

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

**UTILIZAÇÃO DO *BIOSPECKLE* LASER NA AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL GERMINATIVO DE SEMENTES DE IPÊ-ROXO  
(*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo)**

**JULIANA APARECIDA FRACAROLLI**

CAMPINAS  
FEVEREIRO DE 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

**UTILIZAÇÃO DO *BIOSPECKLE* LASER NA AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL GERMINATIVO DE SEMENTES DE IPÊ-ROXO  
(*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo)**

Dissertação submetida à banca  
examinadora para obtenção do título de  
Mestre em Engenharia Agrícola na Área de  
Concentração de Máquinas Agrícolas.

**JULIANA APARECIDA FRACAROLLI**  
**Orientador: Prof. Dr. Inácio Maria Dal Fabbro**  
**Coorientadora: Dra. Leila Martins**

CAMPINAS  
FEVEREIRO DE 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -  
UNICAMP

F841u Fracarolli, Juliana Aparecida  
Utilização do biospeckle laser na avaliação do  
potencial germinativo de sementes de ipê-roxo  
(*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) / Juliana  
Aparecida Fracarolli. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Inácio Maria Dal Fabbro, Leila  
Martins.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. Processamento de imagens. 2. Momento de  
inércia. 3. Germinação. 4. Umidade. 5. Sementes -  
Envelhecimento. I. Fabbro, Inácio Maria Dal. II.  
Martins, Leila. III. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Agrícola. IV. Título.

Título em Inglês: Application of the laser biospeckle in evaluating ipê-roxo  
(*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) seeds germination  
potential

Palavras-chave em Inglês: Image processing, Moment of inertia, Germination,  
Moisture content, Seeds - Aging

Área de concentração: Máquinas Agrícolas

Titulação: Mestre em Engenharia Agrícola

Banca examinadora: Mikiya Muramatsu, João Domingos Biagi

Data da defesa: 23/02/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Agrícola

Este exemplar corresponde à redação final da **Dissertação de Mestrado** defendida por **Juliana Aparecida Fracaroli**, aprovado pela Comissão Julgadora em 23 de fevereiro de 2011, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.



Dedico este trabalho a Abel Rosato, *in memoriam*.

*"A great discovery solves a great problem  
but there is a grain of discovery in the solution of any problem.  
Your problem may be modest;  
but if it challenges your curiosity and brings into play your inventive faculties,  
and if you solve it by your own means,  
you may experience the tension and enjoy the triumph of discovery."*

George Polya em seu livro: How to solve it: a new aspect of mathematical method.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, saúde e inteligência.

Agradeço ao professor Inácio pela honra da convivência. Agradeço por sua inteligência compartilhada, ideias geniais, amizade, confiança, incentivo, pelos momentos de descontração, pela liberdade, pelo carinho e dedicação em orientar esse trabalho.

Agradeço ao amigo Adilson Machado Enes pela companhia, pela atenção, por transmitir confiança e tranquilidade, pelos ensinamentos e pela imensa contribuição na realização deste trabalho.

Agradeço a Leila Martins pela confiança, amizade, incentivo, atenção e dedicação na coorientação deste trabalho.

Aos professores João Domingos Biagi, Mikiya Muramatsu e Silvestre Rodrigues por terem acompanhado este trabalho e por suas importantes sugestões.

Ao professor Jansle pelo espaço que disponibilizou para realização inicial das pesquisas e também às pessoas do laboratório de geoprocessamento, Agmon, Gleice.

Aos meus pais Maria Erci e Antonio. Minha mãe pela calma ensinada. Ao meu pai, com sua vida exemplar, pelos ensinamentos e incentivo ao trabalho! Esse casal constitui uma base sólida que permite a suas filhas altas empreitadas.

À Rosa Helena, pela amizade e carinho.

Aos professores Kil e Benedetti, com quem iniciei a jornada científica.

Ao amigo Rafael Augustus de Oliveira, que vem me acompanhado desde a Iniciação Científica, por dar a ideia da retirada do tegumento nas avaliações ópticas das sementes.

Ao professor Julio Soriano, pela amizade e pela convivência.

Aos amigos que me acompanharam desde a graduação, Cinthya, Mateus, Julia, Elaine, Beatriz e tantos outros com os quais aprendi muito. Estiveram ao meu lado e sempre me apoiaram.

À equipe da secretaria de pós-graduação, Alexandre, Marta, Sidnei, Fábio e Célia.

A Aluisio Brigido Borba Filho por sua tese de doutorado em que usou envelhecimento acelerado e com seu experimento guiei parte de meu trabalho em sementes de ipê-roxo.

À Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - CATI - ao Laboratório Central de Sementes Mudas e Matrizes, Núcleo de Produção de Pederneiras pelo fornecimento de sementes.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Máquinas Agrícolas da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, seus laboratórios, salas de aula, sua organização e infraestrutura.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE EQUAÇÕES .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiv
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	3
2.1 Geral .....	3
2.2 Específicos .....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1 Importância e Características do Ipê-roxo .....	4
3.1.1 Características Anatômicas, Morfológicas e Fisiológicas da Semente .....	6
3.1.2 Danos Térmicos em Sementes .....	10
3.2 Avaliação da Qualidade de Sementes .....	11
3.2.1 Envelhecimento Acelerado .....	12
3.2.2 Técnicas Tradicionais de Avaliação de Qualidade de Sementes e Alguns de seus Problemas .....	14
3.2.3 Técnicas Baseadas em Análise de Imagens .....	15
3.2.4 Aplicação do <i>Biospeckle</i> na Avaliação de Sementes .....	17
3.3 O <i>Biospeckle</i> .....	19
3.3.1 Breve Histórico sobre <i>Biospeckle</i> .....	20
3.3.2 Fundamentos Teóricos .....	20
3.3.3 Interação do Laser com Tecidos Biológicos .....	21
3.3.4 Origens Físicas do <i>Biospeckle</i> .....	22
3.3.5 Configurações Experimentais .....	23
3.3.6 Tamanho dos Grãos de <i>Speckle</i> .....	23
3.4 Formas de Avaliar ou Quantificar o <i>Biospeckle</i> .....	24
3.4.1 Momento de Inércia (MI) .....	24

3.4.2	Autocorrelação Temporal da Sequência de Variação dos Pontos de Interferência do <i>Biospeckle</i> .....	30
3.4.3	Método das Diferenças Generalizadas .....	30
3.4.4	Método de Fujii .....	30
3.4.5	Método de LASCA .....	30
3.4.6	Método LASTCA .....	31
3.4.7	Método Contraste de Correlações Sucessivas .....	31
3.4.8	Coeficiente de Hurst .....	33
3.4.9	Técnicas de Filtragem Utilizadas para o <i>Biospeckle</i> .....	34
3.4.10	Método de Quantificação Baseado na Entropia .....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1	Considerações Iniciais .....	36
4.2	Materiais .....	36
4.3	Experimentos .....	37
4.3.1	Experimento 1: Avaliação de Danos Térmicos em Sementes através do <i>Biospeckle</i> .....	37
4.3.2	Experimento 2: Avaliação da Interferência do Tegumento na Sensibilidade do <i>Biospeckle</i> .....	41
4.3.3	Experimento 3: Diferenciação entre Sementes Germinadas e não Germinadas através do <i>Biospeckle</i> .....	42
4.3.4	Experimento 4: Determinação da Faixa de Umidade das Sementes para a Melhor Interação entre o Laser e a Semente para o <i>Biospeckle</i> .....	43
4.3.5	Experimento 5: Avaliação de Sementes de Ipê-roxo Submetidas ao Envelhecimento Acelerado através do <i>Biospeckle</i> .....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
5.1	Experimento 1: Avaliação de Danos Térmicos em Sementes através do <i>Biospeckle</i> .....	49
5.2	Experimento 2: Avaliação da Interferência do Tegumento na Sensibilidade do <i>Biospeckle</i> .....	51
5.3	Experimento 3: Diferenciação entre Sementes Germinadas e não Germinadas através do <i>Biospeckle</i> .....	52
5.4	Experimento 4: Determinação da Faixa de Umidade das Sementes para a Melhor Interação entre o Laser e a Semente para o <i>Biospeckle</i> .....	55
5.5	Experimento 5: Avaliação de Sementes de Ipê-roxo Submetidas ao Envelhecimento Acelerado através do <i>Biospeckle</i> .....	58

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	66
7	CONCLUSÕES .....	68
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
	APÊNDICES .....	79

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Descrição</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1	Floração do ipê-roxo ( <i>Tabebuia heptaphylla</i> )	5
Figura 2	Sementes de ipê-roxo	6
Figura 3	a-e, Variabilidade morfológica das sementes de <i>Tabebuia chryso-tricha</i> . a, Semente normal. b-e, Sementes anormais. Fonte: BITTENCOURT JUNIOR e SEMIR, 2005	7
Figura 4	Porcentagem de germinação de sementes de <i>Tabebuia roseo-alba</i> submetidas ao envelhecimento acelerado a 40 e 45°C durante 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Letras maiúsculas comparam temperaturas em cada período de envelhecimento e letras minúsculas comparam períodos de envelhecimento em cada temperatura, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (BORBA FILHO, 2006)	13
Figura 5	Padrão <i>Speckle</i> . Fonte: RODRIGUES, 2007	19
Figura 6	Desenho esquemático de uma célula típica vegetal	22
Figura 7	Matriz STS de baixa e alta atividade. Fonte: RABELO, 2000	25
Figura 8	Matriz de ocorrências (MOM) de baixa e alta atividade. Fonte: NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2005	27
Figura 9	Matriz de intensidades referente ao tempo inicial de um material hipotético	32
Figura 10	Matriz de intensidades referente ao tempo final de um material hipotético de baixa atividade	32
Figura 11	Matriz de intensidades referente ao tempo final de um material hipotético de alta atividade	33
Figura 12	Diagrama representando as etapas do experimento 1	38
Figura 13	Esquema de fixação das sementes na placa para o teste do <i>biospeckle</i>	39
Figura 14	Configuração experimental adotada na captura de imagens para o teste do <i>biospeckle</i>	39
Figura 15	Diagrama representando as etapas do experimento 4	44
Figura 16	Diagrama representando as etapas do experimento 5	47
Figura 17	Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade	50
Figura 18	Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade	52

Figura 19	Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade	53
Figura 20	Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade	54
Figura 21	Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade das sementes, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. T 1: sementes sem tegumento; T 2: sementes com tegumento; T 3: sementes sem tegumento submetidas ao congelamento a 0°C; T 4: sementes com tegumento submetidas ao congelamento a 0°C	55
Figura 22	Médias dos valores de MI para cada valor de umidade de cada tratamento. T 1: sementes sem tegumento; T 2: sementes com tegumento; T 3: sementes sem tegumento submetidas ao congelamento a 0°C; T 4: sementes com tegumento submetidas ao congelamento a 0°C	57
Figura 23	Comportamento dos valores de Momento de Inércia (MI) de 30 sementes em função do período de envelhecimento de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Médias seguidas pela mesma letra e número não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade	60
Figura 24	Resultado do teste de germinação e dos valores de MI de sementes de <i>Tabebuia heptaphylla</i> submetidas ao envelhecimento acelerado a 42 °C durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas	61
Figura 25	Representação dos valores de MI e porcentagem de germinação das sementes de ipê-roxo nos momentos inicial (24 h) e final (120 h) do envelhecimento acelerado	62
Figura 26	Comportamento dos valores de MI e das umidades das sementes de <i>Tabebuia heptaphylla</i> submetidas ao envelhecimento acelerado a 42° C durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas	63

## LISTA DE TABELAS

	<b>Descrição</b>	<b>Pág.</b>
Tabela 1	Umidades das sementes para cada iluminação	40
Tabela 2	Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 1	41
Tabela 3	Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 2	42
Tabela 4	Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 3	43
Tabela 5	Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 4	45
Tabela 6	Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 5	48
Tabela 7	Coefficiente de Variação (CV) e Nível de Significância das Análises de Variância dos valores de Momento de Inércia (MI) apresentados na Figura 20	56
Tabela 8	Resultado da Correlação entre Umidade e Média dos Valores de Momento de Inércia (MI)	57
Tabela 9	Análise de Variância para o Fator Períodos de Envelhecimento Acelerado, 30 Repetições e Característica Avaliada, valores de MI	59
Tabela 10	Teste de Tukey* para as Médias das Umidades das Sementes Submetidas ao Envelhecimento Acelerado. Número de Observações: 15. Média harmônica do número de repetições (r): 3. DMS: 15,32. NMS: 0,05. Média geral: 45	60
Tabela 11	Análise de Variância do teste de Germinação para os Períodos Inicial (24 h) e Final (120 h) do Envelhecimento Acelerado	62
Tabela 12	Teste de Tukey para as Médias de Germinação (G) nos Períodos de Envelhecimento. DMS: 43,0265; NMS: 0,05; Média harmônica do número de repetições r: 3; Erro padrão: 7,071	63
Tabela 13	Valores Ordenados de MI de cada Semente, Resultado de Germinação, Ocorrência de não Germinar	65

## LISTA DE EQUAÇÕES

Nº	Descrição	Equação	Pág.
(3-1)	Carga de Energia	$\text{Carga de energia} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$	9
(3-2)	Função Densidade de Probabilidade	$p_u(x) = \text{Prob}[u = x] = \frac{\text{número de elementos com nível } x}{\text{número total de elementos}}$	25
(3-3)	Probabilidade Combinada de Segunda Ordem	$p_u(x_1, x_2) = p_{u_1, u_2}(x_1, x_2) = \text{Prob}[u_1 = x_1, u_2 = x_2]$	25
(3-5)	Matriz de Coocorrências	$\text{COM} = [N_{ij}]$	26
(3-6)	Momento de Inércia ou Módulo de Dispersão de Intensidades	$\text{MI} = \sum_{ij} M_{ij} (i - j)^2$	27
(3-7)	Matriz de Ocorrências	$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}}$	27
(3-8)	Coefficiente de Correlação Linear	$r = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n(\sum x^2) - (\sum x)^2} \cdot \sqrt{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}}$	32
(4-1)	Massa de Matéria Seca	$M_S = (1 - U_i)M_T$	40
(4-2)	Umidade Final	$U_f = \frac{M_T - M_S}{M_T}$	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>PORTUGUÊS</b>		<b>ENGLISH</b>	
<b>ADP</b>	Adenosina Difosfato	<b>Bits</b>	plural <b>Bit</b> - Binary digit
<b>AMP</b>	Adenosina Monofosfato	<b>BOD</b>	Biochemical Oxygen Demand
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato	<b>CCD</b>	Charge-Coupled Device
<b>CATI</b>	Coordenadoria de Assistência Técnica Integral	<b>COM</b>	Concurrence Matrix
<b>CV</b>	Coeficiente De Variação	<b>Gb</b>	Gigabit
<b>DAP</b>	Diâmetro na Altura do Peito	<b>LASCA</b>	Laser Speckle Contrast Analysis
<b>DG</b>	Diferenças Generalizadas	<b>Laser</b>	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
<b>DSMM</b>	Departamento de Sementes, Mudas e Matrizes	<b>LASTCA</b>	Laser Speckle Temporal Contrast Analysis
<b>FEAGRI</b>	Faculdade de Engenharia Agrícola	<b>Pixel</b>	Picture Element
<b>MCO</b>	Matriz de Coocorrências	<b>PC</b>	Personal Computer
<b>MDI</b>	Módulo de Dispersão de Intensidades	<b>PVC</b>	Polyvinyl Chloride
<b>MOM</b>	Matriz de Ocorrências Modificada	<b>RAM</b>	Random Access Memory
<b>MI</b>	Momento de Inércia	<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid
<b>RAS</b>	Regras para Análise de Sementes	<b>STS</b>	Spatial Temporal Speckle
<b>TF</b>	Transformada de Fourier	<b>THSP</b>	Time History Speckle Pattern
<b>TFJ</b>	Transformada de Fourier Janelada		
<b>TW</b>	Transformada de Wavelets		

## RESUMO

O ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) é uma espécie de alto valor econômico, ornamental e medicinal, pertencente à família Bignoniaceae, cuja multiplicação ocorre prioritariamente por sementes. Há considerável necessidade de estudos sobre o desempenho fisiológico das unidades de dispersão dessa e de outras espécies florestais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a potencialidade do *biospeckle*, técnica baseada no fenômeno óptico de interferência, como ferramenta de caracterização do potencial germinativo das sementes de ipê-roxo. A quantificação do *biospeckle* foi expressa através do cálculo do Momento de Inércia (**MI**). Foram utilizados laser vermelho (632 nm de comprimento de onda) e 10 mW de potência, câmera filmadora digital e computador. Foram realizados cinco experimentos, a saber: (1) Avaliação de danos térmicos em sementes através do *biospeckle*; (2) Avaliação da interferência do tegumento na sensibilidade do *biospeckle*; (3) Diferenciação entre sementes germinadas e não germinadas através do *biospeckle*; (4) Determinação da faixa de umidade das sementes para a melhor interação entre o laser e a semente para o *biospeckle*; (5) Avaliação de sementes de ipê-roxo submetidas ao envelhecimento acelerado através do *biospeckle*. Para os experimentos 1, 2, 3 e 4 as sementes foram hidratadas até atingirem grau de umidade de 69%, divididas em quatro sub-amostras sendo que duas delas foram submetidas ao congelamento. Em seguida as sub-amostras foram separadas em 5 níveis de umidade (28, 35, 54, 63, 69%) e iluminadas com laser. Nesses ensaios foram planejados quatro tratamentos: (1) sementes sem tegumento; (2) sementes com tegumento; (3) sementes sem tegumento submetidas a congelamento a 0°C e (4) sementes com tegumento submetidas ao congelamento a 0°C. Os resultados permitem afirmar que é possível diferenciar as sementes que sofreram dano térmico daquelas que não sofreram através do *biospeckle*. A presença do tegumento interfere na sensibilidade do *biospeckle*. É possível diferenciar as sementes viáveis das inviáveis através do *biospeckle*. Do experimento 4 obteve-se uma correlação positiva entre os valores de **MI** e de umidade das sementes. Verificou-se também que a faixa de teor de água para a melhor interação entre o laser e a semente de ipê-roxo está entre 28 e 54%. Esta faixa de umidade das sementes foi utilizada como referência para o experimento 5. No experimento 5 as sementes foram submetidas ao envelhecimento acelerado (42°C e umidade relativa do ar de 100 % durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas) e avaliadas através da técnica do *biospeckle* e teste de germinação. Obteve-se que é possível detectar a redução de viabilidade e vigor das

sementes de *T. heptaphylla* ocasionada pelo envelhecimento acelerado. Dessa forma, o *biospeckle* é uma técnica que vem sendo desenvolvida e apresenta-se como uma ferramenta possível para avaliar o potencial germinativo das sementes de ipê-roxo.

**Palavras-chave:** processamento de imagens; momento de inércia; germinação; umidade; sementes - envelhecimento.

## ABSTRACT

Ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) is considered of very important economical, ornamental, as well as medicinal value which is included in the Bignoniaceae botanical family which multiplication is quite solely carried by seeds. Forest dispersion elements, i.e., the seeds, deserve a deep understanding of their physiological performance. The objective of this research work was to evaluate a biospeckle method potential in testing seed viability, which is based on the laser interferometry. The biospeckle phenomenon quantification was carried by means of the Moment of Inertia (**MI**) which formula resembles its mechanical counterpart. The equipment employed in the experimental setup included a 632 nm red diode laser of 10mW, a digital movie camera as well as a PC. The five tests carried were (1) thermal damage evaluation on seeds, (2) biospeckle sensitivity to the tegument interference, (3) differentiation between non germinated and germinated seeds evaluation by the biospeckle, (4) determination of the best seed moisture content to laser interaction and (5) evaluation of accelerated aging ipê-roxo seeds through the biospeckle. In tests 1, 2, 3 and 4 seeds were hydrated to the value of 69% and divided into four sub samples from which two of them were forwarded to freezing. Following the four sub samples were separated into five moisture level groups (28, 35, 54, 63, 69%) and exposed to the laser. Four treatments have been imposed to the experimental tests, named (1) seeds without teguments, (2) seeds with tegument, (3) frozen at 0° C seeds without teguments and (4) frozen at 0° C seeds with teguments. Results from biospeckle tests confirm the possibility of differentiating seeds with thermal damage from those without thermal damage. When the tegument is covering the seed, the sensitivity of biospeckle is affected. It's possible to differentiate viable seeds from non viable seeds using biospeckle technique. From test (4) it is obtained a positive correlation between **MI** and seeds moisture content. It was also verified that seed moisture content between 28% and 54% showed better interaction with laser. That moisture content range was adopted for the test (5). Seeds were submitted to accelerated aging process in the test (5) (42°C and 100% of relative humidity for 24, 48, 72, 96 and 120 hours) following by biospeckle evaluation and germination tests. It was concluded that viability reduction of *T. heptaphylla* as generated by accelerated aging can be detected by the biospeckle test. Thus, the biospeckle is a technique that has been developed and is presented as a possible tool to assess the germination potential of ipê-roxo seeds.

**Keywords:** image processing; moment of inertia; germination; moisture content; seeds - aging.

## 1 INTRODUÇÃO

Alguns novos métodos de análise de sementes estão sendo propostos e pesquisados. Tais métodos utilizam técnicas de medição de ressonância magnética nuclear, raios X e análise de resposta a estímulos luminosos para avaliar a viabilidade de sementes. Entre estes, destacam-se os métodos ópticos de análise de materiais biológicos que se baseiam na técnica da visão artificial (*machine vision*) e técnicas de processamento de imagens. Outra linha que também tem merecido destaque, entre os métodos ópticos, está relacionada ao estudo do fenômeno *biospeckle*, o qual se caracteriza por ser um fenômeno óptico de interferência que carrega informações do material que está sendo exposto a uma fonte de luz coerente. Através de estudos realizados com outros materiais biológicos e sementes, existem hoje metodologias bem definidas para quantificação e medição do fenômeno a nível laboratorial. As principais características dos testes propostos com base neste fenômeno estão associadas ao fato de envolverem metodologias de análise não destrutivas, passíveis de automação e sem subjetividade do analista.

O ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) é uma espécie nativa da América do Sul. Entre suas principais características, destaca-se a qualidade de sua madeira, o seu uso ornamental e a utilização de extratos retirados de suas folhas. Por se tratar de espécie nativa e ameaçada de extinção, torna-se necessário empreender estudos que possibilitem a preservação da espécie, facilitando a sua propagação e utilização em áreas de recuperação e reflorestamento. Sendo assim, e considerando que a principal forma de disseminação do ipê-roxo ocorre através de sementes e que as metodologias de análise de sementes florestais ainda não estão consolidadas e normatizadas, o estudo de metodologias eficientes de análise de qualidade assume papel importantíssimo para o sucesso dos programas de manejo envolvendo a espécie.

As sementes de ipê-roxo são, de forma geral, desuniformes e de tamanhos variados. Possuem uma estrutura externa alada, que facilita o seu carregamento pelas correntes aéreas, propiciando assim uma maior dispersão das sementes em condições naturais. Por se tratar de uma espécie nativa florestal, cujo principal meio de propagação ao longo dos tempos sempre se deu de forma natural, essa semente se diferencia grandemente da maioria das sementes agrícolas conhecidas, uma vez que essas últimas, por sofrerem diversos estágios de seleção artificial ou até mesmo melhorias genéticas, apresentam de forma geral, altos índices de

germinação e vigor. Essa heterogeneidade característica da semente de ipê-roxo vem a ser um agravante no seu manejo em laboratório, bem como na definição de metodologias de avaliação de qualidade fisiológica.

O estudo de qualidade de sementes florestais tem se intensificado nas últimas décadas, sobretudo pela importância ecológica de preservação de espécies nativas e programas de reflorestamentos; no entanto, pouco se tem em termos de normatização e padronização dos testes de qualidade dessas sementes. Assim, pesquisadores da área utilizam testes e elaboram experimentos a partir de fundamentação teórica e de testes e metodologias já conhecidas e já empregadas em sementes de espécies agrícolas.

Neste cenário, os testes mais encontrados na literatura para avaliação da qualidade de sementes de ipê são aqueles baseados na emergência direta da plântula, comumente chamados de testes de germinação. Além dos testes de germinação, diversos outros testes são encontrados e estudados na literatura pertinente, no entanto, todos apresentam pequenas variações metodológicas segundo diferentes autores. Entre estes, pode-se citar o teste de tetrazólio, testes que empregam escâneres para visualizar e processar imagens de emergência de plântulas, entre outros.

Diante do exposto e considerando a potencialidade do fenômeno conhecido como *biospeckle* na avaliação de atividade em materiais biológicos, neste trabalho se propõe estudar a aplicação deste fenômeno como ferramenta de avaliação de qualidade de sementes de ipê-roxo, permitindo uma análise objetiva, rápida e passível de automação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a aplicação da técnica óptica de *biospeckle* como ferramenta de caracterização do potencial germinativo das sementes de ipê-roxo.

### **2.2 Específicos**

- Identificar, através dos valores de Momento de Inércia (**MI**), danos térmicos em sementes de ipê-roxo gerados por baixa temperatura.
- Verificar se o tegumento interfere na sensibilidade do *biospeckle*.
- Obter a diferenciação entre sementes de ipê-roxo viáveis e inviáveis através do *biospeckle*.
- Caracterizar a faixa de umidade das sementes adequada para a melhor interação entre o laser e a semente de ipê-roxo.
- Verificar a capacidade do *biospeckle* em detectar a redução de viabilidade e vigor das sementes de ipê-roxo ocasionada pelo envelhecimento acelerado.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Importância e Características do Ipê-roxo

*Tabebuia heptaphylla* Vellozo Toledo, conhecido como cabroé, graraíba, ipê-roxo, ipê nos estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina, pau-d'arco-roxo na Bahia e em Minas Gerais, entre outros, é uma Bignoniaceae de porte arbóreo, que comumente apresenta 10 a 20 m de altura podendo alcançar até 35 m. O diâmetro do caule, tomado como base o diâmetro na altura do peito (**DAP**), a 1,30 m de altura na árvore é frequentemente de 30 a 60 cm podendo atingir até 150 cm (CARVALHO, 1994).

A área de ocorrência natural varia da latitude 13°S (Brasil, BA) até 32°S (Uruguai) compreendendo o nordeste da Argentina, sul da Bolívia, leste do Paraguai, Uruguai e os estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e sul e oeste da Bahia no Brasil (CARVALHO, 1994).

O período de floração ocorre de janeiro a julho em Santa Catarina, em fevereiro na Bahia, de abril a setembro no Paraná, de junho a setembro no Rio de Janeiro e em São Paulo, em julho no Mato Grosso do Sul, em agosto no Espírito Santo e Mato Grosso e em setembro no Rio Grande do Sul. Constitui um belo espetáculo da natureza como pode ser observado na Figura 1. A frutificação ocorre durante os meses de julho a dezembro variando conforme a região (CARVALHO, 1994).

A importância do estudo desta espécie provém de seu elevado valor econômico, considerando-se aplicações de uso de sua madeira e extrativos foliares. As aplicações se estendem desde a construção civil, produção de carvão, arborização urbana, paisagismo até uso medicinal. O estudo se faz importante também pela diminuição que vêm sendo observada do número de indivíduos encontrados nas áreas de ocorrência natural, estando na lista de conservação de plantas medicinais (GALLIA; FRANZ, 2005).



**Figura 1** – Floração do ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla*)

Sua madeira é de alta densidade (0,90 a 1,05 g/cm<sup>3</sup> a 15% de umidade (CARVALHO, 1994)), apresenta boas propriedades mecânicas e boa durabilidade mesmo sob condições adversas de conservação. Dessa forma é aplicada para construção pesada, construção naval, dormentes, carpintaria, marcenaria, pontes e obras externas.

A medicina popular revela o emprego das folhas e da entrecasca, esta empregada na forma de chá no tratamento de gripes e como depurativo do sangue; já as folhas são utilizadas contra úlceras sifilíticas e blenorragias. A espécie também tem propriedades anticancerígenas, antirreumática e antianêmica. (BERG, 1984 *apud* CARVALHO, 1994)

No cerne do ipê-roxo encontra-se uma substância – lapachol – a qual apresenta propriedades farmacológicas importantes, além de efeito inibidor sobre o crescimento de tumores malignos (RIZZINI e MORS, 1976).

Essa espécie é muito utilizada na arborização de áreas urbanas na região sul do país. É também ótima para reflorestamentos mistos e para recomposição de áreas degradadas de preservação permanente.

A forma de propagação da espécie se dá através da dispersão natural de suas sementes por correntes de ar (dispersão anemocórica). Embora seja possível facilitar a

propagação através do manejo, seleção e dispersão manual das sementes. O baixo índice de germinação natural apresentado por esta espécie e a falta de padronização nos ensaios de análise de qualidade dificultam os procedimentos adotados no sentido de garantir a preservação da espécie e repovoar áreas destinadas ao reflorestamento. O estudo das características da semente e de metodologias eficientes de análise de qualidade passa a ser de fundamental importância para a preservação da espécie, bem como, assegurar o seu uso de forma eficiente em programas de reflorestamento, recomposição de áreas degradadas e reconstituição da flora nativa.

### 3.1.1 Características Anatômicas, Morfológicas e Fisiológicas da Semente

As sementes dessa espécie são aladas (Figura 2), atingindo até 20 mm de comprimento e 7 mm de largura, com corpo castanho e duas asas esbranquiçadas, membranáceas, mais ou menos brilhantes (CARVALHO, 1994).

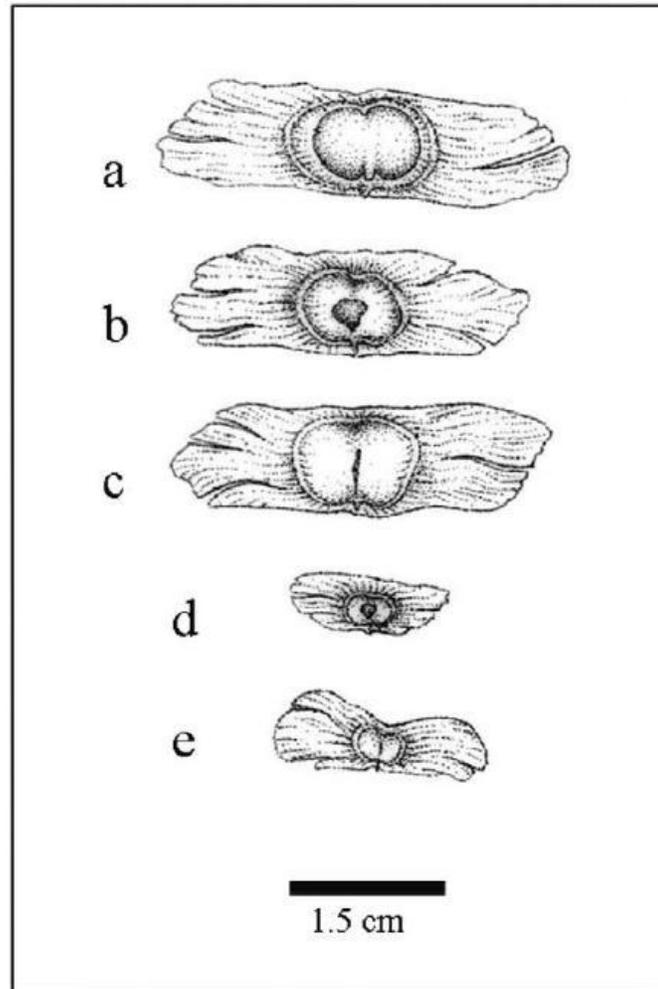


**Figura 2** – Sementes de ipê-roxo

Oliveira, Schleder e Favero (2006) trabalhando com caracterização morfológica de sementes de *T. aurea* observaram que as sementes apresentavam expansões aladas bilaterais e assimétricas. Mediram, com alas, 57,8 x 20,6 x 3,1 mm em média e sem alas, 17,3 x 13,3 x 1,7 mm. Obtiveram um peso médio de 13,18 g com alas e 11,55 g sem alas, em 50 sementes. Schleder, Oliveira e Favero (2003) estudando sementes de *T. impetiginosa* verificaram que o peso médio de 50 sementes foi de 1,25 g e 0,88 g em sementes com alas e sem alas, respectivamente.

Segundo Gurgel Filho e Pasztor (1962) e Lopez (1987) *apud* Carvalho (1994) o ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla*) apresenta de 13.500 a 35.000 sementes por quilograma.

As sementes de ipê apresentam grande variabilidade morfológica. Na Figura 3 é possível visualizar a variabilidade morfológica das sementes de *Tabebuia chrysotricha*.



**Figura 3** - a-e, Variabilidade morfológica das sementes de *Tabebuia chrysotricha*. a, Semente normal. b-e, Sementes anormais. Fonte: BITTENCOURT JUNIOR e SEMIR, 2005

Neste trabalho optou-se por expor os endospermas e a semente de ipê completa ao laser. A fim de se caracterizar os diferentes resultados obtidos com o *biospeckle*, é importante o conhecimento fisiológico dessas estruturas. Baseado nisso, os parágrafos subsequentes incluem a composição, morfologia e reações fisiológicas que ocorrem nesses tecidos.

Consta do Glossário Ilustrado de Morfologia (BRASIL, 2009b) que o tegumento “é a estrutura externa que envolve a semente e protege o embrião e o endosperma, é constituído por

camadas celulares originárias dos integumentos do óvulo.” É formado por estruturas membranáceas, sendo as células são ricas em lignina. O tegumento apresenta as funções de (1) regular as trocas gasosas e de líquidos para o interior da semente por ser semipermeável em algumas espécies, (2) manter unidas as partes internas da semente e (3) servir como barreira para a entrada de micro-organismos patogênicos.

Nenhuma atividade bioquímica relacionada ao vigor da semente ocorre no tegumento, por isso é esperado que os resultados com o *biospeckle* apresentem valores de Momento de Inércia (**MI**) menores. A técnica óptica do *biospeckle*, bem como o cálculo do Momento de Inércia serão detalhados nas próximas páginas.

Neste trabalho, no momento da exposição das sementes ao laser, as sementes foram previamente embebidas em água. Vale ressaltar que as sementes, de uma forma geral, obedecem a uma cinética de absorção de água composta por três fases. A primeira é identificada como embebição, consequência do potencial matricial do conteúdo das células e das paredes celulares. Ocorre em sementes dormentes, não dormentes, viáveis e inviáveis. A segunda fase também ocorre com todas as sementes, porém a terceira fase, como está associada à protrusão da raiz, só ocorre com as sementes viáveis. A duração de cada uma dessas fases varia com a permeabilidade de cada semente, tamanho, quantidade de oxigênio absorvido, conteúdo da semente e com as condições de exposição à água (nível de umidade, temperatura, composição do substrato, etc.). Diferentes partes de uma semente, em especial as de maior tamanho, passam por essas fases a diferentes taxas, como por exemplo, um embrião pode iniciar a fase **três** enquanto um tecido de armazenamento pode estar completando a fase **um** ou **dois** (BEWLEY; BLACK, 1983).

O teor de água das diferentes partes de uma semente também é diferente. O aumento de umidade das sementes causa aumento do volume das células, o que facilita a penetração do laser no tecido biológico.

Quando as sementes absorvem água e ficam embebidas, muitas reações bioquímicas são ativadas; as mitocôndrias iniciam suas atividades, ocorre aumento da taxa respiratória e ativação de organelas já existentes na semente seca. Algumas substâncias químicas são armazenadas nas sementes secas como aminoácidos e nas sementes embebidas, são transformadas. A síntese de proteínas é fundamental para a emergência da raiz, e não ocorre nas sementes com baixo teor de água. A síntese de proteínas só é iniciada quando as células

estão suficientemente hidratadas para permitir que os ribossomos citoplasmáticos se associem ao **RNA** mensageiro. Este é um processo que requer **ATP** (Adenosina trifosfato), mas é inibido com altos níveis de **ADP** (Adenosina difosfato) e **AMP** (Adenosina monofosfato, que armazena menos energia). Esses dois últimos nucleotídeos de adenina diminuem em concentração em embriões de trigo depois da primeira hora de embebição, quando a síntese de proteínas aumenta consideravelmente.

A síntese de proteínas é detectada minutos após a embebição em algumas espécies, e após horas em sementes de outras espécies.

Para expressar o metabolismo de células bacterianas, foi desenvolvido o conceito de *energy charge*. Alguns pesquisadores aplicam esse conceito para células vegetais. Seu valor é dado pela concentração de **ATP**, **ADP** e **AMP** conforme a equação (3-1):

$$\text{Carga de energia} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]} \quad (3-1)$$

Quando a concentração de **ATP**, **ADP** e **AMP** em uma célula é tal que o valor de carga de energia é maior que 0,5, então os sistemas que utilizam **ATP** estão aumentando suas atividades, e acima de 0,8 as células estão ativando seu metabolismo e se multiplicando. Cargas de energia menores que 0,5 indicam que as células são quiescentes ou senescentes. A carga de energia de embriões de trigo em germinação aumenta no início da embebição e é ajustada de 0,6 para 0,8 entre a primeira e a sexta hora depois que a embebição se inicia.

Bewley e Black (1983) destacam uma relação entre os níveis de **ATP** em uma semente embebida e o seu vigor. Por exemplo, é conhecido que o conteúdo de **ATP** de uma semente após 4 horas de embebição e os lipídeos, amido e proteínas contidos na semente podem estar positivamente correlacionados com o tamanho da semente; com o tamanho, a massa e o comprimento da plântula e também com a viabilidade de diferentes lotes de sementes. Esta é uma importante observação, pois sugere que o vigor de uma plântula pode ser previsto sem a necessidade de um longo período de germinação e crescimento.

O endosperma é um tecido nutritivo das sementes e dá origem aos cotilédones nas plantas de germinação epígea (faneroepígeas), como no caso do ipê. Neste tipo de sementes, fanerocotiledonares, os cotilédones são os primeiros órgãos fotossintetizadores da plântula sendo denominados paracotilédones (BRASIL, 2009b).

### 3.1.2 Danos Térmicos em Sementes

As sementes são sensíveis às temperaturas altas (superiores a 40 °C) e baixas (inferiores a 0°C), sobretudo quando apresentam teores de água acima de 12%.

No processo de secagem, muitas vezes acabam sendo expostas a temperaturas maiores que 45°C, o que lhes ocasiona mudanças físicas provocadas por gradientes de temperatura e de umidade, os quais provocam expansão, contração e alterações na densidade e porosidade. O processo de secagem pode provocar fissuras internas ou superficiais, tornando as sementes mais suscetíveis à quebra durante o beneficiamento (VILLELA, 1991 *apud* GARCIA *et al.*, 2004).

Conforme Cavariani (1996 *apud* GARCIA *et al.*, 2004), a principal causa do dano produzido por altas temperaturas em tecidos vegetais se deve à desintegração das membranas celulares, que ocorre provavelmente por alterações nos lipídios que as constituem. Outra teoria é a de que altas temperaturas provocam alterações, dentre elas, a desnaturação de proteínas. Os danos fisiológicos decorridos de altas temperaturas provocam alterações nos sistemas subcelulares, como cromossomas e mitocôndrias, redução do número de grãos de amido no eixo embrionário, aumentos de lixiviação de eletrólitos e de açúcares e de produção de pigmentos carotenoides, redução de permeabilidade de membranas celulares e da taxa respiratória. Esses fatores ocasionam redução na porcentagem de germinação das sementes.

A sensibilidade fisiológica ao dano térmico varia em função da espécie, genótipo, teor de água, temperatura, tempo de exposição, entre outros fatores (MOTTA, 1997 *apud* GARCIA *et al.*, 2004).

A ocorrência de dano térmico pode ser constatada através do teste de germinação, com resultado frequente de plântulas anormais, redução da porcentagem e velocidade de germinação, pela observação de fissuras internas, principalmente em arroz, ou superficiais em milho (HARRINGTON, 1972; NELLIST e HUGHES, 1973 *apud* GARCIA *et al.*, 2004).

Após a maturidade fisiológica até o momento em que a semente será utilizada na semeadura, pode ocorrer perda da qualidade fisiológica decorrente de mudanças bioquímicas e fisiológicas. A deterioração, que é menos perceptível na fase inicial, manifesta-se no decorrer do tempo, com redução do vigor. A perda da qualidade das sementes após a maturidade fisiológica é variável conforme a espécie, cultivar e condições a que as sementes foram

submetidas no campo, após a colheita e nas operações de armazenamento e beneficiamento (GARCIA *et al.*, 2004).

Vidal e Silva (2008) relatam estudo relacionando dano causado por altas temperaturas em sementes por meio de *biospeckle* em sementes de soja e milho submetidas a temperatura de 70°C. As sementes foram avaliadas através do *biospeckle* pelo método de Fujii e Diferenças Generalizadas e comparadas com sementes normais, as quais tiveram sua vitalidade preservada. Como resultado os autores concluíram que o método do *biospeckle* pode ser utilizado para determinar e analisar a atividade biológica em sementes.

O presente trabalho incluiu o estudo de danos gerados por baixa temperatura. No caso da combinação de alta umidade e baixa temperatura, o dano ocorre pela formação de cristais de gelo no interior das células. A água, ao congelar, se expande, ocasionando o rompimento das estruturas celulares.

Braga Júnior *et al.* (2005), trabalhando com identificação de fungos em sementes de feijão inoculadas com três espécies de fungos, submeteram as sementes ao congelamento em freezer a -20°C por 24 horas para restringir toda a atividade biológica à ação dos fungos.

Rodrigues *et al.* (2007) também submeteram as sementes a -20°C com o objetivo de diferenciá-las entre sementes vivas e sementes mortas através do *biospeckle*. Após o congelamento das sementes, houve rompimento das estruturas celulares e morte das sementes, que foi observado pela técnica do *biospeckle*.

### **3.2 Avaliação da Qualidade de Sementes**

Segundo Oakley, Kester e Geneve (2004) os principais testes de qualidade de sementes podem ser classificados em três categorias, sendo elas: 1) testes simples baseados em estudos de germinação; 2) Índices biológicos ou bioquímicos de vigor; 3) Testes com múltiplos procedimentos de análises. De acordo com os autores, os testes simples de germinação estão associados à avaliação do crescimento da plântula e porcentagem de germinação. Estão incluídos nesta categoria o teste de germinação propriamente dito, testes de envelhecimento acelerado e teste de frio. Já os testes bioquímicos incluem várias medidas de atividade metabólica em sementes. Estão nesta categoria os testes de tetrazólio, eletrolíticos, produção de etileno, entre outros. Os testes com múltiplos procedimentos de análises partem do princípio de que o vigor de sementes é resultado de uma relação complexa entre variáveis

ambientais, sendo assim, utilizam muitos testes diferentes de vigor objetivando caracterizar um lote de sementes. Os autores falam como a análise de imagens pode contribuir para a obtenção de informações referentes à qualidade de sementes, levando os testes de viabilidade e vigor a um novo estágio tecnológico. Os autores conseguiram bons resultados ao utilizar análise de imagens para avaliar o crescimento e tamanho de plântulas de *Impatiens*, correlacionando estes dados com vigor.

### 3.2.1 Envelhecimento Acelerado

O potencial fisiológico das sementes pode ser avaliado em laboratório pelo teste de germinação, fornecendo dados sobre a capacidade das sementes de produzirem plântulas normais. Porém por ser realizado em laboratório, em condições ambientais controladas, pode apresentar resultados que igualam sementes com potencial fisiológico diverso. Os testes de vigor têm por objetivo avaliar diferenças no potencial fisiológico de sementes com porcentagem de germinação semelhante, fornecendo informações complementares às obtidas em teste de germinação (VALENTINI e PIÑA-RODRIGUES, 1995 *apud* BORBA FILHO, 2006).

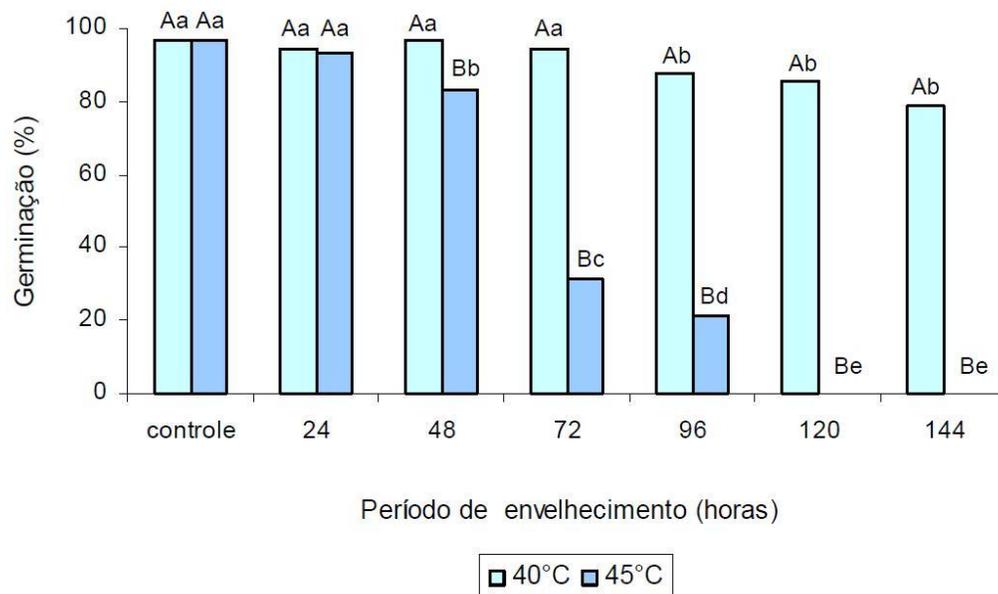
Dentre as propostas de classificação dos métodos de avaliação do vigor, a mais abrangente é atribuída a McDonald (1975 *apud* MARCOS FILHO, 2005), sendo precisa e permitindo a inclusão de novos métodos. Nesta classificação os métodos são agrupados em: a) Testes físicos: avaliam aspectos morfológicos ou características físicas das sementes possivelmente associadas ao vigor, tais como, coloração, tamanho ou massa da semente; b) Testes fisiológicos: visam determinar atividade fisiológica específica cuja manifestação é afetada pelo vigor, como por exemplo, o crescimento de plântulas e a velocidade de germinação; c) Testes bioquímicos: avaliam alterações bioquímicas associadas ao vigor das sementes, como os testes de tetrazólio, de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio; d) Testes de resistência e estresse: avaliam o desempenho de sementes expostas a condições desfavoráveis do ambiente, onde são incluídos os testes de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada.

Na avaliação de sementes, o envelhecimento acelerado é o teste de vigor mais indicado por apresentar eficiência para avaliação do potencial fisiológico de sementes de várias espécies.

O princípio desse método se baseia no fato de a taxa de deterioração das sementes ser influenciada pela exposição a níveis elevados de temperatura e umidade relativa do ar, considerados os fatores ambientais mais relacionados à deterioração de sementes ortodoxas. Sob condições adversas de conservação, as sementes que apresentam alta qualidade deterioram-se mais lentamente do que as menos vigorosas (HAMPTON e TEKRONY, 1995 *apud* BORBA FILHO, 2006).

A partir da maturidade fisiológica, inicia-se o processo de deterioração, em ritmo progressivo, envolvendo mudanças bioquímicas e fisiológicas, como a peroxidação de lipídios, mudanças nas atividades enzimáticas e redução na porcentagem de germinação de sementes e no crescimento de plântulas (BRACCINI; BRACCINI; SCAPIM, 2001 *apud* BORBA FILHO, 2006). No processo de deterioração, o primeiro evento característico é a desorganização do sistema de membranas celulares. Na sequência, ocorrem distúrbios nas atividades respiratórias e biossintéticas, posteriormente a diminuição do vigor e da viabilidade, finalizando com a morte da semente (MARCOS FILHO, 2005 *apud* BORBA FILHO, 2006).

BORBA FILHO (2006) em seu trabalho com envelhecimento acelerado em sementes de *T. roseo-alba* e *T. impetiginosa* avaliou temperaturas de armazenamento de 40 e 45°C, e obteve em seus resultados que a partir de 120 horas houve supressão total da germinação das sementes que foram envelhecidas a 45°C (Figura 4).



**Figura 4** - Porcentagem de germinação de sementes de *Tabebuia roseo-alba* submetidas ao envelhecimento acelerado a 40 e 45°C durante 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Letras

maiúsculas comparam temperaturas em cada período de envelhecimento e letras minúsculas comparam períodos de envelhecimento em cada temperatura, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (BORBA FILHO, 2006).

### **3.2.2 Técnicas Tradicionais de Avaliação de Qualidade de Sementes e Alguns de seus Problemas**

Para avaliar a qualidade das sementes para a semeadura e comparar a qualidade de diferentes lotes, sendo uma base para a comercialização das sementes é que são feitos testes de germinação. Estes são conduzidos em laboratório sob condições controladas e através de métodos padronizados.

A germinação é considerada pelos botânicos como a retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula. Este é o conceito de germinação empregado neste trabalho. Já para os tecnologistas de sementes, a germinação consiste na emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, com capacidade de dar origem a uma planta normal, sob condições ambientais favoráveis.

Ranal e Santana (2006) descrevem de forma detalhada como os ensaios de germinação têm sido realizados nos últimos séculos. Este trabalho mostra não somente o detalhamento matemático de análise, como também o forte enfoque que estes pesquisadores têm dado a este tipo de ensaio, e os cuidados que se deve tomar ao planejar um experimento de análise de germinação, atentando-se sempre para os objetivos do pesquisador. Os autores citam ainda que dentre os principais parâmetros de avaliação estão: medida de capacidade de germinação, tempo, taxa de germinação e sincronia.

O tempo de resposta requerido em testes de germinação é variável conforme a espécie da semente avaliada. Um exemplo deste fato é a avaliação da capacidade germinativa das sementes íntegras de *Araucaria angustifolia* em substrato de areia e vermiculita que gera resultados em aproximadamente 65 dias (CASTRO PAZTOR, 1962/63 *apud* DONI FILHO, AMARAL, CERVI, 1985). Conforme as Regras para Análise de Sementes – **RAS** (BRASIL, 2009a), a duração do teste de germinação é em média 28 dias (*Asparagus officinalis*, *Atriplex hortensis*, *Carya ovata*, *Cytisus scoparius*) podendo chegar a 365 dias para a última contagem da espécie *Ilex paraguariensis*.

Buscando reduzir o prazo requerido para obtenção de resultados de viabilidade e vigor, Oliveira, Carvalho e Nery (2005) realizaram estudos com tetrazólio em sementes de ipê-roxo (*T. impetiginosa*) e ipê-amarelo (*T. serratifolia*) para obter metodologia adequada para a condução do teste, tendo em vista que não se encontra prescrita pelas Regras para Análise de Sementes. O teste de tetrazólio é complementar aos testes de germinação. Também permite diagnosticar causas de deterioração de sementes. Os resultados indicaram que a embebição das sementes de ipê-roxo entre papel por 12 horas seguida da remoção dos tegumentos e imersão em solução 0,07% de tetrazólio por 12 horas a 30°C foi eficiente na avaliação da viabilidade de sementes. Já para o ipê-amarelo a mesma metodologia foi eficiente diferindo na concentração de tetrazólio (0,5%). Um inconveniente do teste de tetrazólio é constituir uma análise destrutiva.

### 3.2.3 Técnicas Baseadas em Análise de Imagens

De acordo com Souza *et al.* (2008) a crescente demanda por sementes de espécies florestais nativas tem gerado a necessidade de desenvolvimento de tecnologias para avaliação de qualidade dessas sementes. Os autores destacam ainda que dentre as técnicas estudadas, têm se destacado o uso de raios X, sendo esta a técnica escolhida pelos autores para estudar a qualidade de sementes de *Platypodium elegans* Vong. Os autores concluem que o teste de raios X mostra-se eficiente na avaliação da morfologia interna das sementes da espécie.

O teste de raios X é um método rápido e não destrutivo – recomendado pela **RAS** (BRASIL, 2009a) para análise de estruturas internas de sementes, permitindo detectar sementes cheias, vazias e defeituosas. As sementes defeituosas e vazias afetam a taxa de germinação de um lote. A análise de sementes com raios X também permite, através de um arquivo fotográfico das estruturas internas das sementes, detectar danos mecânicos invisíveis ao olho humano e sementes infestadas por insetos.

Oliveira *et al.* (2004) estudaram a eficiência do teste de raios X na avaliação de defeitos internos em sementes de ipê-roxo e ipê-amarelo e verificaram também a consequência destes defeitos na germinação. Para tanto, as sementes foram expostas a diferentes intensidades e diferentes tempos de exposição à radiação. Como resultado obteve-se que os defeitos internos detectados afetam a germinação das sementes, reduzindo a qualidade do lote.

O uso da técnica de análise de imagens obtidas com emprego de raios X foi eficiente também na identificação de danos mecânicos em sementes de soja. Por meio da comparação das imagens com resultados de germinação foi possível detectar quais danos interferem no processo germinativo. Como resultados, os autores verificaram que é possível identificar danos mecânicos externos e internos nas sementes de soja e também danos causados por umidade e ataque de percevejo (FLOR *et al.*, 2004). No entanto, a imagem obtida no teste de raios X necessita da interpretação de um analista especializado para fazer uma avaliação correta.

Segundo Sako *et al.* (2001) muitos testes de análise de sementes são subjetivos, possuem alto custo e variabilidade elevada. Os autores apontam o processamento de imagens como alternativa capaz de contornar estes problemas.

Cicero e Banzatto Junior (2003) destacam que a possibilidade de utilização de técnicas de análise de imagens para a determinação de danos mecânicos em sementes é promissora, sendo identificados como métodos de precisão, apresentando a vantagem de não destruir as amostras de sementes.

Hoffmaster *et al.* (2003) desenvolveram um *software* para processamento de imagens de plântulas de soja. O trabalho mostra ser possível classificar as plântulas utilizando o processamento de imagens, podendo ser uma alternativa ao método manual de avaliação.

Mondo e Cicero (2005) estudando sementes de milho, utilizaram técnicas ópticas por serem não destrutivas para avaliar forma, danos internos e correlacionar com as plântulas formadas. Dessa forma verificaram uma relação de causa e efeito. As sementes foram fotografadas e radiografadas. As plântulas obtidas ou sementes mortas também foram fotografadas.

Teixeira, Cicero e Dourado Neto (2006) avaliaram vigor de sementes de milho por meio de análise de imagens digitais de plântulas. Segundo os autores, esta técnica permite análise dimensional de imagens com rapidez e precisão e possibilita associar dados obtidos no processamento de imagens a eventuais variações de vigor existentes nos lotes de sementes de milho. Utilizando também esta técnica, Zabot *et al.* (2008) avaliaram vigor de sementes de feijão através do processamento de imagens digitais das plântulas e obtiveram que a avaliação do crescimento de plântulas através do processamento de imagens digitais é uma técnica eficiente.

Teixeira *et al.* (2007) estudaram a utilização de um escâner aplicado no monitoramento do teste de germinação. Os autores listam como principais vantagens do método a possibilidade de automação, a digitalização dos dados, a análise em intervalos de tempo menores do que aqueles que seriam requeridos pelo método tradicional, permitindo assim curvas de germinação mais representativas. Como desvantagens, o autor ressalta a necessidade de utilização de um escâner de maiores dimensões para a realização de ensaios com um maior número de sementes.

### 3.2.4 Aplicação do *Biospeckle* na Avaliação de Sementes

Os estudos para aplicação do *biospeckle* em sementes estão relacionados com avaliação do teor de água, diferenciação dos níveis de atividade metabólica do tecido vegetal e detecção de patógenos. Enes (2006) afirma que tais estudos, analisados em conjunto, trazem informações de interação do fenômeno, contribuindo para o domínio da técnica do *biospeckle* como meio de análise da qualidade de sementes.

Em uma semente, a quantidade de água está relacionada com a intensidade do processo metabólico, sendo que este, por sua vez, tem influência na variação temporal dos pontos de interferência do *biospeckle*, conforme observado por Rodrigues *et al.* (2005) em estudos realizados com sementes. Dessa forma pode-se relacionar a umidade do material biológico com as medidas de Momento de Inércia (**MI**), a exemplo do trabalho realizado por Enes (2005).

Braga Júnior (2000), trabalhando com sementes de feijão (*Phaseolus Vulgaris* L.) em diferentes níveis de umidade, comprovou a influência do teor de água e da evaporação nos resultados do *biospeckle*. O autor utilizou a técnica de Diferenças Generalizadas (**DG**). Posteriormente, o mesmo autor utilizou o laser para diferenciar tecidos vivos de tecidos mortos em sementes utilizando as técnicas conhecidas como Asakura e **MI**, respectivamente. Os resultados foram importantes para a pesquisa do *biospeckle* aplicada na análise de sementes, motivando a realização de novos experimentos aplicando a técnica do *biospeckle* para avaliar outras variáveis relacionadas com a interação entre o laser e a semente. Dessa forma, Moreira *et al.* (2002), realizaram um estudo de caracterização da transmissão do laser em sementes de feijão avaliando três diferentes espessuras (1mm, 2mm e 4mm) e dois níveis de umidade (9,5 e 23,5 %). Os resultados mostraram que quanto maior o teor de água, maior é

a penetração do laser no tecido da semente, pois o aumento da quantidade de água na semente aumenta o volume da célula, facilitando a passagem da luz neste tecido.

Rodrigues *et al.* (2005) utilizaram o *biospeckle* para diferenciar tecidos de sementes de feijão vivos de tecidos mortos por congelamento em água. Os resultados permitiram concluir que, para um mesmo teor de água, é possível diferenciar sementes vivas de sementes que tiveram seu potencial reduzido em função da formação de cristais de água.

Braga Júnior *et al.* (2005) aplicaram a técnica do *biospeckle* para identificar 4 fungos diferentes em tecidos de sementes de feijão que haviam sido submetidas ao congelamento em água, constituindo 4 tratamentos, a saber: tratamento 1, semente testemunha; 2, fungo *Sclerotinia fungi*; 3, *Aspergillus fungi* e 4, *Colletotrium fungi*. Os autores encontraram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos ao nível de 1%, evidenciando a capacidade da técnica em identificar fungos em sementes. Os resultados desenvolvidos demonstraram que foi possível diferenciar um lote de sementes sem a presença de fungos, com lotes inoculados com os 3 tipos, não sendo possível identificar o fungo *Sclerotinia fungi*. É possível que para esse fungo, não detectado, o método do **MI** utilizando os equipamentos e técnicas da época, não tenha sido suficientemente rápido para capturar sua atividade.

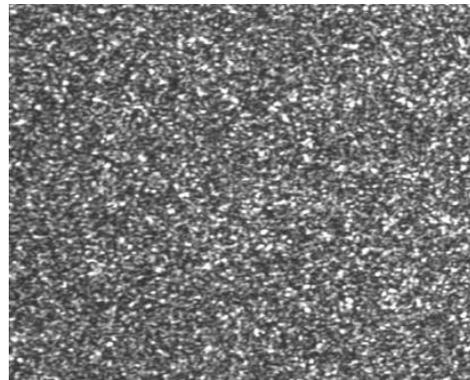
Enes *et al.* (2004) avaliaram a sensibilidade do método do *biospeckle* trabalhando com sementes de feijão com diferentes níveis de atividade. Observou-se no trabalho ser possível diferenciar níveis extremos e alguns níveis intermediários de atividade. As sementes com diferentes níveis de atividade foram obtidas através da técnica conhecida como envelhecimento acelerado e na quantificação do *biospeckle* foi utilizado o **MI**.

A partir dos diversos estudos com o *biospeckle*, pode-se dizer que é uma técnica óptica que permite avaliar sementes. Difere de técnicas como raios X na medida em que não necessita de um analista para avaliar a imagem obtida, permitindo que o processo de avaliação de sementes seja feito de forma automática. Outra vantagem do *biospeckle* na avaliação de sementes em relação aos métodos tradicionais é o tempo de resposta, que irá depender da velocidade de processamento do computador empregado, podendo fornecer uma resposta em tempo real.

### 3.3 O *Biospeckle*

Para entender o fenômeno conhecido como *biospeckle*, deve-se partir da observação da incidência do laser em uma superfície, resultando em uma figura de interferência conhecida por *speckle* (granulado), proveniente da alta coerência do laser. Em uma superfície ou objeto que apresente algum tipo de atividade, podendo, esta atividade, ser proveniente de processos biológicos ou não, o fenômeno do *speckle* se transforma no *speckle* dinâmico ou *biospeckle*.

O fenômeno óptico da interferência pode ser notado quando se ilumina, com laser, fenômenos não biológicos, como o processo de corrosão em metais e a evaporação da água na secagem de materiais. Nestes casos o fenômeno óptico recebe a denominação de *speckle* dinâmico (RABELO, 2000). Se o objeto difusor se move como em tecidos biológicos, os grãos individuais do padrão de *speckle* também se movem alterando, assim, a sua forma. Esse fenômeno é muitas vezes denominado de *boiling speckle* devido ao fato de sua aparência visual ser similar a um líquido em ebulição, podendo também ser descrito como um fervilhamento luminoso (RABELO, 2000). Na Figura 5 é possível visualizar o padrão *speckle*.



**Figura 5** – Padrão *Speckle*. Fonte: RODRIGUES, 2007

Diversos experimentos têm sido realizados utilizando a técnica do *speckle* dinâmico ou *biospeckle* descrita, sendo que alguns resultados satisfatórios foram obtidos em estudos de processos de secagem de pintura (AMALVY *et al.*, 2001), avaliação de danos em frutos (PAJUELO *et al.*, 2003), mapeamento de nervuras em tecido vegetal, medição de fluxo sanguíneo (SILVA, 2007) e também em exames parasitológicos de sangue (ROMERO, 1999).

### 3.3.1 Breve Histórico sobre *Biospeckle*

O fenômeno conhecido por *speckle* ocorre quando um objeto é iluminado por uma fonte de luz que tem comprimento de onda da mesma ordem de grandeza da rugosidade da superfície do objeto e a luz é espalhada ou transmitida através desse objeto (SILVA, 2007). Esse fenômeno, que como resultado da incidência de vários feixes sobre o objeto é gerado pelo fenômeno da interferência, era tratado como ruído em estudos ópticos. Estudos posteriores no sentido de minimizá-lo revelaram que o mesmo era portador de informações sobre a superfície iluminada.

Ao final da década de 60 foi apresentada a primeira aplicação dos padrões de *speckle* para a metrologia, e, a partir de então, surgiram aplicações envolvendo medidas de micro deslocamento (BURCH e TOKARSKI, 1968 apud SILVA, 2007), determinação da coerência de fontes e rugosidade superficial. (PAIVA JUNIOR; MURAMATSU, 2004)

Simultaneamente ao desenvolvimento das aplicações, foram sendo desenvolvidas as bases teóricas estatísticas para descrição formal do granulado óptico. Destacam-se as contribuições de J.W. Goodman (1984 apud SILVA, 2007) e J.C. Dainty (1984 apud SILVA, 2007) no desenvolvimento das estatísticas espaço-temporais de primeira e segunda ordem do granulado óptico.

### 3.3.2 Fundamentos Teóricos

A luz, ao interagir com a matéria, pode apresentar os fenômenos de absorção, transmissão, dispersão, reflexão e espalhamento, que é fundamental na formação do *speckle*.

Quando a superfície é lisa, ou seja, com rugosidade inferior ao comprimento de onda incidente, a reflexão especular é dominante. Já uma superfície rugosa, com rugosidade da ordem de grandeza do comprimento de onda, a reflexão é do tipo difusa.

O fenômeno do espalhamento, que ocorre quando a superfície apresenta rugosidade da ordem de grandeza do comprimento de onda, pode ser classificado como espalhamento Rayleigh, Mie e Geométrico, conforme o tamanho das partículas do meio espalhador.

Silva (2007) em seu trabalho com tecidos biológicos, que apresentam estruturas de diversos tamanhos, indo desde a ordem de nanômetros (dimensão de cadeias enzimáticas) até

a ordem de micrômetros (que são dimensões das células) admitiu serem predominantes os espalhamentos Mie e Geométrico.

Estudando-se sementes de ipê-roxo, que são tecidos biológicos, tratou-se predominantemente dos espalhamentos Mie e Geométrico na formação do granulado óptico.

O espalhamento também pode ser classificado como inelástico, elástico ou *quasi-elástico*, dependendo da frequência e do comprimento da onda refletida em relação a essas características da onda incidente.

No espalhamento inelástico a onda espalhada apresenta comprimento de onda maior que a incidente. Isso se deve principalmente ao fato de elétrons excitados pela luz incidente decaírem para estados intermediários, emitindo fótons de níveis menores de energia. Por isso a onda tem comprimento maior, que está associado ao transporte de menores energias. Já para menores comprimentos de onda estão associados transporte de maiores níveis de energia.

No espalhamento elástico não há alteração do comprimento de onda da luz. Esse tipo de espalhamento ocorre quando a superfície e os centros espalhadores estão estáticos. Assim ocorre mudança apenas na direção de propagação das ondas espalhadas.

Já no espalhamento *quasi-elástico* há uma ligeira mudança na frequência das ondas espalhada e incidente. Esse fenômeno se deve ao fato dos centros espalhadores estarem em movimento, deslocando as ondas espalhadas.

Na formação do granulado óptico, a interferência entre ondas harmônicas de mesma amplitude e com frequências e comprimentos de onda ligeiramente diferentes origina o fenômeno do batimento, que provoca flutuações de intensidades observadas no *speckle* dinâmico.

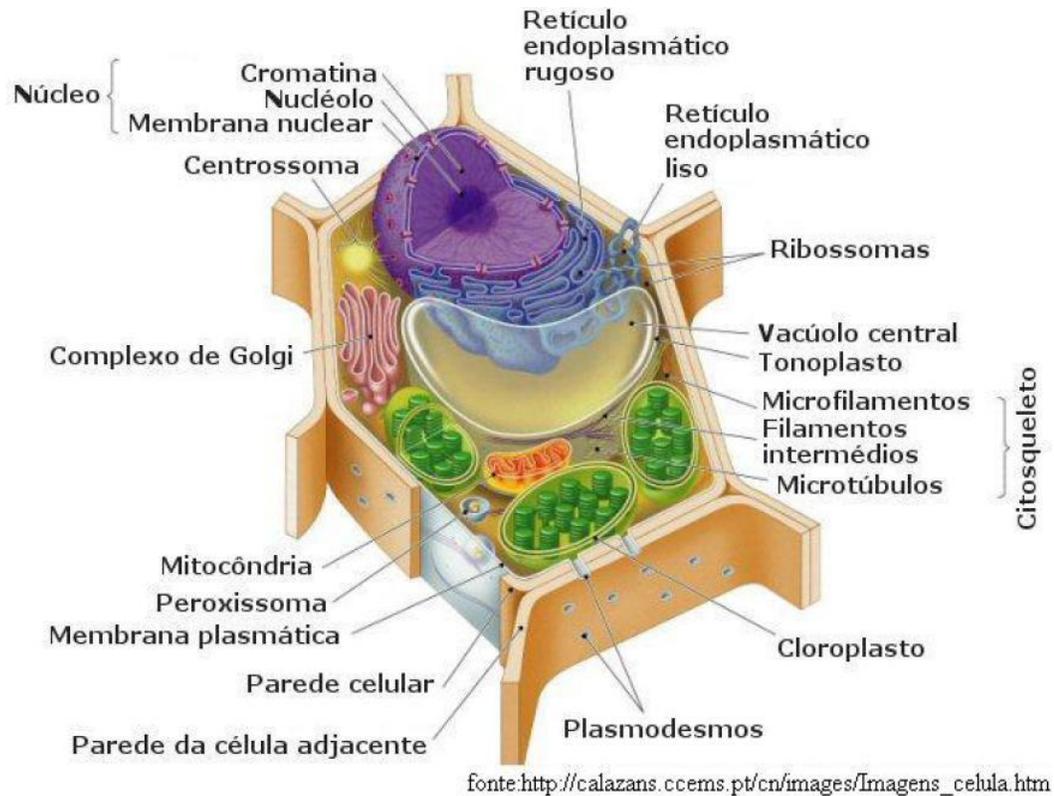
Supõe-se que neste trabalho o espalhamento seja do tipo elástico ou *quasi-elástico*.

### **3.3.3 Interação do Laser com Tecidos Biológicos**

Tendo-se em vista que a técnica do *biospeckle* é sensível a rugosidades da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da fonte de luz, sendo, portanto, útil no monitoramento de atividades a nível microscópico, cabe descrever as estruturas celulares iluminadas neste trabalho bem como a velocidade de movimentação de líquidos em seu interior.

A unidade elementar dos tecidos biológicos são as células, que são constituídas em sua maioria por água e compostos orgânicos. Este trabalho é influenciado pelas dimensões das organelas, pelos índices de refração, pelas propriedades de absorção dos tecidos biológicos e também pelas velocidades dos movimentos das partículas em seu interior.

Na Figura 6 encontra-se um desenho esquemático de uma célula típica vegetal.



**Figura 6** – Desenho esquemático de uma célula típica vegetal

Segundo Caboclo *et al.* (2007 *apud* RODRIGUES, 2007), os movimentos internos de um material biológico são devidos a trocas gasosas, metabolismo e movimentação de nutrientes nas células. Esses movimentos são influenciados pelo movimento browniano e apresentam maior intensidade na direção das fibras.

### 3.3.4 Origens Físicas do *Biospeckle*

O princípio de Huygens-Fresnel postula que a propagação da luz pode ser analisada como uma sucessão de ondas secundárias formadas a partir da frente de onda primária.

Seguindo esse princípio, um feixe de luz ao atingir uma superfície é refletido pelos pontos desta superfície que atuam como emissores de ondículas secundárias. Para superfícies rugosas, apresentando centros espalhadores distribuídos de forma aleatória, as ondículas são espalhadas com fases iniciais também variando aleatoriamente. A superposição coerente das ondículas origina um padrão de interferência de intensidades variáveis ao acaso. Onde a interferência é construtiva formam-se grãos claros e onde a interferência é destrutiva, os grãos escuros.

### 3.3.5 Configurações Experimentais

Silva (2007) classificou a geometria de observação quanto à presença ou não de uma lente entre a superfície espalhadora e o plano de observação como propagação em espaço livre e geometria imagem.

Assim, quando não há auxílio de uma lente a configuração é chamada propagação em espaço livre e o *speckle* formado é chamado objetivo. É caracterizada por apenas uma pequena área da superfície ser iluminada pelo feixe de laser e a luz espalhada é registrada em um filme ou sensor **CCD** (sigla proveniente do inglês *charge-coupled device*) colocado no plano de Fraunhofer.

Já a geometria imagem é obtida com a interposição de uma lente entre os pontos do objeto e os pontos do plano de observação que é denominado plano imagem. Pode ser iluminada uma área maior da superfície, pois o feixe laser é expandido. O *speckle* é chamado subjetivo.

Rabelo (2000) em seu trabalho analisou diversas configurações, como a propagação em espaço livre; a presença de um polarizador entre o observador e o objeto, verificando a influência da componente especular no *biospeckle*; e também utilizou um filtro neutro para controlar a intensidade luminosa do feixe incidente.

Enes (2006) utilizou uma lente com a finalidade de expandir o feixe laser e assim iluminar uma área maior do tecido vegetal.

### 3.3.6 Tamanho dos Grãos de *Speckle*

Silva (2007) destacou que, na propagação em espaço livre, o tamanho dos grãos do padrão *speckle* varia em função do comprimento de onda da luz incidente, da distância de

observação e do tamanho da área iluminada. Também explicou fisicamente os fenômenos envolvidos para essa variação.

### 3.4 Formas de Avaliar ou Quantificar o *Biospeckle*

#### 3.4.1 Momento de Inércia (MI)

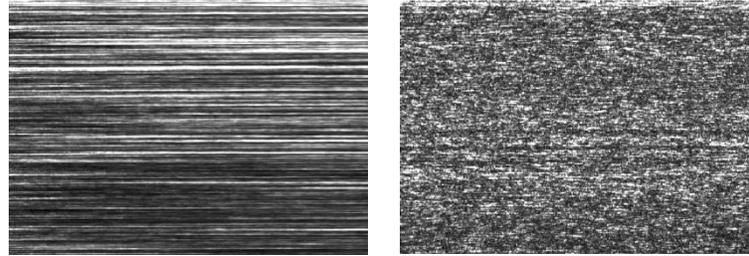
A obtenção de informação sobre a atividade de um material biológico através do *biospeckle* pode ser feita por diferentes métodos. Existem métodos de análise do *biospeckle* que fornecem resultados visuais, podendo-se citar: Fujii e Diferenças Generalizadas (**DG**). Há também métodos que geram resultados numéricos, tais como: Momento de Inércia (**MI**), Método do Contraste e Autocorrelação.

Neste trabalho optou-se pelo processamento das imagens e obtenção de resultados em valores de **MI** pela facilidade em se capturar sequências de imagens em filmes de aproximadamente 10 s. Isso foi possível pelo tipo de amostra avaliada. Se estivesse sendo estudado algum tipo de animal que apresentasse dificuldade na permanência na mesma posição para aquisição das imagens, seria melhor escolher métodos que permitem avaliar com uma quantidade menor de imagens, como o método de **LASCA** (sigla proveniente do inglês *laser speckle contrast analysis*).

O cálculo do **MI** é baseado na variação temporal do *speckle*. Para se quantificar a variação temporal do *speckle*, é utilizado o **STS** (sigla do inglês: *Spatial Temporal Speckle*) ou **THSP** (sigla do inglês: *Time History Speckle Pattern*), o qual se constitui de uma manipulação das diversas imagens obtidas da superfície do objeto iluminado pelo laser. Estas imagens provêm de uma sequência de imagens espaçadas uma da outra por intervalos de tempo da ordem de milissegundos. De cada imagem, retira-se uma coluna amostral do centro que é posicionada ao lado da coluna da imagem subsequente, formando uma imagem cuja altura é correspondente ao tamanho da coluna em *pixels* e cuja largura é correspondente ao número de imagens capturadas. A matriz então obtida, também chamada de matriz **STS**, é auxiliar nas etapas de processamento, sendo que suas linhas representam a variação temporal dos *pixels* e suas colunas, a variação espacial.

A ocorrência de algum movimento superficial ou interno do material será transmitida para a figura do *speckle* formado e assim, a coluna observada será diferente da anterior. Por

outro lado, se a figura formada for composta por linhas bem definidas, significa que não está ocorrendo mudança na formação do *speckle* de uma imagem para a outra, repetindo sempre o padrão anterior. A Figura 7 a apresenta o **STS** de um material de baixa atividade, enquanto que a Figura 7 b, apresenta o **STS** de um material que exhibe alta atividade.



a – STS baixa atividade

b – STS alta atividade

**Figura 7** – Matriz STS de baixa e alta atividade. Fonte: RABELO, 2000

Considerando que o **STS** carrega informações da atividade do material sob estudo, cada tipo de material apresenta um padrão **STS** diferente. Isso pode ser percebido através de inspeção visual, porém valores numéricos são necessários para efeito de comparação através de processos artificiais objetivos e mais precisos. Dessa forma, torna-se necessário transformar essa imagem em um número ou índice de quantificação para permitir diferenciar os objetos que apresentam níveis de atividades distintos. Assim, considerando-se (**u**) como sendo uma variável aleatória que representa o nível de intensidade de uma dada região da imagem. A função densidade de probabilidade é definida por:

$$p_u(x) = \text{Prob}[u = x] = \frac{\text{número de elementos com nível } x}{\text{número total de elementos}} \quad (3-2)$$

em que,

$$x = 0, \dots, L-1$$

A probabilidade combinada de segunda ordem tem sido bastante útil em aplicações com extração da textura de imagens. Essa função é definida por:

$$p_u(x_1, x_2) = p_{u_1, u_2}(x_1, x_2) = \text{Prob}[u_1 = x_1, u_2 = x_2] \quad (3-3)$$

$$p_u(x_1, x_2) = \frac{\text{número de pares de elementos com níveis } u_1=x_1, u_2=x_2}{\text{número total de pares de elementos da imagem}} \quad (3-4)$$

Onde:

$u_1$  e  $u_2$  são dois elementos (*pixels*) sucessivos na imagem;

$x_1$  e  $x_2$  são os valores das respectivas intensidades desses elementos.

Assim, foi desenvolvido um processo baseado nas ocorrências de valores de intensidade sucessivos dos elementos que compõem a imagem do **STS**. O processo transforma o **STS** em uma matriz de ocorrências (**COM** - do inglês *concurrency matrix*, sendo também encontrada a sigla **MCO**, do português matriz de coocorrências), que é definida como:

$$\mathbf{COM} = [N_{ij}] \quad (3-5)$$

Em que:

$N_{ij}$  corresponde ao número de ocorrências de intensidades;

$i, j$  são intensidades sucessivas que variam de 0 a 255.

As entradas da matriz são números de ocorrências que um certo valor de intensidade (**i**) é seguido por um valor de intensidade (**j**), o que de acordo com Arizaga, Trivi e Rabal (1999) caracteriza um caso particular da também chamada em inglês *spatial gray level dependence matrix*, usualmente utilizada para caracterizar a textura de imagens.

A Figura 7 pode ser transformada em uma matriz de intensidades, onde são considerados os valores das intensidades de cada elemento da imagem, para, em seguida, obter-se a Matriz de Ocorrências Modificada (**MOM**). A Figura 8 a representa a matriz de ocorrências modificada do **STS** de baixa atividade da Figura 7 a, enquanto que na Figura 8 b, refere-se à matriz de ocorrências modificada com respeito ao **STS** de alta atividade da Figura 7 b. Observa-se que em 8 b, a dispersão dos pontos é maior do que em 8 a, na qual os pontos se concentram em torno da diagonal principal da matriz de intensidades. Para se extrair um número que represente ou quantifique essa dispersão, Arizaga, Trivi e Rabal (1999) e Arizaga (2009) propôs calcular o Momento de Inércia (**MI**) da Matriz de Ocorrências Modificada (**MOM**), analogamente ao sistema mecânico, como se a dispersão da matriz fosse análoga a uma massa. O método foi estudado por Rabelo (2000), que comprovando sua eficiência o denominou como Módulo de Dispersão de Intensidades (**MDI**). Esse parâmetro consiste no

somatório dos produtos dos valores de intensidade da matriz pelo quadrado da distância entre cada elemento da matriz e a diagonal principal. A equação (3-6) representa a operação do momento de inércia. Vale ressaltar que o termo Módulo de Dispersão de Intensidades (**MDI**) é equivalente ao termo Momento de Inércia (**MI**).

$$\mathbf{MI} = \sum_{ij} \mathbf{M}_{ij}(\mathbf{i} - \mathbf{j})^2 \quad (3-6)$$

Onde:

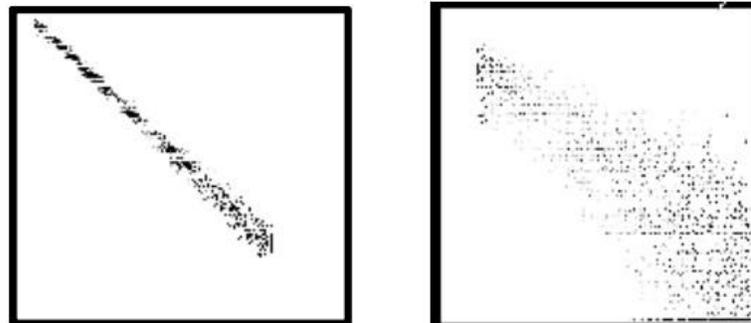
**MI** corresponde ao valor de Momento de Inércia;

**i** e **j** são posições na matriz de ocorrências que também correspondem às intensidades;

**M<sub>ij</sub>** é obtido pela equação (3-7)

$$\mathbf{M}_{ij} = \frac{\mathbf{N}_{ij}}{\sum_j \mathbf{N}_{ij}} \quad (3-7)$$

Para efeito de exemplo, ao se calcular o **MI** para as matrizes das Figura 8 a e 8 b, obtém-se respectivamente os valores 120 e 2450, valores esses que são utilizados como parâmetros de medição de atividade da imagem, para correlação futura com a atividade metabólica.



a – MOM de baixa atividade      b – MOM de alta atividade

**Figura 8** – Matriz de ocorrências (MOM) de baixa e alta atividade. Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2005

Na literatura também, Braga Júnior. (2000) ao estudar o efeito da umidade em sementes obteve resultados a partir de uma Análise de Variância dos valores de Momento de

Inércia. Seus resultados com base em curvas de autocorrelação não satisfizeram os critérios para a implementação da Análise de Variância, pois não apresentaram uma distribuição de Gauss.

De acordo com a ordem da estatística e seu tipo (espacial ou temporal) é possível avaliar características específicas do material analisado, como afirma Silva (2007):

A estatística **espacial** de primeira ordem torna possível, a partir do cálculo da média e da variância das intensidades, uma medida do contraste do padrão. Já a estatística espacial de segunda ordem fornece informações a respeito do tamanho dos grãos. De maneira semelhante, a estatística **temporal** de primeira ordem nos permite conhecer a respeito da proporção entre espalhadores móveis e estáticos, enquanto a estatística temporal de segunda ordem fornece informações acerca da distribuição de velocidades desses espalhadores.

Segundo Nobre *et al.* (2009) o cálculo do **MI** tem por finalidade caracterizar a atividade de um fenômeno pela atribuição de um número ao seu estado.

Alguns estudos que foram realizados através do cálculo do **MI**, que é uma estatística de segunda ordem, são citados nos parágrafos seguintes.

Nobre *et al.* (2009) avaliaram a composição espectral do **STS** através do Momento de Inércia (**MI**), da Entropia baseada em *Wavelets* e da análise de *Cross-Spectrum*. Em seus resultados com amostras reais de tecidos biológicos, o método de **MI** se mostrou mais eficiente na análise de altas frequências enquanto a Entropia e *Cross-Spectrum*, mais sensíveis na análise de baixas frequências.

Segundo Botega (2009), **MI** é o método mais utilizado quando se deseja uma quantificação das informações requeridas da mudança do padrão de *speckle* formado durante uma observação.

Carvalho *et al.* (2009), buscando uma ferramenta para avaliação da qualidade do sêmen bovino, utilizaram o *biospeckle* e correlacionaram os valores de **MI** obtidos com as avaliações microscópicas. Os valores de **MI** refletiram a atividade dos espermatozoides, uma vez que apresentaram correlação com os principais parâmetros da cinética espermática. Em

seus resultados concluíram que a técnica do *biospeckle* é uma ferramenta alternativa para análise objetiva da qualidade de sêmen bovino congelado.

Botega (2009), buscando novas técnicas para análise do déficit hídrico em vegetais, avaliou o uso do *biospeckle* para determinar o status hídrico de plantas de *Coffea arabica* e seus resultados permitiram apresentar a tecnologia como uma contribuição sólida, sustentável e inovadora.

A técnica utilizada neste trabalho foi o **MI**, uma vez que se buscou correlacionar os valores deste com o potencial germinativo de sementes de ipê. No entanto, ressalta-se que o cálculo do **MI** é apenas mais uma dentre as diversas técnicas existentes para avaliação do *biospeckle*, sendo que cada uma delas apresenta características específicas que podem ser aplicadas dependendo do trabalho proposto, tipo de material analisado e condições de observação.

Sendo assim, os estudos de aplicação desse fenômeno óptico levaram os pesquisadores a desenvolverem um grande número de técnicas auxiliares, que combinadas com o **MI** possibilitam extrair informações adicionais dos materiais biológicos, aumentando a precisão do método, bem como sua gama de aplicações.

Entre estas metodologias, pode-se citar: a Auto Correlação Temporal da Sequência de Variação dos Pontos de Interferência do *Biospeckle*, conforme proposto por Rabal, Trivi e Arizaga (1996); o método das Diferenças Generalizadas e o método de Fujii; Modelos Matemáticos de Simulação do Fenômeno, como o proposto por Rabal *et al.* (2003); método de **LASCA** e **LASTCA** (sigla proveniente do inglês *laser speckle temporal contrast analysis*); Contraste de Correlações Sucessivas; o coeficiente Hurst proposto por Passoni (2004); técnicas de filtragem utilizando a Transformada de Fourier (ENES, 2005) e a transformada de *Wavelets* como proposto por Braga Júnior. *et al.* (2005) e o método de quantificação proposto por Rodrigues (2007) baseado em medidas de entropia.

Nos subitens a seguir encontra-se uma breve descrição destas técnicas e o princípio empregado em seu desenvolvimento.

### 3.4.2 Autocorrelação Temporal da Sequência de Variação dos Pontos de Interferência do *Biospeckle*

Esta técnica é baseada no estudo da sequência temporal dos *pixels* de imagens sequentes através da função de autocorrelação temporal. Sendo que esta consiste na correlação entre um vetor  $(x(t))$  e ele mesmo deslocado no tempo  $(x(t+1))$ . Maior detalhamento e discussão entre valores obtidos com a correlação e convolução da técnica encontram-se em Enes (2006) e Rabal e Braga Júnior (2009).

### 3.4.3 Método das Diferenças Generalizadas

Este método permite diferenciar regiões do material que apresentam níveis diferentes de atividade relacionada à mudança da imagem do *speckle* observado. Cada imagem obtida do material iluminado tem seus *pixels* identificados, sendo suas intensidades luminosas reconhecidas por  $I(x,y)$ , onde  $(x,y)$  são coordenadas da imagem. A partir da diferença de intensidade de um *pixel* de uma imagem e sua subsequente obtém-se uma nova imagem que irá apresentar *pixels* mais claros onde houve maior variação de intensidade dos *pixels* apresentados pelas imagens de origem.

### 3.4.4 Método de Fujii

O método de Fujii é uma técnica utilizada para gerar mapas de atividades utilizando o *biospeckle*. Esta técnica consiste basicamente de um somatório do cociente entre as diferenças de intensidades e a soma das intensidades para imagens consecutivas.

Tem o mesmo princípio do Método de Diferenças Generalizadas, diferindo na forma de tratamento das imagens na qual se aplica uma ponderação das diferenças (FUJII *et al.*, 1985).

### 3.4.5 Método de LASCA

Este método foi proposto por BRIERS e WEBSTER (1996) e sua sigla provém do inglês *Laser Speckle Contrast Analysis*, em português Análise de Contraste do Laser *Speckle*.

Seu princípio tem por base a perda de contraste que ocorre quando se tira uma fotografia de um objeto dinâmico. Nesse contexto, a movimentação ocorre num intervalo de tempo menor que o tempo de integração da câmera e este é finito. Dessa forma, um tecido com alta atividade terá uma imagem formada com menor contraste que uma imagem de um tecido estático. (RABAL, 2009)

Uma das desvantagens dessa técnica é a interferência do contraste espacial, que é devido à rugosidade do material, não sendo característico da atividade biológica ou de um processo dinâmico que se queira monitorar.

A vantagem é que a avaliação pode ser feita com uma única fotografia, sendo útil em aplicações da medicina, ou quando se trabalha com animais que respiram e se movem facilmente, dificultando a permanência na mesma posição para obtenção de sequências de imagens (SILVA, 2007).

#### 3.4.6 Método LASTCA

A sigla LASTCA provém do inglês e em português quer dizer Análise de Contraste Temporal do Laser *Speckle*. Este método consiste na construção de um mapa através do cálculo do contraste temporal das intensidades de cada *pixel* ao longo do tempo. Para tanto são necessárias várias imagens (ordem de dezenas) sequentes do objeto e a variação dos *pixels* ao longo do tempo irá gerar o valor de intensidade no mapa final (SILVA, 2007).

#### 3.4.7 Método Contraste de Correlações Sucessivas

Neste método utiliza-se o coeficiente de correlação, proveniente da função de autocorrelação. Esse coeficiente indica numericamente quanto o padrão *speckle* é semelhante consigo mesmo num instante ou numa região diferentes. O equacionamento matemático encontra-se detalhado no trabalho de Silva (2007).

O método consiste em comparar uma linha ou coluna de pixels da **THSP** ou **STS** com ela mesma no instante imediatamente posterior.

A correlação é usada para determinar se duas variáveis estão relacionadas. Se existe correlação estatística, pode-se então, a partir de uma variável, estimar-se a outra. O coeficiente de correlação linear pode variar de -1 a 1. Valores positivos e próximos de um indicam uma

correlação linear positiva. Valores próximos de 0 são referentes à baixa correlação linear e quanto mais próximos de -1, alta correlação linear negativa.

A equação do coeficiente de correlação linear ( $r$ ) é dada pela equação:

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n(\sum x^2) - (\sum x)^2} \cdot \sqrt{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}} \quad (3-8)$$

Onde  $x$  e  $y$  são variáveis que se deseja identificar a correlação.

Para efeito didático, abaixo está um exemplo numérico ilustrativo. O valor adotado como máximo é nove, que corresponde ao valor de *pixel* branco (255 na imagem real) e o valor mínimo é zero que corresponde ao negro (0 na imagem real).

Considerando-se que a matriz numérica (Figura 9) seja uma imagem capturada pela câmera no instante inicial  $t=0$ .

0	3	5	1
9	6	5	0
2	1	6	8
4	0	9	3

**Figura 9** – Matriz de intensidades referente ao tempo inicial de um material hipotético

Após um determinado intervalo de tempo, uma nova imagem (Figura 10) é capturada na mesma posição, no tempo  $t=1$ .

0	3	5	1
9	6	5	0
2	2	6	8
4	0	9	3

**Figura 10** – Matriz de intensidades referente ao tempo final de um material hipotético de baixa atividade

Neste caso, observamos que a matriz mudou muito pouco, correspondendo, portanto, a um material hipotético de baixa atividade.

Para exemplificar o procedimento matemático de avaliação do *biospeckle* usando o coeficiente de correlação, será tomada a segunda coluna da matriz como vetor  $v_t$ , para efetuar-se o respectivo cálculo. Assim sendo, têm-se  $v_t = (3, 6, 1, 0)$  e  $v_{t+1} = (3, 6, 2, 0)$ .

Calculando-se o coeficiente de correlação destes dois vetores obtém-se como resultado um coeficiente de correlação de 0,98. Esse valor é bastante alto (próximo de 1), mostrando, alta correlação e que, portanto, o material possui baixa atividade, pois não houve alterações ao longo do tempo.

Caso as matrizes tomadas como exemplo apresentem muitas diferenças entre os valores inicial e final, representando um material de atividade maior, o valor do coeficiente de correlação é menor, como no exemplo a seguir.

4	0	9	5
2	7	1	8
9	6	0	5
1	9	3	2

**Figura 11** – Matriz de intensidades referente ao tempo final de um material hipotético de alta atividade

Tomando-se a segunda coluna do tempo  $t = 0$  (Figura 9), têm-se  $v_t = (3, 6, 1, 0)$  e  $v_{t+1} = (0, 7, 6, 9)$  da Figura 11. Calculando-se o coeficiente de correlação, tem-se como resultado o valor 0,23, que é mais próximo de 0. Dessa forma, pode-se dizer que o coeficiente de correlação indica baixa correlação e indica que o material apresenta alta atividade biológica.

### 3.4.8 Coeficiente de Hurst

O parâmetro ou expoente de Hurst (H) é uma ferramenta capaz de caracterizar o grau de autossimilaridade de um processo, ou seja, é uma medida de correlação e persistência (SOTERRONI; DOMINGUES; RAMOS, 2008).

O valor desse expoente varia entre 0 e 1. A classificação para a dependência temporal do sistema é: para  $H = 0.5$  o sinal ou processo é aleatório; para  $0 < H < 0.5$ , o sinal é caracterizado como antipersistente, ou seja, existe uma probabilidade maior do que cinquenta por cento de que um valor “negativo” seja seguido de um valor “positivo”; e para  $0.5 < H < 1$ , o sinal é dito persistente, pois apresenta uma tendência, isto é, a probabilidade de repetição de um valor é maior do que cinquenta por cento (SOTERRONI; DOMINGUES; RAMOS, 2008).

Processos autossimilares podem ser usados para descrever o comportamento de sistemas biológicos, geológicos, tráfego de redes, mercado financeiro e séries temporais de precipitação de chuvas (SALOMÃO, RODRIGUES NETO e CAMPANHA, 2008).

Existem diversos estimadores para o parâmetro de Hurst (H), tais como espectro de potência de Fourier, semivariograma, transformada *wavelet*, estatística R/S, entre outros.

A transformada *wavelet* decompõe um sinal no domínio do espaço e do tempo, tornando possível estudar a invariância de escala de processos auto-similares por meio da decomposição realizada na análise multirresolução (SIMONSEN e HANSEN, 1998 *apud* SOTERRONI; DOMINGUES; RAMOS, 2008).

Passoni (2004) propôs a descrição do *speckle* dinâmico com base no estimador de *wavelet* de Hurst. Considerando a caracterização previa do *biospeckle* baseada na função de autocorrelação e sua relação com o coeficiente de Hurst, um estimador baseado em *wavelet* foi proposto como ferramenta de obtenção de características do *speckle* dinâmico.

### 3.4.9 Técnicas de Filtragem Utilizadas para o *Biospeckle*

As técnicas de filtragem para quantificar o *biospeckle* têm sido desenvolvidas utilizando-se a Transformada de Fourier (TF), a Transformada de Fourier Janelada (TFJ) e a Transformada de Wavelets (TW). O uso das Transformadas de Fourier (TF) permite a criação de filtros para a eliminação de determinadas faixas de frequências. Isto é possível calculando-se a Transformada, eliminando-se as faixas de frequência desejadas e realizando-se a Transformada de Fourier inversa. A eliminação das faixas de frequência é feita retirando-se os valores indesejados, normalmente os de alta frequência. No entanto, este processo é limitado, pois não permite trabalhar com partes separadas da imagem (janelas). Para resolver este problema, Galvão *et al.* (2001) cita a Transformada de Fourier Janelada (TFJ), sendo que esta, segundo o autor, consiste em dividir a função em regiões (janelas) e aplicar a TF em cada uma delas.

Segundo Galvão *et al.* (2001), dois fatores afetam a eficiência da TFJ, sendo um deles o efeito de borda causado pela criação das janelas, e o outro, a escolha da largura para a função “janelamento” (Princípio da incerteza de Heisenberg).

Para contornar estes problemas foram introduzidas as **TW**, que permitem criar janelas com tamanho variável, além de suavizar os contornos, permitindo a reconstrução da função original.

#### **3.4.10 Método de Quantificação Baseado na Entropia**

Rodrigues (2007) quantificou a atividade biológica através do *biospeckle* utilizando o princípio da entropia. Em sua tese, ao monitorar um sistema, observou que se a entropia final era maior que a entropia inicial, isso também era visível através da imagem obtida do *biospeckle* do material.

O modelo matemático que descreve a entropia e a associa ao *biospeckle* encontra-se detalhado em Rodrigues (2007).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Considerações Iniciais

Os trabalhos com *biospeckle* foram realizados no Laboratório de Máquinas Agrícolas. Já a preparação das amostras, bem como os ensaios de viabilidade e vigor, foram realizados no Laboratório de Pós-Colheita, todos da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI/UNICAMP). Os procedimentos experimentais podem ser divididos nas seguintes etapas.

- Experimento 1: Avaliação de danos térmicos em sementes através do *biospeckle*.
- Experimento 2: Avaliação da interferência do tegumento na sensibilidade do *biospeckle*.
- Experimento 3: Diferenciação entre sementes germinadas e não germinadas através do *biospeckle*.
- Experimento 4: Determinação da faixa de umidade das sementes para a melhor interação entre o laser e a semente para o *biospeckle*.
- Experimento 5: Avaliação de sementes de ipê-roxo submetidas ao envelhecimento acelerado através do *biospeckle*.

### 4.2 Materiais

Na preparação das amostras e testes de viabilidade e vigor foram utilizados os seguintes materiais: papel toalha, estufa, germinador (**BOD**), sacos plásticos, câmara fria, freezer, balança analítica e sementes de ipê-roxo.

As sementes de ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla*) foram obtidas de 15 árvores matrizes do Núcleo de Produção de Mudas de Pederneiras-SP – DSMM/CATI. Neste local, os frutos, coletados maduros e fechados, foram postos em ambiente sombreado para remoção do excesso de umidade e posterior extração das sementes.

Nos ensaios ópticos foram utilizados: um laser diodo de 632 nm de comprimento de onda (vermelho) e 10 mW de potência, uma câmera filmadora digital SAMSUNG® SC-HMX20C com taxa de aquisição de 60 Hz, um computador tipo **PC** com processador *Quad*

Core com 4 Gb de memória RAM com *softwares* para o processamento das imagens, como SUPER © versão 2009.bld.36, ImageJ versão 1.45b (RASBAND, 2008), os *softwares* estatísticos Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2003) e o R versão 2.12.0 (R Development Core Team, 2010).

### 4.3 Experimentos

#### 4.3.1 Experimento 1: Avaliação de Danos Térmicos em Sementes através do *Biospeckle*

Para avaliar o efeito da temperatura a que foram submetidas as sementes nos valores de Momento de Inércia (MI), obtidos com o *biospeckle*, foi realizado o seguinte procedimento experimental.

Uma amostra de 50 sementes foi submetida a uma imersão em água destilada por 24 horas a fim de atingir estados de maior umidade. Desta, obteve-se duas sub-amostras de 25 sementes cada, que constituíram os tratamentos 1 e 2.

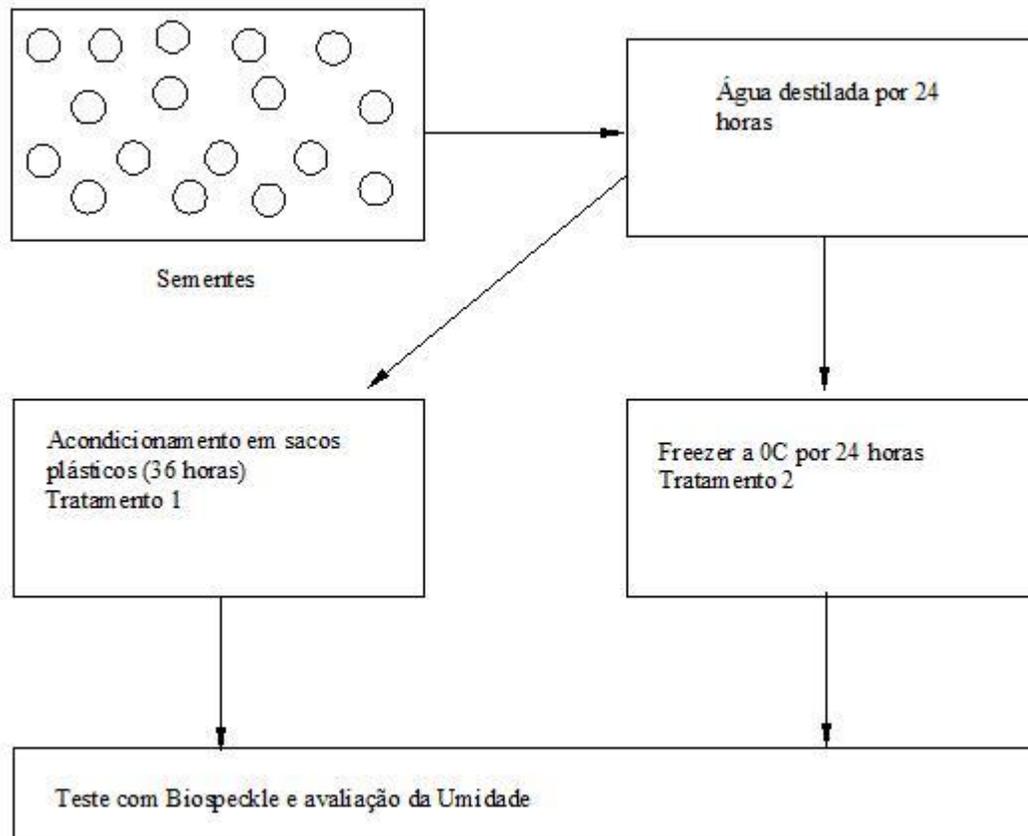
Para o tratamento 1, a sub-amostra foi acondicionada em saco plástico hermeticamente fechado e impermeável à água e armazenada à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 36 horas a fim de se conservar as características físicas e fisiológicas até o início dos ensaios com *biospeckle*.

Já o tratamento 2 foi obtido acondicionando-se a segunda sub-amostra em saco plástico, impermeável à água, e levada ao freezer durante 24 horas para que a baixa temperatura (0°C) do ambiente combinada com o alto teor de água das sementes (69%), proporcionasse a formação de cristais de gelo que danificariam a estrutura celular das sementes. Este mesmo procedimento foi utilizado por Rodrigues *et al.* (2007) para inviabilizar sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

Após o congelamento pelo período de 24 horas, essa amostra foi retirada do freezer e armazenada em câmara fria a 5°C por 12 horas, mantendo-se a mesma embalagem impermeável. Neste período de armazenamento adicional houve o descongelamento das sementes.

Os dois tratamentos foram, então, submetidos ao ensaio com *biospeckle* para obtenção dos valores de MI.

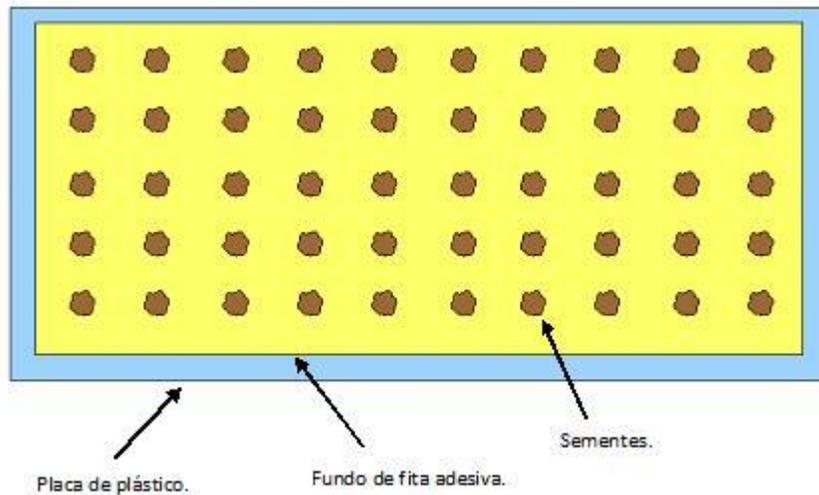
A Figura 12 ilustra as etapas experimentais descritas para o experimento 1.



**Figura 12** – Diagrama representando as etapas do experimento 1

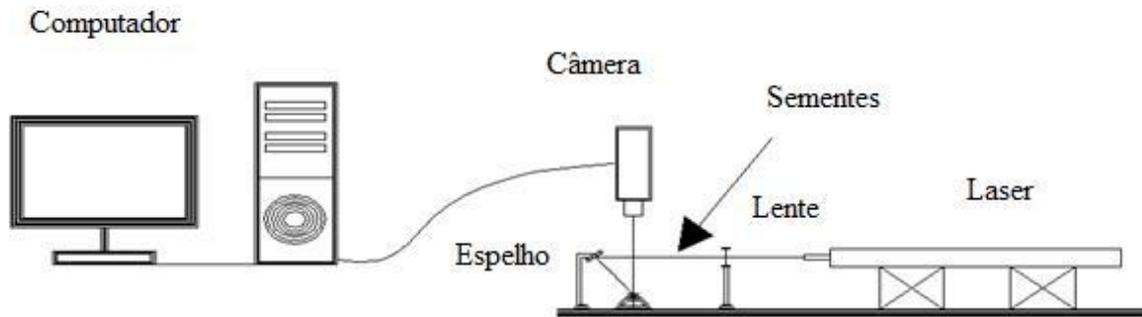
Inicialmente as 25 sementes de cada tratamento foram afixadas em um recipiente plástico retangular para realização do ensaio com *biospeckle*. A Figura 13 ilustra o arranjo e disposição das sementes no recipiente.

As sementes foram iluminadas pelo laser em ordem aleatória, sendo esta ordem obtida por meio de um sorteio prévio. As sementes provenientes do tratamento 1 e as do tratamento 2 passaram pelos mesmos procedimentos experimentais. Durante a iluminação foram feitos filmes de 10 s para cada semente em cada tratamento.



**Figura 13** – Esquema de fixação das sementes na placa para o teste do *biospeckle*

A Figura 14 ilustra a configuração experimental adotada nos ensaios com *biospeckle*. O ângulo de incidência da luz foi de aproximadamente 45 graus.



**Figura 14** – Configuração experimental adotada na captura de imagens para o teste do *biospeckle*

Foi feita segmentação de *frames* sucessivos dos vídeos e assim trabalhou-se com 512 imagens de 640 x 480 *pixels* para cada semente. O processamento das imagens incluiu a conversão das cores para escala 8 bits que pode apresentar 256 níveis de cinza. Posteriormente, com o *software* ImageJ (RASBAND, 2008), foram obtidos os valores de **MI**.

Foram realizadas 5 iluminações com o laser para obtenção dos dados com *biospeckle*, variando-se o grau de umidade das sementes. As imagens foram capturadas inicialmente com as sementes apresentando 69% de água, que foi certificado por teste de umidade em estufa a

130 °C por 2 horas (BRASIL, 2009a). As demais imagens obtidas foram nas umidades descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Umidades das sementes para cada iluminação

Sequência de iluminação	Umidade das sementes (%)
1	69
2	63
3	54
4	35
5	28

Para obtenção destas umidades, as sementes foram expostas à umidade relativa do ar ambiente da cidade de Campinas. A partir do valor inicial obtido em estufa, os demais foram determinados por pesagens em balança de precisão em intervalos de tempo de 3 horas, seguindo-se o cálculo de seu teor de água através das equações:

$$M_S = (1 - U_i)M_T \quad (4-1)$$

$$U_f = \frac{M_T - M_S}{M_T} \quad (4-2)$$

Onde  $M_S$  = massa de matéria seca;

$U_i$  = umidade inicial;

$M_T$  = massa das sementes (obtida na pesagem);

$U_f$  = umidade final.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 25 repetições, num esquema fatorial (2x5), sendo dois tratamentos (sementes não submetidas ao congelamento e sementes submetidas ao congelamento) e cinco níveis de umidade (28, 35, 54, 63 e 69 %). Os valores das variáveis dependentes atenderam aos pressupostos da análise de variância e foram analisados sem transformação. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar 5.3.

As variáveis resposta adotadas foram valores de **MI**. A Tabela 2 exibe o detalhamento dos fatores e níveis estatísticos adotados neste experimento.

**Tabela 2** – Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 1.

<b>Experimento 1 – Avaliação de danos térmicos em sementes através do <i>biospeckle</i></b>			
<b>Fatores</b>	<b>Quantidade de níveis</b>	<b>Valor de cada nível</b>	<b>Código</b>
Dano térmico	2	Sementes não submetidas ao congelamento	1
		Sementes submetidas ao congelamento	2
Umidade das sementes (%)	5	28	1
		35	2
		54	3
		63	4
		69	5

#### **4.3.2 Experimento 2: Avaliação da Interferência do Tegumento na Sensibilidade do *Biospeckle***

Na avaliação da influência do tegumento nos valores de **MI** foram utilizadas 50 sementes. Foram imersas em água destilada, para que o aumento da umidade facilitasse a retirada do tegumento. Destas, 25 tiveram o tegumento removido, constituindo-se o tratamento 1. As sementes que tiveram o tegumento preservado formaram o tratamento 2.

Foi, então, realizado teste com *biospeckle*. O procedimento experimental para o teste com *biospeckle* ocorreu da mesma forma que no experimento 1. As iluminações também foram feitas para os mesmos 5 níveis de umidade descritos na tabela do experimento 1.

As variáveis resposta adotadas foram valores de **MI**.

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado com 25 repetições, num esquema fatorial (2x5). Os valores das variáveis dependentes atenderam aos pressupostos da análise de variância e foram analisados sem transformação. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar 5.3.

A Tabela 3 exibe o detalhamento dos fatores e níveis estatísticos adotados neste experimento.

**Tabela 3** – Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 2.

<b>Experimento 2 – Avaliação da interferência do tegumento na sensibilidade do <i>biospeckle</i></b>			
<b>Fatores</b>	<b>Quantidade de níveis</b>	<b>Valor de cada nível</b>	<b>Código</b>
Presença do tegumento	2	Sementes sem tegumento	1
		Sementes com tegumento	2
Umidade das sementes (%)	5	28	1
		35	2
		54	3
		63	4
		69	5

#### **4.3.3 Experimento 3: Diferenciação entre Sementes Germinadas e não Germinadas através do *Biospeckle***

Neste experimento, 38 sementes foram identificadas e subdivididas em dois tratamentos de 19 sementes. Cada semente foi enumerada e fixada na placa acrílica como descrito no experimento 1. Procedeu-se a iluminação para o teste com *biospeckle*. As imagens foram processadas, conforme descrito também no experimento 1, para obtenção dos valores de **MI**.

Após a iluminação, as respectivas sementes foram avaliadas fisiologicamente pelo teste de germinação. Este foi realizado em rolos de papel mantidos a 25 °C e fotoperíodo de 8 horas. O substrato foi umedecido com volume de água (em ml) equivalente a duas vezes e meia a sua massa (em gramas). As avaliações foram realizadas a cada sete dias até completar 28 dias, considerando-se germinadas as sementes com protrusão de radícula igual ou superior a 2,0 mm e curvatura geotrópica positiva (LABOURIAU, 1983 *apud* BORBA FILHO, 2006). O conceito de germinação empregado foi o botânico.

O tratamento 1 foi referente às 19 sementes germinadas e o tratamento 2 foi constituído pelas 19 sementes que não germinaram durante a realização do teste de germinação.

As variáveis resposta adotadas foram valores de **MI**.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 19 repetições, num esquema fatorial (2x6). Os valores das variáveis dependentes atenderam aos pressupostos da análise de variância e foram analisados sem transformação. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar 5.3.

A Tabela 4 exibe o detalhamento dos fatores e níveis estatísticos adotados neste experimento.

**Tabela 4** – Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 3.

<b>Experimento 3 – Diferenciação entre sementes germinadas e não germinadas através do biospeckle</b>			
<b>Fatores</b>	<b>Quantidade de níveis</b>	<b>Valor de cada nível</b>	<b>Código</b>
Vitalidade do tecido biológico	2	Sementes germinadas	1
		Sementes não germinadas	2
Umidade das sementes (%)	6	20	1
		28	2
		35	3
		54	4
		63	5
		69	6

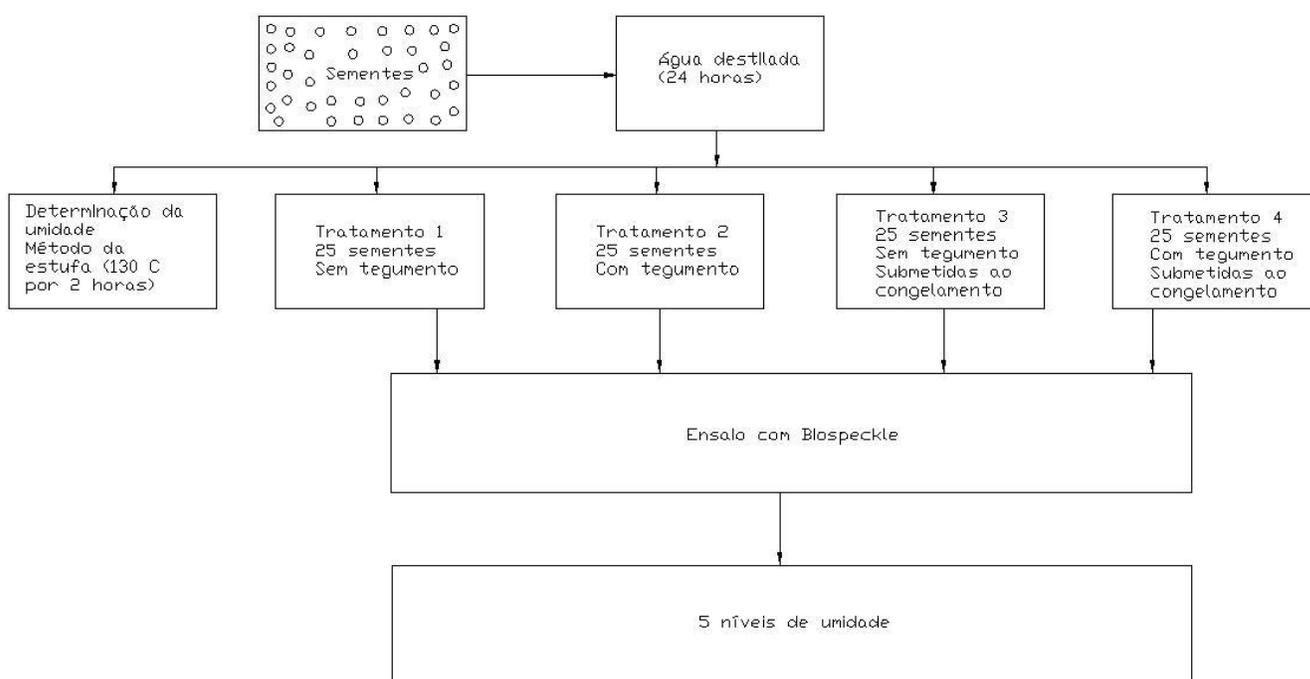
#### **4.3.4 Experimento 4: Determinação da Faixa de Umidade das Sementes para a Melhor Interação entre o Laser e a Semente para o Biospeckle**

Para caracterizar a faixa de umidade adequada para a melhor interação entre o laser e a semente de ipê-roxo, uma amostra de 100 sementes foi submetida a uma imersão em água destilada por 24 horas a fim de se elevar a umidade.

Obteve-se quatro sub-amostras, que compuseram 4 tratamentos: 1 - formado por 25 sementes que tiveram seus tegumentos removidos; 2 - referente a 25 sementes que tiveram seus tegumentos preservados; 3 - 25 sementes com tegumento removido e submetidas a uma baixa temperatura (0 °C) por 12 horas; 4 - composto por 25 sementes com tegumento, mas também submetidas a 0 °C por 12 horas.

A umidade inicial das sub-amostras foi medida em estufa a  $130\pm 3$  °C por 2 horas (BRASIL, 2009a) e a partir desse valor foram obtidas as demais por pesagens em balança de precisão em intervalos de tempo de três horas, como descrito no experimento 1.

Para todos os tratamentos foi realizado teste com *biospeckle*. O procedimento e a configuração experimental foram os mesmos realizados no Experimento 1. Para cada intervalo de tempo que correspondia a uma umidade diferente, os procedimentos da pesagem das sementes e a iluminação com laser foram repetidos para obtenção dos valores de **MI** para as 25 repetições dos 4 tratamentos até que se obtivesse 5 níveis de umidade (Figura 15).



**Figura 15** – Diagrama representando as etapas do experimento 4

O recipiente foi pesado antes de afixar as sementes e após sua fixação. As sementes provenientes dos tratamentos 1, 2, 3 e 4 passaram pelos mesmos procedimentos experimentais nos ensaios ópticos. Após a iluminação, as imagens capturadas foram processadas também como no experimento 1 e foram obtidos os valores de **MI** para cada semente.

Após a primeira iluminação, que foi à umidade mais elevada, as placas contendo as sementes dos tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram expostas ao ar ambiente para que ocorresse a diminuição da umidade por evaporação da água contida nas sementes. A perda de água foi monitorada através de pesagens em intervalos de tempo de três horas.

O objetivo foi obter 5 níveis de umidade (Tabela 1) para obtenção de resultados para diversas umidades.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 25 repetições, num esquema fatorial (4x5), sendo quatro tratamentos (sementes não submetidas ao congelamento, sementes submetidas ao congelamento, sementes sem e com tegumento) e cinco níveis de umidade (28, 35, 54, 63 e 69 %). Os valores das variáveis dependentes atenderam aos pressupostos da análise de variância e foram analisados sem transformação. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar 5.3.

As variáveis resposta adotadas foram valores de **MI**. A Tabela 5 exhibe o detalhamento dos fatores e níveis estatísticos adotados neste experimento.

**Tabela 5** – Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 4

<b>Experimento 4 – Determinação da faixa de umidade das sementes para a melhor interação entre o laser e a semente para o <i>biospeckle</i></b>			
<b>Fatores</b>	<b>Quantidade de níveis</b>	<b>Valor de cada nível - Tratamentos</b>	<b>Código</b>
Danos no tecido vegetal e influência do tegumento.	4	Sementes sem tegumento	1
		Sementes com tegumento	2
		Sementes sem tegumento e submetidas ao congelamento	3
		Sementes com tegumento e submetidas ao congelamento	4
Umidade das sementes (%)	5	28	1
		35	2
		54	3
		63	4
		69	5

#### **4.3.5 Experimento 5: Avaliação de Sementes de Ipê-roxo Submetidas ao Envelhecimento Acelerado através do *Biospeckle***

Nesta etapa, foi utilizada uma amostra de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla*) com 100% de germinação inicial, que foi avaliada por um teste de germinação interpretado segundo o conceito botânico de germinação. O teor de água das sementes

utilizado durante este ensaio experimental foi aquele cujos valores de **MI** encontrados no experimento 4 apresentaram menores coeficientes de variação para a diferenciação entre os 4 tratamentos. Dessa forma, a umidade das sementes neste experimento variou entre 28 e 54 %. O teste de *biospeckle* foi realizado no momento inicial (tempo 0) e em intervalos de tempo regulares de 24 horas (tempos 1, 2, 3...) até que as sementes apresentassem queda significativa no potencial germinativo.

Para garantir a diminuição do potencial germinativo das sementes em um intervalo de tempo relativamente curto, as sementes foram submetidas ao envelhecimento acelerado.

Para realização do envelhecimento acelerado, as sementes foram dispostas em caixas de plástico transparente (gerbox) como compartimentos hermeticamente fechados. No interior de cada gerbox havia uma bandeja com tela metálica onde as sementes foram distribuídas. Sob a tela foram adicionados 40 ml de água destilada para garantir elevada umidade relativa do ar (100%) no interior dos gerbox.

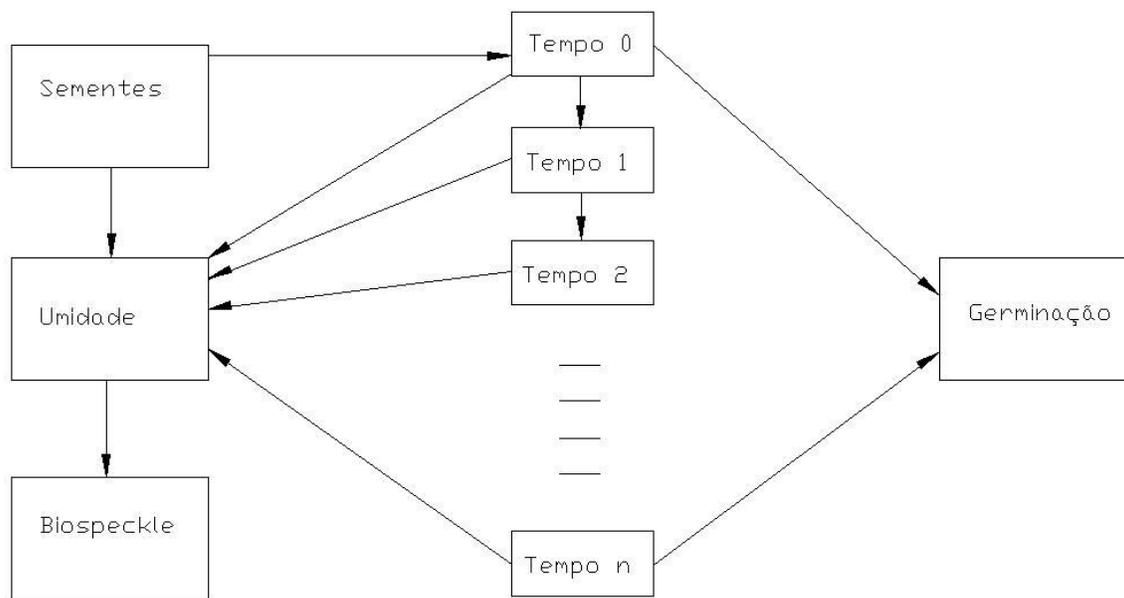
Neste trabalho, as caixas devidamente tampadas foram, então, mantidas em câmara climática Modelo 346 FANEM® sob temperatura de 42° C, por períodos de: 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

No momento inicial foi determinada a umidade das sementes em estufa, 130° C por 2 horas, bem como sua porcentagem de germinação e avaliação com *biospeckle*.

Decorridos os períodos de permanência na câmara, foi determinada a umidade das sementes para garantia de que estivesse dentro da faixa adequada, obtida do experimento 4 e realizados testes com *biospeckle*.

Para a realização do teste com *biospeckle*, foram retiradas amostras aleatórias da amostra de sementes submetidas ao envelhecimento acelerado. Em seguida foi feita a iluminação com o laser e a aquisição dos dados. A configuração experimental para o *biospeckle* foi a mesma adotada no Experimento 1. Após a obtenção dos dados as mesmas sementes foram submetidas ao teste de germinação ao final do envelhecimento acelerado.

O teste de germinação permitiu verificar a variação do potencial germinativo das sementes ao longo do tempo e sua comparação com os valores de **MI**, através do *software* R já referenciado. A Figura 16 apresenta um diagrama que ilustra as etapas experimentais para o experimento 5.



**Figura 16** – Diagrama representando as etapas do experimento 5

Os testes para avaliação da qualidade fisiológica das sementes para os períodos inicial e final do envelhecimento acelerado foram realizados da seguinte maneira:

- **Teste de Germinação:** realizado utilizando-se 30 sementes (3 repetições de 10 sementes) na forma entre papel formando rolos mantidos a 25°C e fotoperíodo de 8 horas. O substrato foi umedecido com volume de água destilada equivalente a duas vezes e meia a sua massa seca. As avaliações foram realizadas a cada sete dias até completar 28 dias, considerando-se germinadas as sementes com protrusão de radícula igual ou superior a 2,0 mm e curvatura geotrópica positiva (LABOURIAU, 1983 *apud* BORBA FILHO, 2006). A partir desses dados foram calculados os valores de porcentagem de germinação. O conceito de germinação empregado foi o botânico.
- **Determinação do Grau de Umidade:** feito em estufa para umidade, marca Nova Ética, à temperatura de 130±3°C por 2 horas (BRASIL, 2009a) com três amostras de 1 g cada. Foi realizado para cada período de envelhecimento. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem.

As variáveis resposta adotadas foram valores de **MI** e porcentagem de germinação. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 30 repetições para o *biospeckle*, num

esquema fatorial (1x5). Os valores das variáveis dependentes atenderam aos pressupostos da análise de variância e foram analisados sem transformação. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar 5.3.

A Tabela 6 exibe o detalhamento dos fatores e níveis estatísticos adotados neste experimento.

**Tabela 6** – Fatores, níveis e valor de cada nível adotado ao experimento 5

<b>Experimento 5 – Avaliação de sementes de ipê-roxo submetidas ao envelhecimento acelerado através do <i>biospeckle</i></b>				
<b>Fatores</b>	<b>Quantidade de níveis</b>	<b>Valor de cada nível</b>	<b>Código</b>	<b>Número de Repetições</b>
Períodos de envelhecimento	5	tempo 0 – 24 horas	1	30
		tempo 1 – 48 horas	2	30
		tempo 2 – 72 horas	3	30
		tempo 3 – 96 horas	4	30
		tempo 4 – 120 horas	5	30

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

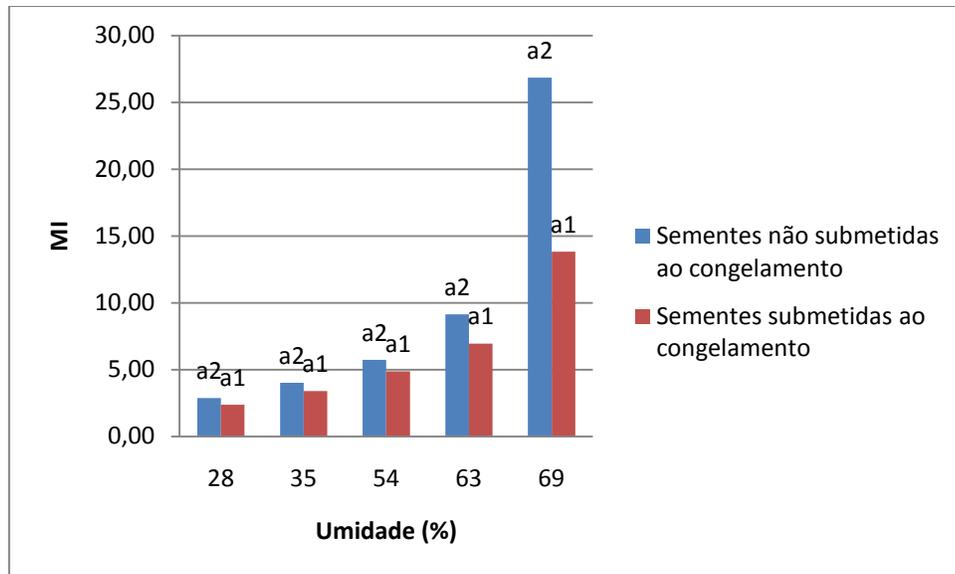
### 5.1 Experimento 1: Avaliação de Danos Térmicos em Sementes através do *Biospeckle*

Para a análise dos dados obtidos neste experimento, foi utilizada uma análise de variância seguida por um teste de Tukey a 5% de probabilidade (Figura 17). Esta análise foi realizada para as sementes submetidas ao congelamento a 0 °C e para as sementes não submetidas ao congelamento. Pela análise do nível de significância ( $\alpha$ ), pode-se verificar que todos os tratamentos foram significativos.

Pode ser visto também na Figura 17 que para todas as umidades das sementes foi possível diferenciar os tratamentos, que são: tratamento 1, sementes não submetidas ao congelamento e tratamento 2, sementes submetidas ao congelamento a 0 °C por 12 horas.

A média dos valores de Momento de Inércia (**MI**) obtidos para as sementes do tratamento 1 foi acima dos valores obtidos para as sementes submetidas ao congelamento (tratamento 2). Isto se deve ao fato de que no tratamento 1 estão as sementes com alta vitalidade e apresentam atividade metabólica de um tecido vegetal vivo e em boas condições. Já as sementes do tratamento 2 apresentavam danos devidos à baixa temperatura e alta umidade, que ocasionaram desestruturação celular pela formação de cristais de gelo. Este fato refletiu nos valores de **MI**, indicando tecidos biológicos com baixa atividade metabólica no tratamento 2 e menores valores de **MI**.

É possível visualizar na Figura 17 os valores de **MI** para os dois tratamentos estudados em função dos valores de umidade, podendo-se notar a diferenciação estatística.



**Figura 17** – Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No Apêndice A encontra-se tabelado o resumo dos resultados de Análise de Variância e Teste de Tukey para as médias dos valores de **MI** para os tratamentos 1 e 2.

Vidal e Silva (2008) avaliaram sementes de soja e milho através do *biospeckle* e os dados foram obtidos através dos métodos de Fujii e das Diferenças Generalizadas. Foram feitas comparações entre sementes com alta atividade biológica e sementes com baixa atividade biológica, após serem submetidas à temperatura de secagem de 70 °C por aproximadamente uma hora. Este processo causou redução da atividade metabólica das sementes e danos em seus embriões. Como resultado, os autores evidenciaram o potencial do *biospeckle* na diferenciação de sementes de boa qualidade e sementes danificadas por alta temperatura.

Rodrigues *et al.* (2005, 2007) obtiveram que a média dos valores de **MI** das sementes vivas foi maior que a das sementes submetidas ao congelamento. Portanto, as menores médias obtidas para o tratamento 2, nas umidades avaliadas, estão de acordo com a literatura.

Os dados obtidos são de fundamental importância para uma melhor eficiência de aplicação da técnica do *biospeckle* em sementes de ipê, pois indicam a possibilidade de se diferenciar as sementes que sofreram danos por temperatura através de uma técnica óptica não invasiva e não destrutiva.

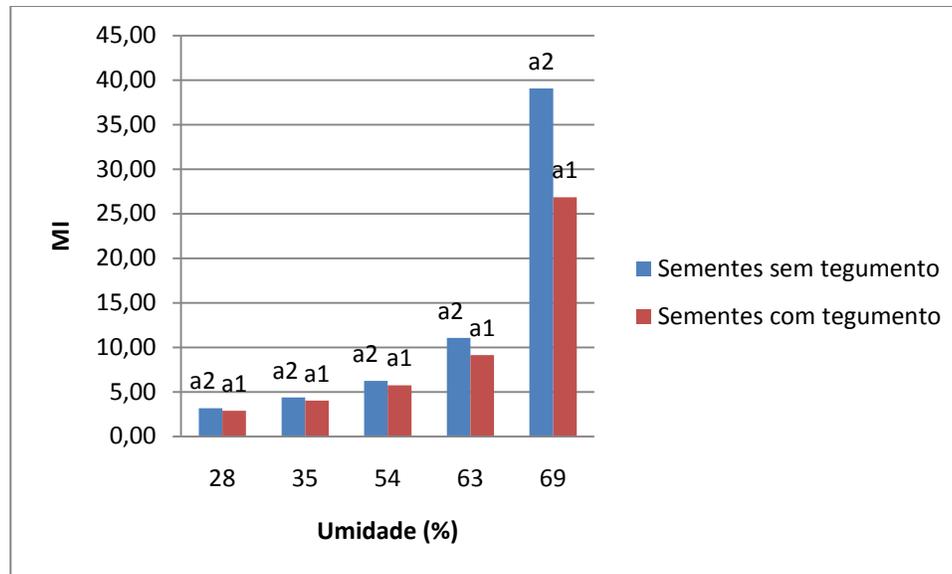
## 5.2 Experimento 2: Avaliação da Interferência do Tegumento na Sensibilidade do *Biospeckle*

Como pode ser visto na Figura 18, as médias dos valores de **MI** das sementes sem tegumento foram maiores que as que estavam com tegumento, já que as sementes iluminadas sem tegumento apresentavam maior atividade celular, onde foram iluminados os endospermas com o laser. Outros fatores que influenciaram os valores de **MI** foram as diferentes propriedades ópticas entre estes tecidos biológicos, que proporcionaram mudanças na absorção e na reflexão da luz ao interagir com estes materiais.

O endosperma, após absorver água, é um tecido de reserva onde ocorrem reações bioquímicas como respiração celular, com ativação das mitocôndrias e no caso de *Tabebuia heptaphylla*, iniciam-se atividades dos cloroplastos. Ocorre também a síntese de proteínas e após certo tempo do início da absorção de água, há diminuição de amido para fornecimento de energia para o início do desenvolvimento da plântula. Todas essas reações representam movimentações no citoplasma, que são registradas através do *biospeckle* e fornecem uma quantificação de Momento de Inércia (**MI**) maior que aquela registrada pela iluminação do tegumento.

Já o tegumento representa uma região de menor atividade biológica, sendo um tecido de revestimento constituído por lignina, sem ocorrência de reações bioquímicas. O tegumento apresenta permeabilidade seletiva e é através de suas células que água e algumas substâncias químicas penetram no interior da semente.

Na Figura 18 também pode ser visto o resultado da análise de variância, na qual os dois tratamentos foram diferenciados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade em todas as umidades das sementes avaliadas.



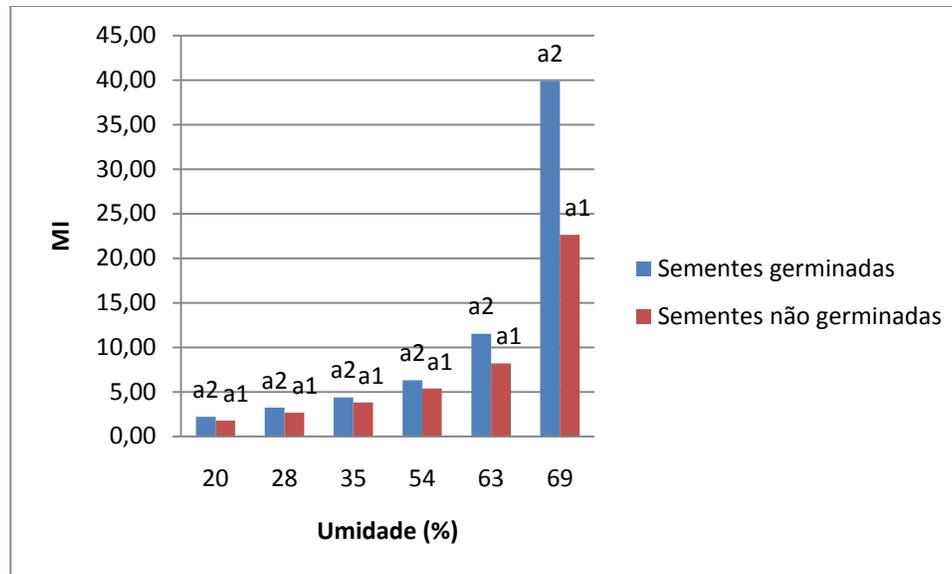
**Figura 18** – Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O resumo dos resultados estatísticos (Análise de Variância e Teste de Tukey) e as médias dos valores de **MI** podem ser observados tabelados no Apêndice B.

### 5.3 Experimento 3: Diferenciação entre Sementes Germinadas e não Germinadas através do *Biospeckle*

As sementes, após serem avaliadas pelo *biospeckle*, foram postas para germinar. O conceito de germinação empregado foi o botânico.

A análise dos dados obtidos neste experimento também foi realizada por uma análise de variância seguida por um teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme a literatura. Este procedimento foi realizado para os dois tratamentos aqui avaliados: tratamento 1 – 19 sementes germinadas e tratamento 2 – 19 sementes não germinadas. A partir da análise do nível de significância ( $\alpha$ ), verificou-se que a diferenciação entre os tratamentos foi significativa, como pode ser observado na Figura 19 e no Apêndice C.

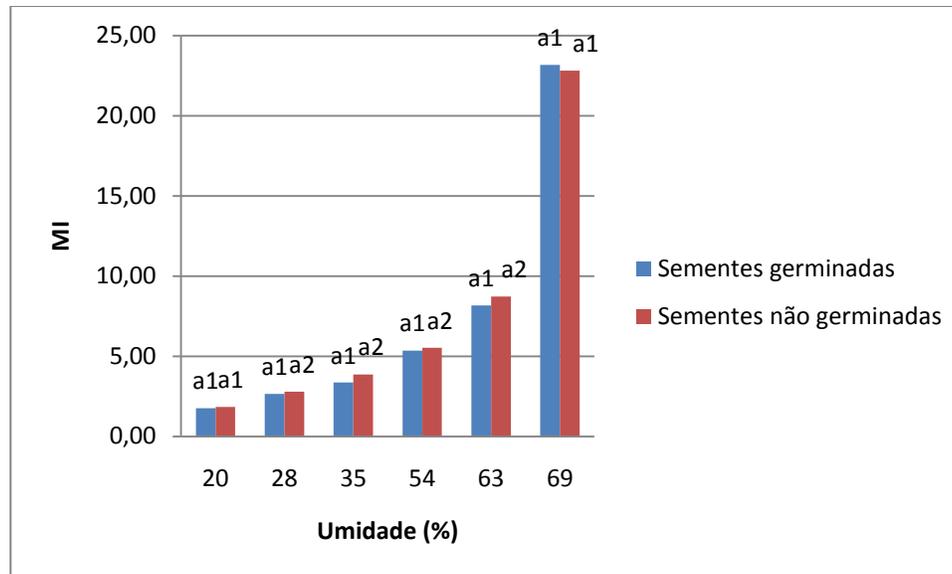


**Figura 19** – Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores de **MI** estão diretamente relacionados com a atividade biológica do tecido vegetal. As sementes sem tegumento germinadas apresentaram valores médios de **MI** maiores que as sementes sem tegumento não germinadas, já que sementes em bom estado e com alto vigor apresentam mais atividade metabólica que sementes com baixo potencial germinativo.

Na Figura 20 encontram-se resultados referentes à avaliação de sementes com tegumento, que posteriormente ao teste com *biospeckle* foram postas para germinar. O tratamento 2 é formado pelas sementes germinadas e o tratamento 4 é formado pelas sementes não germinadas. Estes resultados também podem ser observados em tabela no Apêndice D.

As sementes com tegumento germinadas e não germinadas nas umidades 20 e 69 % não foram diferenciadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (nível de significância de 0,05) (Figura 20).



**Figura 20** – Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para as umidades 28, 35, 54 e 63% as sementes não germinadas com tegumento apresentaram média dos valores de **MI** maiores que as germinadas.

Uma vez que o *biospeckle* fornece informações a respeito do tecido vegetal e a quantificação dessa informação pelo cálculo do **MI** é maior quanto maior é a atividade biológica do tecido, pode-se dizer que as sementes germinadas deveriam ter apresentado maiores valores de **MI**. As sementes vigorosas apresentam maior atividade biológica que sementes não vigorosas. Se as sementes com tegumento não germinadas apresentaram maiores valores de **MI**, é provável, embora não tenha sido avaliado, que a atividade biológica registrada pelo *biospeckle* seja devida à presença de microrganismos no tegumento, que contribuíram para o aumento dos valores de **MI** nas sementes não germinadas.

Nas sementes sem o tegumento, foi possível avaliar com o *biospeckle* apenas a vitalidade do tecido biológico.

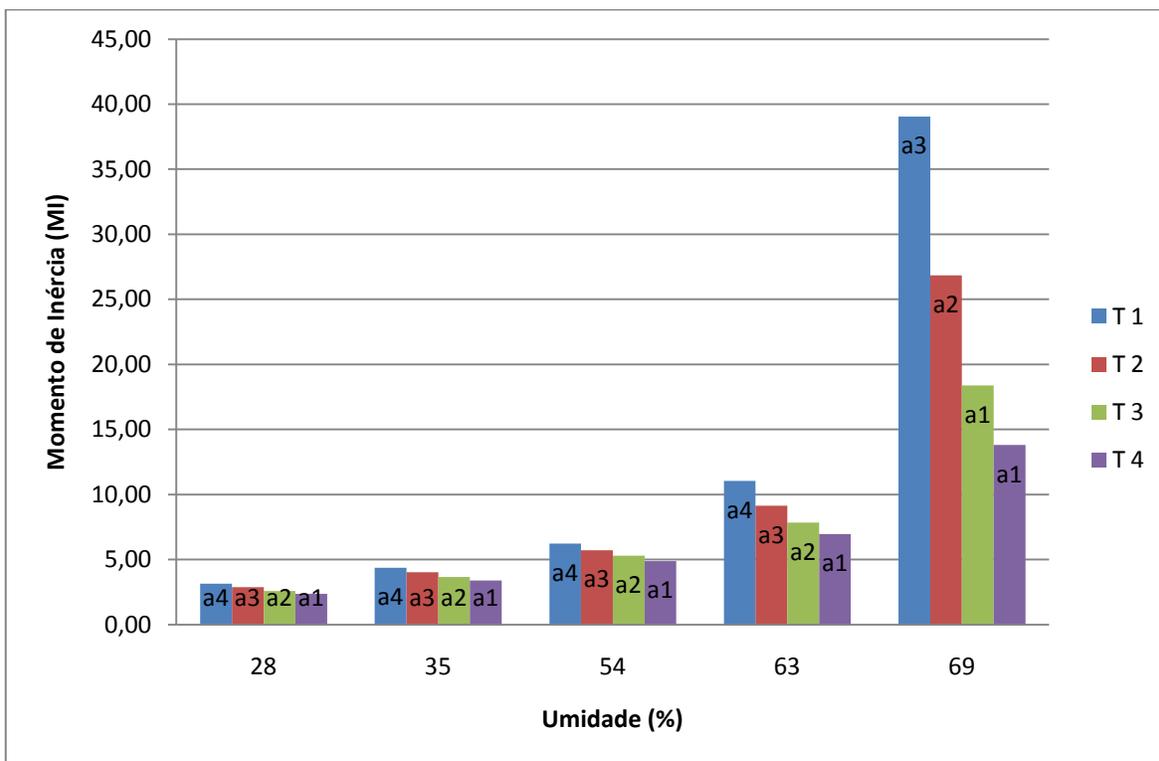
Dessa forma, a presença do tegumento nas avaliações impediu que se observasse a atividade metabólica relacionada com a vitalidade da semente, influenciando nas avaliações com o *biospeckle*.

Como pode ser observado, através das Figura 19 e Figura 20, as sementes avaliadas sem tegumento exibiram resultado de valores de **MI** maiores para as sementes germinadas.

#### 5.4 Experimento 4: Determinação da Faixa de Umidade das Sementes para a Melhor Interação entre o Laser e a Semente para o *Biospeckle*

A análise de variância dos valores de **MI**, obtidos das sementes de *Tabebuia heptaphylla*, apresentou diferença significativa entre os fatores sementes com e sem tegumento e sementes submetidas ao congelamento e não submetidas para a variável Momento de Inércia.

Dessa forma pode-se dizer que o método foi eficiente na diferenciação dos 4 tratamentos, exceto para a umidade de 69% na qual os tratamentos 3 e 4 apresentaram médias estatisticamente iguais (Figura 21). Os valores das médias de **MI** e maiores detalhes estatísticos encontram-se no Apêndice E.



**Figura 21** – Médias dos valores de MI para cada tratamento nas umidades estudadas. Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade das sementes, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. T 1: sementes sem tegumento; T 2: sementes com tegumento; T 3: sementes sem tegumento submetidas ao congelamento a 0°C; T 4: sementes com tegumento submetidas ao congelamento a 0°C.

Pela análise do nível de significância ( $\alpha$ ) e pelo coeficiente de variação (**CV**), é possível verificar que a faixa de umidade mais adequada está entre 28 e 54% para as medições com *biospeckle*.

**Tabela 7** - Coeficiente de Variação (**CV**) e Nível de Significância das Análises de Variância dos valores de Momento de Inércia (**MI**) apresentados na Figura 20

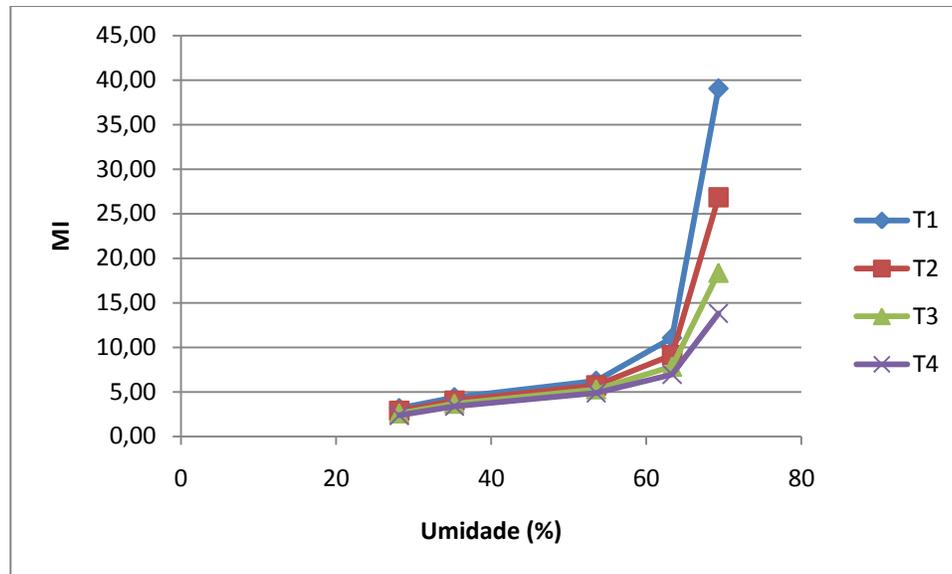
Umidade %	CV %	Nível de Significância
28	5,12	0,0001
35	5,12	0,0001
54	5,35	0,0001
63	9,67	0,0001
69	25,86	0,0001

Rabelo (2000) trabalhou *set up* com umidade monitorada a fim de reduzir o efeito da umidade no ensaio.

As sementes que estavam à maior umidade podem ter os valores de **MI** influenciados pela evaporação, visto que houve um gradiente de pressão de vapor entre a umidade relativa do ar ambiente e a umidade das sementes, propiciando a evaporação. O efeito da umidade nos valores de **MI** já foi estudado anteriormente sendo comprovado o seu efeito no sentido de aumentar os valores de **MI**. Braga Júnior (2000) avaliou o efeito da evaporação em sementes iluminadas recobrando-as com um filme de **PVC** a fim de evitar a evaporação. Em seus resultados, observou que quanto maior a umidade, maiores eram os valores de **MI** para as sementes sem filme. Já com filme, os valores de **MI** foram estabilizados, o que evidenciou o efeito da evaporação.

Os dados obtidos são de fundamental importância para uma melhor eficiência de aplicação da técnica do *biospeckle* em sementes de ipê, pois permitem caracterizar a faixa de umidade mais adequada para a realização de experimentos. Foi a partir dos dados obtidos neste experimento que se definiu a faixa de umidade utilizada no experimento 5.

Os valores de **MI** são função da Umidade, como já estudado por Braga Júnior (2000). Quanto maior a Umidade, maiores são os valores de **MI**. Dessa forma, na Figura 22, as médias dos valores de **MI** foram representadas no eixo das ordenadas e as Umidades, no eixo das abscissas, para cada tratamento avaliado.



**Figura 22** – Médias dos valores de MI para cada valor de umidade de cada tratamento. T 1: sementes sem tegumento; T 2: sementes com tegumento; T 3: sementes sem tegumento submetidas ao congelamento a 0°C; T 4: sementes com tegumento submetidas ao congelamento a 0°C.

Foi então realizado um estudo de correlação entre esses dois valores através da função lm do *software* R. Foi possível ajustar um modelo linear entre Umidade e valores de **MI** de cada um dos tratamentos até a umidade de 63%. Em seguida, foi feita a Análise de Variância e o teste de Pearson para verificar a significância da correlação.

A correlação entre Umidade e os valores de **MI** para cada Tratamento, o nível de significância,  $R^2$ , p-valor e equação da reta de regressão estão na Tabela 8.

**Tabela 8** – Resultado da Correlação entre Umidade e Média dos Valores de Momento de Inércia (MI)

Tratamento	Nível de significância (%)	Coefficiente de correlação	$R^2$	p-valor	Equação da reta de regressão
1	10	0,9305	0,8658	0,06950	$Y=4,362X+17,947$
2	5	0,9528	0,9078	0,04723	$Y=5,686X+14,096$
3	5	0,9698	0,9404	0,03024	$Y=6,919X+11,494$
4	5	0,9767	0,9540	0,02327	$Y=7,973X+9,957$

Nas equações da reta de regressão, em Y estão representados os valores de umidade e em X os valores de **MI**.

Nota-se pelo valor do  $R^2$  (coeficiente de determinação) que para o tratamento 4 a correlação entre os valores de **MI** e a umidade das sementes obtida experimentalmente foi mais próxima do ajuste linear proposto pelo modelo. O tratamento 4 corresponde às sementes com tegumento submetidas ao congelamento a 0°C.

O coeficiente de correlação entre as respostas observadas e os valores previstos pelo modelo também foi maior para o tratamento 4. O menor valor foi obtido para o tratamento 1, que corresponde às sementes sem tegumento.

Obteve-se uma correlação linear e positiva entre os valores de **MI** e os valores de teor de água da semente de ipê, como pode ser visto na Tabela 8. O teor de água está diretamente relacionado aos valores de **MI**, conforme demonstram os resultados de Rodrigues *et al.* (2007). Porém a correlação foi linear e positiva até a umidade de 63%, sendo que a partir deste valor de umidade das sementes, o ajuste passou a se comportar de forma não linear.

### **5.5 Experimento 5: Avaliação de Sementes de Ipê-roxo Submetidas ao Envelhecimento Acelerado através do *Biospeckle***

Neste experimento as sementes foram submetidas ao envelhecimento acelerado sob temperatura de 42 °C, por períodos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. As sementes foram avaliadas pelo *biospeckle* e teste de germinação, cujo conceito empregado foi o botânico. As umidades das sementes em cada período também foram monitoradas.

As sementes submetidas às avaliações com o *biospeckle* e posteriormente ao teste de germinação passaram por uma triagem manual para seleção das sementes de maior tamanho, de mesma cor e de melhor estado de conservação. Foram retirados os tegumentos, tendo-se em vista os resultados dos experimentos 2 e 3 que indicaram resultados mais condizentes com a literatura quando se obteve valores de **MI** iluminando-se os endospermas com o laser. Selecionaram-se para a iluminação as sementes que apresentavam endospermas maiores e de coloração uniforme e clara. Isto garantiu homogeneidade e alta taxa de germinação inicial.

Borba Filho (2006) observou redução do vigor de sementes de *T. roseo-alba* submetidas ao envelhecimento acelerado a 40 e 45°C por períodos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas através de análise da velocidade de emergência de plântulas e porcentagem de plântulas normais.

Os resultados das sementes avaliadas através do *biospeckle* são condizentes com os de Borba Filho (2006), uma vez que os valores de **MI** foram reduzidos ao longo dos períodos de envelhecimento, indicando redução de vigor.

A Tabela 9 contém resultados da análise de variância para o fator períodos de envelhecimento acelerado, 30 repetições e característica avaliada, valores de **MI**.

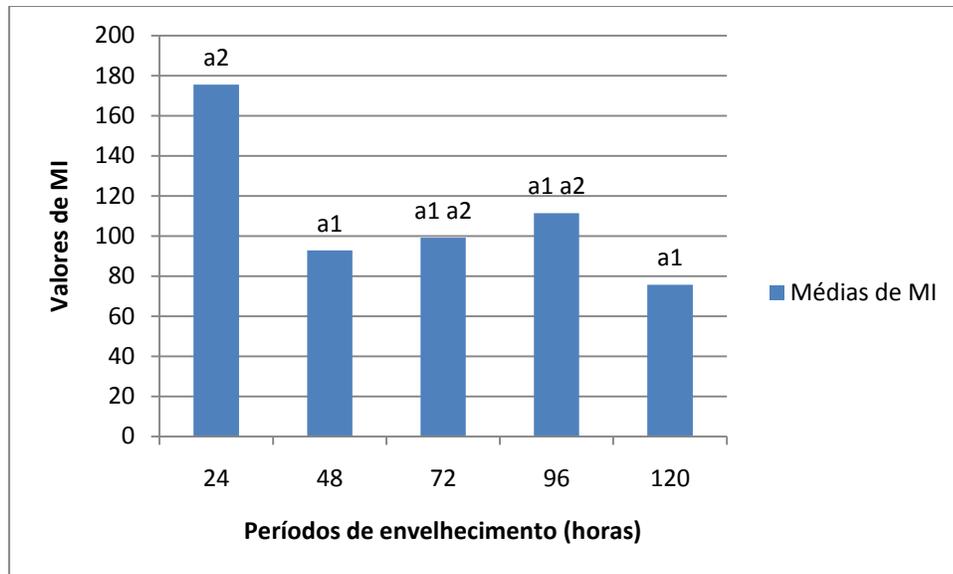
**Tabela 9** - Análise de Variância para o Fator Períodos de Envelhecimento Acelerado, 30 Repetições e Característica Avaliada, valores de **MI**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ENVELHECIMENTO	4	176561	44140,25	3,352	0,0123
REPETICAO	29	1131775	39026,72	2,964	0
Erro	116	1527553	13168,56		
Total corrigido	149	2835889			
CV (%) =	103,47				
Média geral:	110,9011	Número de observações:			150

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; SQ: Soma de Quadrados, feita pela soma dos quadrados das diferenças entre cada observação e a média geral do experimento; QM: Quadrados Médios, obtidos pela razão entre a Soma de Quadrados e o número de Graus de Liberdade; Fc: Valor de f calculado; Pr>Fc: Nível de significância; CV: Coeficiente de Variação.

A análise de variância dos resultados dos valores de **MI** com sementes de *Tabebuia heptaphylla* submetidas ao envelhecimento acelerado apresentou diferença significativa entre o fator períodos de envelhecimento para a variável **MI**.

Na Figura 23 podem-se visualizar as médias dos valores de **MI** bem como o resultado do teste de Tukey a 5% de probabilidade, obtidos para cada período de envelhecimento acelerado de sementes de *T. heptaphylla*. A média dos valores de **MI** do período de 24 horas foi maior, indicando que no início as sementes apresentavam maior vigor que no momento final do envelhecimento (120 horas).



**Figura 23** – Comportamento dos valores de Momento de Inércia (MI) de 30 sementes em função do período de envelhecimento de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Médias seguidas pela mesma letra e número não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando-se os valores de **MI** obtidos no período inicial (24 h) com os valores obtidos nos períodos de 48 e 120 h, pode-se observar uma diminuição das médias (Figura 23). Nota-se, no entanto, que houve um aumento nos valores de **MI** nos períodos de 72 e 96 h.

Os valores de umidade das sementes obtidos para cada período de envelhecimento foram também analisados por meio de análise de variância seguida por teste de Tukey (Tabela 10).

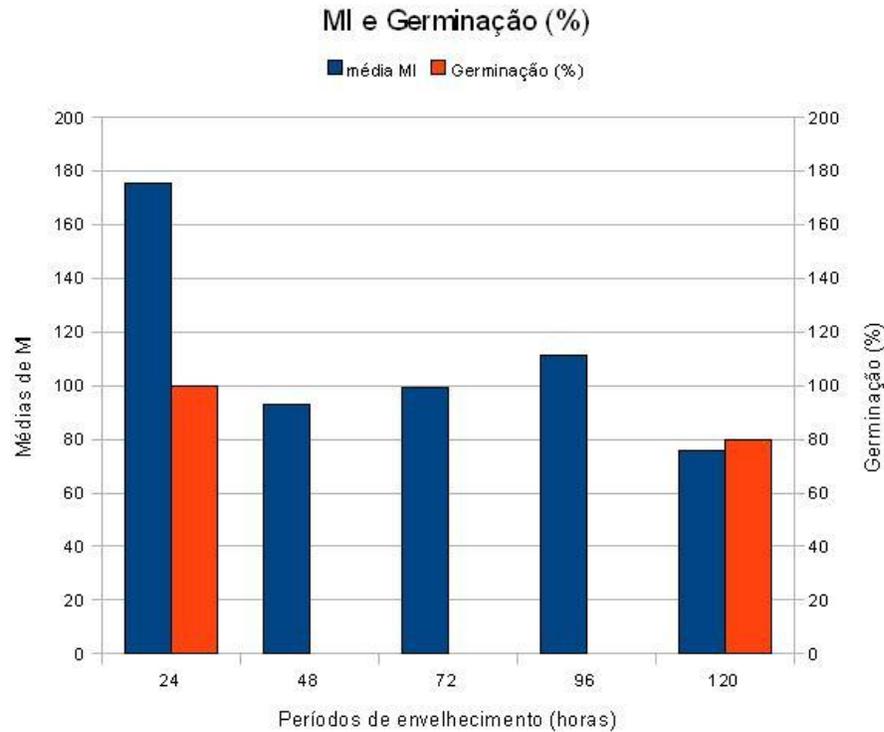
**Tabela 10** - Teste de Tukey\* para as Médias das Umidades das Sementes Submetidas ao Envelhecimento Acelerado. Número de Observações: 15. Média harmônica do número de repetições (r): 3. DMS: 15,32. NMS: 0,05. Média geral: 45

Período de envelhecimento (horas)	Umidade (%)
24	41 a1
48	42 a1
72	47 a1
96	44 a1
120	51 a1
CV (%) =	12,04

\*Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: Diferença Mínima Significativa; NMS: Número Mínimo Significativo; CV: Coeficiente de Variação.

A partir dos dados apresentados na Tabela 10 é possível verificar que as umidades não apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% e variaram dentro da faixa de umidade adequada ao *biospeckle* na interação entre o laser e as sementes de ipê, obtida a partir do experimento 4, que está entre 28 e 54 %.

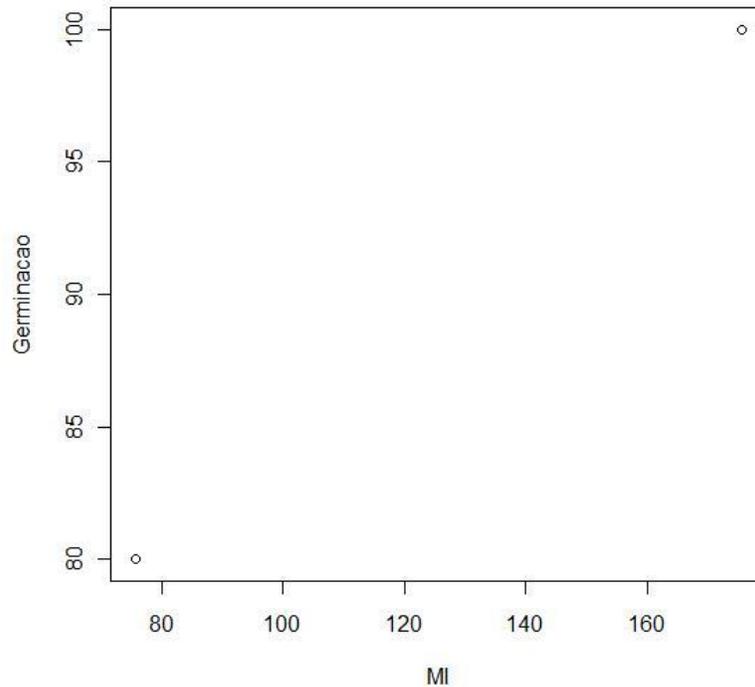
Na análise do experimento 5, os valores de **MI** foram dispostos graficamente em função dos períodos de envelhecimento (Figura 24).



**Figura 24** – Resultado do teste de germinação e dos valores de MI de sementes de *Tabebuia heptaphylla* submetidas ao envelhecimento acelerado a 42 °C durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas

Os valores de **MI** foram também comparados com os resultados do teste de germinação para os períodos inicial e final do envelhecimento acelerado. Os valores de **MI** e os percentuais de germinação das sementes nos períodos de 24 e 120 horas foram diretamente proporcionais. (Figura 25)

A Figura 25 ilustra os valores de **MI** e a porcentagem de germinação das sementes de ipê. Quanto maior a porcentagem de germinação, maiores foram os valores de **MI**.



**Figura 25** – Representação dos valores de MI e porcentagem de germinação das sementes de ipê-roxo nos momentos inicial (24 h) e final (120 h) do envelhecimento acelerado

Já a Análise de Variância do teste de germinação não apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Tabela 11 e Tabela 12).

**Tabela 11** – Análise de Variância do teste de Germinação para os Períodos Inicial (24 h) e Final (120 h) do Envelhecimento Acelerado

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	1	600	600	4	0,1835
REPETICAO	2	300	150	1	0,5000
Erro	2	300	150		
Total corrigido	5	1.200			
CV (%) =	13,61				
Média geral:	90	Número de observações:		6	

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; SQ: Soma de Quadrados, feita pela soma dos quadrados das diferenças entre cada observação e a média geral do experimento; QM: Quadrados Médios, obtidos pela razão entre a Soma de Quadrados e o número de Graus de Liberdade; Fc: Valor de f calculado; Pr>Fc: Nível de significância; CV: Coeficiente de Variação.

**Tabela 12**– Teste de Tukey para as Médias de Germinação (G) nos Períodos de Envelhecimento. DMS: 43,0265; NMS: 0,05; Média harmônica do número de repetições r: 3; Erro padrão: 7,071

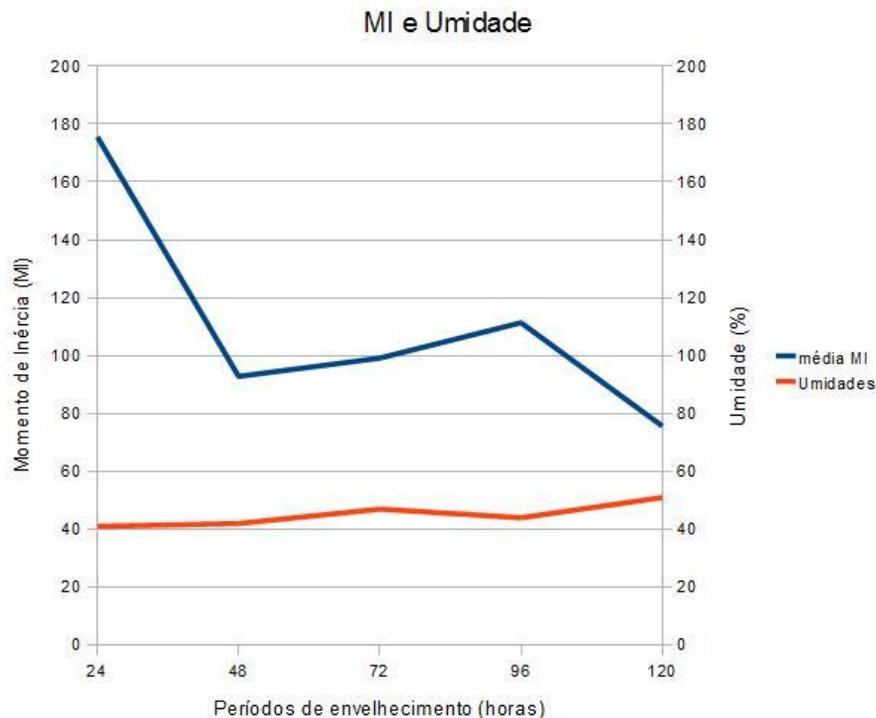
Períodos de envelhecimento (horas)	Médias de G (%)
24	100 a1
120	80 a1

\*Médias seguidas pela mesma letra e número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: Diferença Mínima Significativa; NMS: Número Mínimo Significativo.

Apesar das médias não serem diferentes estatisticamente, nota-se que a média do tratamento 1 (referente à germinação no início do período, 24 horas) foi maior que do tratamento 2 (sementes submetidas a 120 horas de envelhecimento acelerado) o que indica redução do potencial germinativo.

Dessa forma, tanto os valores de **MI** quanto o resultado do teste de germinação indicaram redução do potencial germinativo das sementes de ipê-roxo nos períodos inicial (24 h) e final (120 h) do envelhecimento acelerado.

Na Figura 26 é possível observar os valores de **MI** e de umidade (Tabela 10) das sementes ao longo do período de envelhecimento acelerado.



**Figura 26** – Comportamento dos valores de MI e das umidades das sementes de *Tabebuia heptaphylla* submetidas ao envelhecimento acelerado a 42° C durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas

Nota-se que os valores de **MI** decaem com o tempo e as médias das umidades sofrem um ligeiro aumento. Estes foram os parâmetros que sofreram alterações durante o experimento. O objetivo do experimento foi detectar através do *biospeckle* se a redução do potencial germinativo influenciaria os valores de **MI** e para isso monitorou-se as umidades das amostras. Como é sabido do experimento 4 para sementes de ipê-roxo e da literatura (RODRIGUES *et al.*, 2005; ENES, 2005; BRAGA JÚNIOR, 2000; MOREIRA *et al.*, 2002), os valores de **MI** aumentam, quanto maiores são os valores de umidade. Neste caso, apesar de a umidade apresentar um leve aumento, os valores de **MI** continuaram decaindo com o tempo. Logo, a diminuição dos valores de **MI** ocorreu devida à redução do potencial germinativo das sementes.

O fenômeno da evaporação pode ter influenciado de maneira uniforme todas as medições com *biospeckle*, para uma mesma iluminação, porque as condições de iluminação foram as mesmas para todos os experimentos.

Nos Apêndices de G a O estão gráficos dos valores de **MI** em função dos períodos de envelhecimento para cada semente.

Foi realizada também uma análise qualitativa dos dados por meio de uma estatística descritiva. De posse dos valores de **MI** de cada semente e resultado de germinação foram tabelados os valores de **MI** em ordem crescente, o resultado do teste de germinação e a ocorrência acumulada de sementes não germinadas (Tabela 13).

Uma observação constatada neste experimento foi que quando os valores de **MI** ficaram abaixo de 40,00, 23 % das sementes não germinaram. Para as sementes com valores de **MI** entre 40,00 e 100,00, todas as sementes germinaram. Já para as sementes cujos valores de **MI** foram acima de 100,00, 22% das sementes não germinaram.

Isso indica que valores menores que 40,00 e maiores que 100,00 apresentam maior probabilidade da semente de ipê-roxo não germinar. Este fato pode estar relacionado à baixa atividade biológica do tecido vegetal e sementes mortas, no caso de valores de **MI** menores que 40,00. Já para a faixa de valores de **MI** maiores que 100,00 é possível que tenha ocorrido contaminação de algumas sementes por micro-organismos, indicando atividade biológica alta e anormal, prejudicando a germinação destas sementes.

**Tabela 13** – Valores Ordenados de MI de cada Semente, Resultado de Germinação, Ocorrência de não Germinar

Repetição	Ocorrência de não germinar	Germinação	Valores de MI	Probabilidade %
1	0	sim	7,11	0,00
2	0	sim	12,59	0,00
3	0	sim	12,75	0,00
4	0	sim	14,47	0,00
5	1	não	14,65	20,00
6	2	não	14,67	33,33
7	2	sim	15,93	28,57
8	2	sim	16,83	25,00
9	2	sim	17,04	22,22
10	3	não	18,68	30,00
11	3	sim	22,04	27,27
12	4	não	22,89	33,33
13	4	sim	23,86	30,77
14	4	sim	27,24	28,57
15	4	sim	32,75	26,67
16	4	sim	32,95	25,00
17	4	sim	36,53	23,53
18	4	sim	42,91	22,22
19	4	sim	52,43	21,05
20	4	sim	54,14	20,00
21	4	sim	76,17	19,05
22	4	sim	100,48	18,18
23	4	sim	122,45	17,39
24	4	sim	149,42	16,67
25	4	sim	157,96	16,00
26	4	sim	165,30	15,38
27	4	sim	188,84	14,81
28	5	não	213,65	17,86
29	6	não	220,52	20,69
30	6	sim	382,55	20,00

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para sementes de *Tabebuia heptaphylla* submetidas ao congelamento, os valores de **MI** apresentaram médias menores nas umidades avaliadas. O dano causado pela baixa temperatura combinada com alta umidade da semente foi diferenciado através do *biospeckle*.

Avaliando-se a influência do tegumento nos valores de **MI**, observou-se que as sementes sem tegumento apresentaram maiores médias de **MI** nas umidades estudadas.

Na diferenciação entre sementes germinadas e não germinadas através do *biospeckle* obteve-se os maiores valores de Momento de Inércia para as sementes vigorosas quando as sementes estavam sem tegumento.

Com relação ao tempo de resposta da avaliação das sementes com o *biospeckle* em relação aos métodos tradicionais de avaliação de sementes, pode-se dizer que com o *biospeckle* obteve-se resultados em aproximadamente uma semana, enquanto os resultados do teste de germinação foram obtidos em 28 dias. O tempo de coleta e o tempo de processamento dos dados com *biospeckle* podem ser melhorados, podendo ser obtidos em tempo real no caso de uma implementação prática. Para isso é necessário otimizar os algoritmos e integrar todas as etapas do processamento de imagens, além de se usar processadores mais rápidos.

Pode-se observar também, do experimento 4, que analisando-se o coeficiente de variação e o nível de significância, a faixa de umidade mais adequada para a interação entre o laser e a semente de ipê-roxo está entre 28 e 54%. Houve uma correlação positiva entre o teor de água das sementes e os valores de Momento de Inércia até a umidade das sementes de 63%.

Foi possível avaliar através do *biospeckle* a redução do potencial germinativo das sementes de *Tabebuia heptaphylla*.

Os coeficientes de variação de experimentos agrícolas são classificados como baixos, se inferiores a 10%; médios, quando variam de 10 a 20%; altos quando estão entre 20 e 30%; e muito altos, quando são acima de 30%.

Os trabalhos realizados com *biospeckle* têm apresentado coeficientes de variação (**CV**) relativamente altos quando comparados com experimentos agrícolas tradicionais como pode ser observados nos trabalhos de Braga Júnior (2000) cujo **CV** obtido foi de 21,99 %, Enes (2006) obteve **CV** de 37,76% e Rodrigues (2007) obteve **CV** de 98,52%.

Observando-se os resultados estatísticos apresentados nos Apêndices A, B, C, D e E, pode-se dizer que nos experimentos 1, 2, 3 e 4, no entanto, verificaram-se coeficientes de

variação elevados apenas para a umidade das sementes de 69%, sendo de 26,00; 26,19; 37,31; 19,91 e 25,86%, respectivamente. Observa-se que os coeficientes de variação até a umidade das sementes de 63% foram predominantemente baixos (Apêndices A, B, C, D e E) sendo menores que 11%. Para o experimento 5 o coeficiente de variação obtido foi de 103,47% como pode ser observado na tabela 9.

## 7 CONCLUSÕES

É possível diferenciar as sementes que sofreram dano térmico causado por baixa temperatura daquelas que não sofreram através do *biospeckle* quantificado pelo cálculo do Momento de Inércia (**MI**).

A presença do tegumento nas sementes interfere na sensibilidade do *biospeckle*.

É possível diferenciar as sementes viáveis das inviáveis através do *biospeckle*.

A faixa de umidade das sementes adequada para a melhor interação entre o laser e a semente de ipê-roxo está entre 28 e 54%.

O *biospeckle* é uma técnica capaz de detectar a redução de viabilidade e vigor das sementes de *T. heptaphylla* ocasionada pelo envelhecimento acelerado.

Dessa forma, o *biospeckle* é uma técnica que vem sendo desenvolvida e apresenta-se como uma ferramenta possível para avaliar o potencial germinativo das sementes de ipê-roxo.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Uma dificuldade em se trabalhar com as sementes de *T. heptaphylla* está associada à grande variabilidade morfológica, que resulta em sementes anormais, fato que não é visível a olho nu. Ao trabalhar com sementes de espécies florestais, é interessante fazer inicialmente o teste de raios X. Assim é possível detectar se a semente está formada ou não, e descartar as sementes vazias.

A técnica do *biospeckle* apresenta limitações atualmente para sua utilização a nível comercial. Estas limitações são devidas à necessidade de maiores estudos, padronização de *set up* e de procedimentos. Devido à alta sensibilidade, não só a atividade biológica contribui para a ocorrência do fenômeno, mas também diversos outros fatores interferem, sendo necessário um controle rigoroso das fontes de interferência. Por isso os ensaios são realizados atualmente em laboratórios específicos. É necessário estudar meios que eliminem os ruídos e filtrem as informações consideradas importantes para que a técnica passe a ser utilizada a nível comercial.

É interessante também, para uso da técnica do *biospeckle* em sementes de ipê-roxo, avaliar a transmissão do laser através do tegumento das sementes de ipê para verificar a quantidade de luz transmitida, absorvida e a quantidade que chega até o endosperma.

Para maior detalhamento do *speckle* obtido das sementes recomenda-se o uso de análise de frequências, tais como a Transformada de Fourier e a Transformada de *Wavelets*. Estas técnicas permitem extrair informações mais precisas possibilitando-se diferenciar a atividade biológica superficial daquela proveniente das camadas celulares mais internas da semente. Porém estudos e ensaios específicos seriam necessários para se determinar em quais faixas de frequência a atividade biológica da superfície da semente é mais evidente e em quais faixas de frequências as atividades biológicas das camadas subsuperficiais são melhor identificadas.

Recomenda-se também comparar as análises ópticas geradas a partir de ensaios *biospeckle* analisado por métodos que fornecem imagens como resultado, como Fujii e Diferenças Generalizadas com teste de tetrazólio das respectivas sementes.

A vantagem de se empreender estudos no desenvolvimento de uma metodologia que utiliza *biospeckle* se deve ao fato dessa técnica apresentar potencialidade em termos de

automação da avaliação de sementes e processamento automático dos dados. Dessa forma, é possível eliminar da cadeia de análise de sementes a subjetividade humana que está presente quando o técnico executa a análise.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMALVY, J. I. *et al.* **Applications of dynamic speckle interferometry to the drying of coatings** *Progress in Organic Coatings*, [s.l.], v. 42, p. 89 – 99, 2001.

ARIZAGA, R.; TRIVI, M. R.; RABAL, H. J. *Speckle* time evolution characterization by co-occurrence matrix analysis. **Optics & Laser Technology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.

ARIZAGA, R. Methods of Dynamic Speckle Analysis: Statistical Analysis. In: RABAL, Hector J.; BRAGA JUNIOR, Roberto A. (Comp.). **Dynamic Laser Speckle and Applications**. New York: Crc Press, 2009. p. 99-104.

BERG, M. E. V. D. Formas atuais e potenciais de aproveitamento das espécies nativas e exóticas do Pantanal Mato-Grossense. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 1. Corumbá, Embrapa-UFMS, 1984. Anais... Brasília: Embrapa/DDT, 1986, p. 131-136 (Embrapa/CPAP. Documentos, 5). *Apud* CARVALHO, P. E. R.. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira**. Brasília-DF: EMBRAPA – SPI; Colombo-PR: EMPRABA - CNPF , 1994. 675 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M.. **Physiology and Biochemistry of Seeds: in Relation to Germination**. New York: Springer-verlag, 1983. 1 v.

BITTENCOURT JUNIOR, N. S.; SEMIR, J.. Late-acting self-incompatibility and other breeding systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). **International Journal Of Plant Sciences**, Chicago, p. 493-506. 1 nov. 2005.

BOTEGA, J. V. L. **Viabilidade de métodos ópticos para a identificação da umidade da folha de café (*Coffea arabica*)**. 2009. 102p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

BORBA FILHO, A. B.. **Aspectos da germinação e da conservação de sementes de espécies do gênero *Tabebuia* (BIGNONIACEAE)**. 2006. 86 p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

BRACCINI, A.L.; BRACCINI, M.C.L.; SCAPIM, C.A. Mecanismos de deterioração das sementes: aspectos bioquímicos e fisiológicos. **Informativo ABRATES**, v.11, n.1, p.10-15, abril, 2001 *apud* BORBA FILHO, A. B.. **Aspectos da germinação e da conservação de sementes de espécies do gênero *Tabebuia* (BIGNONIACEAE)**. 2006. 86 p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

BRAGA JÚNIOR, R. A. *et al.* Detection of Fungi in Beans by the Laser Biospeckle Technique. **Biosystems Engineering**, San Diego, v. 91, n. 4, p. 465-469, Ago. 2005.

BRAGA JÚNIOR., R. A. “**Bio-Speckle**”: uma contribuição para o desenvolvimento de uma tecnologia aplicada à análise de sementes. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ ACS, 2009a. 399 p.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Glossário Ilustrado de Morfologia**. Brasília: Mapa/ ACS, 2009b. 406 p.

BRIERS, J. D.; S. WEBSTER, Laser speckle contrast analysis (LASCA): A non-scanning full field technique for monitoring capillary blood flow, **J. Biomed. Opt.**, 1, 174, 1996.

BURCH, J.M.; TOKARSKI, J.M.J. Production of multiple beam fringes from photographic scatterers. **Opt. Acta** 15. 1968. p. 101-11. *Apud* SILVA, E. R. da . **Estudo das propriedades do Biospeckle e suas aplicações**. São Paulo, 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física Geral, Universidade de São Paulo.

CABOCLO, L.O.S.F. *et al.* Correlation between temporal pole MRI abnormalities and surface ictal EEG patterns in patients with unilateral mesial temporal lobe epilepsy. **Seizure** (London), v. 16, p. 8-16, 2007. *Apud* RODRIGUES, S. **Efeito Estocástico em Speckle Dinâmico**. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARVALHO, P. E. R.. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira**. Brasília-DF: EMBRAPA – SPI; Colombo-PR: EMPRABA - CNPF , 1994. 675 p.

CARVALHO, Pablo H.A. *et al.* Motility parameters assessment of bovine frozen semen by biospeckle laser (BSL) system. **Biosystems Engineering**, London, v. 102, n. 1, p.31-35, 01 jan. 2009.

CAVARIANI, C. **Secagem estacionária de sementes de milho com distribuição radial do fluxo de ar**. 1996. 85f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Esalq-USP. *Apud* GARCIA, D. C. *et al.* A secagem de sementes. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, Abr. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 01 July 2010. doi: 10.1590/S0103-84782004000200045.

CASTRO PAZTOR, Y.P. de. Teste abreviado de germinação em *Araucaria angustifolia* – embriões. *Silvicultura em São Paulo*, 1(2):285-90, 1962/63. *Apud* DONI FILHO, L.; AMARAL, L.; CERVI, P.H.. Métodos para testar o poder germinativo das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 7, n. 2, p.113-124, 1985.

CICERO, S. M.; BANZATTO JUNIOR, H. L. Avaliação do relacionamento entre danos mecânicos e vigor, em sementes de milho, por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n. 1, p.29-36, 2003.

DAINTY, J.C. Recent Developments. In: Dainty, J.C. (ed.). **Laser speckle and related phenomena**. Berlin: Springer-Verlag. 1984. p. 321-335. *Apud* SILVA, E. R. da . **Estudo das propriedades do Biospeckle e suas aplicações**. São Paulo, 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física Geral, Universidade de São Paulo.

DONI FILHO, L.; AMARAL, L.; CERVI, P.H.. Métodos para testar o poder germinativo das sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 7, n. 2, p.113-124, 1985.

ENES, A. M. **Análise de resposta em frequência do biospeckle laser**. 2006. 48 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ENES, A. M. **Análise do comportamento de tecidos vivos e tecidos mortos em sementes de feijão (*Phaseolus Vulgaris L.*) pela ótica do biospeckle laser**. 2005. 32 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ENES, A. M. *et al.* Utilização do Laser aplicado na diferenciação de tecidos vivos de tecidos mortos em sementes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 33, 2004, São Pedro. **Anais...** Campinas: Unicamp/Embrapa, 2004.

FERREIRA, D. **SISVAR software**: versão 5.3. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>> Acesso em: 15 nov. 2010.

FLOR, E. P. O. *et al.* Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 1, p.68-76, 2004.

FUJII, H., *et al.* Blood flow observed by time-varying laser speckle, **Opt. Lett.**, 10(3), 104, 1985.

GALLIA, Eleanor; FRANZ, Karen. Iracambi Medicinal Plants Project in Minas Gerais (Brazil) and the International Standard for Sustainable Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants (ISSC-MAP). **Medicinal Plant Conservation**, Boon, p. 6-9. 01 ago. 2005. Disponível em: <<http://cmsdata.iucn.org/downloads/mpc11.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2010.

GALVÃO, R. K. H. *et al.* Estudo comparativo sobre filtragem de sinais instrumentais usando Transformadas de Fourier e Wavelet. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 6, Nov./Dec. 2001.

GARCIA, D. C. *et al.* A secagem de sementes. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, Abr. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 01 julho 2010. doi: 10.1590/S0103-84782004000200045.

GOODMAN, J.W. Statistical Properties of Laser Speckle Patterns. In: Dainty, J.C. (ed). Laser speckle and related phenomena. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 9-75. *Apud* SILVA, E. R. da. **Estudo das propriedades do *Biospeckle* e suas aplicações**. São Paulo, 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física Geral, Universidade de São Paulo.

GURGEL FILHO, O. A.; PÁSZTOR, Y. P. C. Fenologia e comportamento em alfobre de espécies florestais. **Silvicultura em São Paulo**, v. 1, n.2, p. 291-304, 1962. *Apud* CARVALHO, P. E. R.. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira**. Brasília-DF: EMBRAPA – SPI; Colombo-PR: EMPRABA - CNPF , 1994. 675 p.

HAMPTON, J.G.; TEKRONY, D.M. **Handbook of vigor testes methods**. Zurich: ISTA, 1995. 117p. *Apud* BORBA FILHO, A. B.. **Aspectos da germinação e da conservação de sementes de espécies do gênero *Tabebuia* (BIGNONIACEAE)**. 2006. 86 p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

HARRINGTON, J.F. Seed storage and longevity. In: KOZLOWSKI, T.T. Seed biology. New York: Academic, 1972. V.3, p.145-245. *Apud* GARCIA, D. C. *et al.* A secagem de sementes. *Cienc. Rural*, **Santa Maria**, v. 34, n. 2, Abr. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 01 Julho 2010. doi: 10.1590/S0103-84782004000200045.

HOFFMASTER, A. L. *et al.* An automated system for vigor testing three-day-old soybean seedlings. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 31, n. 3, p.701-713, 2003.

LABOURIAU, L. G. **A germinação de sementes**. Washington: Secretaria Geral da OEA, 1983. 173 p. *apud* BORBA FILHO, A. B.. **Aspectos da germinação e da conservação de sementes de espécies do gênero *Tabebuia* (BIGNONIACEAE)**. 2006. 86 p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

LOPEZ, J. A. *et al.* **Arboles comunes del Paraguay; ñande yvyra mata kuera**. Washington: Cuerpo de Paz, 1987. 425 p. *apud* CARVALHO, P. E. R.. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira**. Brasília-DF: EMBRAPA – SPI; Colombo-PR: EMPRABA - CNPF , 1994. 675 p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p. *apud* BORBA FILHO, A. B.. **Aspectos da germinação e da conservação de sementes de espécies do gênero *Tabebuia* (BIGNONIACEAE)**. 2006. 86 p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MONDO, V. H. V.; CICERO, S. M. Análise de imagens na avaliação da qualidade de sementes de milho localizadas em diferentes posições na espiga. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 1, p.09-18, 2005.

MOREIRA, M. F. B. *et al.* Caracterização da Transmissão da Luz Laser em semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 119-126, 2002.

MOTTA, W.A. **Adaptação do método contínuo de secagem para sementes de arroz**. 1997. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - UFPel. *Apud* GARCIA, D. C. *et al.* A secagem de sementes. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, Abr. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 01 Julho 2010. doi: 10.1590/S0103-84782004000200045.

NASCIMENTO, Álvaro Leonardo do *et al.* DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PARA O BIOSPECKLE NA ANÁLISE DE SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 2, p.456-461, 09 set. 2005.

NELLIST, M. E.; HUGHES, M. Physical and biological processes in the drying of seed. **Seed Science and Technology**, Zurich: v.1, n1, p.613-643,1973. *Apud* GARCIA, D. C. *et al.* A secagem de sementes. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, Abr. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 01 Julho 2010. doi: 10.1590/S0103-84782004000200045.

NOBRE, C.M.B. *et al.* Biospeckle laser spectral analysis under Inertia Moment, Entropy and Cross-Spectrum methods. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 282, n. 11, p.2236-2242, 01 jun. 2009.

OAKLEY, K.; KESTER, S.T.; GENEVE, R.L.. Computer-aided digital image analysis of seedling size and growth rate for assessing seed vigour in Impatiens. **Seed Sci. & Technol**, Zürich, n., p.907-915, 2004.

OLIVEIRA, A. K. M. de; SCHLEDER, E. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, vitalidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2006.

OLIVEIRA, L. M. de *et al.* Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* VAHL NICH. E T. *impetiginosa* (MARTIUS EX A. P. DE CANDOLLE) STANDLEY - (Bignoniaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, n. 2, p. 138-143, 2004.

OLIVEIRA, L. M. de; CARVALHO, M. L. M. de; NERY, M. C.. Teste de tetrazólio em sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich. e *T. impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley – Bignoniaceae. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 2, maio - ago., p. 169-174, 2005.

PAIVA JUNIOR, R. D.; MURAMATSU, M.. Desenvolvimento de um Rugosímetro a LASER. **Revista de Física Aplicada e Instrumentação**, São Paulo, v. 17, n. 2, p.60-69, 07 abr. 2004.

PAJUELO, M. *et al.* Bio-speckle assessment of bruising in fruits. **Optics and laser in Engineering**, [s.l.], v. 40, p. 13-24, 2003.

PASSONI, L. I. Characterizing Dynamic Speckle Time Series With The Hurst Coefficient Concept. **Fractals**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 319-329, 2004.

R Development Core Team (2010). **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 15 nov. 2010.

RABAL, H. Activity Images: Generalized Differences, Fujii's, Lasca and Related Methods. In: RABAL, Hector J.; BRAGA JUNIOR, Roberto A. (Comp.). **Dynamic Laser Speckle and Applications**. New York: Crc Press, 2009. p. 115-136.

RABAL, H. J. *et al.* Numerical model for dynamic speckle: an approach using the movement of the scatterers. **Journal Of Optics A: Pure And Applied Optics**, [s.l.], v. 5, p. 381-385, 2003.

RABAL, H. J.; TRIVI, M. R.; ARIZAGA, R. Transient Phenomena Analysis Using Dynamic Speckle Patterns. **Optical Engineering**, [s.l.], v. 35, p. 10 - 12, 1996.

RABAL, H.J.; BRAGA JUNIOR, R. A. (Ed.). **Dynamic Laser Speckle and Applications**. New York: Crc Press, 2009.

RABELO, G. F. **Avaliação da Aplicação do *speckle* Dinâmico no Monitoramento da Qualidade da Laranja**. 2000. 149 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. de. How and why to measure the germination process? **Revista Brasil. Bot.**, São Paulo, v. 29, n. 1, p.1-11, 2006.

RASBAND, W.S., **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008.

RIZZINI, C.; MORS, V. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EDUSP, 1976.

RODRIGUES, S. **Efeito Estocástico em *Speckle* Dinâmico**. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RODRIGUES, S. *et al.* Aplicação do *Speckle* Dinâmico na Análise de Sementes de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.9, p.119-124, 2007.

RODRIGUES, S. *et al.* Efeito da Umidade na Determinação da Atividade Biológica de Sementes de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), Utilizando Imagens de *Speckle* Dinâmico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 30, p. 135-139, 2005.

ROMERO, G. G. **Estudio y caracterización de patrones de speckle que varían en el tiempo**. 1999. 133 p. Tese (Doutorado em Física) - Universidad Nacional de Salta, Argentina.

SALOMÃO, L. R.; RODRIGUES NETO, C.; CAMPANHA, J. R. Modelagem de séries de precipitação de chuvas usando o expoente de hurst. In: BRAZILIAN CONFERENCE ON DYNAMICS, CONTROL AND APPLICATIONS, 7., 2008, Presidente Prudente. **Proceedings Dincon**. Presidente Prudente: Fct, 2008. p. 1 - 4. Disponível em: <[http://www4.fct.unesp.br/dmec/dincon2008/artigos/05/02-05\\_salomao\\_modelagem\\_CAMPANHA\\_JR.pdf](http://www4.fct.unesp.br/dmec/dincon2008/artigos/05/02-05_salomao_modelagem_CAMPANHA_JR.pdf)>. Acesso em: 25 set. 2010.

SAKO, Y. *et al.* A System for Automated Seed Vigor Assessment. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 29, n., p.625-636, 2001.

SCHLEDER, E. J. D.; OLIVEIRA, A. K. M.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl – BIGNONIACEAE. **Ensaios e Ciências – Série Agrárias**, v.7, p. 271-282, 2003.

SILVA, E. R. da . **Estudo das propriedades do Biospeckle e suas aplicações**. São Paulo, 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física Geral, Universidade de São Paulo.

SIMONSEN, I.; HANSEN, A., “Determination of the Hurst exponent by use of wavelet transform”, *Physical Review E*, Vol. 58, No. 03, pp. 2779-2787, February 1998. *Apud* SOTERRONI, A. C.; DOMINGUES, M. O.; RAMOS, F. M.. Estimativa do expoente de hurst de séries temporais caóticas por meio da transformada wavelet discreta. In: BRAZILIAN CONFERENCE ON DYNAMICS, CONTROL AND APPLICATIONS, 7., 2008, Presidente Prudente. **Proceedings Dincon**. Presidente Prudente: Fct, 2008. p. 1 - 6. Disponível em: <<http://www4.fct.unesp.br/dmec/dincon2008/artigos/04/03-AlineSoterroniCorrigido.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2010.

SOTERRONI, A. C.; DOMINGUES, M. O.; RAMOS, F. M. Estimativa do expoente de hurst de séries temporais caóticas por meio da transformada wavelet discreta. In: BRAZILIAN CONFERENCE ON DYNAMICS, CONTROL AND APPLICATIONS, 7., 2008, Presidente Prudente. **Proceedings Dincon**. Presidente Prudente: Fct, 2008. p. 1 - 6. Disponível em: <<http://www4.fct.unesp.br/dmec/dincon2008/artigos/04/03-AlineSoterroniCorrigido.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2010.

SOUZA, L. A. de *et al.* Uso de raios-x na avaliação da qualidade de sementes de *Platypodium elegans* Vog. **Rev. Ciên. Agron.**, Fortaleza, v. 39, n. 02, p.343-347, 2008.

TEIXEIRA, E. F.; CICERO, S. M.; DOURADO NETO, D.. Análise de imagens digitais de plântulas para avaliação do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 2, p.159-167, 2006.

TEIXEIRA, P. C. N. *et al.* An instrumental set up for seed germination studies with temperature control and automatic image recording. **Braz. J. Plant Physiol.**, Pelotas, v. 19, n. 2, p.99-108, 2007.

VALENTINI, S.R.T.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Aplicação do teste de vigor em sementes. In: SILVA, A.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.). **Manual técnico de sementes florestais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1995. p. 75-84. (Série Registros, n. 14). *Apud* BORBA FILHO, A. B.. **Aspectos da germinação e da conservação de sementes de espécies do gênero *Tabebuia* (BIGNONIACEAE)**. 2006. 86 p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

VIDAL, M. C.; SILVA, F. T. C. da. Biospeckle laser na determinação de atividade biológica em sementes de milho e soja. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNEMAT, 4., 2008, Cárceres. **Anais...** . Cárceres: Prppg, 2008. p. 513 - 517. Disponível em: <[http://www2.unemat.br/prppg/jornada2008/resumos\\_conic/Expandido\\_00513.pdf](http://www2.unemat.br/prppg/jornada2008/resumos_conic/Expandido_00513.pdf)>. Acesso em: 1 jul. 2010.

VILLELA, F.A. **Efeitos da secagem intermitente sobre a qualidade de sementes de milho**. 1991. 104f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Esalq-USP. *Apud* GARCIA, D. C. *et al.* A secagem de sementes. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, Abr. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000200045&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 01 Julho 2010. doi: 10.1590/S0103-84782004000200045.

ZABOT, Lucio *et al.* Uso de imagens digitais para avaliação de plântulas de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 2, p.184-192, 2008.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A** - Resumo dos resultados estatísticos (Análise de Variância e Teste de Tukey\*) para as médias dos valores de Momento de Inércia (MI) das sementes de cada tratamento. Tratamento 1 – sementes normais; Tratamento 2 – sementes congeladas a 0°C.

Umidade %	Trat.	Médias MI	DMS	CV %	Nível de Significância	Núm. observações
28	1	2,88 a2	0,082	5,38	0,0001	50
	2	2,36 a1				
35	1	4,01 a2	0,118	5,47	0,0001	50
	2	3,39 a1				
54	1	5,72 a2	0,173	5,60	0,0001	50
	2	4,88 a1				
63	1	9,13 a2	0,346	7,37	0,0001	50
	2	6,95 a1				
69	1	26,84 a2	3,085	26,00	0,0001	50
	2	13,82 a1				

\*Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: Diferença Mínima Significativa; CV: Coeficiente de Variação; Trat.: Tratamento.

**APÊNDICE B** – Resumo dos resultados estatísticos (Análise de Variância e Teste de Tukey\*) para as médias dos valores de Momento de Inércia (MI) das sementes de cada tratamento. Tratamento 1 – sementes sem tegumento; Tratamento 2 – sementes com tegumento

Umidade %	Trat.	Médias de MI	DMS	CV %	Nível de Significância	Núm. Observações
28	1	3,15 a2	0,087	4,94	0,0001	50
	2	2,88 a1				
35	1	4,38 a2	0,127	5,20	0,0001	50
	2	4,01 a1				
54	1	6,23 a2	0,174	4,98	0,0001	50
	2	5,72 a1				
63	1	11,05 a2	0,633	10,75	0,0001	50
	2	9,13 a1				
69	1	39,06 a2	5,038	26,19	0,0001	50
	2	26,84 a1				

\*Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: Diferença Mínima Significativa; CV: Coeficiente de Variação; Trat.: Tratamento.

**APÊNDICE C** - Resumo dos resultados estatísticos (Análise de Variância e Teste de Tukey\*) para as médias dos valores de Momento de Inércia (MI) das sementes de cada tratamento. Tratamento 1 – sementes germinadas; Tratamento 2 – sementes não germinadas.

Umidade %	Trat.	Médias de MI	DMS	CV %	Nível de Significância	Núm. de observações
20	1	2,18 a2	0,100	7,37	0,0001	38
	2	1,78 a1				
28	1	3,22 a2	0,109	5,45	0,0001	38
	2	2,67 a1				
35	1	4,38 a2	0,227	8,13	0,0001	38
	2	3,80 a1				
54	1	6,31 a2	0,205	5,14	0,0001	38
	2	5,37 a1				
63	1	11,52 a2	0,721	10,72	0,0001	38
	2	8,20 a1				
69	1	39,86 a2	7,945	37,31	0,0002	38
	2	22,63 a1				

\*Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: Diferença Mínima Significativa; CV: Coeficiente de Variação; Trat.: Tratamento.

**APÊNDICE D** - Resumo dos resultados estatísticos - Análise de Variância e Teste de Tukey\* - para as médias dos valores de Momento de Inércia (MI) das sementes de cada tratamento. Tratamento 2 – sementes germinadas; Tratamento 4 – sementes não germinadas.

Umidade %	Trat.	Médias de MI	DMS	CV %	Nível de Significância	Núm. de observações
20	2	1,77 a1	0,082	6,69	0,071	38
	4	1,84 a1				
28	2	2,66 a1	0,105	5,67	0,024	38
	4	2,78 a2				
35	2	3,36 a1	0,361	14,66	0,009	38
	4	3,86 a2				
54	2	5,35 a1	0,143	3,87	0,024	38
	4	5,52 a2				
63	2	8,17 a1	0,450	7,82	0,020	38
	4	8,72 a2				
69	2	23,17 a1	3,120	19,91	0,814	38
	4	22,82 a1				

\*Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: Diferença Mínima Significativa; CV: Coeficiente de Variação; Trat.: Tratamento.

**APÊNDICE E** - Resumo dos resultados estatísticos (Análise de Variância e Teste de Tukey\*) para as médias dos valores de Momento de Inércia (MI) das sementes de cada tratamento. Tratamentos: 1 – sementes sem tegumento; 2 – sementes com tegumento; 3 – sementes sem tegumento submetidas ao congelamento a 0°C; 4 – sementes com tegumento submetidas ao congelamento a 0°C.

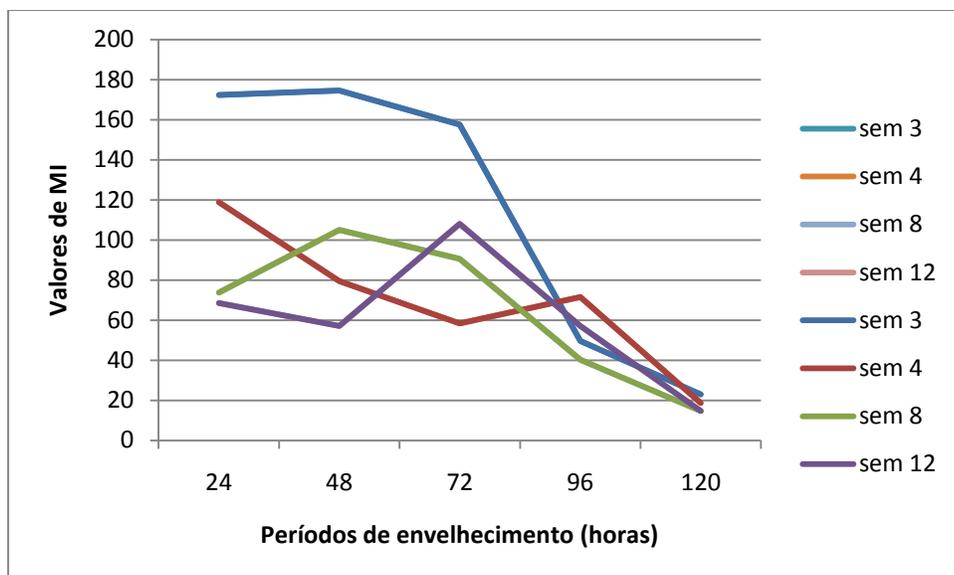
Umidade %	Trat.	Médias de MI	DMS	CV %	Nível de Significância	Núm. Observações
28	1	3,15 a4	0,105	5,12	0,0001	100
	2	2,88 a3				
	3	2,59 a2				
	4	2,36 a1				
35	1	4,38 a4	0,147	5,12	0,0001	100
	2	4,01 a3				
	3	3,66 a2				
	4	3,39 a1				
54	1	6,23 a4	0,220	5,35	0,0001	100
	2	5,72 a3				
	3	5,29 a2				
	4	4,88 a1				
63	1	11,05 a4	0,629	9,67	0,0001	100
	2	9,13 a3				
	3	7,83 a2				
	4	6,95 a1				
69	1	39,06 a3	4,718	25,86	0,0001	100
	2	26,84 a2				
	3	18,37 a1				
	4	13,82 a1				

\*Médias seguidas pela mesma letra e número, dentro de cada umidade, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: Diferença Mínima Significativa; CV: Coeficiente de Variação; Trat.: Tratamento.

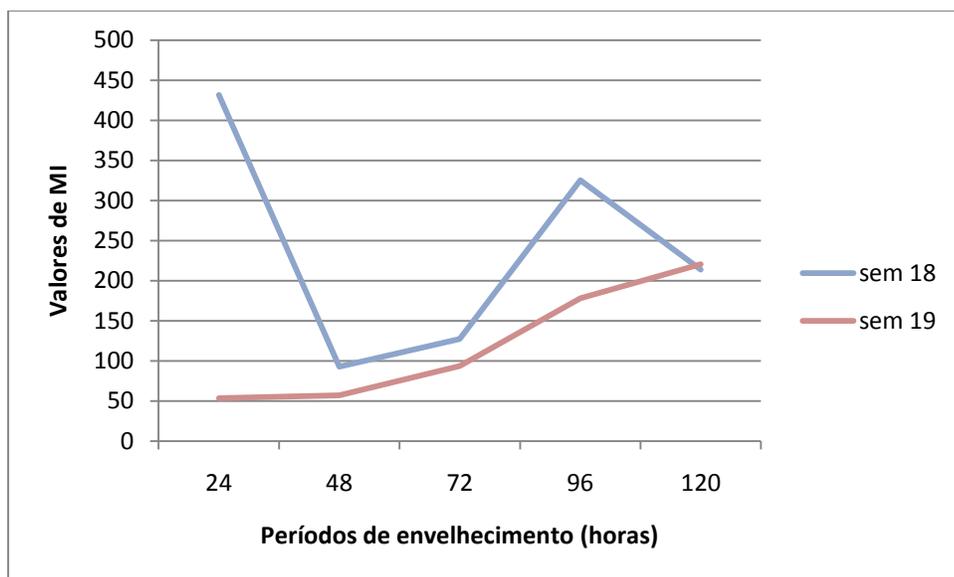
**APÊNDICE F** - Teste de Tukey. DMS: 82,12876; NMS: 0,05; Média harmônica do número de repetições r: 30; Erro padrão: 20,95118.

Períodos de envelhecimento (horas)	Médias de MI*
24	175,535 a2
48	92,813 a1
72	99,13267 a1 a2
96	111,3647 a1 a2
120	75,66 a1

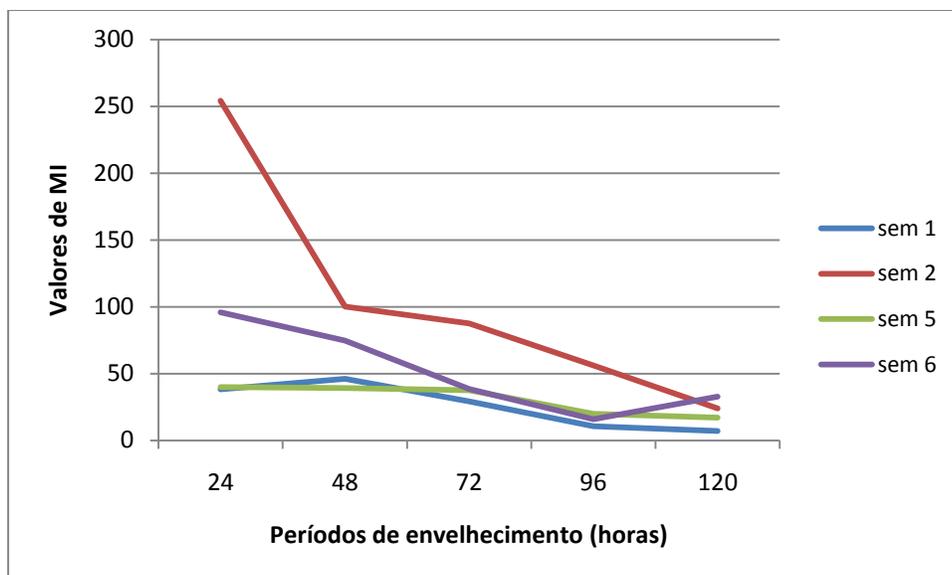
\*Médias seguidas pela mesma letra e número não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: Diferença Mínima Significativa; NMS: Número Mínimo Significativo.



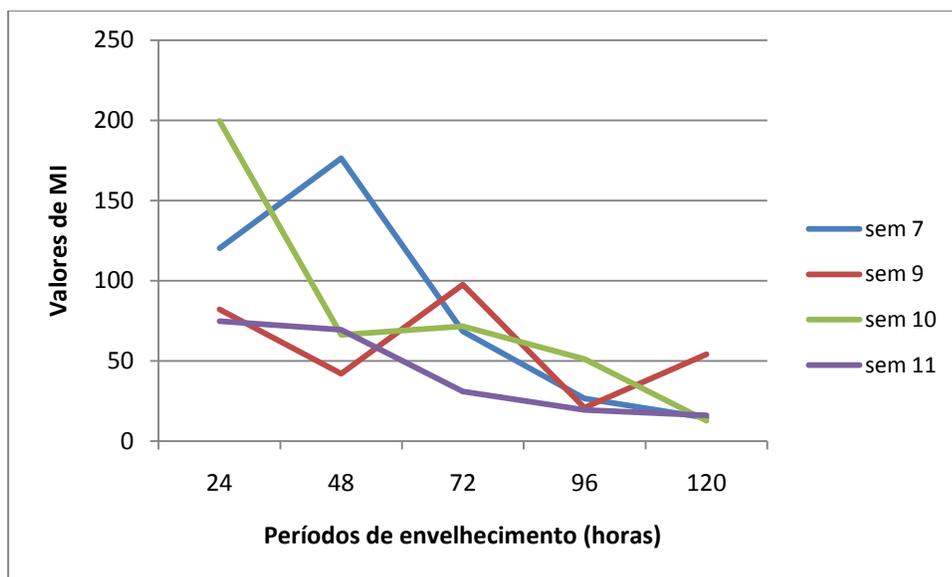
**APÊNDICE G** – Comportamento dos Valores de MI para cada semente nos períodos de envelhecimento acelerado (estas sementes não germinaram). Sem: semente



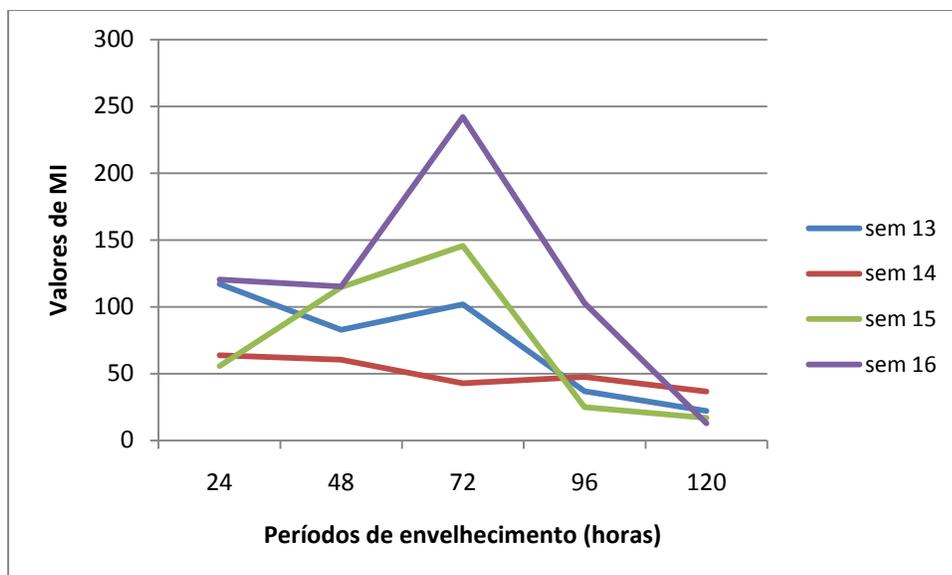
**APÊNDICE H** - Comportamento dos Valores de MI para cada semente nos períodos de envelhecimento acelerado. Sem: semente



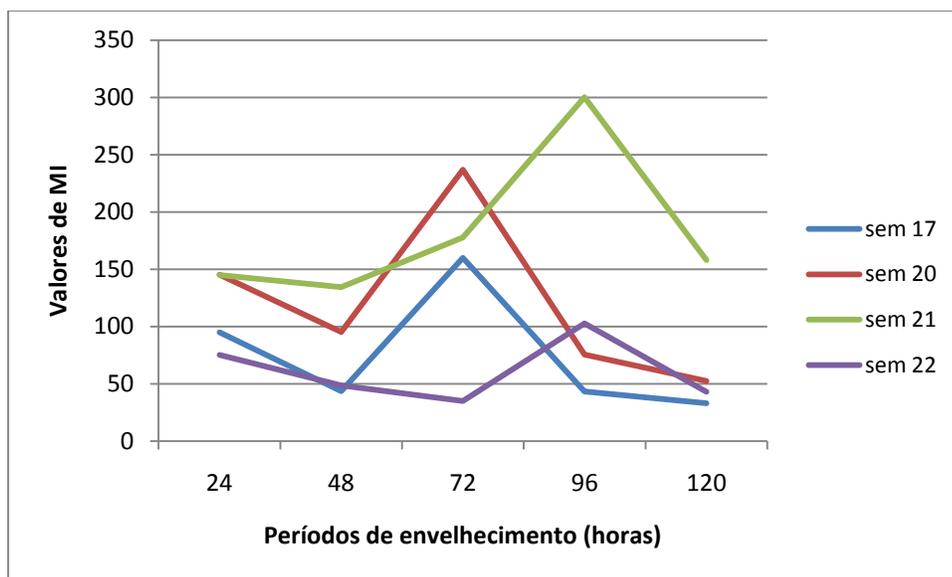
**APÊNDICE I** - Comportamento dos Valores de MI para cada semente nos períodos de envelhecimento acelerado. Sem: semente



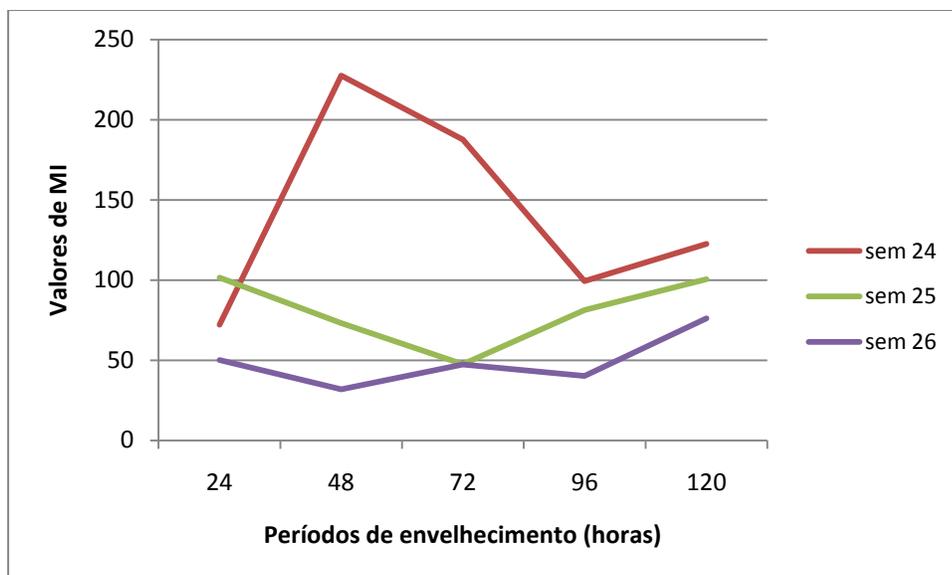
**APÊNDICE J** - Comportamento dos Valores de MI para cada semente nos períodos de envelhecimento acelerado. Sem: semente



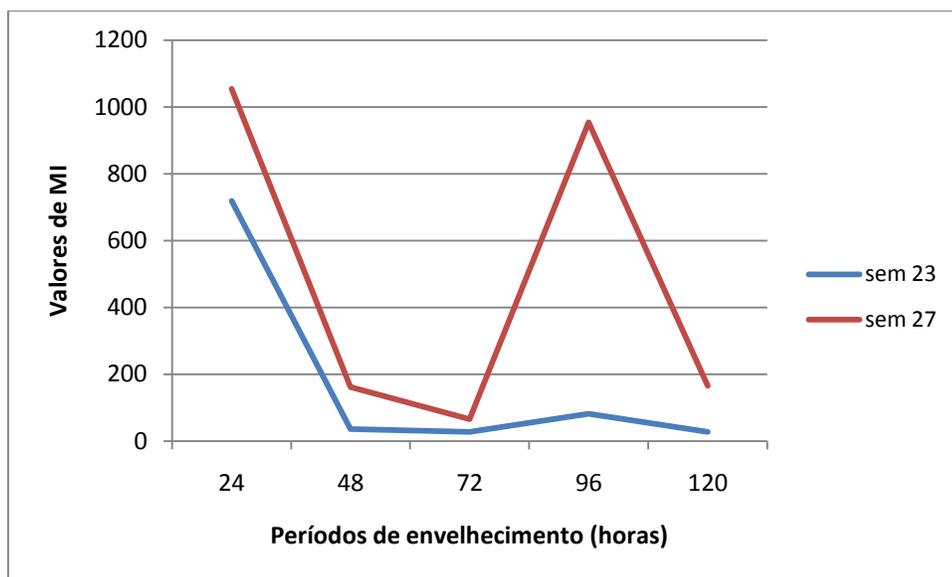
**APÊNDICE K** - Comportamento dos Valores de MI para cada semente nos períodos de envelhecimento acelerado. Sem: semente



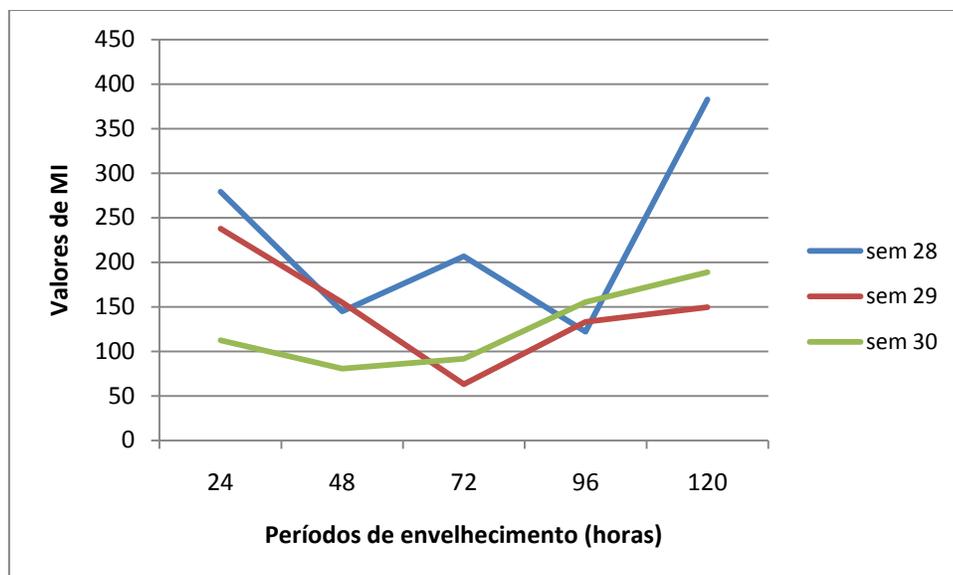
**APÊNDICE L** - Comportamento dos Valores de MI para cada semente nos períodos de envelhecimento acelerado. Sem: semente



**APÊNDICE M** - Comportamento dos Valores de MI para cada semente nos períodos de envelhecimento acelerado. Sem: semente



**APÊNDICE N** - Comportamento dos Valores de MI para cada semente nos períodos de envelhecimento acelerado. Sem: semente



**APÊNDICE O** - Comportamento dos Valores de MI para cada semente nos períodos de envelhecimento acelerado. Sem: semente