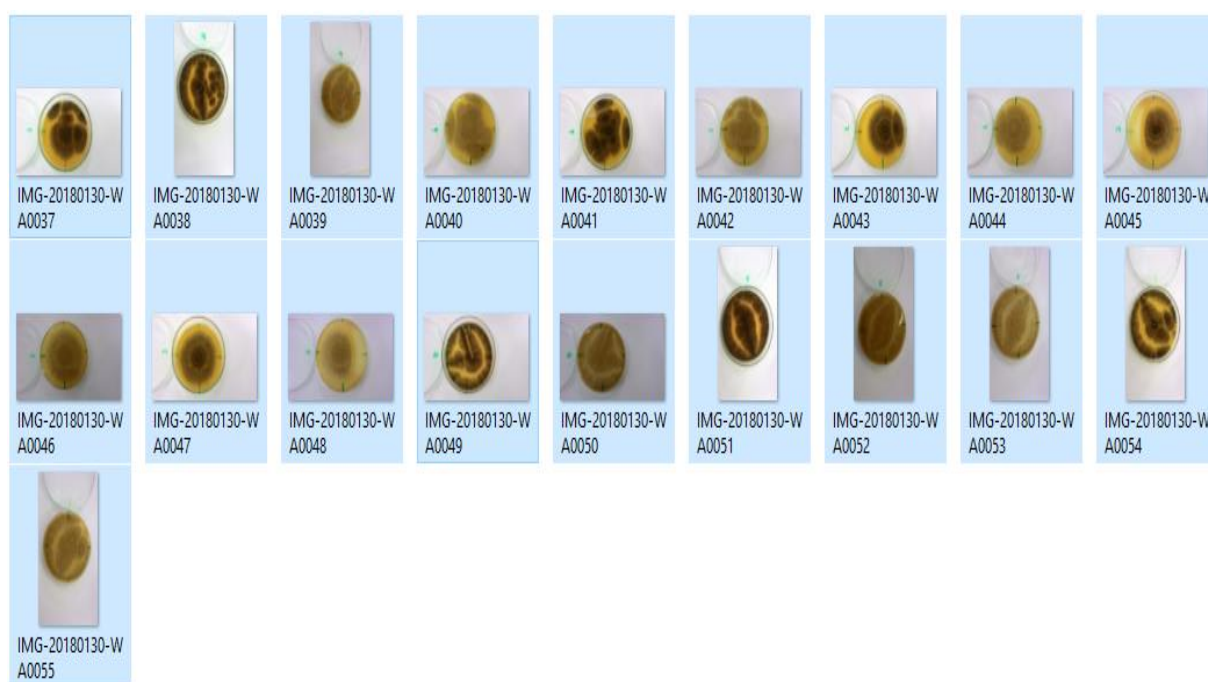
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
10 Repetições Tratamento de 1 a 5 segunda	1 2h										
	2 4h										
	3 6h										
	4 7h										
	5 8h										
10 Repetições Tratamento de 6 a 10 terça	6 20h										
	7 21h										
	8 22h										
	9 23h										
	10 24h										
10 Repetições Tratamento de 10 a 15 Quarta	11 44h										
	12 46h										
	13 47h										
	14 48h										
	15 50h										

Procedeu-se assim a realização do terceiro ensaio, com 10 repetições, 15 tratamentos e três variáveis de um mesmo fungo *Aspergillus*, em placas de Petri, inoculados todos no mesmo substrato o MEA. Os fungos ficaram armazenados logo após a inoculação na BDO a 25°C.

3.3.5 Experimento 4 – Imagem ao longo do tempo *Aspergillus*

Com o objetivo de obter um resultado semelhante do experimento anterior, trabalhou-se com dez placas Petri com os inoculados com o fungo *Aspergillus niger* que foram repicados no meio MEA, incubados em câmaras de crescimento tipo BDO a 25 C°, logo após 2h procederam-se as leituras e assim sucessivamente. As Figuras 36 e apresenta a sequência de imagens dos fungos observados após uma semana de inoculação.

Figura 34 – Placas de fungos *Aspergillus* após uma semana.



3.4 Material e modelo de análise

Para análise do experimento, por ser tratar do mesmo fungo e as condições de estudo serem uniformes, o experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado em branco (DIC), com parcelas subdivididas em tempo. Os tempos utilizados foram:

02h, 04h, 06h, 08h, 10h

12h, 14h, 16h, 20h, 24h,

28h, 32h, 36h, 40h, 44h,

E as variáveis respostas foram:

AVD – (Diferença dos Valores Absolutos)

MI – (Momento de Inércia)

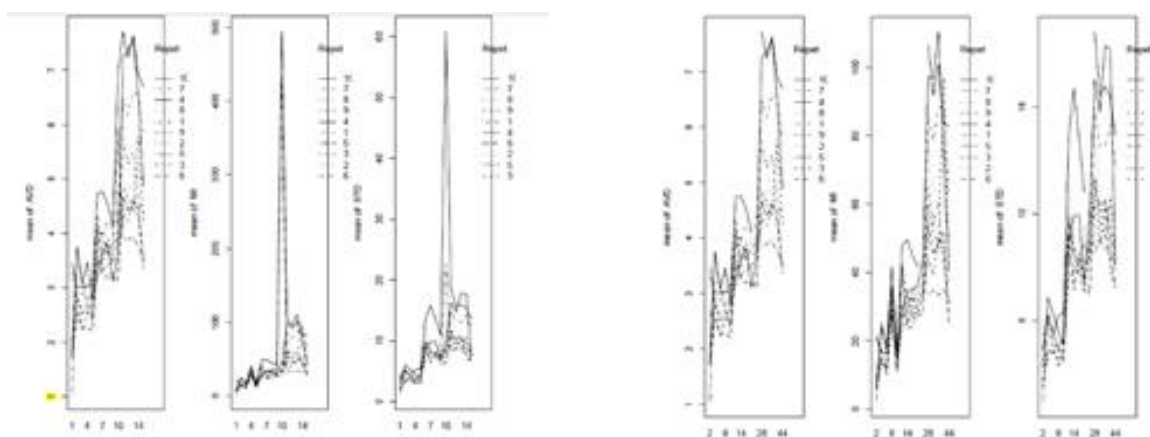
STD – (Desvio Padrão)

3.4.1 Estatísticas descritivas

Nessa etapa do trabalho de pesquisa se fez necessário recorrer a uma análise estatística no tocante à conformidade da batelada de dados processados para verificar a consistência das informações geradas quanto a sua normalidade. A Ufla – onde parte experimental da pesquisa foi desenvolvida – dispõe de um departamento de estatística, coordenado pelo Prof. Dr. Júlio S. de S. Bueno Filho, o qual teve a gentileza de realizar as referidas análises dos dados da pesquisa.

A Figura 35 apresenta a análise descritiva antes e depois de desprezar duas informações como “outliers”.

Figura 35 – Estatístico antes de depois, desprezando duas informações como “outliers”



Fonte: Consultoria em estatística – UFLA

3.4.2 Material Analisado

O modelo de Poisson é um membro da família exponencial que tem a particularidade do valor médio μ ser igual à variância. Se considerarmos que as respostas Y_i são independentes e modeladas por uma distribuição de Poisson com distribuição de probabilidade $P(\mu)$ de parâmetro $\mu > 0$, μ sua função de probabilidade é dada por:

$$(10) P(x = x_i) = \frac{\lambda^{x_i}}{x_i!} \cdot e^{-\lambda}$$

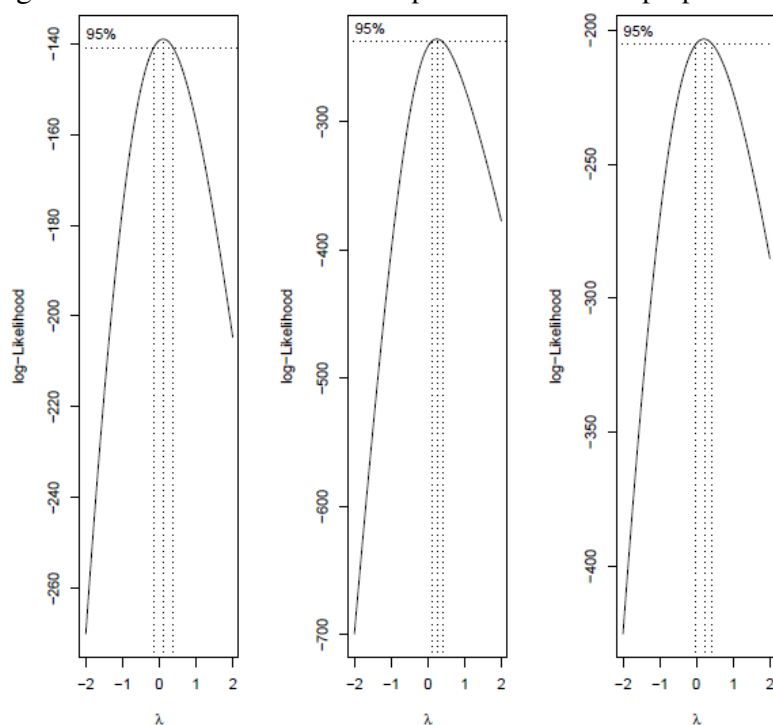
em que $\lambda = n.p$ (λ lê-se “lambda”), $\lambda > 0$ $x_i = 0, 1, \dots, n$

No III Congresso de Ensino e Extensão, realizado em 2016, discutiu-se que a distribuição de Poisson é uma das mais importantes dentre as distribuições discretas e que amostragem de conjuntos ordenados é frequentemente utilizada para modelar o número de ocorrências de um evento por certo período de tempo, por certo volume, área ou distância. A distribuição Poisson tem apenas um parâmetro, que é interpretado como uma taxa média de ocorrência do evento, e há probabilidade de ocorrerem exatamente x eventos.

A Figura 37 mostra as imagens processadas de um retorno animador, indicando a consistência das informações geradas para os três índices propostos na pesquisa.

A Figura 36 mostra as imagens processadas de um retorno animador, indicando a consistência das informações geradas para os três índices propostos na pesquisa.

Figura 36 – Curva de normalidade para os três índices propostos: AVD, IM e STD



Fonte: Consultoria em estatística - UFLA

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

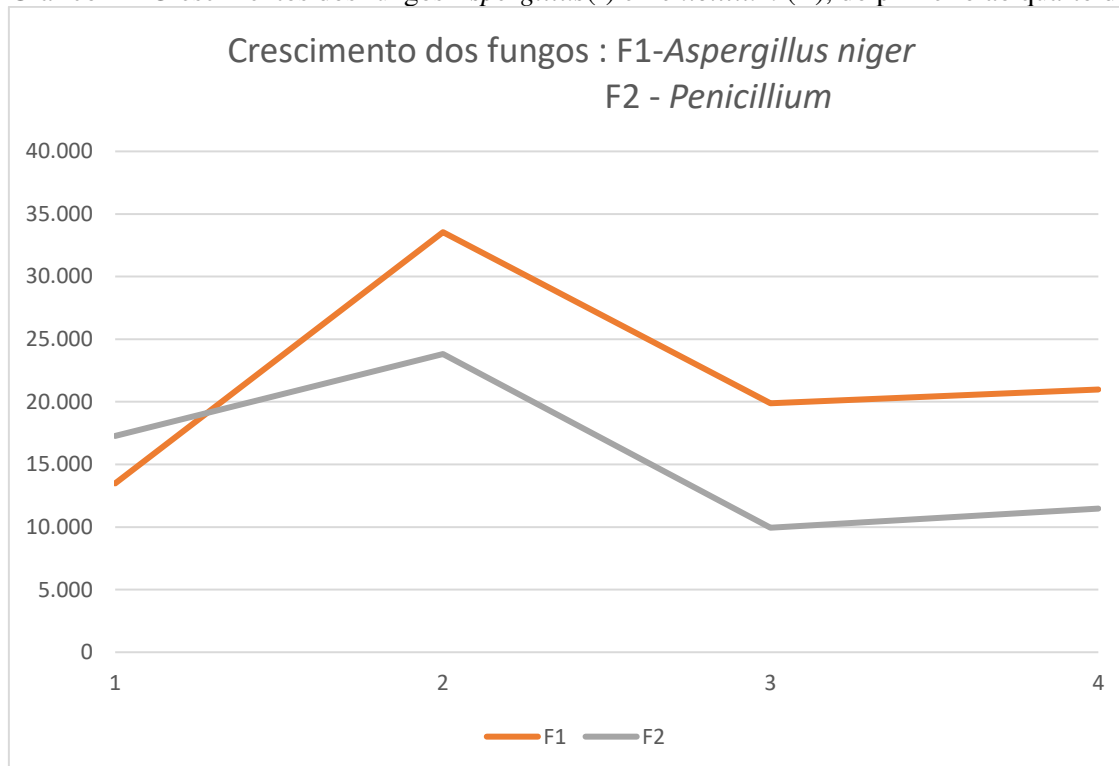
Em função dos dados obtidos no primeiro experimento, obtiveram-se os seguintes resultados para os quatro dias de monitoramento dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, conforme apresentado na Tabela 2:

		F1	F2
1º dia	IM1	13,486	17,270
	IM2	222,225	2,129
2º dia	IM1	33,548	23,815
	IM2	74,266	1,33 E+08
3º dia	IM1	19,883	44,020
	IM2	5996,5	4,20E+03
4º dia	IM1	20,990	11,476
	IM2	4,877	7,687

Tabela 2 – IM1, IM2 para os fungos (I) *Aspergillus* e (II) *Penicillium*.

Com a aplicação do Momento de Inércia nas primeiras 24 horas foi possível observar o crescimento dos fungos, com destaque para fungo 1, *Aspergillus*, que registrou crescimento ligeiramente superior ao fungo 2, *Penicillium*. Interessante notar que, no segundo dia, 48 horas, houve uma inversão, o fungo 2, *Penicillium* apresentou crescimento maior, talvez pela sua forma morfológica, tendência esta que se confirmou também no 3º dia, com 72 horas, havendo somente uma inversão de crescimento no último dia, conforme demonstra a análise dos resultados (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Crescimentos dos fungos *Aspergillus*(I) e *Penicillium* (II), do primeiro ao quarto dia, 96 horas.



Nota-se que o ápice da curva se prolongou até o terceiro dia em decorrência da mudança de foco de análise de *Biospeckle*. Procurou-se, com a análise gaussiana, pontos mais próximos do foco de crescimento do fungo, transferindo a referência do centro da placa de Petri inicialmente, como foi medido no método anterior, para o segmento mais relevante, onde se encontra o foco de crescimento do fungo na placa. Após o terceiro dia, uma queda acentuada foi verificada, isto se deve justamente à falta de espaço para o crescimento dentro da placa.

No terceiro e no quarto dias, aplicando a distribuição gaussiana nas novas áreas de interesse sugeridas em função do crescimento dos fungos, observou-se o crescimento a partir do centro para a periferia da Placa de Petri. Com o deslocamento do foco foi possível mensurar de forma mais precisa o crescimento. O Gráfico 2 demonstra a comparação entre os três métodos de análise de *Biospeckle* utilizados na pesquisa.

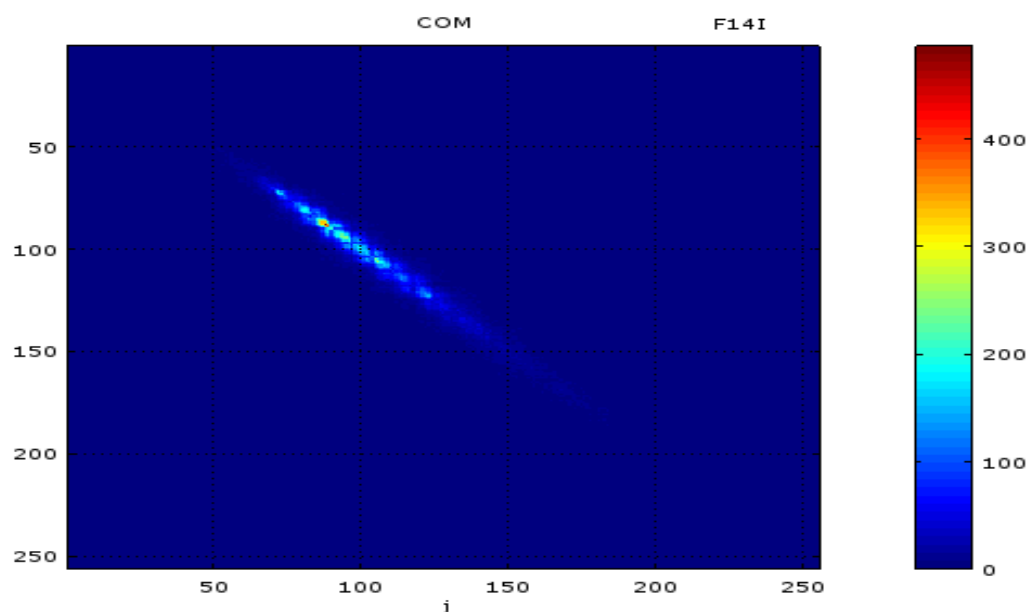
Gráfico 2 – Curva após o deslocamento do foco

MI - aplicando corrigido



De acordo com Braga Junior (2016), o Momento de Inércia (IM1) é o parâmetro que corresponde ao Momento de Inércia com normalização da matriz coocorrência proposto por Cardoso et al. (2014), enquanto o parâmetro IM2 corresponde ao momento de inércia com normalização da matriz de coocorrência proposto por Arizaga, Trivi e Rabal (1999). A Figura 40 mostra o Momento de Inércia (IM1) obtido para o experimento.

Figura 37 – Momento de Inércia (IM1) obtido para o experimento no segundo dia



4.1 Cálculos do Momento de Inércia (IM1)

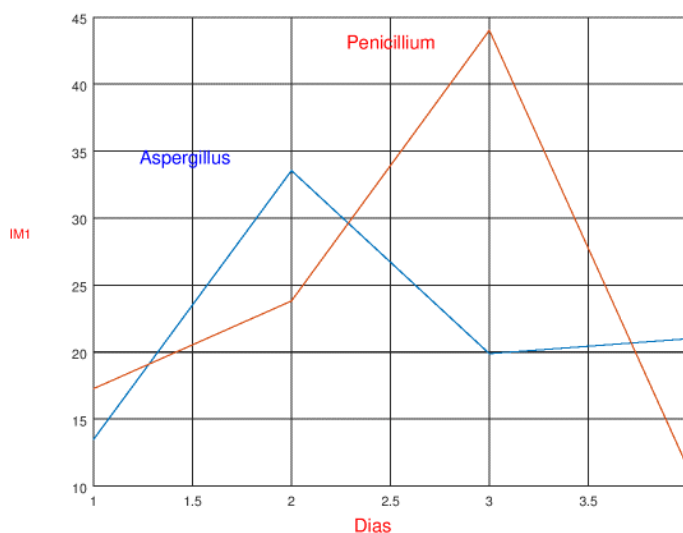
No Gráfico 3, é mostrado o Momento de Inércia (IM1) nos quatro primeiros dias, após inoculação dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium*. Observa-se para o primeiro fungo (*Aspergillus*) um crescimento até o segundo dia, logo depois da inoculação, após o seu decaimento até o terceiro dia de monitorização, demonstrando uma tendência ao crescimento novamente no quarto dia. Acredita-se que este se refere à autofagia por falta de substrato para o desenvolvimento.

Para o segundo fungo (*Penicillium*), ainda para o Momento de Inércia (IM1), o crescimento se deu até o fim do segundo dia, logo após um crescimento ainda mais acentuado até terceiro dia seguido, após a inoculação, de uma brusca queda. Por questões metodológicas não se demonstra o gráfico parâmetro IM2, pois o mesmo apresenta vários “*Out Liers*”.

Gráfico 3 – Relação de crescimento do IM –fungos (F1_*Aspergillus* e F2_*Penicillium*).

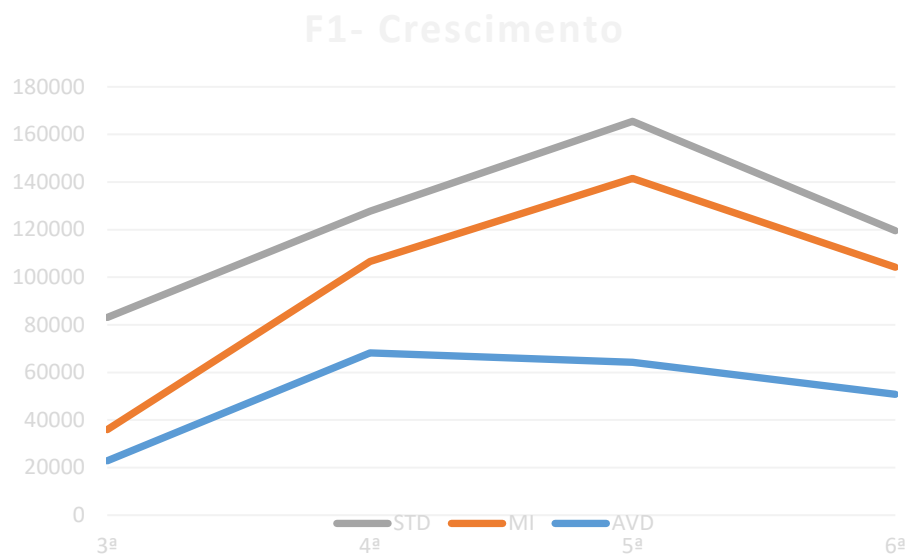
4.2. Segundo experimento

Gráfico 3 – Curva após o deslocamento do foco



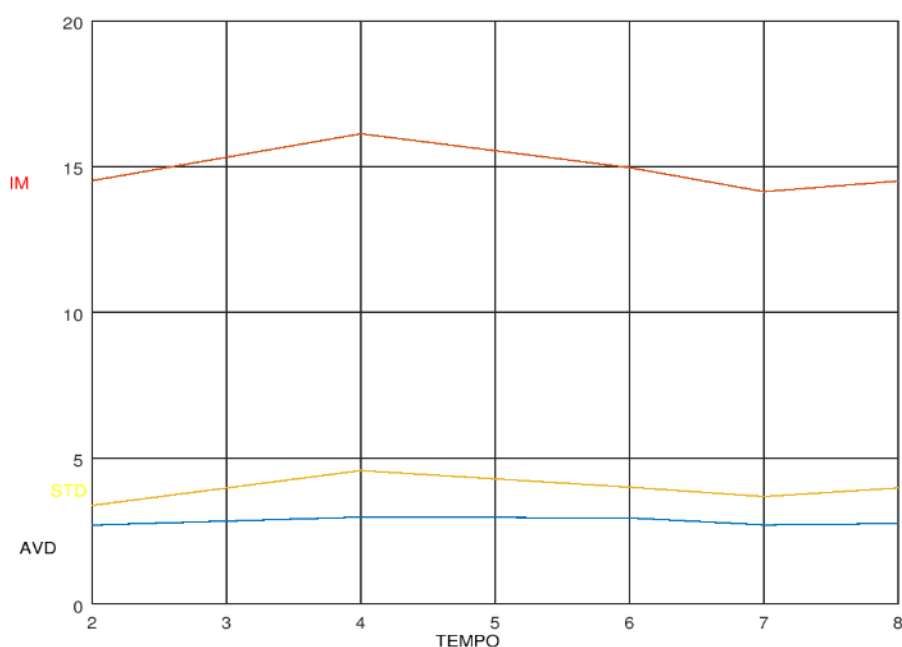
A detecção do crescimento e a quantificação de fungos combinados com a análise são essenciais na caracterização microbiana dos alimentos. A possibilidade de uma análise comparativa dentre três métodos fundamentais IM, STD e AVD em *Biospeckle* é proposta e mostrada no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Comparação do crescimento entre AVD MI e STD primeira semana



Divide-se o intervalo de observação da atividade biológica monitorada pelo *Biospeckle* em intervalos de tempos de duas até oito horas, após a inoculação.

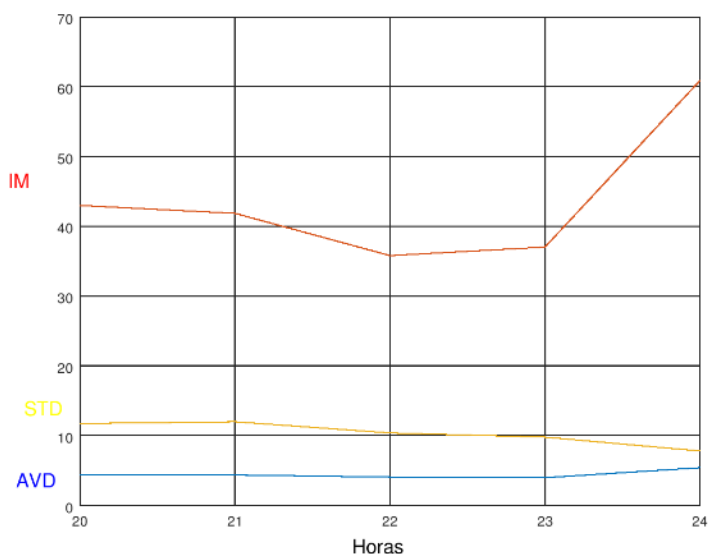
Gráfico 5 – Comparação de 2 a 8 horas após a inoculação – parâmetros IM, STD e AVD



Os parâmetros AVD e STD demonstraram um comportamento semelhante ao longo dessas oito horas, o Momento de Inércia demonstrou maior variação com um pico de crescimento até quatro horas, sofrendo decréscimo, finalizando com uma tendência a crescimento novamente.

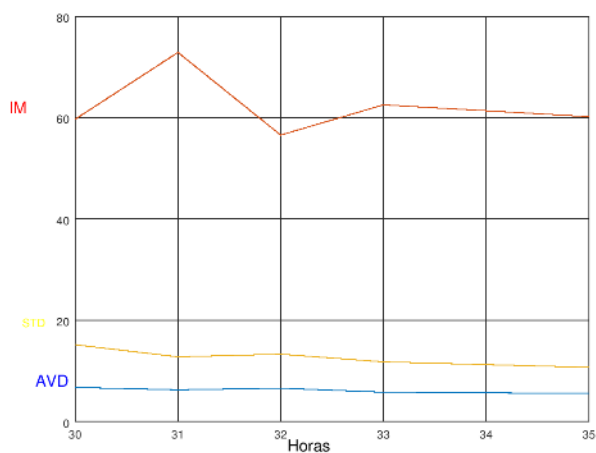
No intervalo de 20 a 24 horas confirmou-se a tendência de comportamento semelhante dos parâmetros de AVD e STD. Momento de Inércia mostrado durante este intervalo apresentou uma suave queda até às 22 horas, permanecendo em uma constante até 23 horas e, a seguir, um nítido aumento de atividade biológica.

Gráfico 6 – Comparação de 20 a 24 horas após a inoculação – parâmetros IM, STD e AVD



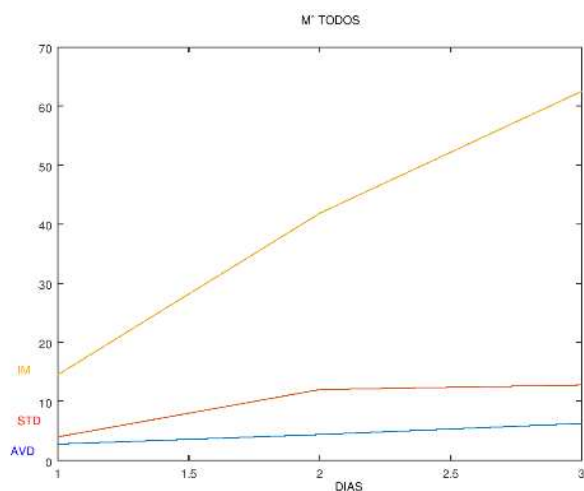
Neste último intervalo proposto para análise do comportamento de *Biospeckle*, da 3ª à 35ª hora, confirmou-se a semelhança de comportamento detectado através do AVD e STD, mas o IM ratificou a tendência de crescimento do intervalo anterior atingindo até a trigésima primeira hora. Após, houve uma queda até próxima hora, levando a uma tendência de estabilização do crescimento.

Gráfico 7 – Comparação de 30 a 35 horas após a inoculação – parâmetros IM, STD e AVD



Esta tendência na detecção de crescimento da atividade biológica mostrou-se também ao longo dos três dias de observação. Utilizando a média, traçou-se um gráfico que comprova a possibilidade do *Biospeckle* em detectar com precisão o seu desenvolvimento, como se observa no Gráfico 8.

Gráfico 8 – Três métodos de detecção de crescimento - *Biospeckle*, AVD, STD, IM.



4.3 Terceiro experimento

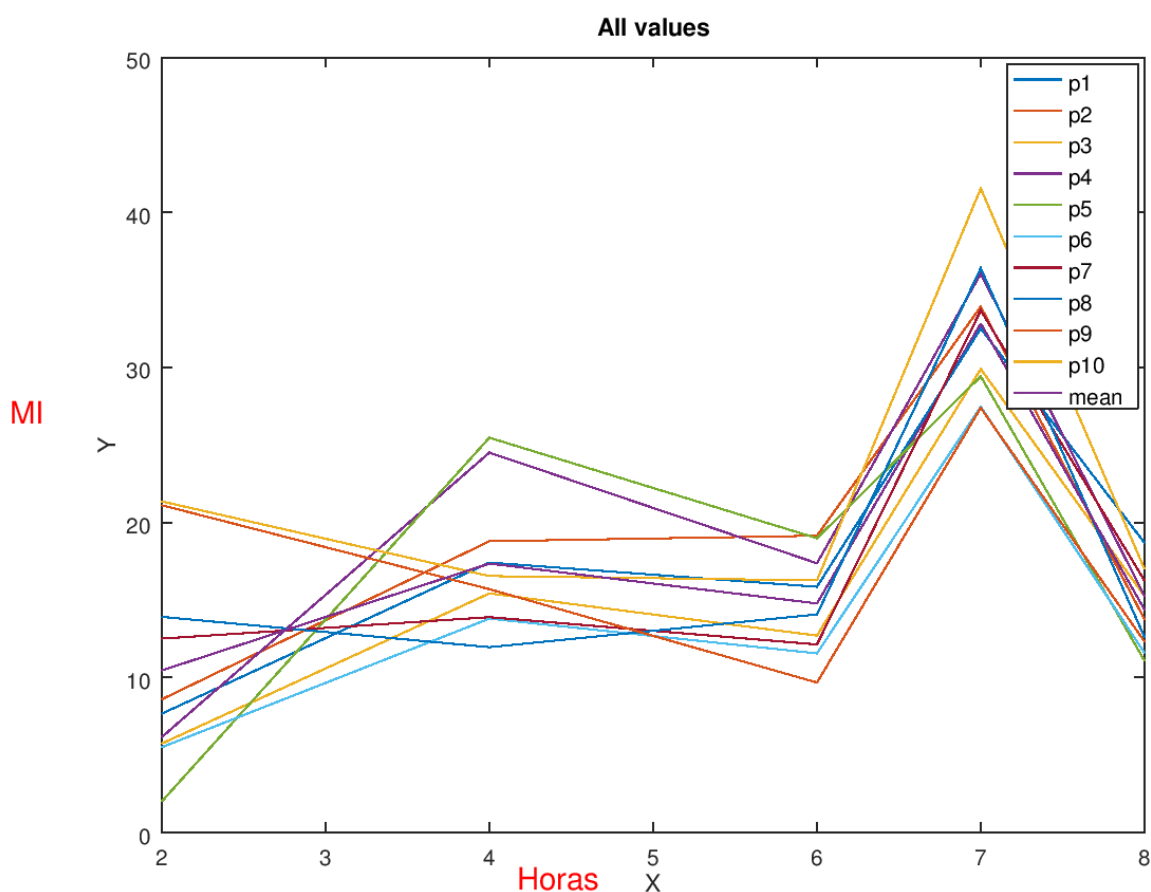
A Tabela 3 apresenta o Momento de Inércia, do terceiro experimento, para as primeiras oito horas de monitoramento com 10 placas de fungos da mesma espécie, *Aspergillus* repicados com o substrato MEA.

Tabela 3 – Momento de Inércia para as primeiras 8 horas

HORAS	2H	4H	6H	7H	8H
PL1	7,6693	17,418	15,8525	32,5117	18,686
PL2	8,5979	18,7909	19,1504	33,9263	13,7503
PL3	5,7439	15,4269	12,7068	29,9011	15,2547
PL4	6,1631	24,5089	17,3722	36,0504	15,2547
PL5	2,0111	25,4708	18,984	29,4294	11,077
PL6	5,5068	13,8022	11,5595	27,4736	11,5959
PL7	12,5117	13,8951	12,1342	33,6825	16,2526
PL8	13,914	11,9601	14,0714	36,4021	12,6104
PL9	21,1147	15,7002	9,6781	27,3933	12,3216
PL10	21,3624	16,5461	16,2694	41,5478	17,0006

Por ser o *Biospeckle* composto por pontos aleatórios, podendo assim ser expresso somente por estatísticas ou médias, demonstra-se através do Gráfico 9 a comparação do crescimento das dez placas de Petri inoculadas com o substrato MEA nas primeiras oito horas dos fungos.

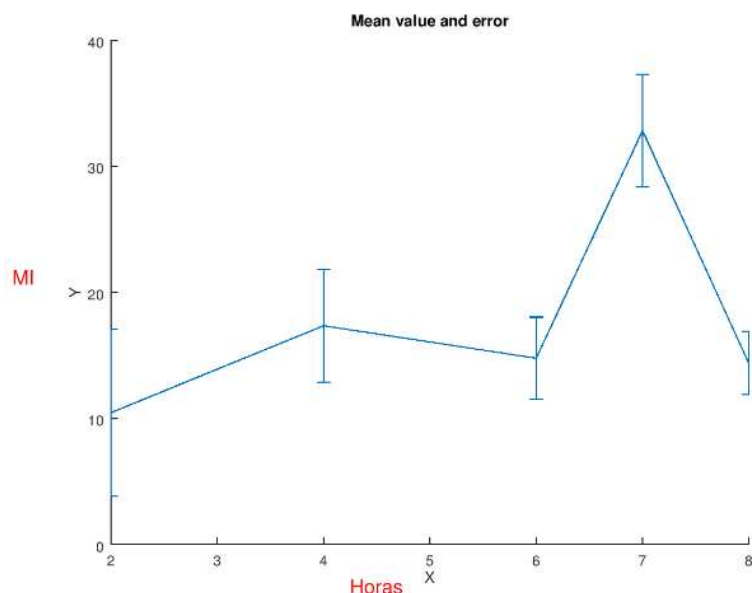
Gráfico 9 – Comportamento dos fungos nas primeiras oito horas após a inoculação



Nota-se uma nítida tendência de crescimento até o quarto dia para as dez placas observadas, apesar de o Momento de Inércia inicial variar de 0 a 20 aproximadamente (valores adimensionais obtidos pelo parâmetro Momento de Inércia), entretanto, uma concentração de até 13, aproximadamente, dominou este período de monitorização. O comportamento semelhante de crescimento da atividade biológica prevaleceu nestas primeiras oito horas.

Na curva média das placas inoculadas mostra-se mais definido o comportamento de crescimento do Momento de Inércia, ultrapassando o seu valor inicial monitorado pelo *Biospeckle* até no final das oito primeiras horas.

Gráfico 10 – Curva média do comportamento dos fungos da segunda à oitava horas após a inoculação.



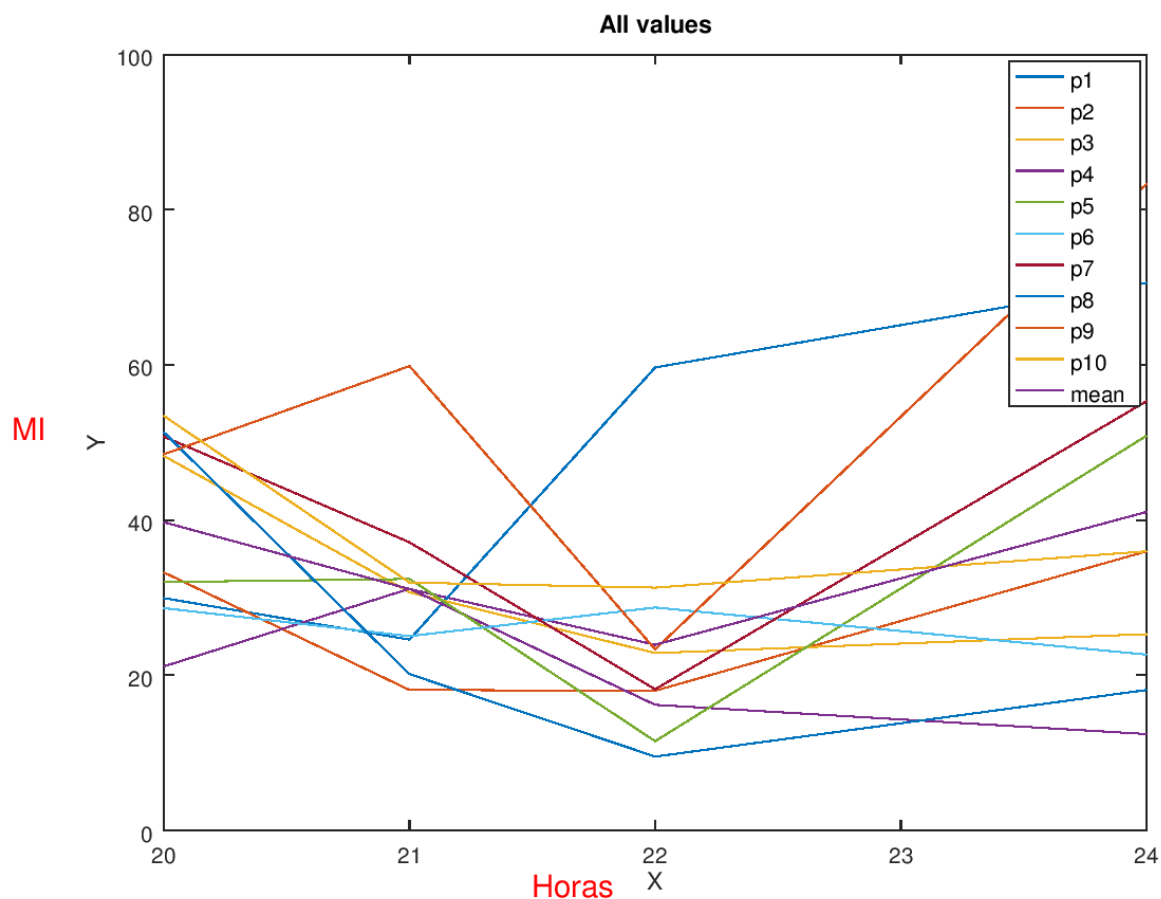
Deu-se continuidade à observação, desta feita, o período analisado ficou entre 20 e 24 horas da inoculação dos fungos, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Momento de Inércia para 20 a 24 horas após a inoculação.

HORAS	20 H	21H	22H	23H	24H
PL1	38,029	34,1512	26,6354	32,5117	33,0777
PL2	27,8182	34,1512	29,4679	33,9263	36,5593
PL3	42,5354	28,6573	34,1818	29,9011	34,7437
PL4	28,8227	34,6134	34,8752	36,0504	44,0811
PL5	41,3926	23,3771	24,3633	29,4294	433,7363
PL6	30,1019	25,3771	28,1922	27,4736	27,8234
PL7	26,7911	30,8303	35,4958	33,6825	36,4071
PL8	31,5007	32,6069	31,7319	36,4021	33,099
PL9	24,1317	25,272	33,0041	27,3933	33,0093
PL10	47,9594	49,5642	44,9765	41,5478	494,9158

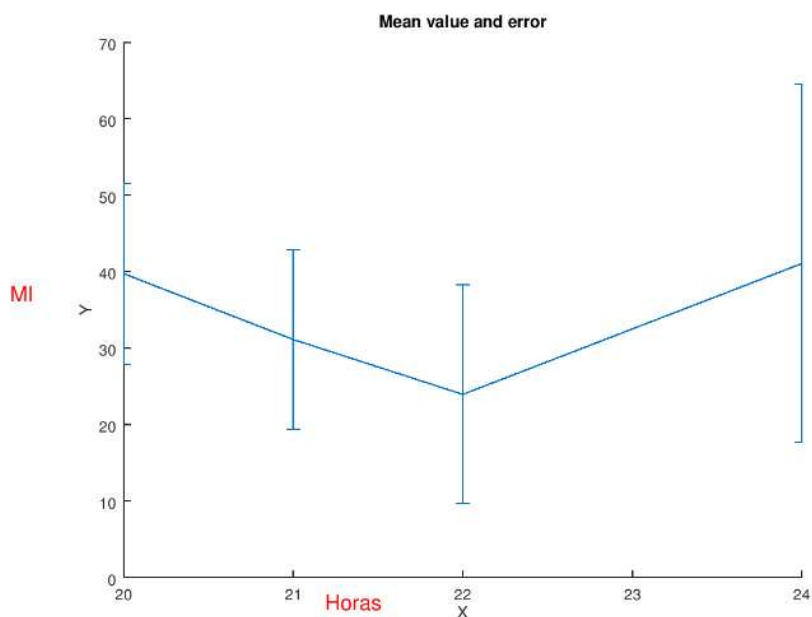
Nesta etapa da análise os fungos mostraram o seu comportamento aleatório, mas foi possível atentar que 60% deles demonstraram certa inclinação ao crescimento do nosso parâmetro, mas 40% seguiram a tendência ao decaimento, acredita-se, a continuidade resgatada do Gráfico 9.

Gráfico 11 – Fungos da vigésima à vigésima quarta horas após a inoculação.



A seguir de forma análoga a primeira etapa a curva média das placas inoculadas para esta segunda etapa da vigésima à vigésima quarta hora, mostra-se mais definido o comportamento de crescimento do Momento de Inércia, ultrapassando o seu valor inicial monitorado pelo *Biospeckle* até no final.

Gráfico 12 – Curva média do comportamento dos fungos da vigésima à vigésima quarta horas após a inoculação.



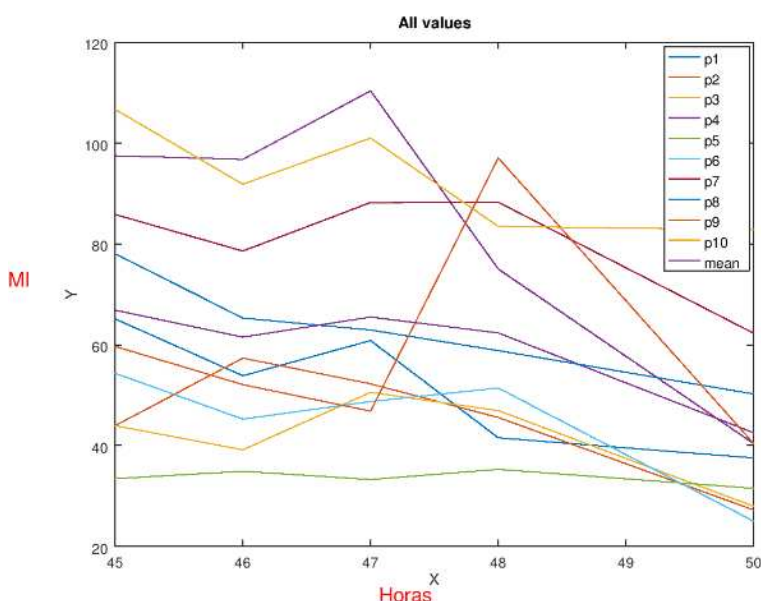
A Tabela 5 representa a parte final do experimento proposto, a análise do comportamento das placas de Petri inoculadas com o mesmo fungo da quadragésima quinta hora até o final, com 50 horas de observação da atividade biológica.

Tabela 5 – Momento de Inércia para 45 a 50 horas após a inoculação.

HORAS	45	46	47	48	50
PL1	65,1486	53,8617	60,8465	41,542	37,5524
PL2	43,9489	57,3678	52,2569	45,5817	27,2221
PL3	43,9634	39,1577	50,5727	46,9505	27,9549
PL4	97,5209	96,8024	110,4027	75,0397	40,3817
PL5	33,438	34,9074	33,2691	35,2922	31,5219
PL6	54,3495	45,2561	48,7425	51,4275	24,9862
PL7	85,857	78,6073	88,2327	88,2978	62,2786
PL8	78,0689	65,3056	62,9400	58,8486	50,2392
PL9	59,6793	52,0998	46,8331	97,0691	40,4043
PL10	106,7092	91,8737	101,0144	83,496	82,821

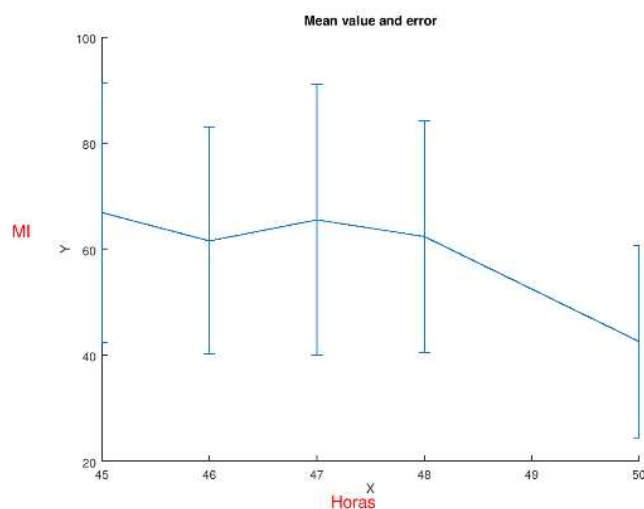
O gráfico desta última etapa do experimento corrobora um pouco mais a teoria, pois quase todas as placas demonstraram um nítido decaimento do parâmetro Momento de Inércia observado, apontando para o fim da atividade biológica, demonstrando desta maneira que o *Biospeckle* se mostrou bastante capaz de registrar o comportamento destas atividades biológicas dos fungos.

Gráfico 13– Comportamento dos fungos da quadragésima quinta hora até a quinquagésima hora após a inoculação.



A seguir de forma análoga as etapas anteriores mostra-se a curva média das placas inoculadas para esta terceira etapa da quadragésima quinta até o final quinquagésima a hora final do experimento, uma suave queda do crescimento tendendo a estabilização do Momento de Inércia.

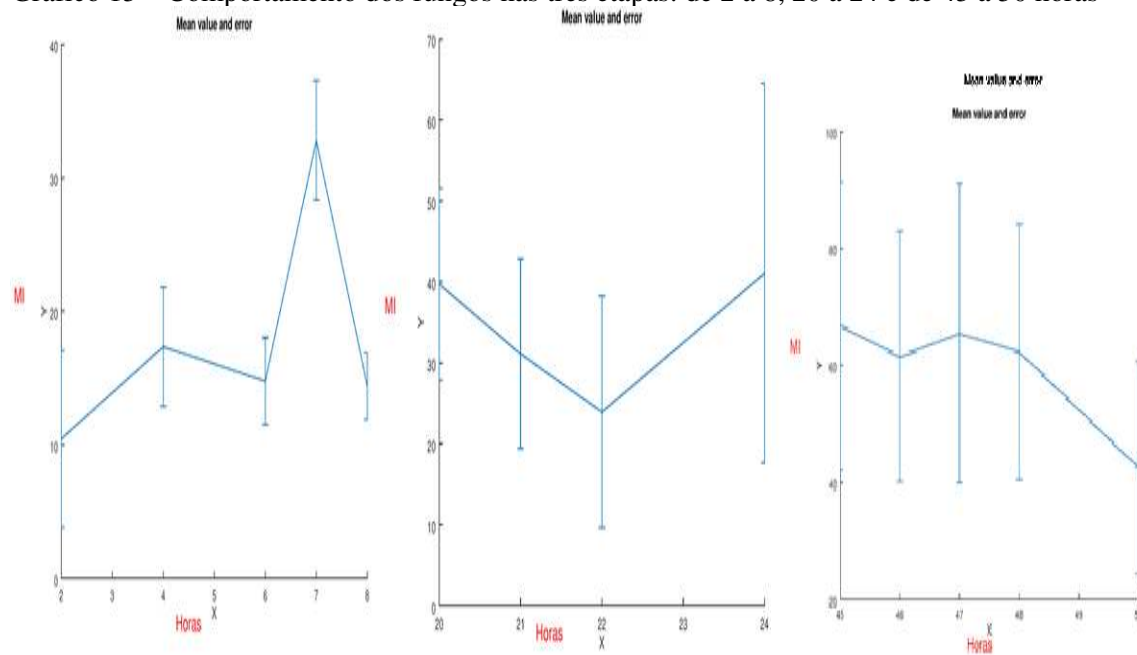
Gráfico 14 –Curva média do comportamento dos fungos da quadragésima quinta a quinquagésima hora



Pode-se acreditar que o caminho para a montagem de um protocolo que sustente as pesquisas referentes ao controle de detecção de fungos através do *Biospeckle* em suas primeiras horas foi lançado com relativo sucesso.

O Gráfico 12 mostra as médias com dispersão para as primeiras cinquenta horas de inoculação do fungo *Aspergillus*.

Gráfico 15 – Comportamento dos fungos nas três etapas: de 2 a 8, 20 a 24 e de 45 a 50 horas



Desta feita mostra-se a Tabela 5 do Momento de Inércia, do quarto experimento, realizado de forma similar ao terceiro para comprovar a capacidade do biospeckle em detectar o

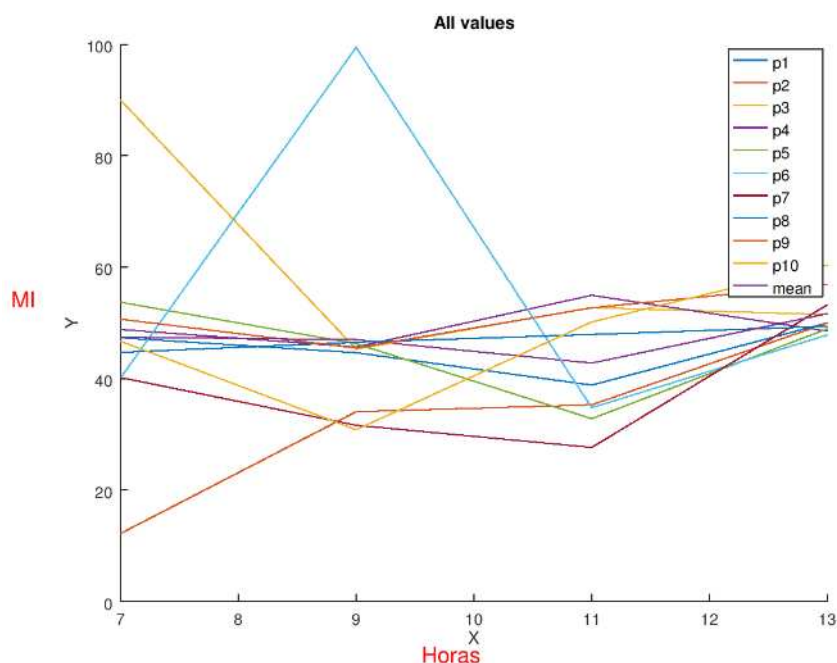
crescimento nas primeiras sete horas até a décima terceira hora após a inoculação, monitoram-se as 10 placas de fungos da mesma espécie, *Aspergillus niger* repicados com o mesmo substrato com MEA.

Tabela 6 – Momento de Inércia para 7 a 13 horas após a inoculação.

HORAS	7H	9H	11H	13H
PL1	47,320	44,643	38,827	49,989
PL2	12,183	34,046	35,284	49,989
PL3	89,994	45,292	52,739	51,485
PL4	48,810	45,664	54,948	48,518
PL5	53,708	46,254	32,803	48,933
PL6	40,118	99,451	34,767	47,834
PL7	40,182	31,615	27,636	53,230
PL8	44,699	46,519	47,911	49,379
PL9	50,659	45,478	52,698	56,869
PL10	46,693	30,813	50,161	60,364

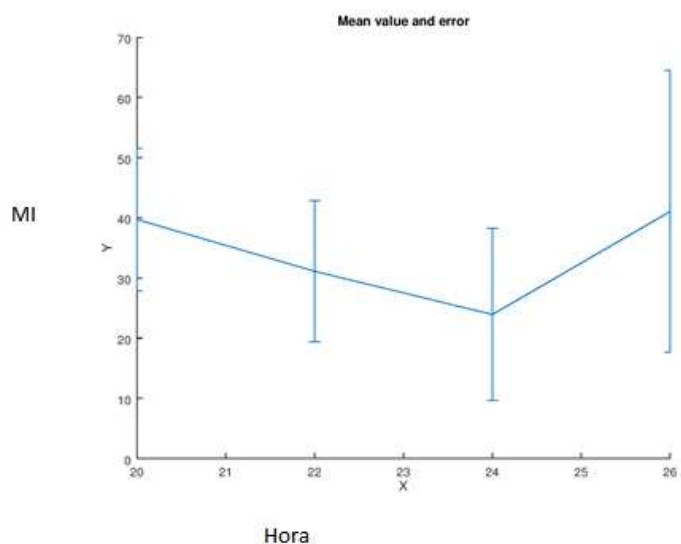
Pelo Gráfico 13 observa-se um comportamento que oscila nota-se um decréscimo do Momento de Inércia nas 7 horas iniciais, entretanto, a curva tende a um crescimento até o final do gráfico a décima terceira hora.

Gráfico 16 – Comportamento dos fungos da sétima hora até a décima terceira hora



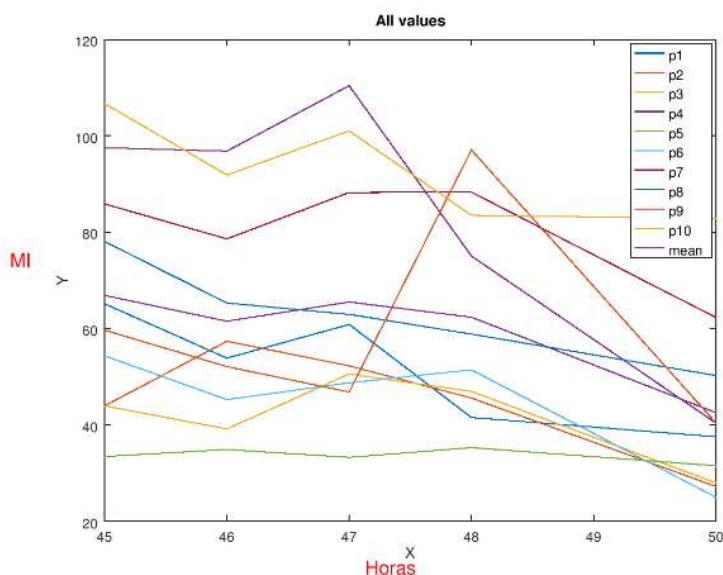
Sua curva média é mostrada no gráfico 16, que demonstra um perceptível decréscimo a atividade biológica até a vigésima quarta hora e partir deste instante um notável crescimento da atividade biológica.

Gráfico 19 – Comportamento médio do crescimento dos fungos da vigésima à vigésima sexta hora



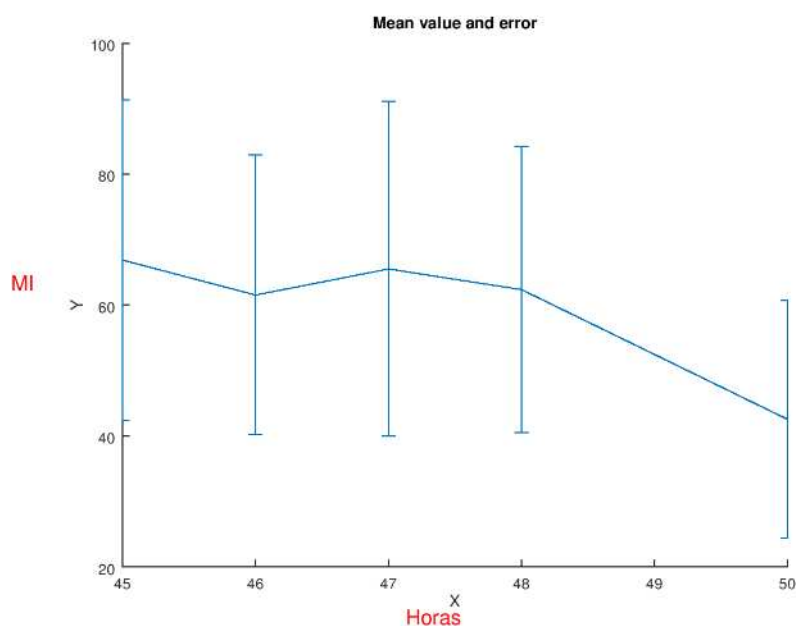
Na sequência parte-se para a etapa final deste último experimento analisando o comportamento dos fungos da quadragésima quinta hora até o final do experimento a quinquagésima hora. O gráfico a seguir relata este comportamento.

Gráfico 20 – Comportamento médio do crescimento dos fungos da vigésima à vigésima sexta hora



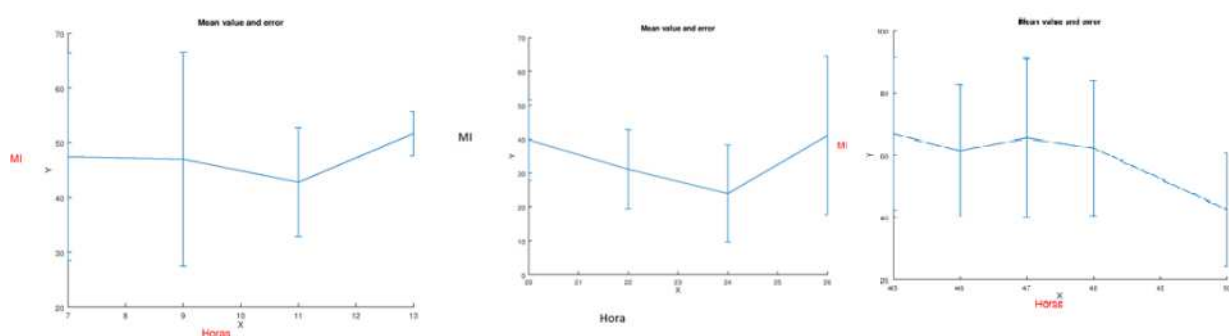
Como se previa ao final do monitoramento desta última etapa, por não haver mais o substrato para a alimentação observa-se uma decréscimo da atividade biológica, a partir de então os fungos iniciam a etapa de economia de energia se estabilizando o comportamento, como é mostrado no gráfico do comportamento da curva média.

Gráfico 21 – Comportamento médio do crescimento dos fungos da vigésima à vigésima sexta hora



Curva media comparativa do crescimento do terceiro experimento das primeiras cinquenta horas é mostrada na sequência, a curva de monitoramento do crescimento corrobora com o terceiro experimento, mostrando um perceptível crescimento inicial a seguir uma estabilidade com pequenas oscilações finalizando com uma queda e estabilidade da atividade biológica.

Gráfico 22 – Curva comparativa do crescimento do 4º experimento



5 CONCLUSÕES

A necessidade atual percebida de se pesquisar os fungos, atribuída à sua importância em diversos ramos de pesquisa, levou-nos à superação em se conseguir dados confiáveis que pudessem ser aplicados em trabalhos semelhantes e acredita-se que esta tenha sido atingida.

A detecção de crescimento de fungos em ambiente ágar-ágar em sua primeira semana e em seguida nas primeiras horas após a incubação, em um substrato como Ágar Extrato de Mate (MEA), como aplicado nos experimentos, foi bem comprovada através do *Biospeckle*. A análise do desenvolvimento mostrou-se bastante profícua, demonstrando que técnica do *Biospeckle* a laser, revelou-se um bom instrumento de monitorização na primeira semana de crescimento para ambos os fungos, principalmente nas primeiras 24 horas de desenvolvimento.

A observação dos fungos através dos índices Diferença dos Valores Absolutos (AVD), Momento de Inércia (MI) e Desvio Padrão (STD) comprova o crescimento dos fungos a partir do centro da placa de Petri para a periferia. Com a mudança de foco foi possível monitorar esse desenvolvimento.

A repetitividade das curvas de crescimento obtidas nas primeiras horas ainda requer mais aplicações. Acredita-se que uma estrutura que pudesse juntar a configuração do experimento com a incubadora dos microrganismos e a análise do *Biospeckle* concentrada em um mesmo local (evitando o deslocamento) poderia contribuir para melhorar os dados obtidos.

Para futuros trabalhos, interessante seria diminuir o tempo de observação, definir nas primeiras 8 horas, logo após as repicagens dos fungos nas placas, para obter informações quanto à viabilidade da inoculação, e assim, prosseguir com o processo de identificação, conseguindo com isto aperfeiçoar o processo, não necessitando aguardar uma semana para se ter a confiança do seu desenvolvimento, dispondo do *Biospeckle* como mais uma ferramenta utilizada em laboratório para estudos taxonômicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZU, Y; ASAKURA, T. Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow. **Optics & Laser Technology**, Surrey, v. 23, n. 4, p. 205-219, Aug. 1991.

ALVES, J.A. **Aplicação da técnica Biospeckle a laser com abordagem espectral em cenoura minimamente processadas**. 73p. Tese (Doutorado Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2012.

ALVES, J.A. et al. Identification of respiration rate and water activity change in fresh-cut carrots using *Biospeckle* laser and frequency approach. **Postharvest Biology and Technology**, v.86, p. 381–386. 2013. Disponível em: www.elsevier.com/locate/postharvbio. Acesso em: 13/12/17.

AMALVY, J.I. et al. Application of dynamic speckle interferometry to the drying of coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 42, p. 89-99. 2001.

ANVISA. Microbiologia Clínica para o controle de infecção Relacionada à Assistência à saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica/Agência Nacional de vigilância Sanitária. Brasília: **ANVISA**, 2013. p. 46.:il,9 Volume. ISBN.

ARIZAGA, R; RABAL, H.J.; TRIVI, M.R. Speckle time evolution characterization by co-ocorrência matrix analysis. **Optics & Laser Technology**, v.4-5, p. 1-7, 1999.

ARIZAGA et al. Display of local activity using dynamical speckle patterns. **Opt. Eng.** v.41(2), p. 287–294, 2002.

BRAGA JUNIOR, R.A. **“Bio-Speckle”: uma Contribuição para o Desenvolvimento de uma Tecnologia Aplicada a Análise de Sementes**. 117p. Tese (doutorado Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo SP. 2000. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document>. Acesso em: 21/06/2015.

BRAGA JUNIOR et al. Biospeckle numerical values over spectral image maps of activity. **Optics communication**, v. 285, p. 553-561, 2012.

BRAGA JUNIOR, R.A.; RIVERA, F.P.; MOREIRA, J. Practical Guide to Biospeckle Laser Analysis: Theory and software. Lavras: **Ed. Ufla**, 2016.

BRAGA JÚNIOR, R.A. When noise became information: State-of-the-art in Biospeckle laser. **Ciência e Agrotecnologia**, v.41 (4), p. 359-366, 2017. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542017414000317>. Acesso em: 20/03/17.

BRAGA, R.A. Challenges to Apply the Biospeckle Laser technique in the Field. **CET Chemical Engineering Transactions**. v.58, p. 577-582, 2017.

CARDOSO, et al. Alternative protocols on dynamic speckle laser analysis. IN: **V International Conference on Speckle Metrology**, p. 10-12, Sept. 2012, Vigo Spain.

CARDOSO, Rafael Rodrigues. **Análise do Speckle laser dinâmico: uma releitura**. 130p. Dissertação (Mestrado Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Lavras. 2011.

DANTAS, S.A.F. et al. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira** v.28, n.5, 2003. Disponível: <<http://www.scielo.br/scielo>>. Acesso em: 21/06/15.

DIJKSERHUIS, J.; SAMSON, R.A. Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food. **Ed. CRC press**. Boca London New York, 2007.

ENES, ADILSON MACHADO. **Análise de frequência do Biospeckle laser aplicada ao mapeamento de fenômenos em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)** 97 p. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2001. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document>>. Acesso em: 21/06/2015.

FRACAROLLI, Juliana Aparecida. **Utilização do Biospeckle laser na avaliação do potencial germinativo de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla*) (Vellozo) Toledo**. 86 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, SP. 2011. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document>>. Acesso em: 22/06/2015.

FREIRE, et al. **Micotoxinas: a importância na alimentação e na saúde humana d animal**. 48 p. Embrapa agroindústria tropical, 2007. Fortaleza

FUJII, H.; et al. Blood flow observed by time-varying laser speckle. **Optics Letters**, v. 10, p. 104-106, 1985.

GALLI, F. et al. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres LTDA, 1978. v. I

GHERBAWY, Y.; VOIGT, K. **Molecular Identification of Fungi**. Germany: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2010.

GODINHO, Robson Pirangeli. **Alternativas para a implementação da análise do speckle a laser em tempo real**. 61p. Dissertação (mestrado) -Universidade Federal de Lavras-Faculdade de Engenharia de Sistemas. Lavras. Minas Gerais, MG.2012. Disponível em: <<http://www.prpg.ufla.br/esistemas/wp-content/uploads/2012/08> > Acesso em: 13/12/2017.

HAWKSWORTH, D.L A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. **IMA Fungus** v. 2, n. 2, p155–162, 2011.

HIBBETT, D.S.; TAYLOR, J.W. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? **Nature Reviews/MICROBIOLOGY**, v.11, Ed.129, fev 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/reviews/micro>>. Acesso em: 19/12/17.

- HO, F.F.C. **Crescimento de Fungos em Estrumes**. Disponível em: <<https://eaulas.usp.br/portal/home/video.action?idItem=1858>>. Acesso em: 20/03/2017.
- JÁY, J. M. Microbiologia de alimentos/ JAMES m. Jay: Trad. Eduardo Cesar Tondo. [et al.]-6ª edição –**Editora Artmed**, Porto Alegre, 2005.
- KAVANAGH, K. Biology and applications. **Ed. Jonh Wiley & Sons LTDA**, 2005.
- KIM et al. Laser-induced speckle scatter patterns in Bacillus colonies. **Frontiers in Microbiology**, v.5, article,53,1,oct. 2014.
- LOPES et al. Diversidade e evolução de fungos e Animais. 1ed. São Paulo: **USP/Univesp/Edusp**, 2014.
- MACIEL, M.H.C. **Abordagem polifásica para a identificação das linhagens *Aspergillus* seção Nigri. preservadas na micoteca URM e caracterização quanto a produção e purificação de Poligalacturonases**. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciência Biológicas, Pós-graduação em Biologia de Fungos.2013.
- MAZIERO, M.T. e BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidas no Brasil. **Revista Brasileira de produtos agroindustriais**. V.12, n.1, p. 89-99, Campina Grande, 2010.
- MEDEIROS, F.H.V.DE et al. Biological control of micotoxin-producing molds. **Ciênc. agrotec.** v. 36, n. 5, p. 483-497, Lavras, 2012.
- MONTEIRO, M.C.P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. Dissertação(mestrado) Faculdade de Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais 2012.
- MOREIRA, J. **Desenvolvimento de uma ferramenta computacional livre acesso para o processamento de imagens do speckle laser dinâmico**. 153p. Dissertação (mestrado). Modelagem de Sistemas Biológicos, Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, 2013.
- MURIALDO, et al. Discrimination of motile bacteria from filamentous fungi using dynamic speckle. **Journal of Biomedical Optics**. v.17(5), 2012. Disponível em: <<https://www.spiedigitallibrary.org/journals/Journal-of-Biomedical-Optics> on 12/16/2017 Terms of Use: <https://www.spiedigitallibrary.org/terms-of-use>>. Acesso 20/03/2017.
- NASCIMENTO et al. Desenvolvimento de um modelo para o Biospeckle na análise de semente de feijão. (*Phaseolus vulgaris* L.) **Ciênc. agrotec.**, v. 31, n. 2, p. 456-461, Lavras., 2007.
- NEVES, S.C.M.; PELAES, E.G. ESTUDOS E IMPLEMENTAÇÕES DE TÉCNICAS DE SEGMENTAÇÃO DE IMAGENS. **Revista virtual de iniciação científica da Ufpa**. Para. v.1, n. 2, p. 1 -11, 2001.
- NOTHDURFT, R.; YAO, G. Imaging obscured subsurface inhomogeneity using laser speckle. **OPITCS EXPRESS**, v.13, n. 25, 2005.

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**, v. 36, n. 2, p. 165-179, 1989.

PAPOULIS, A. Probability, Random Variables, and Stochastic Processes. **McGraw-Hill Series in Electrical Engineering**. 3ed. 1984.

PIT, J.I.; HOCKIMG, A.D. Fungi and Food Spoilage 3ed. New York: **Springer Science**, 2009.

PRADO, J. et al. Mudanças no novo Código de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Código de Melbourne). **Acta Bot. bras.** 25(3): 729-731. 2011.

RABAL, H.J.; BRAGA, R.A. Dynamics speckle laser and application, **Boca Raton: CRC/ Taylor and Francis** 2008.

RABELO, G. F. **Avaliação da aplicação do "Speckle" dinâmico no monitoramento da qualidade da laranja**. 149p. Tese (doutorado Ciência dos Alimentos) –Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 2000.

RAMIREZ-MIQUET, E.E. et al. Digital imaging information technology for Biospeckle activity assessment relative to bacteria and parasites. **Laser Med Sci** 1375-1386. 2017.

RAMIRO, J. **Detecção molecular de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja**. 88p. Tese (doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 2015.

RIVERA, F.P.; BRAGA JÚNIOR, R.A - Selection of statistical indices in the Biospeckle laser analysis regarding filtering actions. **Optics Communications**, 394:144-151, 2017.

RODRIGUES, S. **Efeitos estocásticos em Speckle dinâmico**. [S.n.]. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) –Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, SP. 2007. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document>>. Acesso em 19/12/2017.

RODRIGUEZ, A. et al. Detection of filamentous fungi in foods. **Current Opinion in Food Science**, v.4, p 36-42, 2015.

SAITO, Edson Hiroshi. **Medições de tensões em componentes mecânicos utilizando técnica ESPI**. [s.n.]. Dissertação (mestrado engenharia mecânica). Faculdade de Engenharia Mecânica- Universidade Estadual de Campinas. São Paulo SP. 2010.

SILVA, D.M. **Identificação de espécie de Aspergillus Seção Nigri por taxonomia polifásica e descrição de duas novas espécie do gênero**. 76p. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2009.

SILVA, E.R. **Estudo das propriedades do Biospeckle e suas aplicações**. Dissertação (Mestrado em Física) – Departamento de Física Geral, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

SILVA, Emerson Rodrigo, MURAMATSU, Mikiya. O fenômeno do speckle como introdução à metrologia óptica no laboratório didático. **Revista Brasileira do Ensino da Física**, v.29, n.2, p. 283-286, 2007.

SIZO, Sergio Rodrigues. **Avaliação in vitro do colar de implante cone Morse de diferente diâmetro sobre cargas cêntrica e excêntrica: Estudo interferometria Eletrônica por padrões de Speckle**. 120p. Dissertação (mestrado prótese dentária) Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

PELUQUE, Erika. **Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênicos de fungos e ocorrências de micotoxinas em misturas de cereais comercializadas no Brasil**. 80p. Dissertação (mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharias dos Alimentos. Universidade de São Paulo.

TANIWAKI, et al. Fungos Deterioradores De Alimentos Ocorrência e Detecção. ITAL Instituto de Tecnologia de Alimentos – **Laboratório de Microbiologia** – Campinas 1996.

TORTORA, G.J. et al.; Microbiologia; 10 ed., Porto Alegre: **Artmed**, 2012.

VIVAS, P.G. et al.; Desenvolvimento de uma metodologia utilizando Biospeckle laser para acessar a atividade de um embrião em sementes de café. **XLIII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola-CONBEA**, Campo Grande Brasil, 2014.

Xu, Z.J. et al. Temporal and Spatial Proprieties of the Time-Varing Speckles of Botanical Specimens. **Optical Engineering**, v.34, n. 5, p. 1487-1502, may 1995.

APÊNDICES

Nestes apêndices apresenta-se ao leitor a apreciação dos dados obtidos submetidos à análise de variância ($P < 0,05$), comparando-se as médias pelo teste de Tukey (5%) e por contrastes ortogonais a 5% de probabilidade (primeiro experimento).

Os resultados das contagens totais de unidades formadoras de colônias serão submetidos à análise de variação e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey, através do uso do programa de pacotes estatísticos livres e gratuitos.

Para tanto foram monitorados os seguintes parâmetros: temperatura, umidade, pH. As placas de Petri foram mantidas a uma temperatura de 25 ± 2 °C com umidade relativa UR de 50%, com tempo adequado para o seu crescimento micelial medido através do diâmetro em dois sentidos com auxílio de uma régua milimétrica.

O pH do sistema deve ser compatível com crescimento microbiano e com a atividade e estabilidade.

APÊNDICE A – ANÁLISE DO EXPERIMENTO

A

Arquivo analisado:

C:\Users\deli\Desktop\analises de dados\experimentaex.dbf

Variável analisada: AVD

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

T 14 505.774531 36.126752 93.885 0.0000

TRAT 9 125.074999 13.897222 36.116 0.0000

REP 2 0.000003 0.000001 0.000 1.0000

erro 424 163.153467 0.384796

Total corrigido 449 794.003000

CV (%) = 15.80

Média geral: 3.9268260 Números de observações: 450

Regressão para a FV T

Média harmônica do número de repetições (r): 30

Erro padrão de cada média dessa FV: 0,113254273327681

b1 : X^2

b2 : X^3

Modelos reduzidos sequenciais

t para

Parâmetro Estimativa SE H0: Par=0 Pr>|t|

b0 3.010567 0.04058408 74.181 0.0000

b1 0.000999 0.00003069 32.559 0.0000

R² = 80.65%

Valores da variável

Independente Média observada Médias estimadas

2.000000 2.226200 3.014564

4.000000 3.011800 3.026556

6.000000 2.750920 3.046543

7.000000 2.768080 3.059535

8.000000 2.711870 3.074525

20.000000 3.889230 3.410302

21.000000 3.802440 3.451275

22.000000 3.799350 3.494246

23.000000 3.693530 3.539216

24.000000 4.284380 3.586185

45.000000 5.461750 5.034225

46.000000 5.324550 5.125164

47.000000 5.472540 5.218103

48.000000 5.239390 5.313040

50.000000 4.466360 5.508910

t para

Parâmetro Estimativa SE H0: Par=0 Pr>|t|

b0 2.508270 0.05503905 45.573 0.0000
b1 0.004631 0.00027056 17.117 0.0000
b2 -0.000073 0.00000539 -13.510 0.0000

 $R^2 = 94.54\%$

Valores da variável

independente Médias observadas Médias estimadas

2.000000 2.226200 2.526213
4.000000 3.011800 2.577713
6.000000 2.750920 2.659277
7.000000 2.768080 2.710242
8.000000 2.711870 2.767413
20.000000 3.889230 3.778651
21.000000 3.802440 3.876777
22.000000 3.799350 3.974997
23.000000 3.693530 4.072875
24.000000 4.284380 4.169974
45.000000 5.461750 5.255981
46.000000 5.324550 5.225493
47.000000 5.472540 5.184186
48.000000 5.239390 5.131622
50.000000 4.466360 4.990977

Somas de quadrados sequenciais –Tipo I (Type I)

Causas de Variação G.L. S.Q. Q.M. Fc Pr>F

b1 1 407.906588 407.906588 1060.060 0.000
b2 1 70.237837 70.237837 182.533 0.000
Desvio 12 27.630107 2.302509 5.984 0.000
Erro 424 163.153467 0.384796

 Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 0,416028739957732 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 45

Erro padrão: 0,0924717269475059

Tratamentos Médias Resultados do teste

6 3.256867 a1

5 3.483927 a1 a2

3 3.514867 a1 a2 a3

2 3.665580 a1 a2 a3

9 3.673920 a2 a3

8 3.872900 a2 a3

1 3.927953 a3

7 4.364473 a4

4 4.386453 a4

10 5.121320 a5

Teste Tukey para a FV REP

DMS: 0,16851451946243 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 150

Erro padrão: 0,0506488507806073

Tratamentos Médias Resultados do teste

3 3.926726 a1

1 3.926826 a1

2 3.926926 a1

Arquivo analisado:

C:\Users\deli\Desktop\analises de dados\experimentaex.dbf

Variável analisada: IM

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

T 14 347899.827282 24849.987663 12.280 0.0000

TRAT 9 110884.358340 12320.484260 6.088 0.0000

REP 2 0.000003 0.000002 0.000 1.0000

erro 424 858013.334616 2023.616355

Total corrigido 449 1316797.520241

CV (%) = 105.06

Média geral: 42.8195938 Número de observações: 450

Regressão para a FV T

Média harmônica do número de repetições (r): 30

Erro padrão de cada média dessa FV: 8,21303101829995

b1 : X^2

b2 : X^3

Modelos reduzidos sequenciais

t para

Parâmetro Estimativa SE H0: Par=0 Pr>|t|

b0 29.014910 2.94309678 9.859 0.0000

b1 0.015056 0.00222585 6.764 0.0000

$R^2 = 26.61\%$

Valores da variável

independente Médias observadas Médias estimadas

2.000000 10.459630 29.075136

4.000000 19.351993 29.255812

6.000000 14.777990 29.556940

7.000000 32.831887 29.752672

8.000000 14.440447 29.978518

20.000000 33.908270 35.037458

21.000000 31.860070 35.654769

22.000000 32.292410 36.302193

23.000000 32.831820 36.979730

24.000000 120.745270 37.687379

45.000000 66.868370 59.504059

46.000000 61.523950 60.874188

47.000000 65.511060 62.274431

48.000000 62.354510 63.704786

50.000000 42.536230 66.655834

t para

Parâmetro Estimativa SE H0: Par=0 Pr>|t|

b0 11.937834 3.99134949 2.991 0.0029

b1 0.138532 0.01962096 7.060 0.0000

b2 -0.002474 0.00039056 -6.334 0.0000

R² = 49.95%

Valores da variável

independente Médias observadas Médias estimadas

2.000000	10.459630	12.472173
4.000000	19.351993	13.996030
6.000000	14.777990	16.390663
7.000000	32.831887	17.877414
8.000000	14.440447	19.537331
20.000000	33.908270	47.560585
21.000000	31.860070	50.120983
22.000000	32.292410	52.646751
23.000000	32.831820	55.123046
24.000000	120.745270	57.535025
45.000000	66.868370	67.043325
46.000000	61.523950	64.285170
47.000000	65.511060	61.121319
48.000000	62.354510	57.536929
50.000000	42.536230	49.047161

Somas de quadrados sequenciais –Tipo I (Type I)

Causas de Variação G.L. S.Q. Q.M. Fc Pr>F

b1	1	92592.795208	92592.795208	45.756	0.000
b2	1	81185.302963	81185.302963	40.119	0.000
Desvio	12	174121.729110	14510.144093	7.170	0.000
Erro	424	858013.334616	2023.616355		

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 30,1697838446327 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 45

Erro padrão: 6,70591174549527

Tratamentos Médias Resultados do teste

6 28.911249 a1
 3 30.523460 a1
 2 32.167740 a1
 1 34.366291 a1
 9 35.006927 a1
 8 37.980060 a1
 7 43.677176 a1
 4 46.542682 a1
 5 55.179973 a1 a2
 10 83.840380 a2

Teste Tukey para a FV REP

DMS: 12,2204216645711 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 150

Erro padrão: 3,6729791316466

Tratamentos Médias Resultados do teste

1 42.819489 a1
 2 42.819588 a1
 3 42.819704 a1

Arquivo analisado:

C:\Users\deli\Desktop\analises de dados\experimentaex.dbf

Variável analisada: STD

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV GL SQ QM Fc Pr>Fc

T 14 5675.631111 405.402222 23.757 0.0000

TRAT 9 2230.417594 247.824177 14.523 0.0000

REP 2 0.000003 0.000001 0.000 1.0000

erro 424 7235.243402 17.064253

Total corrigido 449 15141.292110

CV (%) = 49.82

Média geral: 8.2912293 Número de observações: 450

Regressão para a FV T

Média harmônica do número de repetições (r): 30

Erro padrão de cada média dessa FV: 0,754193903158371

b1 : X^2

b2 : X^3

Modelos reduzidos sequenciais

t para

Parâmetro Estimativa SE H0: Par=0 Pr>|t|

b0 6.060922 0.27026145 22.426 0.0000

b1 0.002433 0.00020440 11.901 0.0000

R^2 = 42.58%

Valores da variável

independente Médias observadas Médias estimadas

2.000000 2.976000 6.070652

4.000000 4.503390 6.099843

6.000000 4.103240 6.148493

7.000000 3.793950 6.180116

8.000000 4.001540 6.216604

20.000000 9.886720 7.033935

21.000000 8.765910 7.133669

22.000000 8.568410 7.238267

23.000000 7.975760 7.347731

24.000000 14.738820 7.462060

45.000000 12.683370 10.986799

46.000000 11.147030 11.208159

47.000000 11.590830 11.434384

48.000000 11.024050 11.665475

50.000000 8.609420 12.142251

t para

Parâmetro Estimativa SE H0: Par=0 Pr>|t|

b0 3.097549 0.36652138 8.451 0.0000

b1 0.023859 0.00180177 13.242 0.0000

b2 -0.000429 0.00003586 -11.969 0.0000

$R^2 = 85.66\%$

Valores da variável

Independente Médias observadas Médias estimadas

2.000000	2.976000	3.189552
4.000000	4.503390	3.451823
6.000000	4.103240	3.863758
7.000000	3.793950	4.119411
8.000000	4.001540	4.404752
20.000000	9.886720	9.207064
21.000000	8.765910	9.643981
22.000000	8.568410	10.074528
23.000000	7.975760	10.496129
24.000000	14.738820	10.906209
45.000000	12.683370	12.295082
46.000000	11.147030	11.800064
47.000000	11.590830	11.234286
48.000000	11.024050	10.595171
50.000000	8.609420	9.086630

Somas de quadrados sequenciais –Tipo I (Type I)

Causas de Variação G.L. S.Q. Q.M. Fc Pr>F

b1	1	2416.871897	2416.871897	141.634	0.000
b2	1	2444.686358	2444.686358	143.264	0.000
Desvio	12	814.072856	67.839405	3.976	0.000
Erro	424	7235.243402	17.064253		

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 2,77045916233954 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 45

Erro padrão: 0,615796743285346

Tratamentos Médias Resultados do teste

6 6.677120 a1

3 6.796913 a1 a2

9 7.065987 a1 a2

1 7.169420 a1 a2

2 7.227360 a1 a2

5 7.588300 a1 a2

8 7.972160 a1 a2

7 8.435613 a1 a2

4 9.453893 a2

10 14.525527 a3

Teste Tukey para a FV REP

DMS: 1,12218832400705 NMS: 0,05

Média harmônica do número de repetições (r): 150

Erro padrão: 0,337285767135602

Tratamentos Médias Resultados do teste

3 8.291129 a1

1 8.291229 a1

2 8.291329 a1

APÊNDICE B – TABELAS E GRÁFICOS PARCIAIS

Neste apêndice mostra-se a relação entre os três índices AVD, IM, STD obtidos para *Biospeckle* do experimento realizado em 22, 23, 24 de maio de 2017 com cinco amostras de *Aspergillus niger*. Nos três dias da pesquisa, as curvas médias obtidas dos índices AVD e STD mostram-se muito próximas enquanto o IM está com um comportamento diferenciado dos demais, sempre com valor inicial superior. Supõe-se que esse comportamento seja devido à não normalização aplicada para este índice.

Experimento de maio

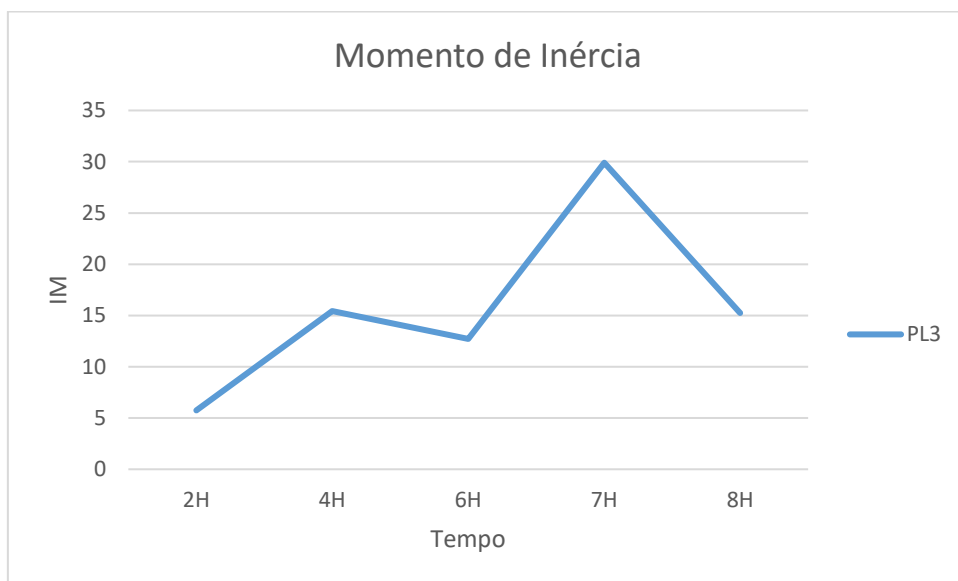
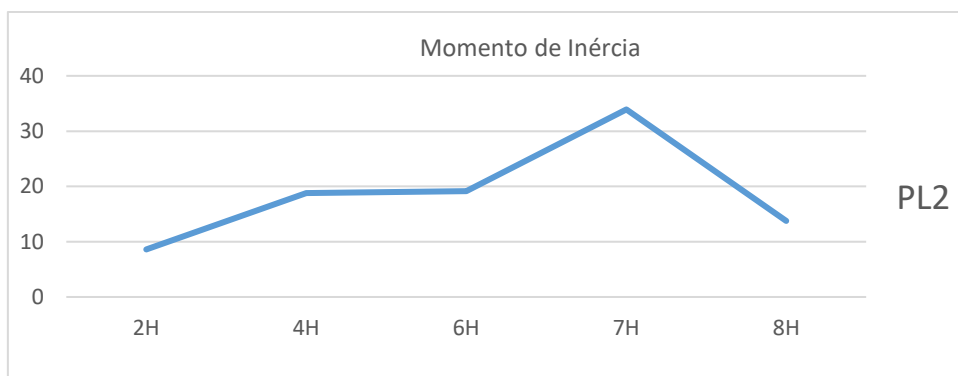
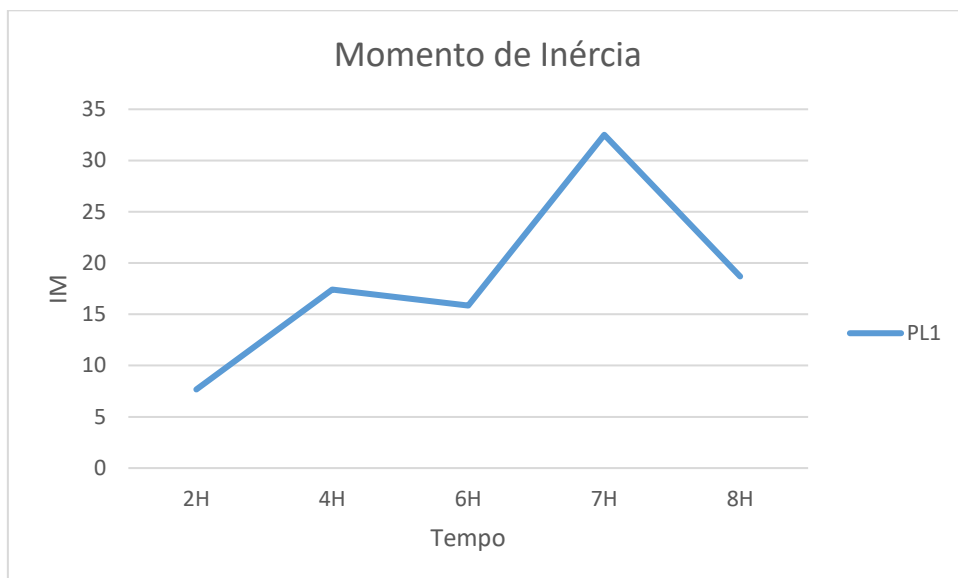
Tabelas do experimento

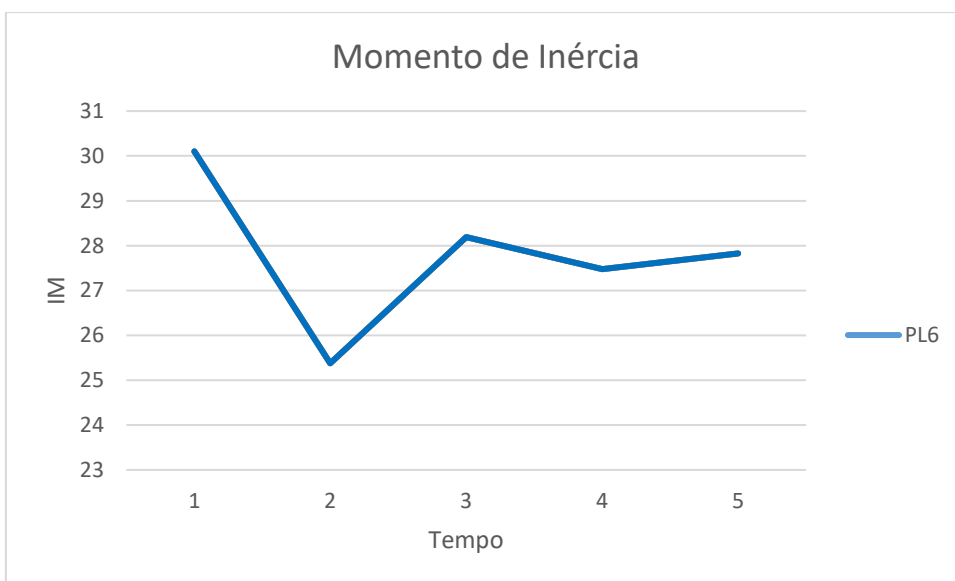
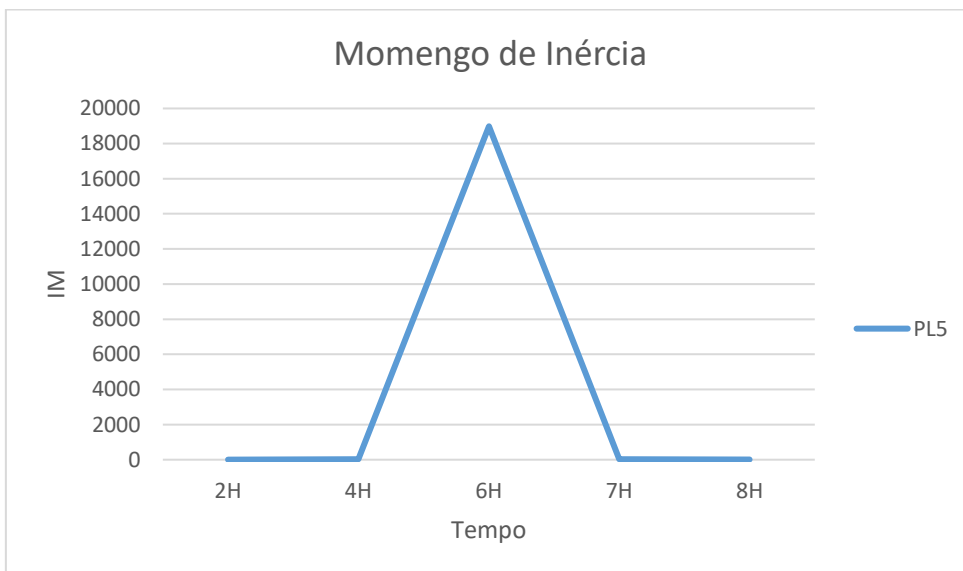
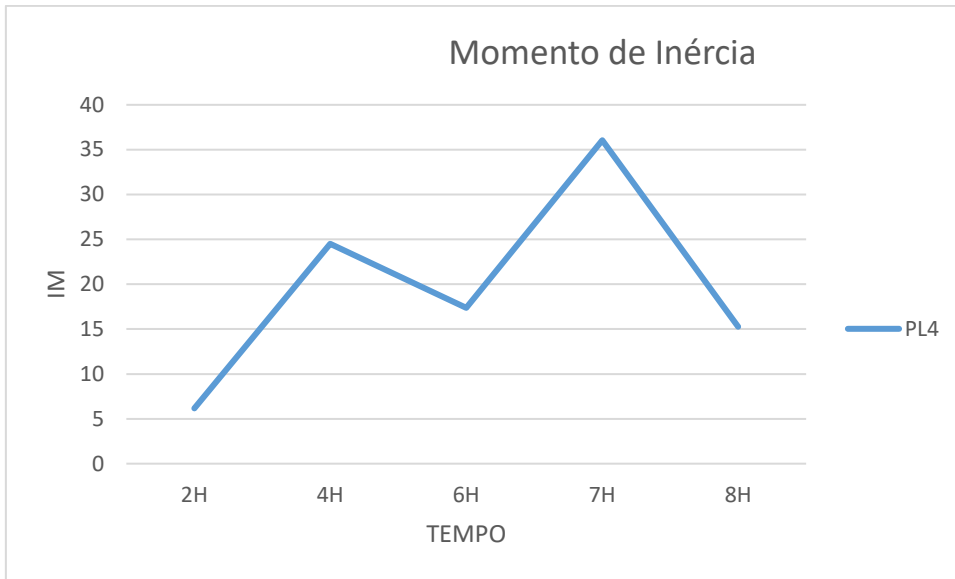
Tabela B1 – Experimento do 22 de maio de 2017

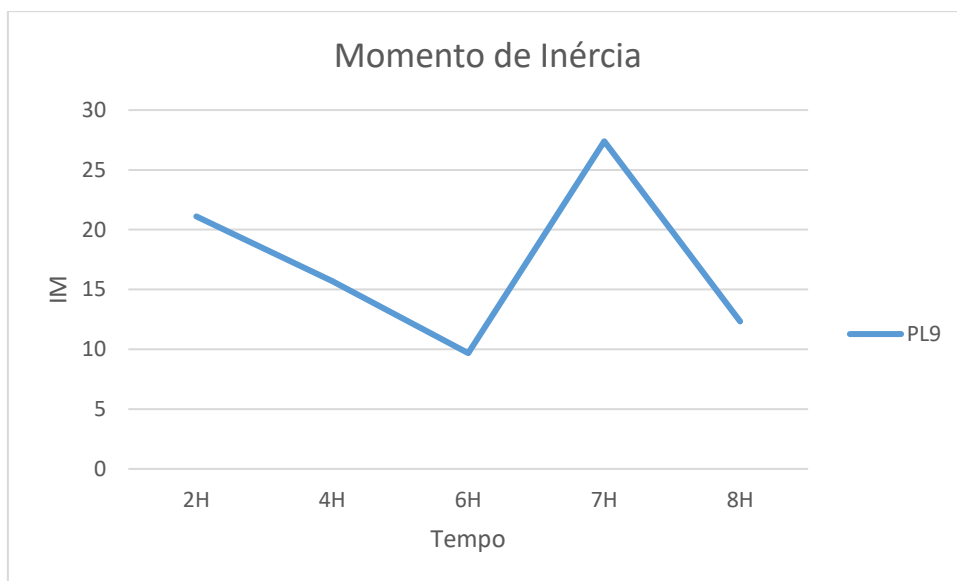
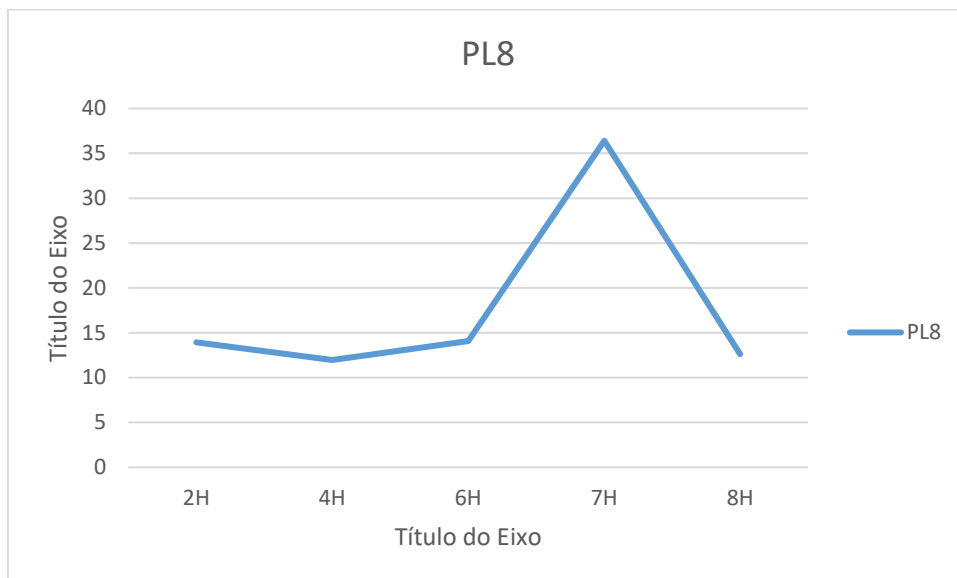
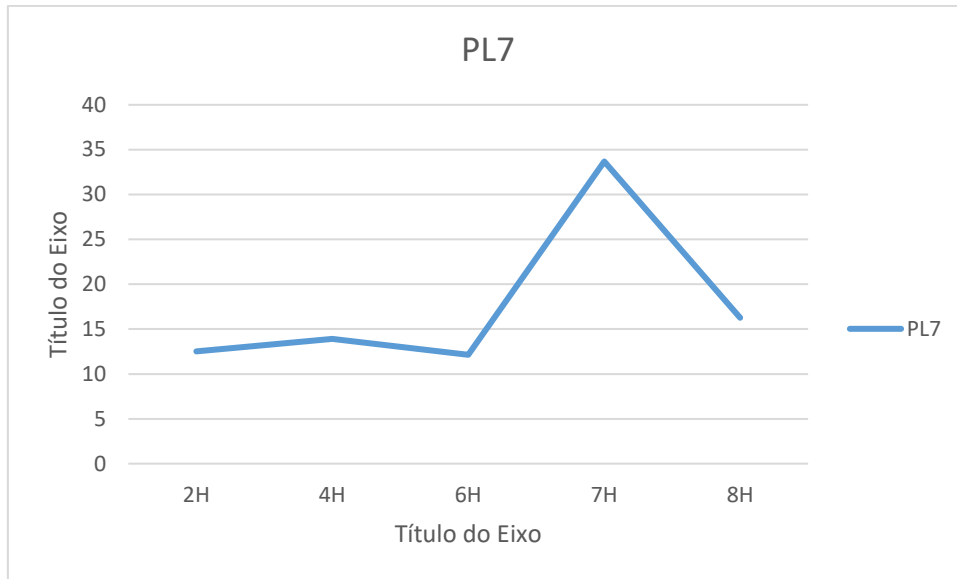
		14:40:00	14:45:00	14:45:00	14:54:00	14:46:00	14:46:00	14:46:00	14:46:00	14:47:00	14:47:00	14:47:00	Metodo	Horas	
	Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA	METODO	Horas	tempo
Obser 1	AVD	1.9610	2.0753	1.7122	1.7583	1.0359	1.7247	2.5911	2.6746	3.2795	3.4494	2.7052	AVD	14:40:00	2
	IM	7.6693	8.5979	5.7439	6.1631	2.0111	5.5068	12.5117	13.9140	21.1147	21.3624	14.5159	IM	14:47:00	
	STD	3.1117	3.2454	1.8910	2.7685	1.1692	2.1321	3.7846	3.7088	4.3034	3.6453	3.3785	STD	14:47:00	
	Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA			
Obser 2	AVD	2.96	3.1698	2.878	3.7489	3.7564	2.5429	2.7465	2.4514	2.8685	2.9976	2.9778	AVD	16:50:00	4
	IM	17.4180	18.7909	15.4269	24.5089	25.4708	13.8022	13.8951	11.9601	15.7002	16.5461	16.1232	IM	16:50:00	
	STD	3.1393	5.439	3.4192	6.0564	5.2176	3.6226	4.2205	3.7190	4.9265	5.2738	4.5735	STD	16:52:00	
	Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA			
Obser 3	AVD	2.8779	3.253	2.576	3.0616	3.1116	2.2435	2.5159	2.6296	2.2197	3.0204	2.94915	AVD	18:11:56	6
	IM	15.8525	19.1504	12.7068	17.3722	18.984	11.5595	12.1342	14.0714	9.6781	16.2694	14.9620	IM	18:11:56	
	STD	3.5452	4.4962	3.8529	5.3042	4.4443	3.5188	4.1557	3.6627	3.7437	4.3087	4.0043	STD	18:30:00	
	Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA			
Obser 4	AVD	3.1259	2.7869	2.4978	3.4663	2.7094	2.2683	2.7133	2.5757	2.5214	3.0158	2.71135	AVD	19:45:00	7
	IM	18.0246	14.6208	12.0971	22.3518	14.5708	11.3762	13.7054	13.2442	12.6705	16.6938	14.1381	IM	19:45:00	
	STD	3.4664	3.5909	2.7717	4.5231	3.6322	3.2333	3.8326	3.7323	3.9087	5.2483	3.6823	STD	20:03:00	
	Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA			
Obser 5	AVD	3.1366	2.7144	2.7966	2.7966	2.3853	2.2142	2.948	2.5381	2.5193	3.0696	2.7555	AVD	21:39:00	8
	IM	18.6860	13.7503	15.2547	15.2547	11.077	11.5959	16.2526	12.6104	12.3216	17.0006	14.5025	IM	21:39:00	
	STD	4.1571	4.5128	3.8841	3.8841	3.1825	3.0444	4.0490	3.9052	4.0656	5.3306	3.9771	STD	21:53:00	

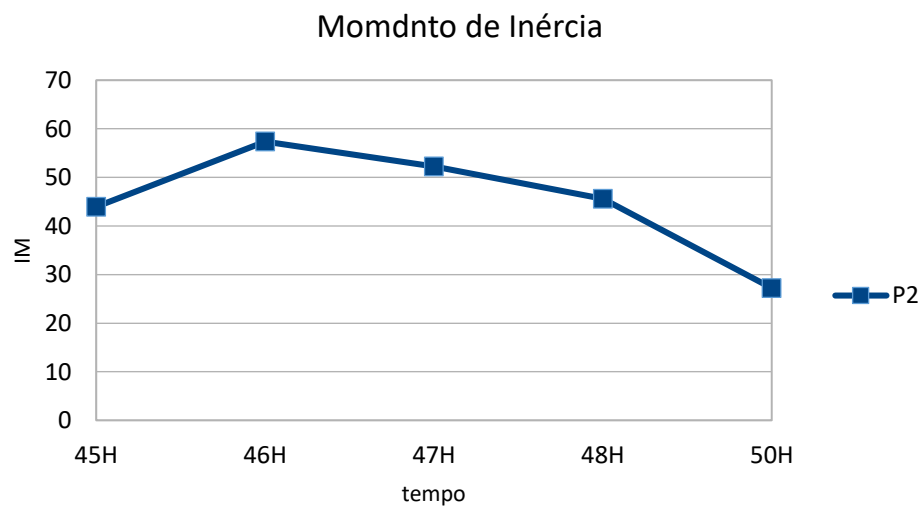
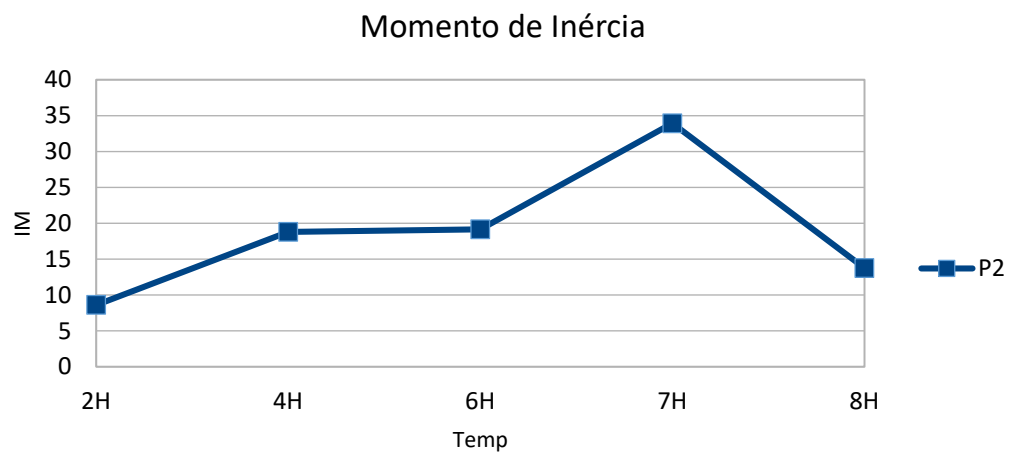
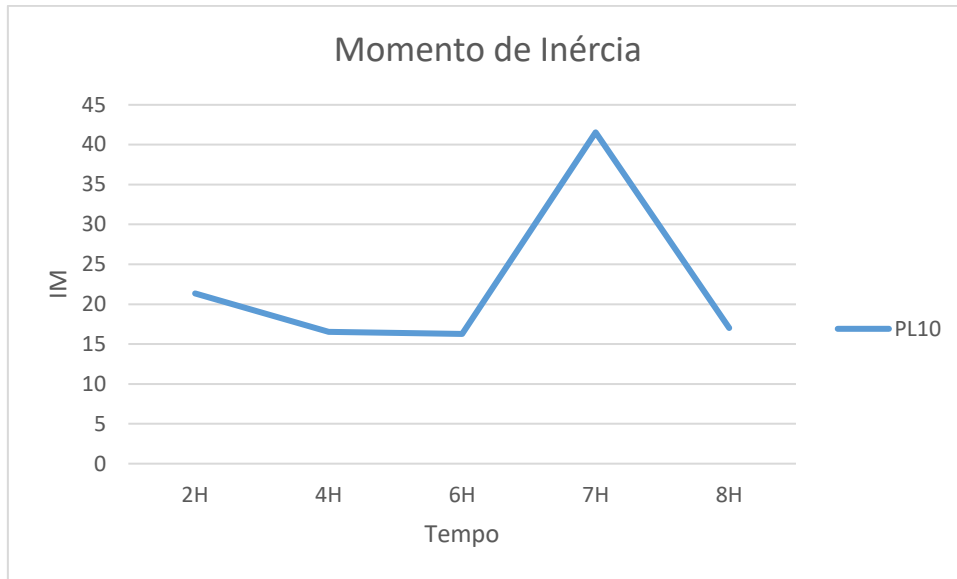
Tabela B2 – Experimento do dia 23 de maio de 2017

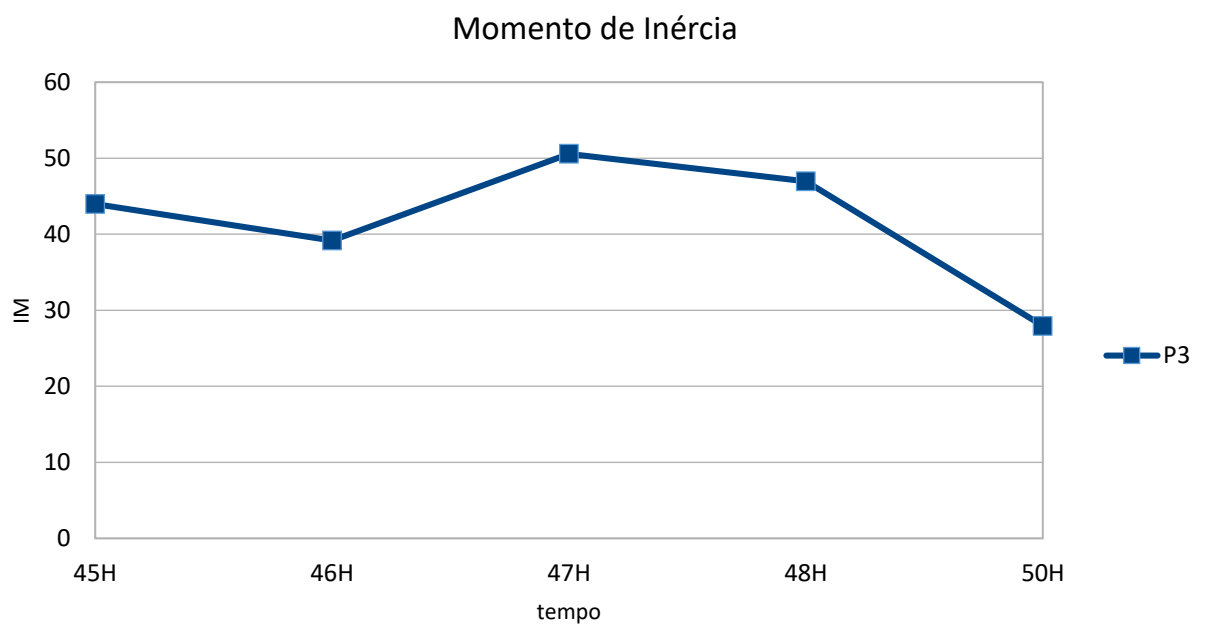
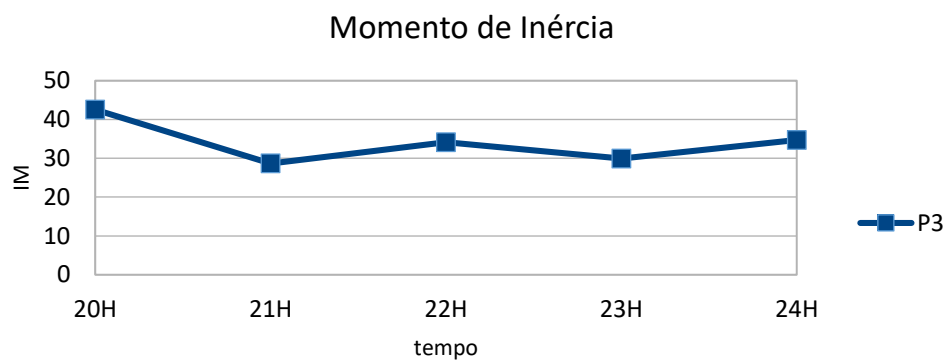
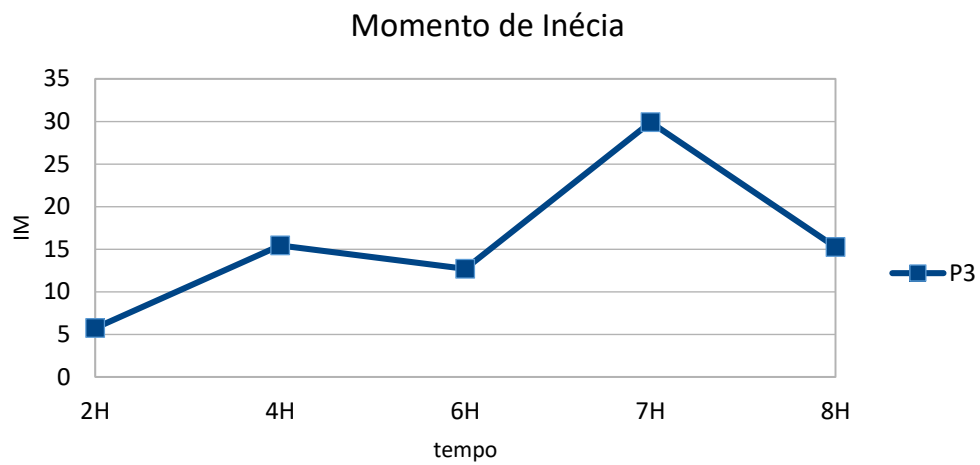
	Metodo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA			
Obser 1	AVD	4.0454	3.5986	4.3283	3.2110	4.1327	3.5960	3.8094	3.9204	3.5161	4.7344	4.3899	AVD	07:21:00	20
	IM	38.029	27.8182	42.5354	28.8227	41.3926	30.1019	26.7911	31.5007	24.1317	47.9594	42.9942	IM	07:37:00	
	STD	9.8917	10.7973	9.6876	8.5352	9.8636	9.0427	8.1831	12.2825	6.9881	13.5954	11.74355	STD	07:37:00	
Obser 2	AVD	3.9847	3.9847	3.5882	3.6529	3.3222	3.2443	4.0118	4.0135	3.4604	4.7617	4.3732	AVD	08:48:00	21
	IM	34.1512	34.1512	28.6573	34.6134	23.3771	25.3771	30.8303	32.6069	25.2720	49.5642	41.8577	IM	09:02:00	
	STD	8.1157	8.1157	8.3920	9.9000	8.0051	6.4262	7.2079	8.287	7.3369	15.8730	11.99435	STD	09:02:00	
Obser 3	AVD	3.6025	3.6758	3.8983	3.8141	3.4074	3.1864	4.2100	3.9187	3.7587	4.5216	4.06205	AVD	09:46:00	22
	IM	26.6354	29.4679	34.1818	34.8752	34.752	24.3633	35.4958	31.7319	33.0041	44.9765	35.80595	IM	10:02:00	
	STD	7.2321	7.9233	8.1310	9.9438	7.8161	7.9806	7.9001	7.9122	7.2954	13.5495	10.3908	STD	10:02:00	
Obser 4	AVD	3.8116	3.9292	3.7028	3.1125	3.4797	3.1984	4.0948	4.0016	3.4656	4.1391	3.97535	AVD	10:55:00	23
	IM	32.5117	33.9263	29.9011	36.0504	29.4294	27.4736	33.6825	36.4021	27.3933	41.5478	37.02975	IM	11:14:00	
	STD	8.5956	8.5977	7.6373	6.8127	7.7381	6.7139	6.9575	9.4453	6.2723	10.9872	9.7914	STD	11:14:00	
Obser 5	AVD	3.9116	3.8814	3.7296	3.6088	5.9445	3.1019	4.2630	3.8335	3.6496	6.9199	5.41575	AVD	12:20:00	24
	IM	33.0777	36.5593	34.7437	44.0811	433.7363	27.8234	36.4071	33.0990	33.0093	494.9158	263.99675	IM	12:20:00	
	STD	8.1777	7.8082	7.7115	9.8380	22.6776	6.2545	8.5933	7.1293	8.3065	60.8916	34.53465	STD	12:36:00	

Gráficos parciais do Momento de Inércia nas placas de Petri de nas primeiras 8 horas









ANEXO – CONSULTORIA EM ESTATÍSTICA

Universidade Federal de Lavras - Consultoria em Estatística

Departamento de Estatística
Professor Júlio S. de S. Bueno Filho

Pesquisador: José Francisco Ferreira de Oliveira
 (201786022@posgrad.ufla.br), Caio Césio Salgado
 (salgado.caio@gmail.com), Luís Roberto Batista,
 Roberto Alves Braga Junior (robbraga@gmail.com)

Atividade de imagem ao longo do tempo

Introdução

Três índices de atividade de imagem foram calculados para 10 amostras em 15 tempos cada.

as perguntas básicas de pesquisa são:

- O biopeste é eficiente para diferenciar a atividade fúngica?
- Qual dos índices seria melhor?
- Em qual tempo ocorre o pico de atividade?

Material e modelo de análise

DIC em branco, parcela subdividida no tempo.

Os tempos utilizados foram: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 e 44 horas. Variáveis resposta:

- AVD: average ...
- MI (momento de inércia)
- STD (desvio padrão)

Dados

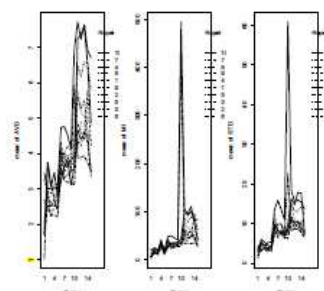
Leitura de dados, etc.

```
> dados <- read.table("dadosfu.csv",b=T)
> attach(dados)
> names(dados)
[1] "Tempo" "Repet" "AVD" "MI" "STD"
```

06 de julho de 2017

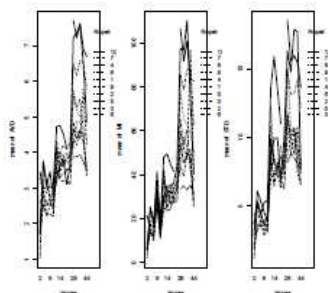
Análise básica

Estatística descritiva e escolha de transformações



logando fora as duas observações como outliers

Universidade Federal de Lavras - Consultoria em Estatística



Redefinindo os fatores

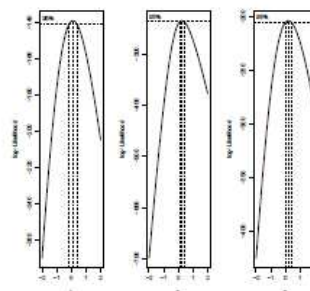
```
> Rep <- factor(Repet)
> contrasts(Horas) <- contr.poly(15,levels(Horas))
```

Testando a normalidade

```
> library(MASS)
> par(mfrow=c(1,3))
> b1 <- boxcox(AVD ~ Tempo + Repet)
> b2 <- boxcox(MI ~ Tempo + Repet)
> b3 <- boxcox(STD ~ Tempo + Repet)
> par(mfrow=c(1,1))
> (I1 <- b1$x[which(b1$y==max(b1$y))])
[1] 0.1010101
> (I2 <- b2$x[which(b2$y==max(b2$y))])
[1] 0.2626263
```

06 de julho de 2017

```
> (I3 <- b3$x[which(b3$y==max(b3$y))])
[1] 0.2222222
> AVDt <- (AVD[I1]-1)/I1
> MIIt <- (MI[I2]-1)/I2
> STDt <- (STD[I3]-1)/I3
```



```
> library(lme4)
> m1 <- lmer(AVDt ~ Horas + (1|Rep))
> m2 <- lmer(MIIt ~ Horas + (1|Rep))
> m3 <- lmer(STDt ~ Horas + (1|Rep))
> anova(m1); anova(m2); anova(m3)
```

Analysis of Variance Table
 Df Sum Sq Mean Sq F value
 Horas 14 15.068 1.0763 40.613

Analysis of Variance Table
 Df Sum Sq Mean Sq F value
 Horas 14 285.12 20.366 53.6

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
Rep	(Intercept)	0.06200	0.2490
Residual		0.07082	0.2661

Number of obs: 148, groups: Rep, 10

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	2.47011	0.09174	30.220
Horas.L	2.26010	0.09431	26.806
Horas.Q	-0.86661	0.09474	-10.227
Horas.C	-0.40101	0.09483	-4.727
Horas^4	-0.06346	0.09426	-0.753
Horas^5	-0.20868	0.09521	-2.426
Horas^6	-0.35633	0.09422	-4.231
Horas^7	0.65883	0.09499	7.752
Horas^8	-0.18060	0.09496	-2.128
Horas^9	-0.48130	0.09432	-5.708
Horas^10	0.20718	0.09557	2.421
Horas^11	0.14637	0.09440	1.734
Horas^12	-0.06756	0.09499	-0.795
Horas^13	0.50879	0.09659	5.876
Horas^14	-0.13578	0.09527	-1.592

```
> qt(.975,9)
```

```
[1] 2.262157
```

```
> f1 <- fitted(m1)
```

```
> f2 <- fitted(m2)
```

```
> f3 <- fitted(m3)
```

```
> par(mfrow=c(1,3))
```

```
> interaction.plot(Horas,Repot,f1)
```

```
> interaction.plot(Horas,Repot,f2)
```

```
> interaction.plot(Horas,Repot,f3)
```

```
> par(mfrow=c(1,1))
```

Parece que o efeito do dia é mais importante do que o das horas dentro do dia... Colocando efeito do dia no modelo provavelmente