

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

**ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DO *BIOSPECKLE* LASER
APLICADA AO MAPEAMENTO DE FENÔMENOS EM
SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

ADILSON MACHADO ENES

CAMPINAS
FEVEREIRO DE 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

**ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DO *BIOSPECKLE* LASER
APLICADA AO MAPEAMENTO DE FENÔMENOS EM
SEMENTES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Tese submetida à Faculdade de
Engenharia Agrícola da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Doutor em Engenharia Agrícola na
área de concentração Máquinas Agrícolas.

ADILSON MACHADO ENES
Orientador: Inácio M. Dal Fabbro
Co-orientador: Roberto Alves Braga Júnior

CAMPINAS
FEVEREIRO DE 2011

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

En27a Enes, Adilson Machado
Análise de frequência do biospeckle laser aplicada ao
mapeamento de fenômenos em sementes de feijão
(Phaseolus vulgaris L.) / Adilson Machado Enes. --
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Inacio Maria Dal Fabbro, Roberto
Alves Braga Júnior.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. Processamento de imagens. 2. Speckle. 3.
Sementes - Análise. I. Dal Fabbro, Inacio Maria. II.
Braga Júnior, Roberto Alves. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. IV.
Título.

Título em Inglês: Frequency analysis of biospeckle laser applied to mapping
phenomena in bean seeds (Phaseolus vulgaris L.)

Palavras-chave em Inglês: Image processing, Speckle, Seed analysis

Área de concentração: Máquinas Agrícolas

Titulação: Doutorado em Engenharia Agrícola

Banca examinadora: Eduardo Acedo Barbosa, Mikiya Muramatsu, Antonio
Carlos de Oliveira Ferraz, Kil Jin Park

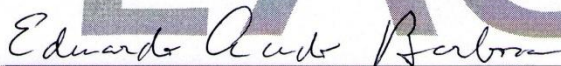
Data da defesa: 23/02/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Agrícola

Este exemplar corresponde à redação final da **Tese de Doutorado** defendida por **Adilson Machado Enes**, aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de fevereiro de 2011, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.



Prof. Dr. Inácio Maria Dal Fabbro – Presidente e Orientador
Feagri/Unicamp




Prof. Dr. Eduardo Acedo Barbosa - Membro Titular
Unesp



Prof. Dr. Mikiya Muramatsu - Membro Titular
USP



Prof. Dr. Antonio Carlos de Oliveira Ferraz - Membro Titular
Feagri/Unicamp



Prof. Dr. Kil Jin Park - Membro Titular
Feagri/Unicamp

Dedico esta tese ao meu pai, Olávio Machado Enes
e a minha mãe, Maria Leida Meri Enes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter iluminado o meu caminho.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Olávio Machado Enes e Maria Leida Meri Enes, pelo apoio, incentivo e dedicação.

Ao meu orientador, amigo e grande mestre, Professor Inácio M. Dal Fabbro, pela orientação, paciência, amizade, pelas conversas, conselhos e por estar sempre presente e disponível para dividir seu conhecimento e brilhantismo.

Ao meu coorientador, Professor Roberto Alves Braga Júnior, que foi fundamental para a realização deste trabalho, e por toda a amizade, orientação e apoio dado na pesquisa, execução dos experimentos, análise dos dados, conselhos e incentivos e por me permitir usar os laboratórios da UFLA para execução de parte dos experimentos.

Ao Professor Giovanni Francisco Rabelo, pelas recepções amistosas em Lavras, pelos conselhos e pela amizade de longa data.

Ao professor Flávio Meira Borém, por ter permitido o uso do Laboratório de Pós-colheita da UFLA para a realização de parte do experimento.

A minha grande amiga Juliana Aparecida Fracarolli, pelo incentivo, auxílio e, sobretudo, pela amizade e companheirismo durante esses anos que passei em Campinas para a realização de meu curso de doutorado.

Aos membros do grupo de pesquisa do Professor Inácio, que carinhosamente costumo chamar de a “Grande Família Inácio” pois é exatamente como uma família que interagem essas adoráveis pessoas, são elas: Silvestre Rodrigues, Renato Laurent, Celina Almeida e sua filha Carolinee Rodrigues, Jonathan Gazola (O presidente), Marcos Valério (O deputado), Enrico di Raimo e Lino.

Aos amigos da batcaverna, local em que residi durante meu curso em Campinas e onde conheci pessoas extremamente amistosas e legais: Meus grandes amigos Rachid, Francelino (O Marrom), a Júlia, a Taísa, o Valter, O Lorival e o Wagner.

Aos amigos Alexandre, Daniel e Credivam, pelo apoio dado quando cheguei em Campinas.

A toda a galera do Jiu Jitsu da UNICAMP, pelos momentos de descontração e também pelos arm-locks, estrangulamentos, quedas, americanas, etc, etc.

A Pós-graduação da FEAGRI/UNICAMP, Alexandre, Marta, Sidney e a todos os outros que sempre foram prestativos em auxiliar durante o curso.

A Universidade Federal de Lavras pelo apoio nas pesquisas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado, permitindo a realização deste curso.

A Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP (FEAGRI) pela realização do curso de doutorado.

A Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por toda a infra-estrutura de apoio ao estudante oferecida.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação.

A todos os amigos que estiveram comigo durante este período.

“Quando os mais bem-sucedidos em qualquer área são tratados como Super-heróis, isso não chega a ser uma tragédia. Porém, quando desistimos de algum projeto por acreditarmos no julgamento dos outros, ou do mercado, em vez de acreditarmos em nós mesmos, trata-se realmente de uma tragédia”

Stephen Hawking: O andar do bêbado.

RESUMO

O *biospeckle* laser é um fenômeno óptico de interferência que ocorre quando há incidência de luz coerente em um material biológico que exibe algum tipo de atividade. Essa atividade pode ser decorrente de processos biológicos ou de fatores puramente físicos, como a evaporação e a vibração ambiental. O conjunto de elementos físicos e biológicos que alteram o padrão de interferência do *biospeckle* laser é constituído por diversos elementos. Atualmente, diversas técnicas de processamento de imagens tem sido empregadas para quantificar o nível de atividade de materiais biológicos e correlacionar esses níveis com padrões de qualidade. No entanto, as técnicas empregadas até o momento para analisar sementes por meio do *biospeckle* laser não conseguem diferenciar os diversos elementos de forma satisfatória. A diferenciação desses elementos é de fundamental importância para o aproveitamento do fenômeno em aplicações reais, tais como a análise de viabilidade e vigor de sementes. Essa diferenciação possibilitaria a elaboração de procedimentos de análise rápidos, automáticos, objetivos e não destrutivos. Entre os elementos de grande relevância para a análise de sementes estão os danos físicos, que podem ser decorrentes de impacto durante o manejo, de ataques de insetos, entre outros e, normalmente, provocam na semente áreas com atividade biológica reduzida. Por outro lado, uma semente pode conter áreas infestadas por fungos e microrganismos diversos, sendo que essas áreas, no geral, constituem áreas de alta atividade biológica. A fundamentação teórica do *biospeckle* laser permite supor que seja possível identificar e mapear os fenômenos decorrentes da atividade biológica em sementes, inserindo no processamento das imagens, técnicas de análise de frequência como a Transformada de *Wavelets* (**TW**). Desta forma, este trabalho teve como objetivo principal verificar a potencialidade da **TW** aplicada ao sinal do *biospeckle* laser, para identificar e mapear fenômenos de atividades em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Para a aquisição dos dados foram utilizados uma câmera monocromática, uma câmera digital, um emissor laser HeNe vermelho de 632 nm e 10 mW de potência e um emissor laser de diodo de 632 nm e 5 mW de potência. Para aferir os resultados foi utilizado o teste padrão de Tetrazólio (**TZ**). Utilizando as técnicas mencionadas, foram gerados mapas digitais de atividade, sendo esses comparados com os resultados do **TZ**. Os resultados mostraram que o mapeamento pela **TW** são capazes de identificar danos naturais e mecânicos em sementes de feijão. Os danos térmicos provocados artificialmente também são identificados, bem como as atividades decorrentes de reações químicas superficiais. A técnica de filtragem por **TW** apresenta grande potencialidade na identificação de fenômenos de baixa e alta atividade nas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e, seus resultados, podem ser correlacionados com danos e contaminações.

Palavras-chave: Processamento de imagens, *Speckle*, Sementes - Análise.

ABSTRACT

The laser biospeckle is an optical interferometric phenomena that occurs when an incident light insides on an active biological material surface. The material activity can be originated from biological processes or even from some isolated physical phenomena. It does exist a group of components in a biological material which can change the biospeckle interference pattern. Many images processing techniques have been employed to quantify the activity level of a biological material and to correlate it with quality patterns. However, the techniques employed at this time for to quantify activity level and to evaluate seed quality, can not be employed to identify the components with acceptable accuracy. However, the identification and differentiation of these components is of fundamental importance to technique development applicable to a variety of situations as seed viability analysis, seed vigor, generating quick and non destructive, as well as capable of automation methods. Physical damages occurring by impact during product handling, insect attack and others do generate zones of low biological activities. By other side, seeds can exhibited zones attacked by fungi and other microorganisms holding high biological activities. Theoretical considerations support the possibility of identifying as well as mapping the phenomena originated from biological activities in seeds by inserting Wavelets Transform (**TW**) and Frequency Analysis in the image processing. Based on what it has been exposed before, the objectives of this research work can be summarized as to verify the potentiality of the **Wavelets Transform (TW)** applied to the laser biospeckle signal in indentifying and mapping phenomena associated to activities in seeds of *Phaseolus vulgaris*, L. The experimental setup included a monochromatic camera, a digital camera, a 632 red and 10 mW powered HeNe laser and a diode 632 nm and 5 mW powered. A tetrazolium (**TZ**) test was employed as a pattern test. The above described procedure generated digital maps of activity which were compared with the **TZ**. Results showed that the technique are able of identifying natural and mechanical bruising beans seeds. Artificially generated thermal and chemical damages were identified as well. **TW** filtering techniques exhibits significant potentiality in indentifying high and low activities in beans seeds (*Phaseolus vulgaris*, L.) that can be correlated to damages and contaminations.

Keywords: Image processing, Speckle, Seed analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens de STS sem atividade e com alta atividade respectivamente. Fonte: (RABELO, 2000).	5
Figura 2 - Matriz de Ocorrências Modificada das figuras 1 – a e 1 - b, respectivamente. Fonte: (RABELO, 2000).	6
Figura 3 – Matriz 3s formada apartir de uma linha central de 640 pixels retirada de 25 imagens com difernetes faixas de frequencias. Fonte: (MARQUES; BRAGA; PEREIRA, 2010).	18
Figura 4 - Semente do Soja processada pelo <i>biospeckle</i> e com o tetrazólio. Fonte: (BRAGA JR,2000)	19
Figura 5 – Anatomia da semente de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.). Fonte: (BORÉM, 2001).	20
Figura 6 – Recipientes com vários compartimentos de armazenamento contendo os cotilédones e a solução de TZ envoltos em papel alumínio para bloquear a entrada de luz durante a reação.	23
Figura 7 – Cotilédones dispostos nos recipientes abertos após a reação com TZ .	23
Figura 8 – Recipientes com vários compartimentos de armazenamento contendo os cotilédones das sementes para armazenamento até a execução dos ensaios com <i>biospeckle</i> laser.	23
Figura 9 – Diagrama ilustrando as etapas experimentais.	24
Figura 10 – Disposição dos equipamentos experimentais durante a captura das imagens e iluminação pelo laser.	25
Figura 11 – Representação da agulha aquecida perfurando o cotilédone da semente de feijão.	26
Figura 12 – Diagrama representando as etapas experimentais.	27
Figura 13 – Caixa usada para armazenar a semente durante a reação.	29
Figura 14 – Diagrama representando as etapas experimentais.	30
Figura 15 – Iniciando o processo de reação química.	32
Figura 16 – Mapas de Tetrazólio.	33
Figura 17 – Semente com danos evidenciados pelo teste de Tetrazólio, 1 atividade respiratória diferenciada, 2 plúmula morta.	34
Figura 18 – Imagem do teste TZ e o resultado DG sem filtragem, respectivamente, da mesma semente, em que 1 representa atividade respiratória diferenciada e 2 a plúmula morta.	35
Figura 19 – Imagem do teste TZ e o resultado Fujii sem filtragem, respectivamente, da mesma semente, em que 1 representa atividade respiratória diferenciada e 2 a plúmula morta.	36
Figura 20 – Mapas DG para as 25 faixas de frequências (da mais alta a mais baixa) representados em pseudo cores em escala de 0 a 255 .	37
Figura 21 – Mapas DG sem filtragem e mapa DG filtrado, respectivamente, na faixa de frequência de número 14.	38
Figura 22 – Mapas Fujii sem filtragem e mapa Fujii filtrado, respectivamente, na faixa de frequência de número 14.	38
Figura 23 – Mapa TZ mostrando as áreas amostradas para análise pela matriz 3s .	39
Figura 24 – Matriz 3s da linha passando pela plúmula morta da semente gerada a partir das imagens DG mostrando uma área de baixa atividade nas imediações do pixel 170.	40
Figura 25 - Matriz 3s da linha passando pelo dano com atividade diferenciada na semente gerada a partir das imagens DG mostrando uma área mais ativa nas imediações do pixel 44.	41

Figura 26 - Matriz 3s da linha passando pela plúmula morta da semente gerada a partir das imagens Fujii mostrando uma área de baixa atividade nas imediações do pixel 170.	42
Figura 27 - Matriz 3s da linha passando pelo dano com atividade diferenciada na semente gerada a partir das imagens Fujii mostrando uma área mais ativa nas imediações do pixel 44.	43
Figura 28 – Imagem microscópica de luz polarizada da área de fronteira entre células danificadas pelo dano térmico e células intactas (aumento de 10 vezes).	44
Figura 29 – Mapa de Tetrazólio (TZ) das sementes danificadas pela agulha aquecida, mostrando a área branca na parte central como resultado do dano térmico.	45
Figura 30 – Imagem do teste TZ e o resultado DG sem filtragem, respectivamente, da mesma semente, mostrando a região correspondente ao dano e sua periferia.	46
Figura 31 – Imagem do teste TZ e o resultado Fujii sem filtragem, respectivamente, da mesma semente, mostrando a região correspondente ao dano e sua periferia.	46
Figura 32 – Matriz 3s gerada a partir das imagens DG de uma semente com dano térmico pontual.	47
Figura 33 - Matriz 3s gerada a partir das imagens Fujii de uma semente com dano térmico pontual.	48
Figura 34 – Imagem fotocopiada da Semente após contato com gota de TZ durante 4 horas em ambiente escuro.	49
Figura 35 – Fujii e DG , representadas em pseudo-cores, do momento inicial (t = 0 h) e final (t = 4 h) respectivamente.	50
Figura 36 – Matriz 3s gerada a partir das imagens Fujii de uma semente com uma gota de TZ no centro (pixel 200), no momento que a gota foi colocada.	51
Figura 37 – Matriz 3s gerada a partir das imagens Fujii de uma semente com uma gota de TZ no centro (pixel 200) quatro horas após a gota ter sido colocada.	52
Figura 38 – Matriz 3s gerada a partir das imagens DG de uma semente com uma gota de TZ no centro (pixel 200), logo após o momento em que a gota foi colocada.	53
Figura 39 – Matriz 3s gerada a partir das imagens DG de uma semente com uma gota de TZ no centro (pixel 200) quatro horas após a gota ter sido colocada.	54
Figura 40 – DG de um cotilédone com uma reação química ocorrendo no centro da mesma.	55
Figura 41 – Fujii de um tegumento com uma reação química ocorrendo no centro da mesma.	56
Figura 42 – Matriz 3s gerada a partir das imagens Fujii de uma semente com uma gota de sal de frutas em sua superfície (pixel 184).	57
Figura 43 - Matriz 3s gerada a partir das imagens DG de uma semente com uma gota de sal de frutas em sua superfície (pixel 184).	58

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO	NÚMERO	PÁGINA
$COM = N_{ij} $	(1)	5
$MDI = \sum_{ij} M_{ij(i-j)^2}$	(2)	6
$I_{(x,y)} = \sum_k \sum_I I_k(x,y) - I_{k+1}(x,y) $	(3)	7
$I(x,y) = \sum_{k=1}^{N-1} \left \frac{I_{k+1}(x,y) - I_k(x,y)}{I_{k+1}(x,y) + I_k(x,y)} \right $	(4)	7
$F(w) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-iwt} dt$	(5)	13

$$(f * g)(t) = \int_0^t f(t) (t - T) dt \quad (6) \quad 13$$

$$(f \circ g)(t) = \int_0^t f(T) g(t - T) dT \quad (7) \quad 14$$

$$f * f^{-*} \quad (8) \quad 14$$

$$\Im\{f * f^{-*}\} = |F|^2 \quad (9) \quad 14$$

$$\Im\{f * f\} = F^2 \quad (10) \quad 14$$

$$|\Im\{f * f\}| = |F^2| = |F|^2 = \Im\{f * f^{-*}\} \quad (11) \quad 15$$

$$f(p, w) = \sum_{x=0}^{N-1} f(x) w(x - p) e^{(-iwx)} \quad (12) \quad 15$$

$$wf(a,b) = \int\limits_{-\infty}^{\infty} f(x)y_{a,b}(x)dx \qquad (13) \qquad 16$$

$$wf(a,b) = \sum_{x=0}^{N-1} f(x)y_{a,b}(x) \qquad (14) \qquad 16$$

$$y_{a,b}(x) = \frac{1}{\sqrt{a}}y\left(\frac{x-b}{a}\right) \qquad (15) \qquad 17$$

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
3s Matrix	<i>Space Spectral Speckle Matrix</i>
Aw	Atividade de água.
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
COM	<i>Concurrence Matrix</i>
DG	Diferenças Generalizadas
FFT	Transformada Rápida de Fourier
Fujii	Método de Geração de Mapa de Atividade.
Hurst (H)	Expoente de Hurst
LASCA	<i>Laser Speckle Contrast Analysis</i>
MDI	Módulo de Dispersão de Intensidades
MI	Momento de Inércia
MOC	Matriz de ocorrência modificada
STS	<i>Spatial Temporal Speckle</i>
TF	Transformada de Fourier
TFJ	Transformada de Fourier Janelada
TW	Transformada de Wavelets
TZ	Teste de Tetrazólio
b.u.	Umidade em Base Úmida

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE EQUAÇÕES	xii
LISTA DE SÍMBOLOS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral	3
2.2. Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Considerações iniciais sobre o <i>biospeckle</i>	4
3.2. Metodologias de Avaliação do <i>biospeckle</i>	4
3.2.1. Momento de inércia (MI)	4
3.2.2. Diferenças Generalizadas (DG)	6
3.2.3. Método de Fujii	7
3.2.4. Método de Contraste de Correlações Sucessivas	8
3.2.5. Laser <i>Speckle</i> Contrast Analysis (LASCA)	8
3.2.6. LASTCA: Análise de Contraste Temporal do Laser <i>Speckle</i>	9
3.2.7. Coeficiente de <i>Hurst</i>	9
3.2.8. Método de quantificação baseado na entropia	10
3.3. <i>Biospeckle</i> Laser em Sementes	10
3.4. <i>Biospeckle</i> Laser em Medicina	11
3.5. Outras Aplicações Para o <i>Biospeckle</i>	12
3.6. Análise de frequência do <i>biospeckle</i> laser	13
3.6.1. A transformada de Fourier	13
3.6.2. Filtros utilizando a Transformada de Fourier	15
3.6.3. Transformada de <i>Wavelet</i> (TW)	16
3.6.4. Transformada de <i>Wavelet</i> (TW) aplicada ao <i>biospeckle</i>	17
3.7. Motivação para realização deste trabalho	19
3.8. Teste de tetrazólio (TZ)	19
3.9. Anatomia da semente de feijão	20
4. METODOLOGIA	22
4.1. Experimento 1 – danos naturais e mecânicos	22
4.2. Experimento 2 – danos térmicos provocados por uma agulha aquecida	25
4.3. Experimento 3 – Reação química em área localizada com gota de Tetrazólio	28
4.4. Experimento 4 – Reação química com bicarbonato de sódio ($\text{NaHCO}_3 + \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 + \text{Na}_2\text{CO}_3$)	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Experimento 1 – danos naturais e mecânicos	33
5.1.1. Identificação das áreas danificadas nas sementes	33
5.1.2. Resultados do teste DG e Fujii sem filtragem	35
5.1.3. Resultados do teste DG e Fujii com filtragem	36
5.2. Experimento 2 – danos térmicos provocados por uma agulha aquecida	43

5.2.1. Identificação e comprovação das áreas danificadas nas sementes	43
5.2.2. Resultados do teste DG e Fujii sem filtragem.....	45
5.2.3. Resultados do teste DG e Fujii com filtragem	47
5.3. Experimento 3 – Reação química pontual com gota de Tetrazólio	49
5.3.1. Comprovação da reação ocorrida pelo contato entre a gota e o tecido da semente	49
5.3.2. Resultados do teste DG e Fujii sem filtragem.....	50
5.3.3. Resultados do teste DG e Fujii com filtragem	51
5.4. Experimento 4 – Reação química pontual com sal de frutas ($\text{NaHCO}_3 + \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ + Na_2CO_3) e gota de água.....	55
5.4.1. Resultados do teste DG e Fujii sem filtragem.....	55
5.4.2. Resultados do teste DG e Fujii com filtragem	56
5.5. Considerações finais.....	58
6. CONCLUSÕES	60
7. TRABALHOS FUTUROS	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9. APÊNDICES	66

1. INTRODUÇÃO

O *biospeckle* ou *speckle* dinâmico é um fenômeno óptico de interferência que ocorre quando há incidência de luz coerente em materiais, cuja superfície seja opticamente rugosa e que possui algum tipo de atividade. O padrão de interferência formado está diretamente relacionado à posição e ao arranjo dos objetos espalhadores, sendo que, a mínima perturbação nesse arranjo irá provocar alterações no padrão de interferência resultante. Consequentemente, pode-se afirmar que as alterações ocorridas no padrão de interferência carregam informações relativas à atividade na superfície do objeto iluminado, bem como abaixo dela. Em materiais biológicos, os níveis de atividades estão diretamente relacionados com a viabilidade celular, troca de gases, respiração, atividade microbiana e atividade de água (**aw**). Por esta razão, o fenômeno tem sido estudado como uma potencial ferramenta aplicável à análise de qualidade e viabilidade de diversos materiais biológicos, como viabilidade de semê, patologias cutâneas em seres humanos (SILVA, 2007), identificação de parasitos no sangue (ROMERO, 1999), mapeamento de nervuras do tecido vegetal e medição de fluxo sanguíneo (SILVA, 2007). Na Engenharia Agrícola os esforços no emprego dessa técnica têm se concentrado na busca por métodos rápidos, objetivos e não destrutivos na avaliação de materiais biológicos, sobretudo na área de sementes, sendo os principais estudos relacionados à avaliação de viabilidade e vigor de sementes, diferenciação de sementes, mapeamento de áreas com atividades distintas (BRAGA JR, 2000), avaliação do teor de água e identificação de espécies de fungos (BRAGA JÚNIOR *et al.*, 2005). As principais técnicas empregadas na análise do fenômeno são baseadas na variação temporal dos dados com estatísticas de primeira e segunda ordem, tais como a História Temporal do *Speckle* (**STS**) e as Matrizes de Ocorrências Modificadas (**MOC**), permitindo tanto a criação de mapas de atividades, empregando técnicas tais como as Diferenças Generalizadas (**DG**) e o Método de Fujji, bem como a quantificação do fenômeno, empregando a técnica conhecida como Momento de Inércia (**MI**) ou Módulo de Dispersão de Intensidades (**MDI**). Dado a complexidade dos materiais biológicos, as técnicas mencionadas têm se mostrado insuficientes para a extração de informações que possibilitem uma inferência mais ampla relativo à natureza da atividade que está sendo monitorada. Neste sentido alguns autores têm proposto técnicas que levam em conta informações relativas ao padrão de frequência do *biospeckle* estudado, tais como as Transformadas de Fourier (**TF**) (ENES, 2005)

e as Transformadas de Wavelets (**TW**) (BRAGA JR *et al.*, 2005). Essas técnicas permitem a decomposição dos padrões de frequências do *biospeckle*, permitindo estudar a relação entre os elementos amostrais e inferir em quais harmônicos, a influência de cada elemento se dará em maior proporção.

Supõe-se que a inserção dessas técnicas no processamento das imagens provenientes do *biospeckle* laser, torne possível a identificação e geração de mapas exibindo áreas com atividades distintas em sementes, permitindo, por conseguinte, a localização de fenômenos que podem comprometer a viabilidade e vigor da mesma. Diante do exposto, este trabalho buscou investigar a aplicação das **TW** na identificação de fenômenos de atividade em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar a potencialidade da técnica de filtragem por **TW** na identificação de fenômenos de baixa e alta atividade nas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), correlacionando-as com possíveis danos e contaminações.

2.2. Específicos

- Investigar a aplicação da técnica na identificação de danos naturais e mecânicos;
- Investigar a aplicação da técnica na identificação de danos ocasionados por ação térmica;
- Investigar a aplicação da técnica na identificação de áreas com uma reação química.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Considerações iniciais sobre o *biospeckle*

O *biospeckle* pode ser definido como sendo um fenômeno óptico de interferência que ocorre quando o laser incide sobre uma superfície onde se desenvolve um processo dinâmico (RABELO, 2000). Esse fenômeno é bem conhecido em estudos de óptica, ocorrendo quando a luz laser incidente se espalha sobre uma superfície, a qual exibe algum tipo de atividade. Pode ser notado quando se ilumina, com luz laser, materiais biológicos, como por exemplo, sementes, ou em fenômenos não biológicos como a corrosão e a evaporação. Se o objeto difusor se move, os grãos individuais do padrão de *speckle* também se movem alterando assim, a sua forma. Isso permite supor que os padrões de *speckle* dinâmico contêm informações sobre o movimento do objeto. 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.

Por ser dinâmico, o *biospeckle* deve ser analisado com técnicas de processamento de imagens e tratamento estatístico, uma vez que a observação visual permite apenas a identificação da existência do fenômeno, mas não permite quantificá-lo (RABAL; TRIVI E ARIZAGA, 1996).

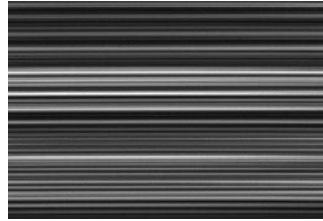
3.2. Metodologias de Avaliação do *biospeckle*

3.2.1. Momento de inércia (MI)

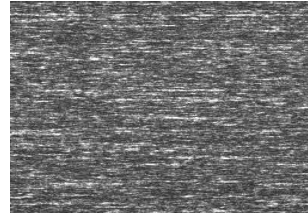
Rabelo (2000) explica o que vem a ser o **STS**, bem como, o módulo de dispersão de intensidades, da seguinte forma:

O Padrão temporal do “speckle” (STS) constitui-se de uma manipulação das diversas imagens obtidas da superfície do objeto iluminado pelo laser. De cada imagem conseguida, retira-se uma linha que é colocada ao lado da linha da imagem subsequente, formando uma imagem de 512x512 “pixels” denominada de STS. A ocorrência de algum movimento superficial ou interno do material será transmitida para a figura do “speckle” formado e assim, a linha 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 mesmo padrão de antes. (RABELO, 2000, p. 12).

Conforme a explicação do autor, a figura 1a apresenta o **STS** de um material que não possui atividade, enquanto que a figura 1-b, apresenta o **STS** de um material que exibe alta atividade.



1 a – STS sem atividade



1 b – STS alta atividade

Figura 1 - Imagens de **STS** sem atividade e com alta atividade respectivamente. Fonte: (RABELO, 2000).

A imagem do **STS** carrega informações relativas à atividade do material sob estudo. Embora as diferenças entre uma imagem **STS** proveniente de um material de baixa atividade, e uma imagem **STS** proveniente de um material de alta atividade possa ser visualmente constatada sem maiores dificuldades, essa diferença qualitativa não é suficiente para fins de automação no processamento dos dados. Sendo assim, procurou-se elaborar métodos matemáticos que pudessem expressar de forma numérica o nível de atividade correspondente a uma imagem **STS**. Para chegar a esta quantificação, torna-se necessário transformar a matriz **STS** em uma matriz de ocorrências denominada *concurrence matrix* (**COM**), cuja definição matemática está representada na equação 1.

$$COM = |N_{ij}| \quad (1)$$

em que,

N_{ij} – número de ocorrências de intensidades

i, j – intensidades sucessivas

A matriz de ocorrências assume a forma predominante de uma matriz diagonal, onde os valores principais se concentram em torno da diagonal principal (quando $i = j$). Os desvios

da diagonal principal estão relacionados com o nível de atividade, pois quando uma intensidade aparece seguida de um valor diferente significa que ocorreu variação na intensidade do pixel, e nesse caso, i é diferente de j . A figura 2 mostra a matriz de ocorrências da figura 1a e Figura 1b, respectivamente.

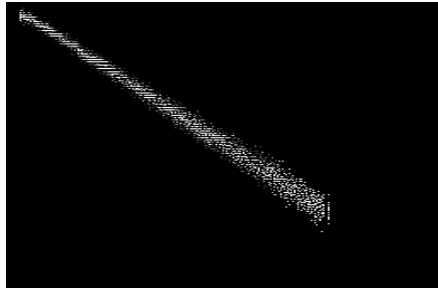


Fig. 2-a MOM baixa atividade

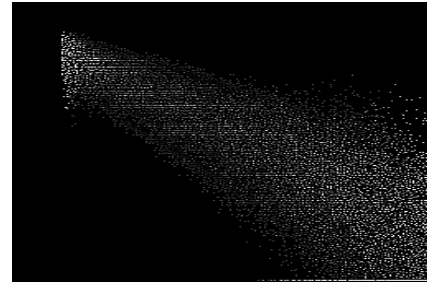


Fig 2-b MOM alta atividade

Figura 2 - Matriz de Ocorrências Modificada das figuras 1 – a e 1 - b, respectivamente. Fonte: (RABELO, 2000).

Para se extrair um número que represente ou quantifique essa dispersão, Arizaga *et al.* (1999) propuseram calcular o momento de inércia (**MI**) da matriz de ocorrências modificada (**MOM**). O método foi estudado por Rabelo (2000), que comprovando sua eficácia passou a tratá-lo como Módulo de Dispersão de Intensidade (**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 2 representa a operação do módulo de dispersão de intensidades, mais conhecido como momento de inércia (**MI**).

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

3.2.2. Diferenças Generalizadas (DG)

O método de Diferenças Generalizadas (**DG**) permite indicar áreas que apresentem diferentes níveis de atividades relacionadas à mudança do padrão do *speckle* observado. Essa

metodologia se baseia em trabalhar a imagem obtida do corpo iluminado, identificando a intensidade luminosa de cada pixel que a compõe, sendo essa intensidade é expressa por $I(x,y)$, em que (x,y) são as coordenadas do pixel. O que se faz, então, é realizar uma soma de diferenças de intensidade entre uma imagem e a sua subsequente (ARIZAGA *et al.*, 1999). O resultado será uma nova imagem e um clareamento dos pixels que apresentarem mudanças de intensidade, representado pela equação 3.

$$I_{(x,y)} = \sum_k \sum_I |I_k(x, y) - I_{k+1}(x, y)| \quad (3)$$

Em que: k - número da imagem

I – intensidade

x,y –pixels subsequentes.

Usualmente, o número de imagens utilizadas no processamento é da ordem de centenas.

3.2.3. Método de Fujii

Assim como o método de **DG**, o método de **Fujii** (FUJII *et al.*, 1987) permite identificar áreas em um espécime com diferentes níveis de atividade, porém aqui há uma ponderação na qual as diferenças das imagens consecutivas são divididas pela soma das mesmas. A equação 4 mostra como a imagens proveniente do método **Fujii** é calculada.

$$I(x, y) = \sum_{k=1}^{N-1} \left| \frac{I_{k+1}(x, y) - I_k(x, y)}{I_{k+1}(x, y) + I_k(x, y)} \right| \quad (4)$$

Em que: N – é o número total de imagens.

Em alguns casos, o **Fujii** permite uma melhor visualização do que ocorre, em termos de atividade, no material analisado devido a esta ponderação.

Esta técnica, juntamente com o **DG**, foi utilizada neste trabalho para a identificação de fenômenos em sementes, delimitando áreas com níveis de atividade diferentes.

3.2.4. Método de Contraste de Correlações Sucessivas

Nesse 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 diferente. O equacionamento matemático encontra-se detalhado no trabalho de Silva (2007).

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

B. Ruiz *et al.* (2005) descreve com detalhes como esta técnica pode ser utilizada para tratar matematicamente as imagens de *biospeckle* coletadas.

3.2.5. Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA)

Este método foi proposto por Briers e Webster (1995) e sua sigla quer dizer *Laser Speckle Contrast Analysis*, em português, Análise de Contraste do *Speckle* Laser. Seu princípio é 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. 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. Sua vantagem é permitir que a avaliação seja feita a partir de uma única fotografia, sendo útil em aplicações da medicina, ou quando se trabalha com animais cuja respiração e movimentação, dificultam a permanência na mesma posição para obtenção de sequências de imagens (SILVA, 2007).

Briers e Webster (1995) mostram detalhes matemáticos da técnica e a forma como ela é utilizada para tratar e interpretar as imagens de *speckle* dinâmico obtido de materiais biológicos.

3.2.6. LASTCA: 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)

3.2.7. Coeficiente de *Hurst*

O parâmetro ou expoente de *Hurst* (H) é uma ferramenta capaz de caracterizar o grau de auto-similaridade 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 valores entre $0 < H < 0.5$, o sinal é caracterizado como anti-persistente, 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 auto-similares 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, semi-variograma, 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 multiresolução (SOTERRONI; DOMINGUES; RAMOS, 2008).

Passoni (2004) propôs a descrição do *speckle* dinâmico com base no estimador de *wavelet* de *Hurst*. Considerando a caracterização prévia 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.

3.2.8. 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).

3.3. *Biospeckle* Laser em Sementes

Na literatura encontram-se três linhas principais de estudos de aplicação do *biospeckle* em sementes, sendo elas relacionadas com avaliação de teor de água, diferenciação dos níveis de atividade e detecção de patógenos. Tais estudos devem ser analisados em conjunto, pois trazem importantes informações de interação do fenômeno, contribuindo assim para o domínio da técnica do *biospeckle* laser como uma ferramenta para a análise de qualidade de sementes e avaliação de materiais biológicos.

Braga Júnior (2000), trabalhando com sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em cinco diferentes níveis de umidade (13, 20, 30, 37, 46 % *b.u.*) com e sem recobrimento com filme de PVC, comprovou a influência do teor de água e da evaporação nos resultados do *biospeckle*. O autor utilizou a técnica conhecida como Diferenças Generalizadas (**DG**).

Braga Júnior *et al.* (2000 e 2001), utilizaram o laser para diferenciar tecidos vivos de tecidos mortos em sementes, utilizando as técnicas conhecidas como **Asakura** e **MI**

respectivamente. Os autores mostraram que as técnicas mencionadas possuem potencial para ser utilizada na avaliação de sementes e materiais biológicos.

Moreira *et al.* (2002), realizaram um estudo de caracterização da transmissão do laser em sementes de feijão avaliando três diferentes espessuras (1 mm, 2 mm e 4 mm) e dois níveis de umidade (9,5 % e 23,5 % *b.u.*). Os resultados mostraram que quanto maior o teor de água, maior é a penetração do laser no tecido da semente.

Enes *et al.* (2004) avaliaram a sensibilidade do método do *biospeckle* laser trabalhando com sementes de feijão com diferentes níveis de atividade. Observou-se ser possível diferenciar níveis extremos e alguns níveis intermediários de atividade. As sementes com níveis intermediários de atividade foram obtidas através da técnica conhecida como envelhecimento acelerado e na quantificação do *biospeckle* foi utilizado o **MI**.

Enes (2005) avaliou a interação dinâmica de interferência da água em tecidos vivos e tecidos mortos de sementes de feijão. O trabalho mostrou ser possível utilizar o *biospeckle* para diferenciar níveis de atividade em diferentes faixas de umidade e o quanto o teor de água influencia nos resultados.

Rodrigues (2007) utilizou o *speckle* dinâmico para avaliar a atividade metabólica de sementes utilizando a técnica de entropia.

Nascimento *et al.* (2007) propuseram métodos de simulação computacional para o fenômeno *biospeckle* laser simulando sua aplicação em sementes.

3.4. *Biospeckle* Laser em Medicina

Briers (1993) cita as diversas aplicações do *biospeckle* na área médica, como por exemplo; medição de fluxo sanguíneo na retina, avaliação e mapeamento de fluxo sanguíneo na pele, medida de fluxo sanguíneo em órgãos internos e no fundo ocular, análise da atividade biológica em células vivas e análise de emissão de calor em embriões de ovos. O autor ressalta ainda, as potencialidades de aplicação do *biospeckle* na área biológica.

Briers e Webster (1995) utilizaram a técnica conhecida como **LASCA** (*Laser speckle contrast analysis*) para estudar o contraste do *speckle* laser no monitoramento do fluxo sanguíneo capilar.

Romero (1999) utilizou o *biospeckle* laser para diferenciar sangue contaminado com *Trypanosoma Cruzi* de sangue não contaminado.

Briers (2000) apresenta uma revisão sobre as técnicas do *biospeckle* e suas potenciais aplicações na medicina, no estudo o autor mostra o tratamento matemático do fenômeno, fala sobre a variação temporal do *speckle* e as diversas aplicações biomédicas tanto das propriedades estatísticas de primeira ordem quanto das propriedades estatísticas de segunda ordem.

3.5. Outras Aplicações Para o *Biospeckle*

Oulamara, Tribillon e Duvernoy (1989) utilizaram a correlação temporal do *speckle* para avaliar atividade em superfícies de espécimes botânicos.

Hogert *et al.* (1994) utilizaram o laser para avaliar deformações e movimentos de superfícies.

Xu, Joenathan e Khorana (1995) utilizaram o *biospeckle* para avaliar as propriedades espaciais e temporais de espécimes botânicos.

Mizukami, Muramatsu e Soga (1997) utilizaram o *biospeckle* para avaliar o espalhamento de luz laser por partículas num meio líquido, visando, entre outros, a proposta de um modelo para aplicação na área ambiental.

Patorski e Olszak (1997) e Lehmann (1997) utilizaram o padrão do *speckle* interferométrico laser para avaliar superfícies de objetos.

Rabelo (2000) avalia a qualidade de laranjas utilizando o *biospeckle* laser, o autor passa a denominar o método de quantificação, antes chamado de Momento de Inércia (**MI**), de Módulo de Dispersão de Intensidades (**MDI**).

Amalvy *et al.* (2001) propõem uma nova técnica para avaliar secagem de pintura baseada no *speckle* dinâmico interferométrico.

Pajuelo *et al.* (2003) utilizaram o *biospeckle* para avaliar danos em frutos.

3.6. Análise de frequência do *biospeckle* laser

3.6.1. A transformada de Fourier

As técnicas de processamento e quantificação apresentadas até o momento, não avaliaram informações relativas às frequências que compõem os sinais presentes nas imagens, o que poderia trazer mais informações sobre os processos monitorados, uma vez que, cada imagem carrega informações sobre a variação temporal da intensidade do pixel; essa variação, por sua vez, está relacionada com a atividade do material que está sendo iluminado. Dessa forma, é possível decompor a variação de intensidade do pixel em um espectro de frequência, a exemplo do que é feito na análise de um sinal de áudio. Assim, ao considerar que uma linha amostral retirada de imagens sucessivas de 512 pontos contém uma função temporal estacionária, essa função pode ser decomposta em uma série de harmônicos através da Transformada de Fourier. Como os dados se apresentam de forma discreta, utiliza-se a transformada discreta de Fourier. Esta transformada pode ser calculada para todo vetor de comprimento 2^n através de um algoritmo computacional denominado *Fast Fourier Transform* (FFT) ou Transformada Rápida de Fourier, conforme descrito nos trabalhos de Loan (1992); Meyer (2000); Oppenheim, Schafer e Buck (1999); Press (1992); Rivest, Shamir e Adleman (1978). A equação 5 é a expressão da Transformada de Fourier para uma função contínua.

$$F(w) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-iwt} dt \quad (5)$$

A equação 6 representa a convolução da função f pela função g .

$$(f * g)(t) = \int_0^t f(t) (t - T) dt \quad (6)$$

A equação 7 expressa a correlação cruzada entre duas funções, denominadas f e g .

$$(f \circ g)(t) = \int_0^t f(T)g(t - T)dT$$
(7)

Quando $g=f$, tem-se a autocorrelação, que pode ser representada pela equação 8.

$$f * f^{-*}$$
(8)

Em que f^{-*} representa a função f invertida no tempo. Segundo o teorema de Wiener-Kintchine, a transformada de Fourier da autocorrelação de uma função f qualquer é igual ao quadrado do Módulo da transformada de Fourier da função f (equação 9).

$$\mathfrak{I}\{f * f^{-*}\} = |F|^2$$
(9)

Por outro lado, o Teorema da Convolução, diz que a transformada de Fourier da convolução de uma função f é igual ao quadrado da transformada de Fourier da função f (equação 10).

$$\mathfrak{I}\{f * f\} = F^2$$
(10)

Dessa forma, pode-se afirmar que o módulo da transformada de Fourier da convolução é numericamente igual a transformada de Fourier da autocorrelação (equação 11).

$$|\mathfrak{F}\{f * f\}| = |F|^2 = |F|^2 = \mathfrak{F}\{f * f^{-*}\} \quad (11)$$

Isto permite supor que, tanto a convolução da Transformada de Fourier quanto a correlação, podem ser igualmente utilizadas para a realização de trabalhos que permitam a análise de frequência de imagens.

3.6.2. Filtros utilizando a Transformada de Fourier

O uso das transformadas de Fourier (**TF**) não se limita a simples análise de frequências, mas também permitem a criação de filtros para a eliminação de determinada faixas de frequências. Isto é conseguido calculando a Transformada, eliminando as faixas de frequência desejadas e realizando a Transformada de Fourier inversa. A eliminação das faixas de frequência é feita eliminando 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.

Matematicamente, a **TFJ** é definida como:

$$f(p, w) = \sum_{x=0}^{N-1} f(x)w(x-p)e^{(-jvx)} \quad (12)$$

$w(\mathbf{x})$ é a função de *janelamento* e p é a posição da janela na função.

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*.

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

3.6.3. Transformada de *Wavelet* (TW)

A transformada de *wavelet* (**TW**) surgiu como uma resposta as limitações da **TF**. Por ser mais modelável, do ponto de vista matemático, a **TW** permite que seja ajustada uma função para cada sinal (ou imagem) com janelamento variável e bordas suavizadas. A equação 13 traz a definição matemática para a Transformada de *Wavelet* (**TW**) de uma função $f(x)$.

$$wf(a, b) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) y_{a,b}(x) dx \quad (13)$$

Para dados discretos a função 13 pode ser simplificada, ficando representada por um somatório, como exibido na equação 14.

$$wf(a, b) = \sum_{x=0}^{N-1} f(x) y_{a,b}(x) \quad (14)$$

A função $y_{a,b}(x)$ é chamada de *wavelet* e é derivada de $y(x)$, como demonstra a equação 15.

$$y_{a,b}(x) = \frac{1}{\sqrt{a}} y\left(\frac{x-b}{a}\right)$$

(15)

Na **TW**, **b** representa a translação da *wavelet*, ou posição da janela, enquanto o **a** está relacionado ao tamanho da janela. Para trabalhos envolvendo dados discretos, normalmente utiliza-se $a=2^m$ e $b=n2^m$, sendo **m** e **n** números inteiros e **a** e **b** o número de imagens usados na análise.

Para o cálculo computacional, normalmente utiliza-se o algoritmo de decomposição em árvore proposto por Mallat (1989). A utilização do algoritmo de Mallat (1989) permite a elaboração de filtros passa baixa e filtros passa alta, dando assim, maior poder de análise a **TW**.

3.6.4. Transformada de *Wavelet* (TW) aplicada ao *biospeckle*

Em se tratando de trabalhos envolvendo *biospeckle*, estudos realizados por alguns autores tem apresentado grande potencial de aplicação da Transformada de *wavelets* na análise do fenômeno. Passoni *et al.* (2005) utilizaram *wavelets* e entropia para avaliar processo de secagem de pintura, sementes e danos em frutos. Braga Júnior *et al.* (2007) utilizaram *wavelets* para avaliar imagens provenientes de diversos materiais biológicos. Marques, Braga e Pereira (2010) utilizaram *wavelets* na avaliação de processos dinâmicos em biofilme, conseguindo identificar áreas de baixa atividade circundadas por áreas de alta atividade utilizando o método de filtragem baseado em *wavelets*. Os autores propuseram ainda, uma nova maneira de avaliar os resultados provenientes da filtragem, que denominaram *Space Spectral Speckle Matrix (3s Matrix)*. Esta metodologia foi utilizada neste trabalho, adotando-se a nomenclatura **matriz 3s**. Esta matriz é gerada da seguinte forma: Utilizando-se um conjunto de 128 imagens representativas da variação temporal do *speckle*, realiza-se a filtragem em frequências por *wavelets*, utilizando as ferramentas disponíveis no software MATLAB. Como resultado desta filtragem, tem-se um conjunto de 25 bandas de frequências, sendo que cada uma destas bandas contem 128 imagens filtradas. Utilizando-se a metodologia

DG ou Fujii, procede-se então a geração dos mapas de atividades para cada uma das 25 bandas de frequência, obtendo desta forma, 25 mapas de atividades. Em seguida, toma-se uma linha de pixels passando por uma área de interesse, sempre na mesma posição, em cada uma dos 25 mapas de atividades gerados, sendo que estas linhas são agrupadas, formando uma matriz, na qual o eixo das abscissas corresponde ao tamanho da linha em pixels e o eixo das ordenadas às bandas de frequência. A título de ilustração, pode-se observar na Figura 3 o resultado alcançado por Marques, Braga e Pereira (2010) avaliando biofilmes.

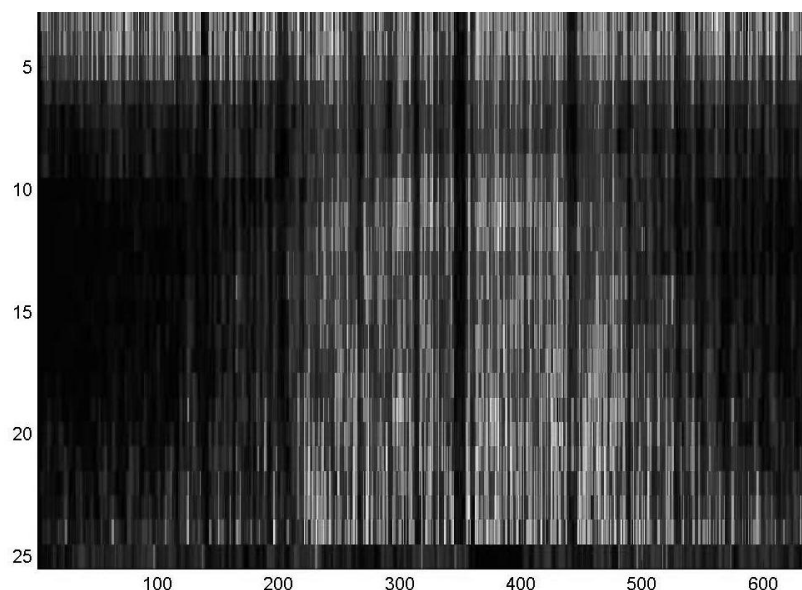


Figura 3 – Matriz 3s formada apartir de uma linha central de 640 pixels retirada de 25 imagens com difernetes faixas de frequencias. Fonte: (MARQUES; BRAGA; PEREIRA, 2010).

As faixas de frequências estão representadas no eixo das ordenadas e divididas em 25 faixas distintas, sendo que a faixa 25 corresponde à frequência mais baixa. O eixo das abscissas representa o tamanho da linha amostral em pixels. Segundo os autores, o pixel 320 representa o meio da imagem e o brilho observado nas frequências mais baixas nesta coordenada corresponde a uma área seca no material analisado.

Nos trabalhos citados, os autores utilizaram a *wavelet* de Morlet na reconstrução do sinal, sendo a mesma também utilizada no presente trabalho.

3.7. Motivação para realização deste trabalho

Braga Jr (2000) realizou diversos experimentos exploratórios buscando identificar danos em sementes de soja através das metodologias **Fujii** e **DG**. O autor comparou os resultados com o teste padrão de tetrazólio (**TZ**), porém não conseguiu resultados satisfatórios. O autor observa que a identificação seria importante para aplicações do método na engenharia agrícola, e ressalta que trabalhos futuros deveriam ser realizados buscando identificar danos em sementes. A Figura 4 permite observar um dos resultados encontrados pelo autor, onde nota-se um dano bem identificado na imagem proveniente do **TZ**, porém o mesmo não pode ser identificado pelo método de **Fujii**.

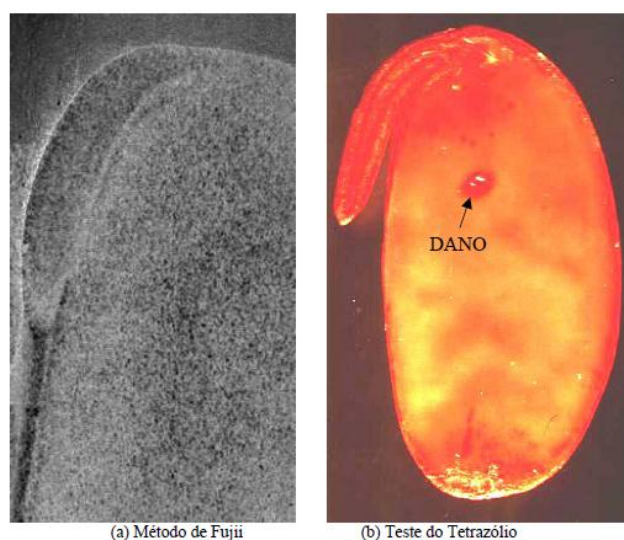


Figura 4 - Semente do Soja processada pelo *biospeckle* e com o tetrazólio. Fonte: (BRAGA JR,2000)

Dessa forma, este trabalho buscou dar uma nova abordagem ao problema, voltando a investigar a identificação de danos em sementes, utilizando novas metodologias de análise que não existiam na época em que o primeiro estudo foi realizado, como a análise de frequências por *wavelets* e a **matriz 3s** proposta por Marques, Braga e Pereira (2010).

3.8. Teste de tetrazólio (TZ)

O teste de tetrazólio é um dos testes mais usados por tecnologistas de sementes visando uma avaliação rápida da qualidade das mesmas. Segundo Brasil (2009) o teste de

tetrazólio, além de avaliar a viabilidade e vigor dos lotes de sementes, fornece o diagnóstico das causas pela redução da qualidade, tais como danos mecânicos, deterioração por umidade e danos de percevejos.

Na semente, os sais de tetrazólio se reduzem nos tecidos vivos, resultando em um composto de cor vermelha (formazan). Por sua vez, as enzimas desidrogenases catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias (organela celular-citoplasma) durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Essas enzimas, e especificamente a desidrogenase do ácido málico, participam do processo reduzindo o sal de tetrazólio nos tecidos vivos.

Quando o tetrazólio é reduzido, formando o trifeniformazan, indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade das células e, portanto, dos tecidos. Assim, a coloração resultante da reação é indicação de viabilidade pela detecção da respiração celular. Tecidos não viáveis não reagem e, conseqüentemente, não se colore.

3.9. Anatomia da semente de feijão

A Figura 5 permite observar a anatomia da semente de feijão, com suas principais partes constituintes.

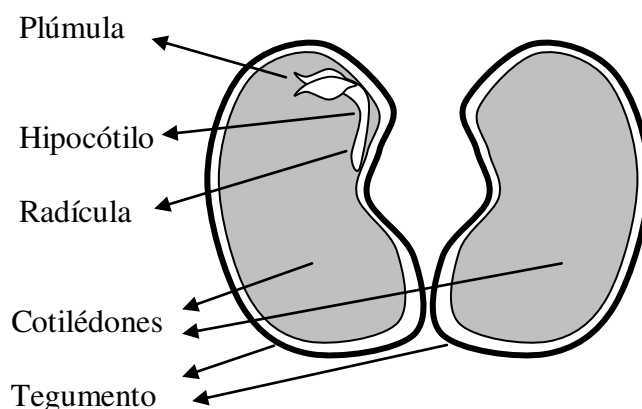


Figura 5 – Anatomia da semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Fonte: (BORÉM, 2001)

O feijão é uma dicotiledônea, a anatomia das dicotiledôneas é relativamente mais simples do que das gramíneas. Os grãos das dicotiledôneas são formados basicamente pelo tegumento e pelo embrião.

O tegumento é composto por várias camadas. É o revestimento externo dos grãos das plantas dicotiledôneas. Constitui-se numa cobertura seca, dura e impermeável, representando uma barreira natural contra diversos fatores de deterioração tais como insetos, microrganismos, umidade e ação mecânica. O tegumento é revestido por uma camada de cera denominada de cutícula. Em geral, a cutícula afeta o controle de troca de umidade entre o grão e o ambiente. Em alguns casos, quando os grãos são excessivamente secos, o tegumento torna-se impermeável à água, impedindo o processo de germinação.

O embrião é formado por dois cotilédones e pelo eixo embrionário. A parte do eixo situada abaixo da inserção dos cotilédones é denominada hipocótilo. A porção terminal inferior é denominada radícula e é revestida pela coifa. A parte do eixo acima dos cotilédones é denominada Epicótilo, apresentando na sua extremidade a plúmula. A plúmula é formada pela gema apical e pelos primórdios foliares (BORÉM, 2001).

4. METODOLOGIA

4.1. Experimento 1 – danos naturais e mecânicos

Esta parte do trabalho foi realizada na Universidade Federal de Lavras. Nos ensaios foram utilizados uma câmera CCD (Dispositivo de Carga Acoplada), um microcomputador para captura dos dados e outro para o processamento das imagens com processador Duo Core e 4 GB de memória RAM, um laser HeNe vermelho (632 nm) de 10 mW de potência, mesa óptica com sistema anti-vibração, Sal de Tetrazólio (**TZ**) e o software MATLAB 6.5 usado para o processamento dos dados. A amostra foi composta por sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) da variedade pérola, apresentando qualidade comprometida devido ao armazenamento em condições inadequadas (sem controle de temperatura e umidade) durante o período de um ano. Estas sementes foram escolhidas a fim de maximizar as chances de encontrar danos naturais, como aqueles ocasionados por picadas de insetos e impactos mecânicos, bem como outros decorrentes do armazenamento inadequado. O experimento foi realizado em laboratório óptico com ausência total de luz branca, sendo que a única fonte de luz era aquela emitida pelo laser. Apenas a parte interna dos cotilédones foi iluminada. O valor da taxa de aquisição adotado na câmera foi de 12,5 Hz.

Uma amostra das sementes que foram selecionadas para o experimento foi levada a estufa a 105 °C durante 24 horas conforme metodologia descrita por Brasil (2009) para avaliar o seu teor de água inicial. O restante das sementes, com umidade 12 % b.u, foi colocado em um recipiente metálico e agitado manualmente durante cinco minutos, para provocar danos mecânicos nas mesmas. Em seguida, as sementes que haviam sido agitadas, foram hidratadas com água destilada, até atingir a umidade de 25 % b.u, sendo esta umidade confirmada pelo método da estufa a 105 °C durante 24 horas. Em seguida, 70 sementes que haviam sido submetidas à agitação, foram escolhidas de forma aleatória, tendo os seus cotilédones separados, através de um bisturi, tomando-se o cuidado de manter as partes intactas, e colocados em um recipiente identificado numericamente. Um dos cotilédones de cada semente foi colocado em uma solução contendo sal de tetrazólio a 1 % (**TZ**) durante 4 horas. O recipiente contendo a solução de **TZ** mais as sementes foi envolto em papel alumínio para

garantir que a reação ocorresse na ausência de luz, e identificado numericamente, conforme pode ser observado na Figura 6 e na Figura 7.



Figura 6 – Recipientes com vários compartimentos de armazenamento contendo os cotilédones e a solução de **TZ** envoltos em papel alumínio para bloquear a entrada de luz durante a reação.



Figura 7 – Cotilédones dispostos nos recipientes abertos após a reação com **TZ**.

O outro cotilédone, de cada semente, foi armazenado em recipiente hermético e igualmente identificado conforme ilustrado na Figura 8.



Figura 8 – Recipientes com vários compartimentos de armazenamento contendo os cotilédones das sementes para armazenamento até a execução dos ensaios com *biospeckle* laser.

Em seguida, tomou-se nota dos cotilédones submetidos ao TZ que apresentaram danos com possibilidade de serem simétricos. Somente os pares dos cotilédones (o outro cotilédone proveniente da mesma semente) que apresentaram danos com potencial de serem simétricos foram levados ao teste do biospeckle laser. Após o ensaio com biospeckle laser o cotilédone foi também submetido ao TZ, para assegurar de que o dano simétrico estava presente. O diagrama da Figura 9 ilustra o procedimento realizado após agitação e hidratação das sementes.

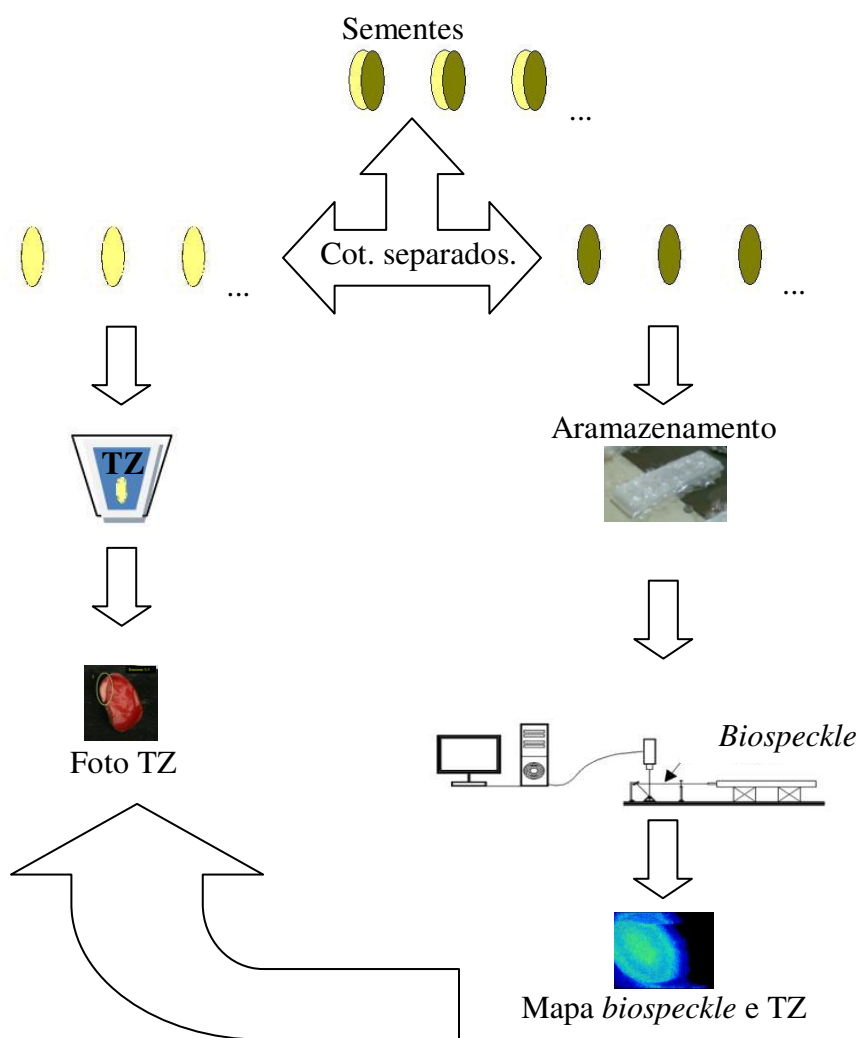


Figura 9 – Diagrama ilustrando as etapas experimentais.

Para o ensaio com *biospeckle* as seguintes etapas foram realizadas:

1. coleta de imagens;
2. geração do mapa de atividade para cada semente utilizando **DG** e **Fujji** sem análise de frequência;
3. filtragem das imagens utilizando a **TW**;
4. geração dos mapas de atividade e da **matriz 3s** para cada semente, utilizando as imagens filtradas por **TW**;
7. comparação entre os mapas de atividades gerados, com e sem filtragem, com as áreas coloridas pela solução de Sal de Tetrazólio.

Toda a etapa de coleta de dados foi realizada na Universidade Federal de Lavras, sendo a análise dos dados realizada na Universidade Estadual de Campinas. A configuração experimental utilizada foi a mesma descrita em detalhe por Braga Jr. (2000), ilustrada na Figura 10.

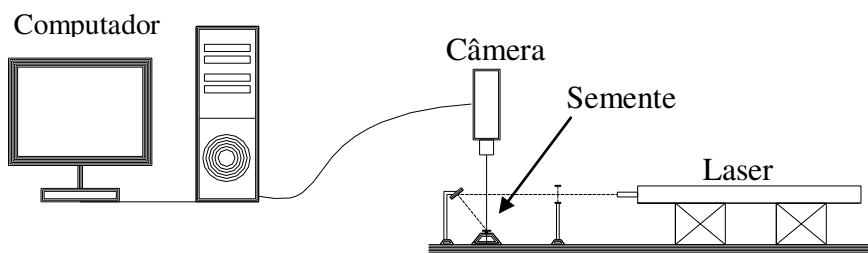


Figura 10 – Disposição dos equipamentos experimentais durante a captura das imagens e iluminação pelo laser.

4.2. Experimento 2 – danos térmicos provocados por uma agulha aquecida

Este experimento foi realizado no Laboratório de Ótica e no Laboratório de Pós-colheita da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI/UNICAMP) e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp (IB/UNICAMP). Nos ensaios foram utilizados um laser diodo vermelho de 5 mW, uma câmera filmadora digital SAMSUNG SC-HMX20C, sal de tetrazólio (**TZ**), sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) da variedade pérola, solução de hipoclorito de sódio a 2 % de cloro ativo, estufa, balança analítica, uma seringa descartável de 5 ml, uma vela de parafina,

um microscópio óptico de luz polarizada, um computador tipo PC com processador Duo Core e 4 GB de memória RAM e aplicativos computacionais desenvolvidos para o processamento das imagens nas plataformas MATLAB 6.5 e ImageJ 1.43. A taxa de aquisição adotada na câmera foi 30 Hz.

Um lote de 1000 g de sementes de feijão foi colocado imerso em água destilada e acondicionado em uma estufa de pré-condicionamento, sendo mantido na temperatura de 35 °C durante duas horas. Após este pré-condicionamento, as sementes foram mergulhadas, durante cinco minutos, em uma solução de hipoclorito de sódio com 2 % de cloro ativo, para desinfestação e, em seguida, lavadas em água destilada. Após a desinfestação e lavagem foram retiradas três amostras de 25 gramas cada e levadas à estufa para determinar umidade (BRASIL, 2009). Do mesmo lote que foram retiradas as amostras, foram retiradas 10 sementes para proceder os ensaios com *biospeckle* laser, sendo que estas sementes tiveram seus tegumentos retirados e um de seus cotilédones descartado. O outro cotilédone foi submetido ao procedimento de dano pontual por agulha aquecida, objetivando provocar um dano em um local conhecido na semente, para tentar identificá-lo posteriormente com o *biospeckle*. Este procedimento foi realizado da seguinte forma: Uma vela de parafina foi colocada acesa na bancada de trabalho. Próximo a vela, os dez cotilédones escolhidos foram colocados com a parte interna voltada para cima. A agulha da seringa foi colocada em contato com a chama da vela, até apresentar coloração avermelhada, sendo então utilizada para perfurar o cotilédone no sentido transversal do mesmo, provocando dessa forma, um dano em local conhecido, sendo parte deste dano causado pelo calor e parte pela pressão da agulha ao perfurar o cotilédone. A extensão da perfuração abrangeu a parte interna do cotilédone até sua periferia, como ilustrado na Figura 11.

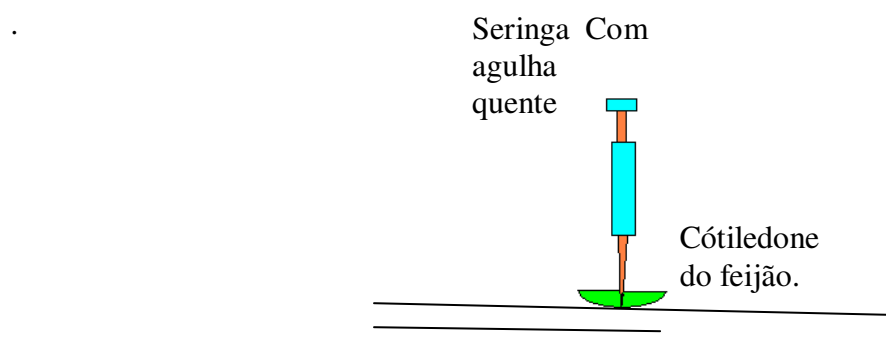


Figura 11 – Representação da agulha aquecida perfurando o cotilédone da semente de feijão.

O procedimento foi reproduzido para cada um dos dez cotilédones. Após o dano ser provocado, as sementes foram armazenadas em ambiente hermético por 16 horas, para que houvesse uma estabilização das trocas de fluidos entre a região danificada e a região íntegra. Após o armazenamento, nove sementes foram iluminadas com o laser e submetidas ao procedimento de análise com *biospeckle* e uma das sementes foi levada ao microscópio óptico de luz polarizada para avaliar o efeito da agulha aquecida nas células da semente. Terminada a coleta de dados para o teste do *biospeckle*, as nove sementes foram imersas em solução de TZ para iniciar o processo de coloração, ficando imersas em uma solução durante o período de 4 horas em temperatura de 25 ° C no interior de uma estufa sem iluminação. Ao ser retiradas da estufa as sementes foram fotografadas e suas imagens comparadas com o resultado do processamento do *biospeckle* laser. No processamento com *biospeckle* foram utilizadas as técnicas **DG** e **Fujii** sem filtrar, **DG** e **Fujii** filtrados por *wavelets* e **matrizes 3S**. A Figura 12 é um diagrama ilustrando as etapas experimentais. A disposição dos equipamentos de captura de imagens para o *biospeckle* foi o mesmo adotado no experimento 1 e pode ser visualizado na Figura 10 (mesma do experimento 1).

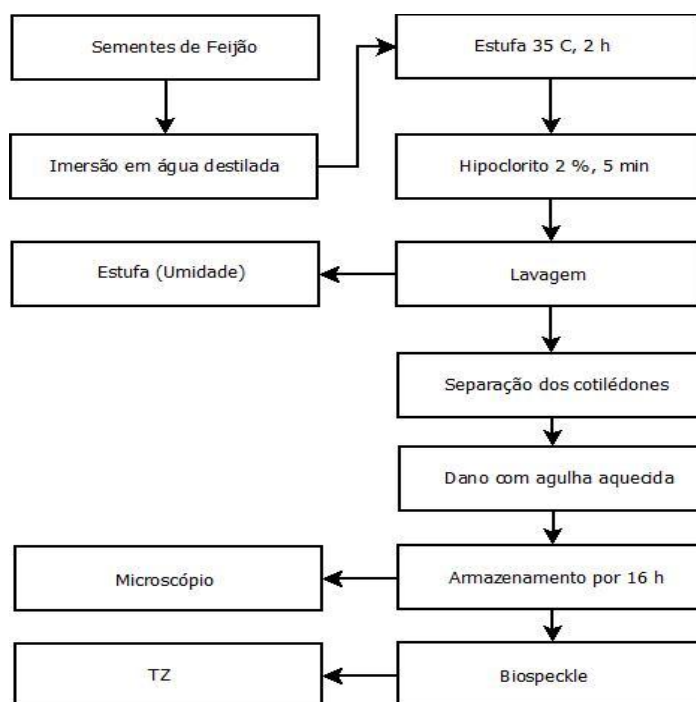


Figura 12 – Diagrama representando as etapas experimentais.

4.3. Experimento 3 – Reação química em área localizada com gota de Tetrazólio

Este experimento foi realizado no Laboratório de Óptica e no Laboratório de Pós-colheita da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI/UNICAMP). Nos ensaios foram utilizados um emissor laser diodo vermelho de 5 mW, uma câmera filmadora digital SAMSUNG SC-HMX20C, sal de tetrazólio (TZ), uma semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em boas condições, uma estufa, uma seringa descartável de 5 ml, um computador tipo PC com processador Duo Core e 4 GB de memória RAM e os software MATLAB 6.5 e ImageJ 1.43. A taxa de aquisição adotada na câmera foi 30 Hz.

Um lote de sementes de feijão foi imerso em água destilada e acondicionado em uma estufa, sendo mantido na temperatura de 35 ° C durante duas horas. Em seguida uma semente foi retirada do lote e seus cotilédones foram separados. Um dos cotilédones foi escolhido para análise. Uma seringa foi usada para colocar uma gota de Tetrazólio a 95 % na superfície interna do cotilédone, seguindo-se a iluminação da semente com o laser e captura de imagens para realizar o *biospeckle* do momento inicial. Após a iluminação, a semente foi colocada dentro de uma pequena caixa, sendo a caixa posteriormente envolta por papel alumínio e mantida nesse estado por um período de 4 horas para ocorrer a reação no contato entre a gota de Tetrazólio e a parte interna do cotilédone. Em seguida, a semente foi retirada da caixa e submetida ao ensaio com *biospeckle* novamente. A semente foi novamente colocada na caixa e ensaiada mais uma vez 24 horas depois, sendo também fotografada comparar com as imagens geradas pelo *biospeckle*. A Figura 13 exibe a caixa usada para realizar a reação do tetrazólio.



Figura 13 – Caixa usada para armazenar a semente durante a reação.

Na Figura 14 é apresentado o fluxograma das etapas deste experimento.

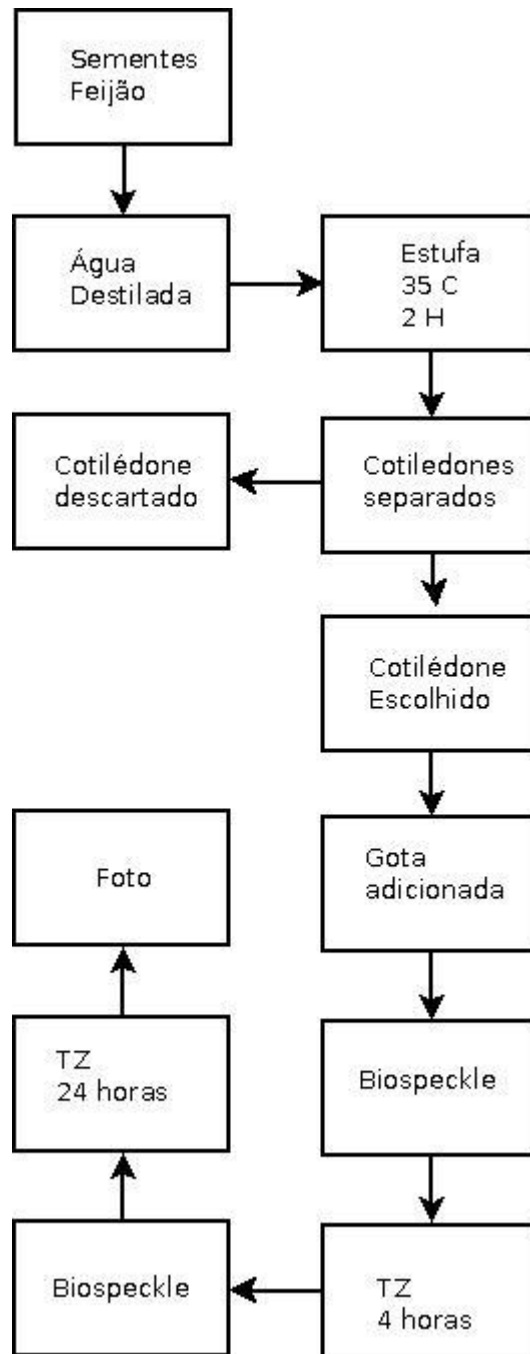


Figura 14 – Diagrama representando as etapas experimentais.

A disposição dos equipamentos de captura de imagens para o *biospeckle* foi o mesmo adotado no experimento 1 (Figura 10).

No processamento com *biospeckle* foram utilizadas as técnicas **DG** e **Fujii** sem filtrar, **DG** e **Fujii** filtrados por *wavelets* e **matrizes 3S**.

4.4. Experimento 4 – Reação química com bicarbonato de sódio ($\text{NaHCO}_3 + \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 + \text{Na}_2\text{CO}_3$)

Este experimento foi realizado no Laboratório de Óptica da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI/UNICAMP). Nos ensaios foram utilizados um laser diodo vermelho de 5 mW, uma câmera filmadora digital SAMSUNG SC-HMX20C, Sal de frutas ($\text{NaHCO}_3 + \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 + \text{Na}_2\text{CO}_3$), uma semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), uma estufa, uma seringa descartável de 5 ml, um computador tipo PC com processador Duo Core e 4 GB de memória RAM os softwares MATLAB 6.5 e ImageJ 1.43. A taxa de aquisição adotada na câmera foi 30 Hz.

Na realização deste experimento, uma pequena quantidade do produto comercial denominado Sal de frutas foi colocada na parte interna do cotilédone de uma semente, formando um círculo de aproximadamente 1 mm, e em seguida foi adicionada uma gota de água utilizando-se a seringa. A água deu início ao processo de reação e, neste momento, a semente foi colocada sob a iluminação laser dando início ao processo de captura de dados. Uma segunda semente foi submetida ao mesmo procedimento descrito anteriormente, porém desta vez, foi feita uma cavidade na parte interna do cotilédone da mesma para manter o reagente concentrado em um mesmo ponto. Todo o experimento ocorreu em ambiente escuro com ausência total de luz branca. No processamento com *biospeckle* foram utilizadas as técnicas **DG** e **Fujii** sem filtrar, **DG** e **Fujii** filtrados por *wavelets* e **matrizes 3S**. A Figura 15 mostra como o reagente foi colocado na semente.



Figura 15 – Iniciando o processo de reação química.

A disposição dos equipamentos de captura de imagens para o *biospeckle* foi o mesmo adotado no experimento 1 e pode ser visualizado na Figura 10 (mesma do experimento 1) e no processamento com *biospeckle* foram utilizadas as técnicas **DG** e **Fujii** sem filtrar, **DG** e **Fujii** filtrados por *wavelets* e **matrizes 3S**.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1 – danos naturais e mecânicos

5.1.1. Identificação das áreas danificadas nas sementes

Os resultados do teste **TZ** permitiram a elaboração de mapas de danos como o da Figura 16.

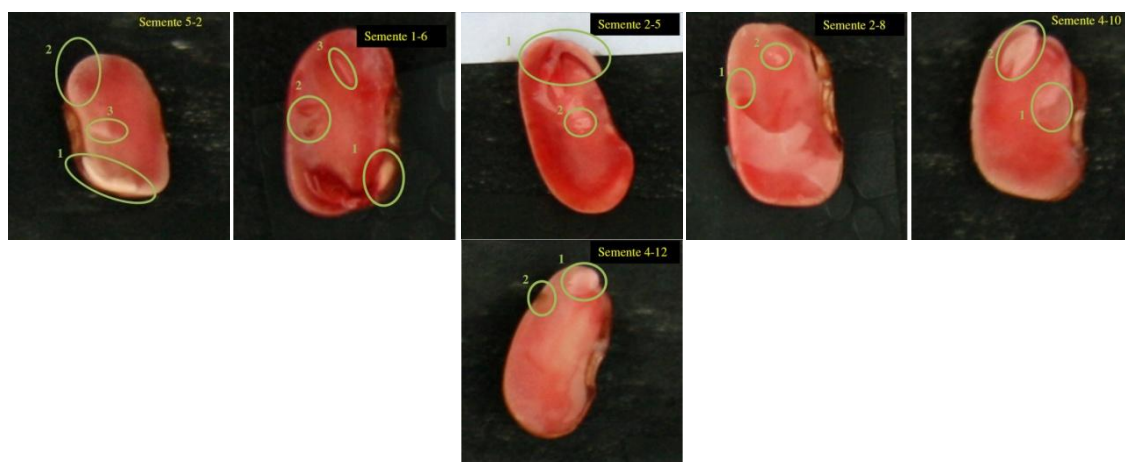


Figura 16 – Mapas de Tetrazólio.

Esses mapas permitiram verificar quais tipos de danos as sementes analisadas sofreram e assim, comparar esses danos com os mapas **DG** e **Fujii** gerados com e sem filtragem. Os resultados do teste de tetrazólio mostraram que 6 sementes apresentaram danos. Como esses danos foram claramente identificados pelo teste TZ, estas sementes foram escolhidas para a realização dos testes em frequência com *biospeckle* laser. A Figura 17 permite observar em detalhes uma das sementes selecionadas com seus respectivos danos.

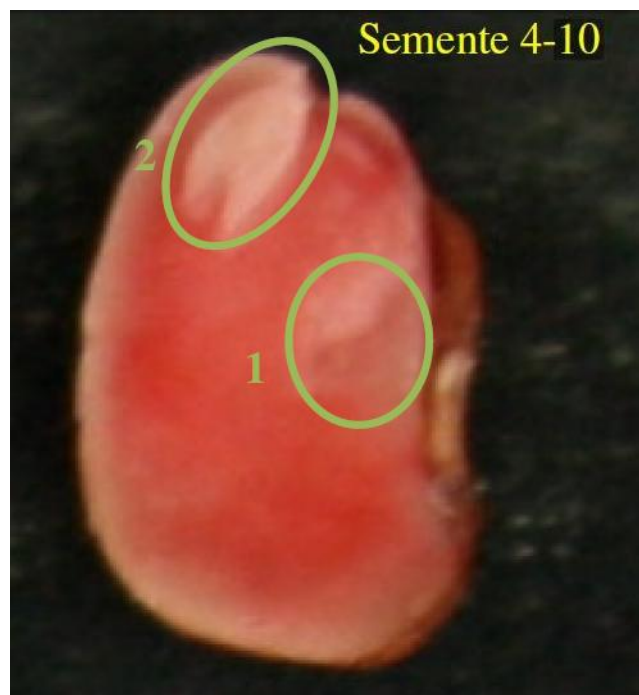


Figura 17 – Semente com danos evidenciados pelo teste de Tetrazólio, 1 atividade respiratória diferenciada, 2 plúmula morta.

A semente mostrada na Figura 17 é uma semente inviável devido ao fato de apresentar apenas metade do eixo embrionário vivo, sendo que a outra metade, composta pela plúmula apresenta tecido morto (círculo 2). A área circulado de número 1 apresenta uma área com atividade respiratória diferenciada das demais partes da semente devido a um dano.

Uma descrição completa com as fotos e danos encontrados em cada uma das sementes se encontra no **APÊNDICE A**.

5.1.2. Resultados do teste DG e Fujii sem filtragem

A Figura 18 permite comparar o mapa gerado pelo **TZ** e o mapa gerado pelo método **DG** sem filtragem. A escala de cores indica o nível de atividade na figura **DG**, sendo que o número 0 corresponde à baixa atividade e o número 255 a altas atividades.

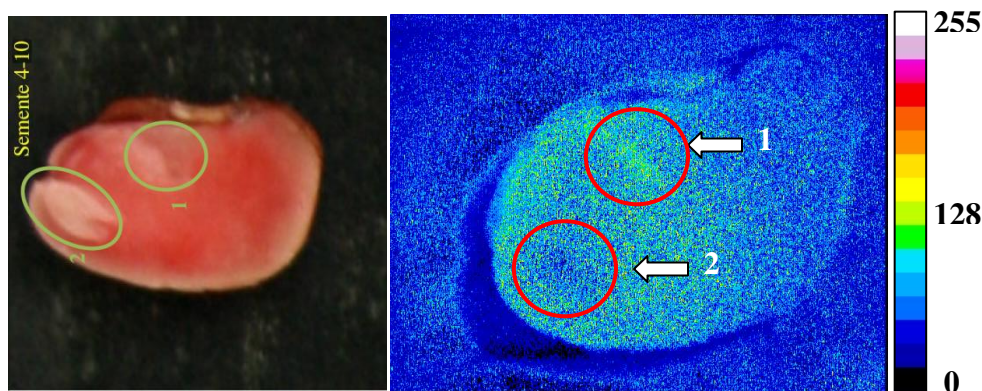


Figura 18 – Imagem do teste **TZ** e o resultado **DG** sem filtragem, respectivamente, da mesma semente, em que 1 representa atividade respiratória diferenciada e 2 a plúmula morta.

A comparação das imagens acima permite observar que as áreas 1 e 2 indicadas na imagem proveniente do **TZ** podem ser identificadas com atividades distintas na imagem **DG**. A seta número 1 aponta a área referente ao dano enquanto que a área indicada pela seta número 2 corresponde à área indicada no **TZ** pela plúmula morta. Nota-se que a área correspondente ao dano (seta número 1) aparece com uma faixa mais ativa indicando que esta região apresenta uma atividade anormal em relação ao restante da semente. O **TZ** não permite uma análise conclusiva sobre a natureza do dano 1, mas indica que havia uma atividade respiratória diferenciada neste local. Já a área indicada pela seta de número 2 aparece no **DG** como uma área de baixa atividade, o que está coerente com o resultado **TZ** que mostra que a plúmula morta da semente está cobrindo esta região. Neste caso a plúmula aparece na imagem **TZ** com a coloração branca, indicando ausência do processo respiratório neste local. Na Figura 19 é possível observar a mesma comparação, porém realizada com o mapeamento **Fujii** sem filtragem.

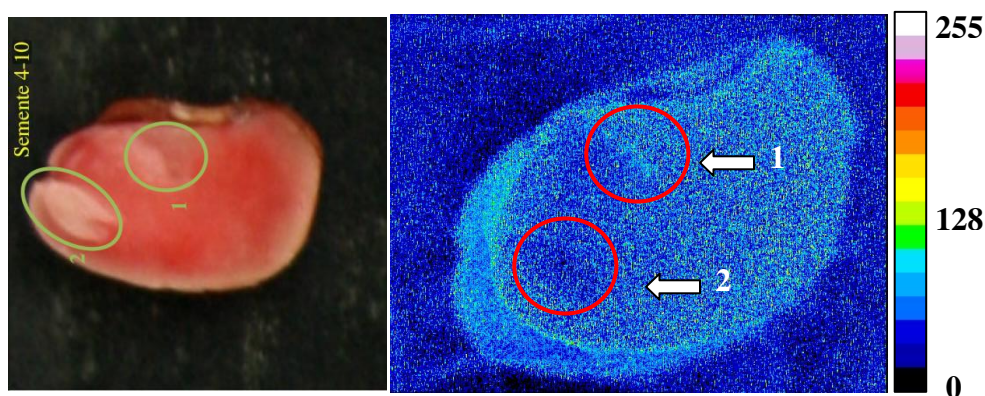


Figura 19 – Imagem do teste **TZ** e o resultado **Fujii** sem filtragem, respectivamente, da mesma semente, em que 1 representa atividade respiratória diferenciada e 2 a plúmula morta.

A Figura 19 permite observar que os resultados do teste **Fujii** estão semelhantes com os observados pelo teste **DG**, sendo que aqui também foi possível observar uma faixa de maior atividade indicada pela seta de número 1, que corresponde ao dano na semente, e uma área de menor atividade, indicada pela seta de número 2, sendo que esta corresponde a plúmula morta observada na imagem **TZ**.

A análise da Figura 18 e da Figura 19, permite verificar que é possível visualizar as áreas de danos indicadas no **TZ**, embora esses danos apareçam de forma sutil tanto na imagem **DG** sem filtragem quanto na imagem **Fujii** sem filtragem. O resultado completo, com outras sementes analisadas por estes métodos, se encontra no **APÊNDICE B**.

5.1.3. Resultados do teste **DG** e **Fujii** com filtragem

A Figura 20 permite verificar os resultados obtidos utilizando-se a técnica de filtragem por *wavelets* combinada com o mapeamento **DG**. Os valores entre parênteses indicam as faixas de frequências, indo da faixa de frequência 1 (mais alta) até a faixa de frequência 25 (mais baixa). Levando-se em conta que a taxa de amostragem foi de 12,5 Hz, e sabendo-se que, de acordo com o teorema da amostragem, pode-se amostrar apenas metade do valor da taxa de aquisição, pode-se considerar que as frequências amostradas estão variando de zero a aproximadamente 6,25 Hz. As figuras estão representadas em pseudo cores, seguindo a mesma escala apresentada na Figura 18 e na Figura 19.

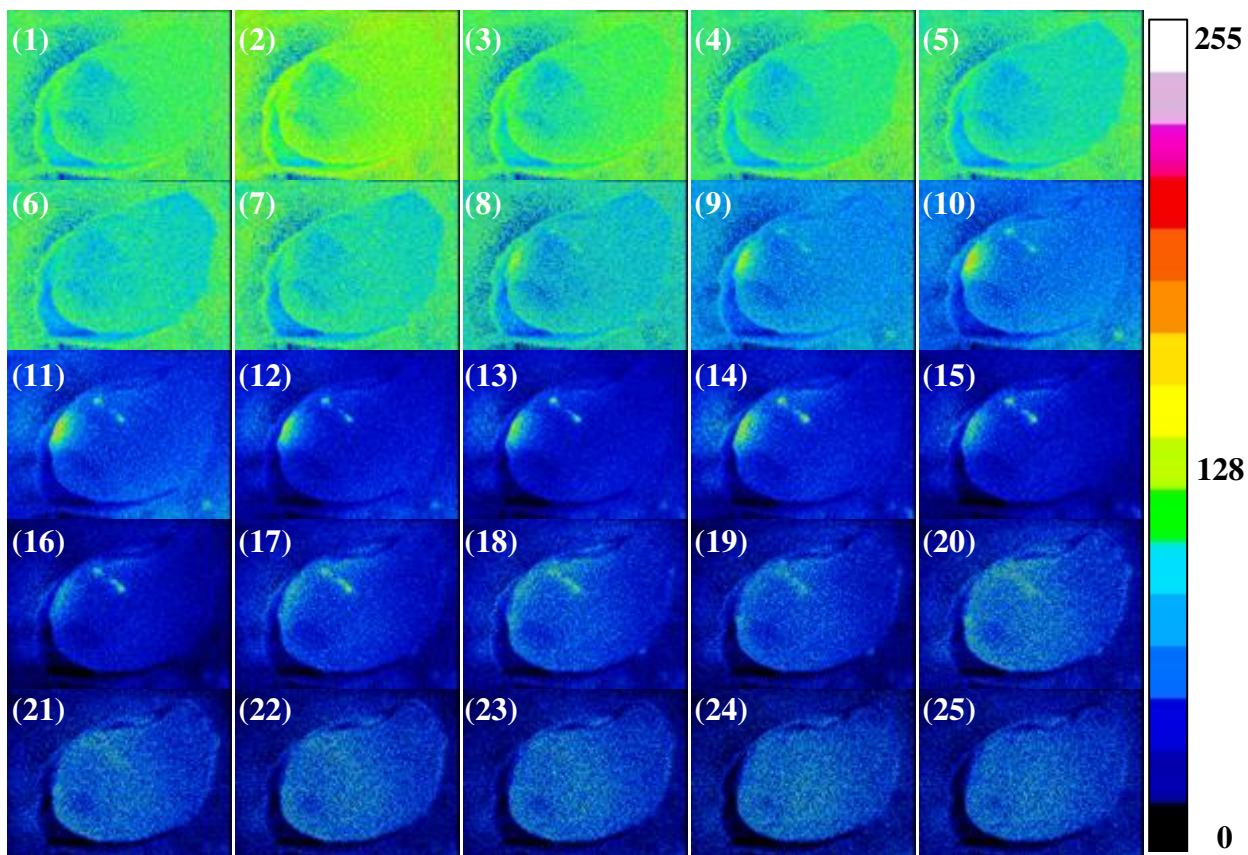


Figura 20 – Mapas **DG** para as **25** faixas de frequências (da mais alta a mais baixa) representados em pseudo cores em escala de **0** a **255**.

Observa-se na Figura 20 que o dano (indicado pela seta número 1 mostrada na Figura 19) aparece de forma mais visível nas faixas de frequências intermediárias. A área do dano pode ser mais bem notada a partir da faixa de frequência de número 8 até a faixa de frequência de número 20. Já entre as faixas de frequências de números 21 a 25 o dano se torna quase imperceptível.

Já a área correspondente a região da plúmula (indicado pela seta número 2 na Figura 19) aparece com uma atividade mais baixa e pode ser mais bem visualizada também nas faixas de frequências intermediárias. A análise de frequência também permite visualizar o que seriam os resquícios da parte inferior do eixo embrionário, que aparece nas imagens com atividade

mais elevada entre as faixas de frequências de números 9 a 15. A Figura 21 permite uma melhor comparação entre o **DG** sem filtragem e o **DG** filtrado por *wavelets*, sendo que nesta ilustração foi escolhida a imagem gerada pela faixa de frequência 14 (aproximadamente 3,5 Hz).

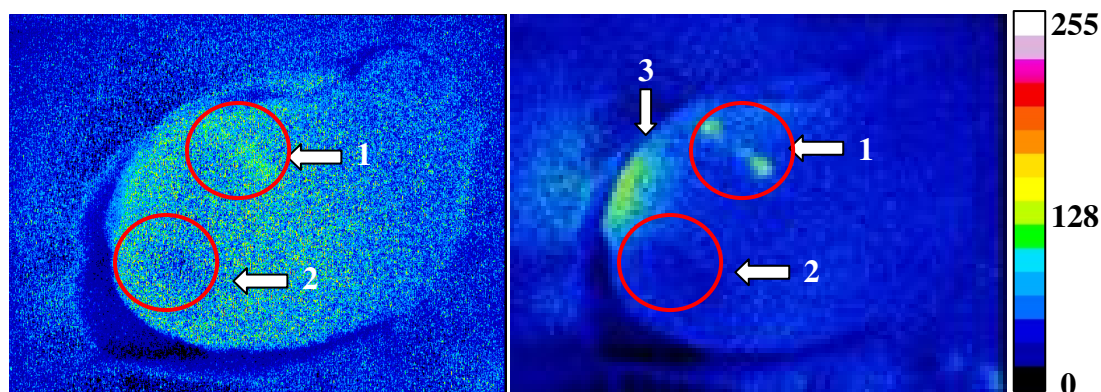


Figura 21 – Mapas **DG** sem filtragem e mapa **DG** filtrado, respectivamente, na faixa de frequência de número 14.

Observa-se pela análise da Figura 21 que a área do dano (1), bem como a região da plúmula morta (2) pode ser visualizada de forma mais clara na imagem filtrada do que na imagem **DG** sem filtro. Também pode ser notado que os resquícios da parte inferior do embrião podem ser observados na imagem filtrada (3), sendo que o mesmo não pode ser notado na imagem que não foi filtrada. A Figura 22 permite que esta mesma comparação seja feita para a técnica **Fujii**.

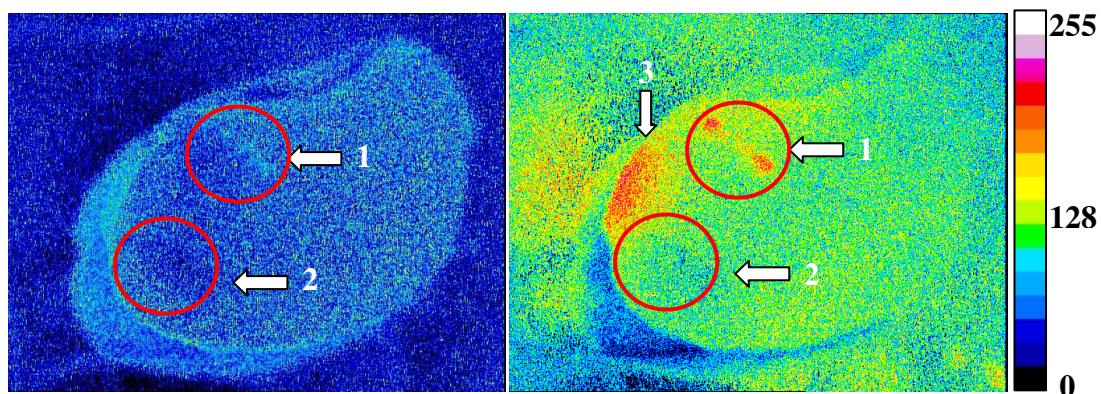


Figura 22 – Mapas **Fujii** sem filtragem e mapa **Fujii** filtrado, respectivamente, na faixa de frequência de número 14.

No caso da imagem **Fujii**, o efeito da filtragem parece ter sido ainda mais significativo, pois quase não foi possível notar as áreas de interesse na imagem sem filtragem, no entanto, estas áreas aparecem de forma clara na imagem **Fujii** filtrada, sendo indicadas na imagem pelas setas 1, 2 e 3.

A Figura 23 permite observar os locais da semente que foram escolhidos para analisar usando a técnica da **matriz 3s**. Para cada linha mostrada na imagem, foi gerada uma **matriz 3s** que permite a visualização do resultado em todas as 25 faixas de frequência.

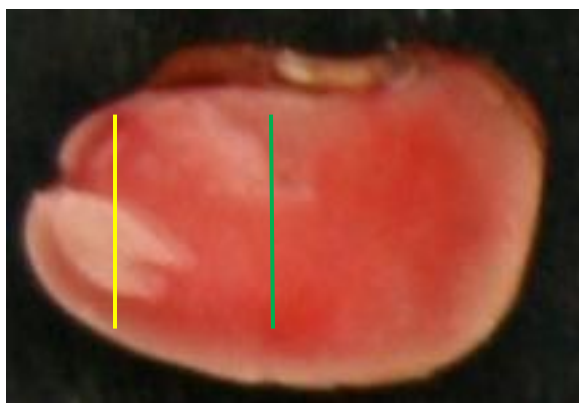


Figura 23 – Mapa **TZ** mostrando as áreas amostradas para análise pela **matriz 3s**.

A Figura 24 permite observar os resultados expressos através da **matriz 3s** para a semente analisada tomando-se como amostra uma linha que passa pela plúmula morta, indicada na Figura 23 pela linha amarela. O eixo das abscissas corresponde ao tamanho da linha amostral em pixels e o eixo das ordenadas corresponde às faixas de frequências convertidas em Hertz (**Hz**). Nota-se pela análise da **matriz 3s** que a parte da linha que passa pela plúmula morta aparece com uma tonalidade mais escura em todas as faixas de frequências, sendo que sua localização no eixo das abscissas se dá aproximadamente no pixel 170. Este efeito na **matriz 3s** se apresenta como uma linha vertical que pode ser facilmente notada ao observar a Figura 24 na posição referente ao pixel 170.

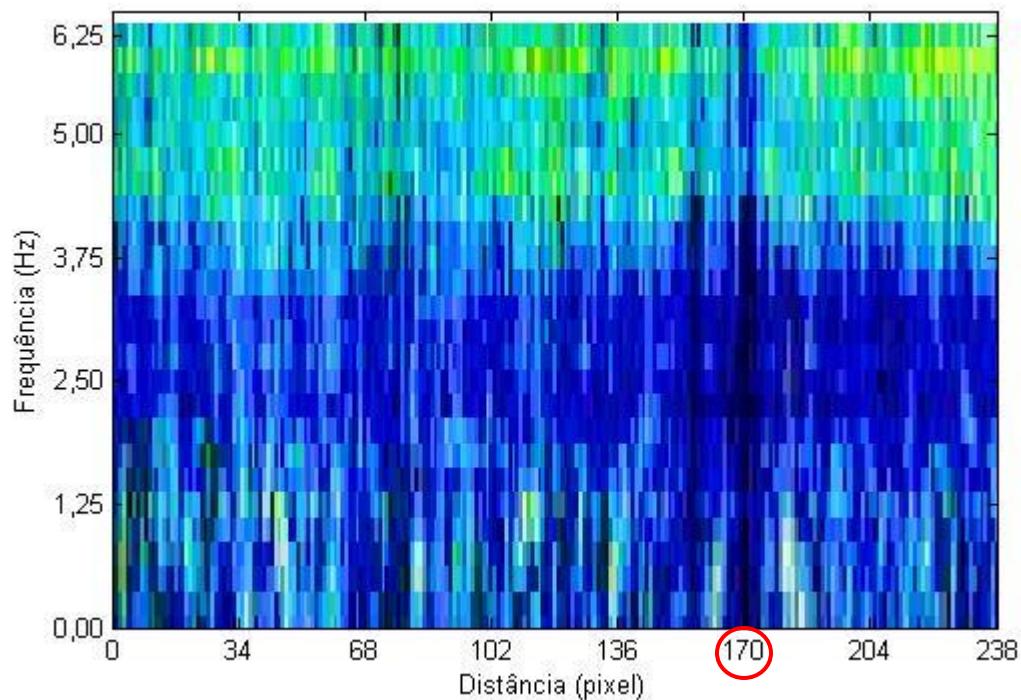


Figura 24 – **Matriz 3s** da linha passando pela plúmula morta da semente gerada a partir das imagens **DG** mostrando uma área de baixa atividade nas imediações do pixel 170.

A Figura 25 permite observar a **matriz 3s** da segunda área referente ao dano que está sob a linha verde na Figura 23. Neste caso, pode-se observar que as áreas de maior intensidades ficaram localizadas nas faixas de frequências intermediárias, podendo ser visualizada na **matriz 3s** aproximadamente na posição do pixel 44 e frequências entre as faixas de aproximadamente 1,50 a 3,75 **Hz**, porém com maior destaque nas frequências aproximadas entre 2,00 e 3,00 **Hz**.

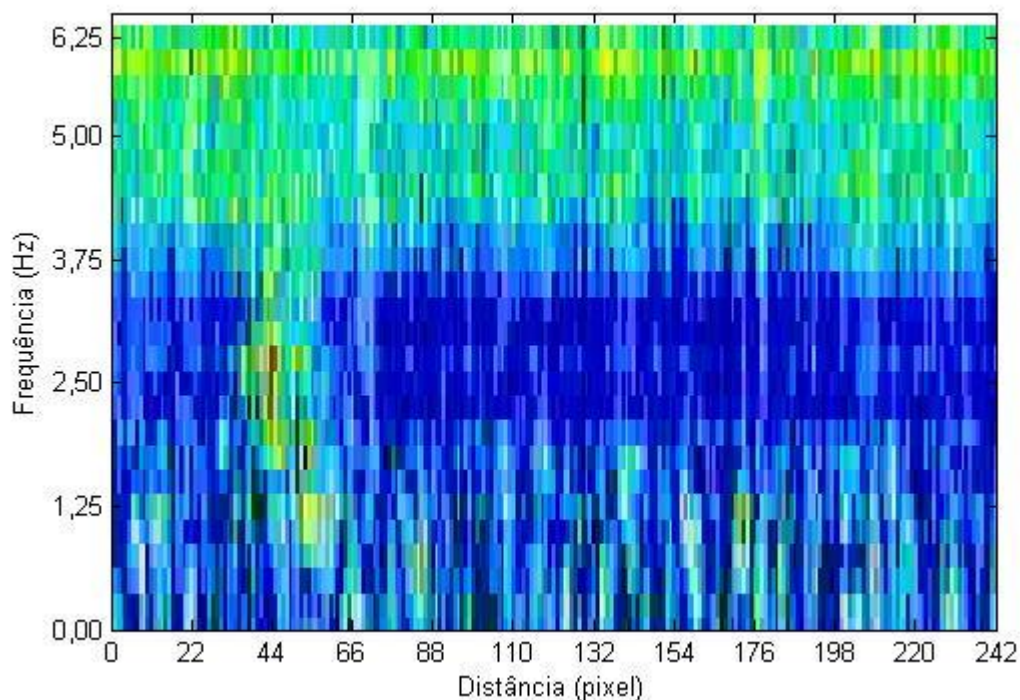


Figura 25 - **Matriz 3s** da linha passando pelo dano com atividade diferenciada na semente gerada a partir das imagens **DG** mostrando uma área mais ativa nas imediações do pixel 44.

Os resultados apresentados nas Figura 24 e Figura 25 são semelhantes com o resultado apresentado pelo teste **TZ**, uma vez que, se considerando que a plúmula da semente estivesse morta, como evidenciou o teste **TZ**, era esperado que esta se apresentasse em um nível de atividade menor quando medido pelo *biospeckle* laser. Sabendo-se que nos mapas **DG** e **Fujii**, assim como na **matriz 3s**, a atividade baixa é representada pela coloração escura como apresentado na escala de cores da Figura 18, era de se esperar que esta informação ficasse visível na **matriz 3s**, como evidenciado pela Figura 24. Este tipo de análise também permite observar em quais faixas de frequências ocorre maior interferência das áreas de maior atividade sobre as áreas de menor atividade, dificultando a detecção de danos em sementes. Pode se notar pela análise da Figura 24 que nas altas frequências a linha vertical escura que representa o dano na **matriz 3s** se torna mais estreita e menos nítida. A maior nitidez neste caso se deu nas faixas de frequências intermediárias, mostrando que ocorre menor interferência das áreas mais ativas da semente nestas faixas de frequências.

Já o segundo dano, que aparece nas frequências intermediárias da Figura 25, se apresenta no **TZ** como sendo uma área de atividade diferenciada do restante da semente, tendo apresentado uma coloração diferente do restante da semente no processo de reação química com o **TZ**, mostrando que a área possuía uma atividade respiratória, embora esta atividade estivesse comprometida por algum fator presente naquele local, de forma que não era igual aquela apresentada pelo restante da semente. A análise da **matriz 3s** da Figura 25 permite inferir que este tipo de dano pode ser encontrado nas frequências intermediárias quando analisado pela técnica do *biospeckle* laser.

A Figura 26 e a Figura 27 permitem observar a **matriz 3s** de cada um dos danos utilizando-se as imagens **Fujii**.

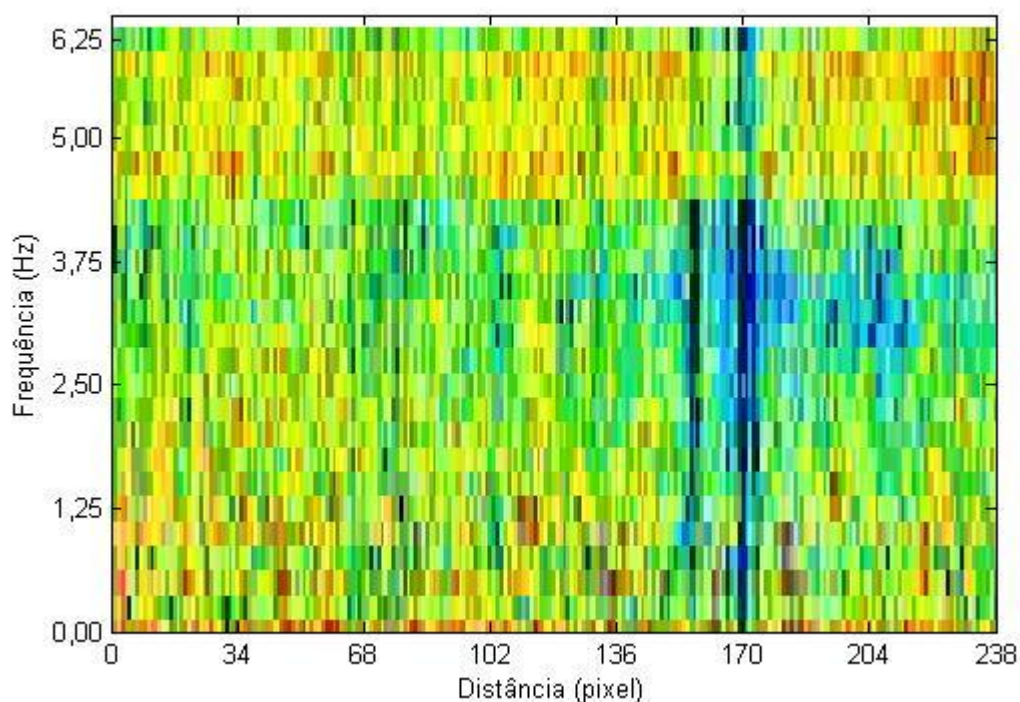


Figura 26 - **Matriz 3s** da linha passando pela plúmula morta da semente gerada a partir das imagens **Fujii** mostrando uma área de baixa atividade nas imediações do pixel 170.

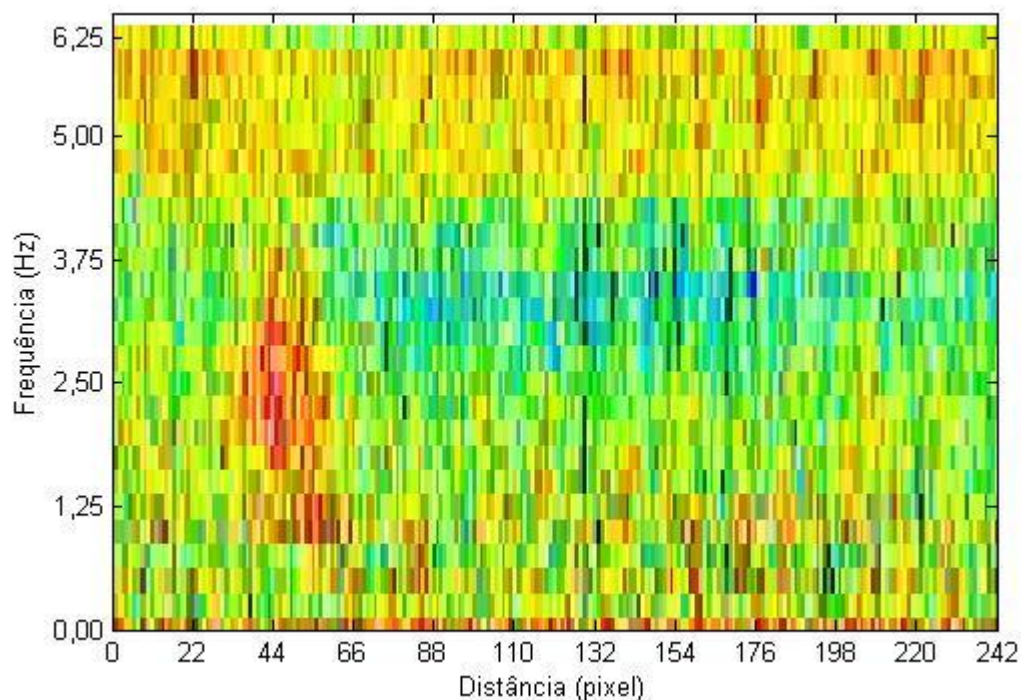


Figura 27 - **Matriz 3s** da linha passando pelo dano com atividade diferenciada na semente gerada a partir das imagens **Fujii** mostrando uma área mais ativa nas imediações do pixel 44.

Apesar da coloração mais clara das **matrizes 3s** geradas usando **Fujii** quando comparadas aquelas geradas a partir do **DG**, nota-se que não houve diferenças quanto ao conteúdo de informações apresentado pelas mesmas, sendo que as mesmas considerações feitas para a Figura 24 e Figura 25 podem ser reafirmadas para a Figura 26 e a Figura 27.

No **APÊNDICE C** encontram-se as **matrizes 3s** de outras sementes analisadas bem como as indicações das respectivas áreas de interesse amostradas nas imagens.

5.2. Experimento 2 – danos térmicos provocados por uma agulha aquecida

5.2.1. Identificação e comprovação das áreas danificadas nas sementes

A Figura 28 permite observar os resultados da microscopia óptica de luz polarizada para a área danificada pela agulha aquecida.

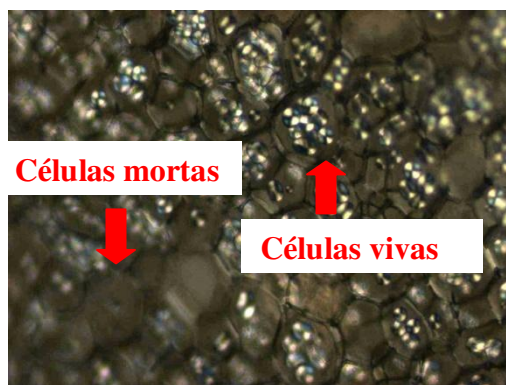


Figura 28 – Imagem microscópica de luz polarizada da área de fronteira entre células danificadas pelo dano térmico e células intactas (aumento de 10 vezes).

A imagem da Figura 28 permite verificar o efeito da agulha aquecida nas células do tecido vegetal. Como podem ser observadas, as células com estrutura intactas e, portanto, vivas, apresentam componentes anisotrópicos em seu interior, apresentando-se na foto de microscopia polarizada como pequenos pontos brilhantes. Já as células que sofreram o dano térmico, não apresentaram componentes com propriedades anisotrópicas, o que mostra que suas estruturas celulares ficaram danificadas e, portanto essas células se encontravam inviáveis.

Desta forma, o método de provocar danos térmicos combinado com pressão, por meio de uma agulha aquecida se mostrou adequado para gerar áreas de tecido morto circundada por áreas de tecido vivo, permitindo assim, que fossem geradas amostras de sementes com danos térmicos localizados para posterior análise com *biospeckle* laser.

Os resultados do **TZ** também mostraram haver ausência de atividade respiratória das áreas afetadas pelo calor e pressão. A Figura 29 permite observar o resultado do teste **TZ** nas sementes submetidas ao processo de danificação térmica.

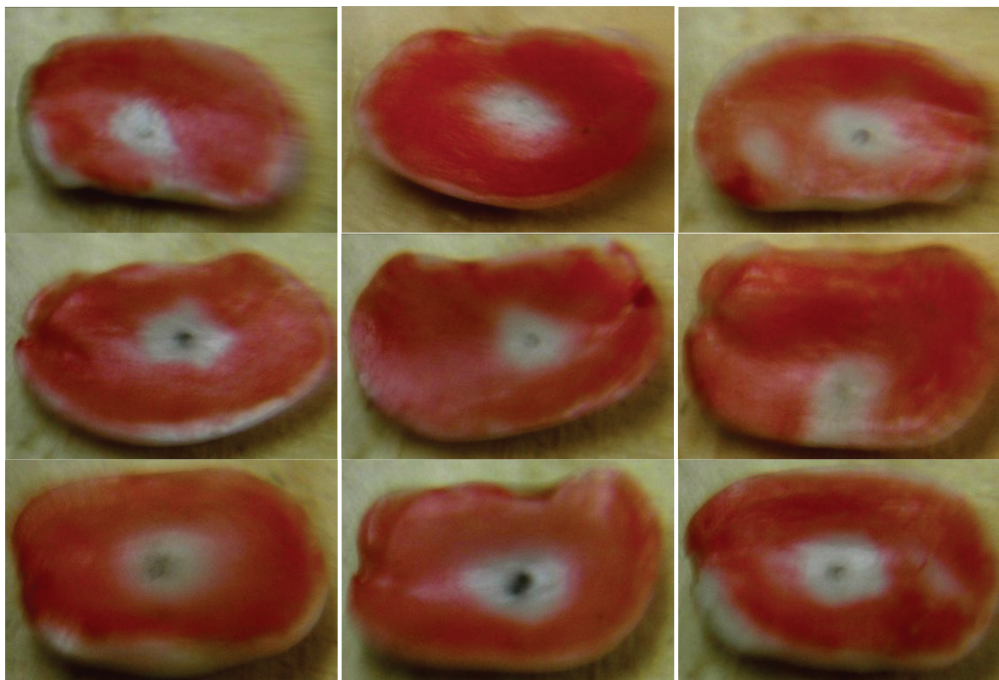


Figura 29 – Mapa de Tetrazólio (**TZ**) das sementes danificadas pela agulha aquecida, mostrando a área branca na parte central como resultado do dano térmico.

A Figura 29 permite verificar que existe uma região circundando a perfuração em cada semente com coloração branca, não reagindo com o **TZ**, comprovando a ausência de atividade vital. Em algumas sementes também é possível observar uma marca negra no centro da semente, sendo que esta corresponde à região perfurada pela agulha aquecida (Carbonização).

5.2.2. Resultados do teste DG e Fujii sem filtragem

A Figura 30 permite comparar o mapa gerado pelo **TZ** e o mapa gerado pelo método **DG** sem filtragem para uma das sementes que sofreram dano térmico. A escala de cores indica o nível de atividade na figura **DG**, sendo que o número 0 corresponde à baixa atividade e o número 255 a altas atividades.

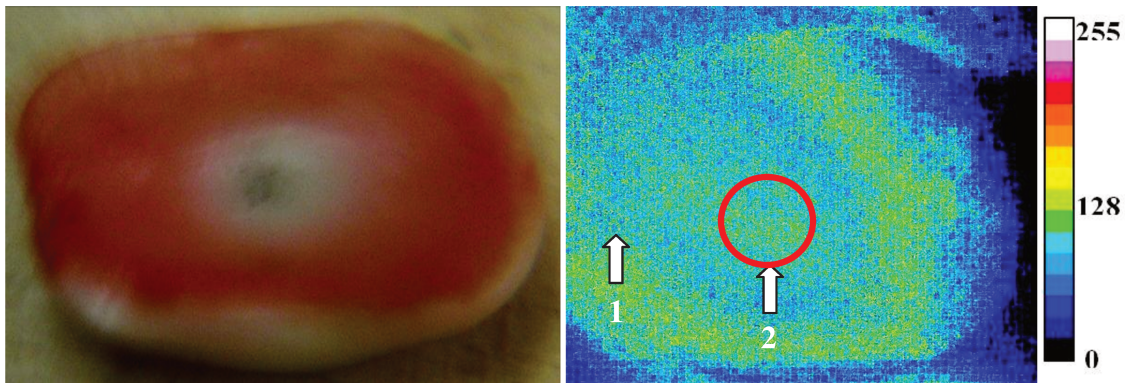


Figura 30 – Imagem do teste **TZ** e o resultado **DG** sem filtragem, respectivamente, da mesma semente, mostrando a região correspondente ao dano e sua periferia.

Pode-se observar na Figura 30 que o dano não é evidenciado de forma clara na imagem **DG** sem filtro, observa-se, no entanto, uma área de baixa atividade circulando a região do dano (1), e uma elevação da atividade nas coordenadas mais próximas da perfuração (2).

A Figura 31 possibilita que esta análise seja feita para o processamento em **Fujii**.

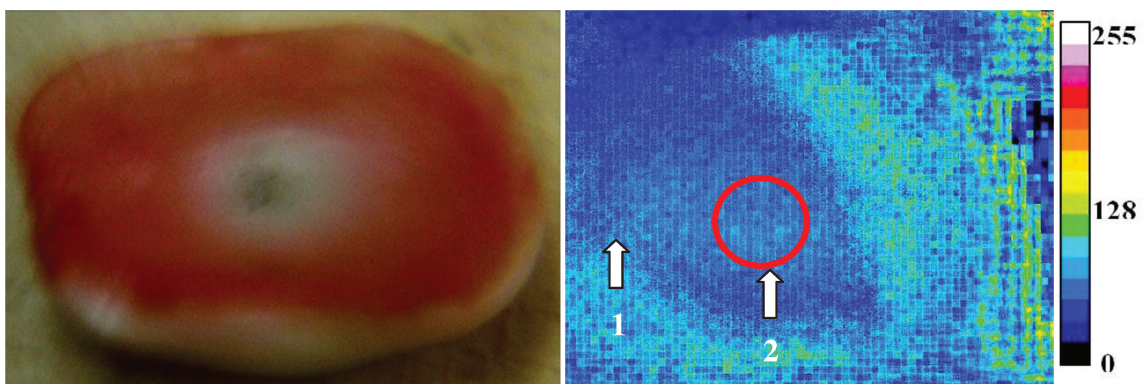


Figura 31 – Imagem do teste **TZ** e o resultado **Fujii** sem filtragem, respectivamente, da mesma semente, mostrando a região correspondente ao dano e sua periferia.

Neste caso, a análise pelo método de **Fujii** fornece contraste para uma diferenciação mais clara, pois nota-se que a área mais próxima do dano (2), apresenta uma atividade mais alta do que a região que circunda o dano (1), porém, menor do que a região periférica da semente (mais afastada do dano).

A água em uma semente se apresenta ligada de diversas formas, sendo elas: água de constituição, água adsorvida e água absorvida. Dessa forma, o dano térmico pode ter alterado

a forma como a água se apresentava ligada nas células do local danificado, fazendo com que a proporção e o arranjo de água nas sementes ficassem alterados, gerando gradientes hídricos no interior da mesma. O re-arranjo da água, fluidos e partículas na parte danificada pode ter influenciado o nível de atividade observado pelo *bioespeckle* laser, o que justifica o fato dessa área aparecer nos mapas **DG** e **Fujii** com uma atividade mais elevada. No caso do experimento 1, este fenômeno não ocorreu uma vez que os danos naturais já estavam presentes na semente a muito tempo, de forma que a região do dano já se encontrava em equilíbrio com o restante da semente.

5.2.3. Resultados do teste DG e Fujii com filtragem

A Figura 32 permite observar o resultado da mesma semente expresso em termos de frequências através da **matriz 3s**. Neste caso, como a taxa de amostragem foi de 30 **Hz**, as frequências amostradas estão na faixa de aproximadamente 0 a 15 **Hz**.

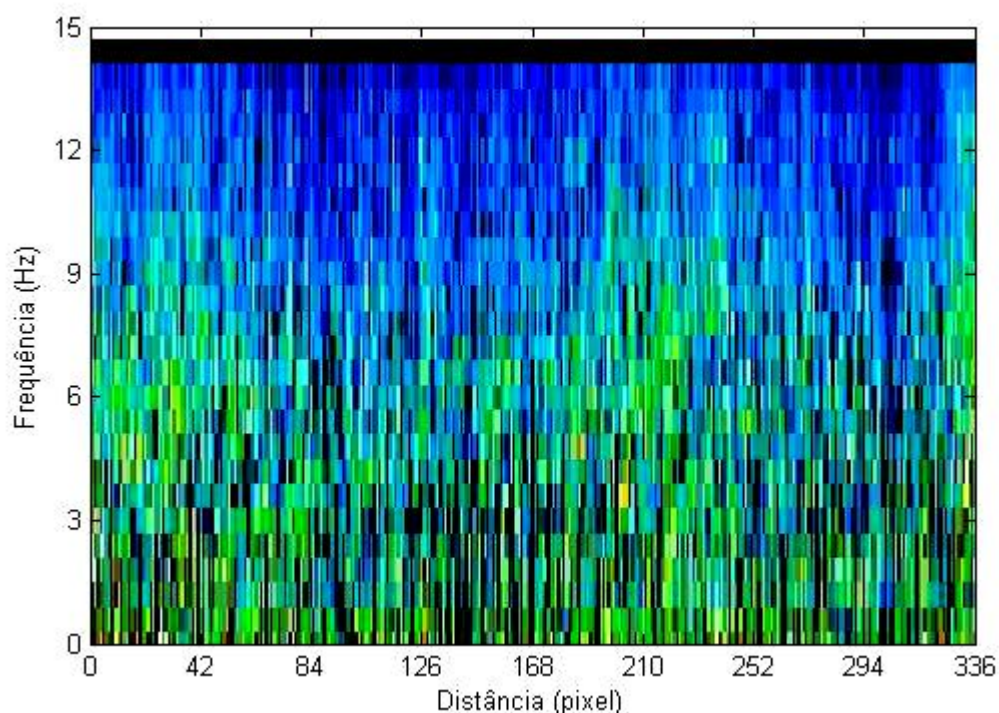


Figura 32 – **Matriz 3s** gerada a partir das imagens **DG** de uma semente com dano térmico pontual.

O pixel de coordenada 210 corresponde ao ponto no qual a linha amostral passa pelo dano central na semente (ponto de inserção da agulha aquecida). Nota-se que nas frequências mais altas e nas frequências mais baixas não é possível identificar a área correspondente ao dano na semente, no entanto, é possível notar que existe uma área com pixels de maior intensidade nas imediações do dano que pode ser observada nas frequências de aproximadamente 9 **Hz**. Nota-se, pela análise da Figura 32 que na frequência de aproximadamente 9 **Hz** os pixels se apresentam com intensidades mais claras (maior atividade) em torno do pixel de número 42 (área mais afastada do dano), por volta do pixel 84 (área que circunda o ponto de inserção da agulha) assume tonalidades mais escuras (menor atividade), volta assumir valores mais elevados nas proximidades do dano (pixel 210), voltando a cair novamente na área vizinha ao dano e subir na periferia da semente (pixels 294 e 336 respectivamente). Já nas frequências em torno de 12 **Hz**, pode-se distinguir na **matriz 3s** gerada a partir das imagens **DG** apenas uma faixa mais ativa em torno do dano (pixel 210).

Na Figura 33 pode-se observar a **matriz 3s** gerada a partir das imagens **Fujii** filtradas.

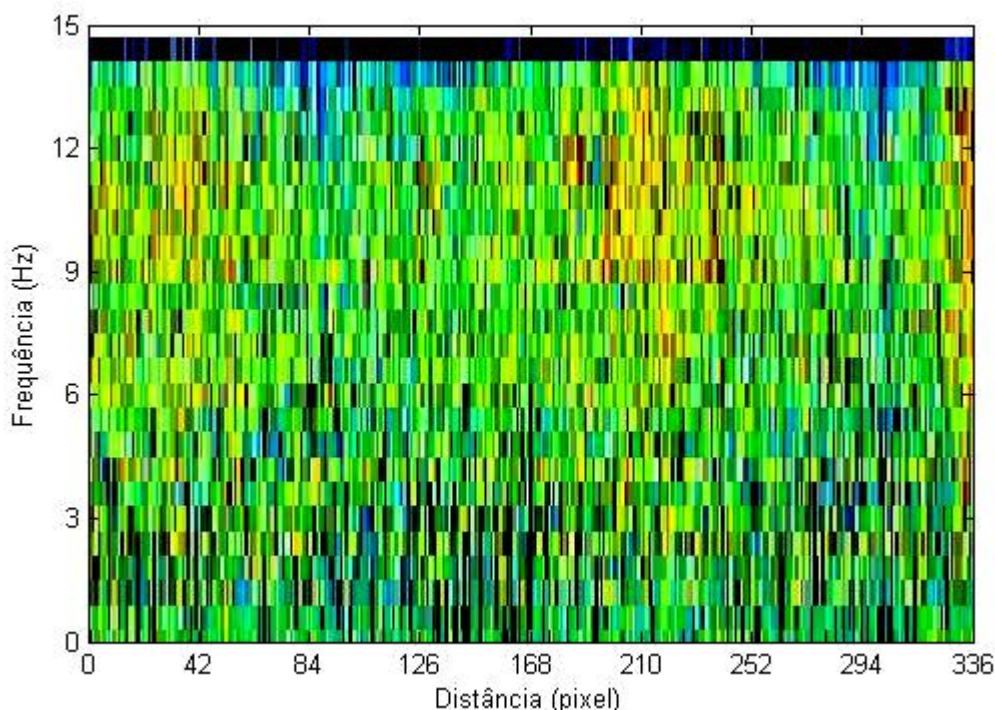


Figura 33 - **Matriz 3s** gerada a partir das imagens **Fujii** de uma semente com dano térmico pontual.

Nota-se que neste caso, a **matriz 3s** gerada apartir das imagens **Fujii** filtradas permitem observar a diferença de atividade com maior clareza. Assim como na **Mariz 3s** gerada pelo **DG**, pode-se observar que a área do dano esta mais ativa do que a área imediatamente próxima a ele (pixel 210) nas frequências mais altas. Também pode-se notar que a periferia da semente se encontra mais ativa nas frequências mais altas (pixel 42 e pixel 336). Os resultados estão compatíveis com os observados na Figura 32, de forma que o que foi discutido para aquela figura também pode ser considerado para a Figura 33.

O resultado completo dos mapas **DG** e **Fujii** para todas as sementes analisadas neste experimento se encontram no **APÊNDICE D**.

5.3. Experimento 3 – Reação química pontual com gota de Tetrazólio

5.3.1. Comprovação da reação ocorrida pelo contato entre a gota e o tecido da semente

A Figura 34 permite observar que o **TZ** reagiu com a semente durante o acondicionamento em ambiente escuro, sendo que o resultado desta reação pode ser observado pela presença da área de coloração vermelha no centro da mesma.



Figura 34 – Imagem fotocopiada da Semente após contato com gota de **TZ** durante 4 horas em ambiente escuro.

Nota-se que houve um escorrimento da gota para uma das laterais da semente, fazendo com que não só o centro da mesma fosse afetado pela reação, mas também uma de suas laterais.

5.3.2. Resultados do teste DG e Fujii sem filtragem

A Figura 35 permite comparar os resultados obtidos com o processamento **Fujii** e **DG** antes e após a reação do **TZ** na semente.

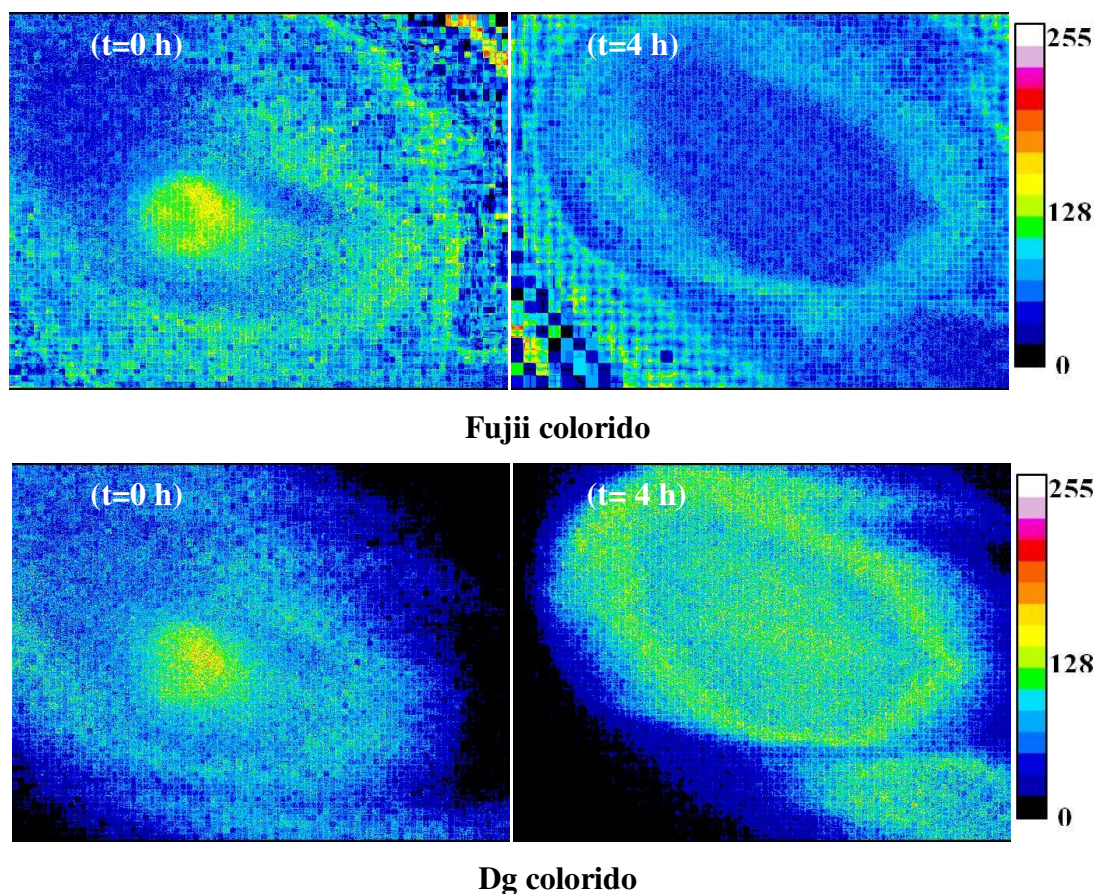


Figura 35 – **Fujii** e **DG**, representadas em pseudo-cores, do momento inicial ($t = 0$ h) e final ($t = 4$ h) respectivamente.

Como é possível observar, no momento inicial, quando a gota foi colocada em contato com a semente, ocorreu uma maior atividade da gota, devido ao processo de evaporação decorrente do contato desta com o ar ambiente. Esta atividade pode ser notada pela análise dos resultados provenientes do *biospeckle*, tanto pelo processamento em **Fujii** quanto pelo processamento em **DG**, aparecendo como uma área circular no centro da semente no $t = 0$ h. Após as 4 horas, nas quais a semente se encontrava em ambiente escuro para propiciar a reação química do **TZ** com a atividade respiratória do tecido vivo, nenhuma atividade diferenciada foi notada pelos testes **DG** e **Fujii** sem filtragem referente a parte da semente que

se manteve em contato com o tecido vivo da semente, no entanto, quando as imagens do momento inicial são comparadas com as imagens do momento final, nota-se que houve uma redução da atividade na parte central da semente, onde se encontrava a gota de **TZ**. Esta diminuição de atividade pode ser melhor notada na imagem **Fujii** e pode ter sido provocada pela reação do **TZ** com as enzimas mitocondriais das células vegetais vivas que estavam presentes no interior da semente.

5.3.3. Resultados do teste DG e Fujii com filtragem

A Figura 36 permite observar a **matriz 3s** gerada apartir do processamento **Fujii** de uma linha amostral passando pelo centro da gota de **TZ** no momento inicial, logo depois que a gota foi colocada na semente. Pode se observar que a atividade se apresenta mais elevada na faixa de frequências que vai de aproximadamente 2 **Hz** até aproximadamente 15 **Hz**.

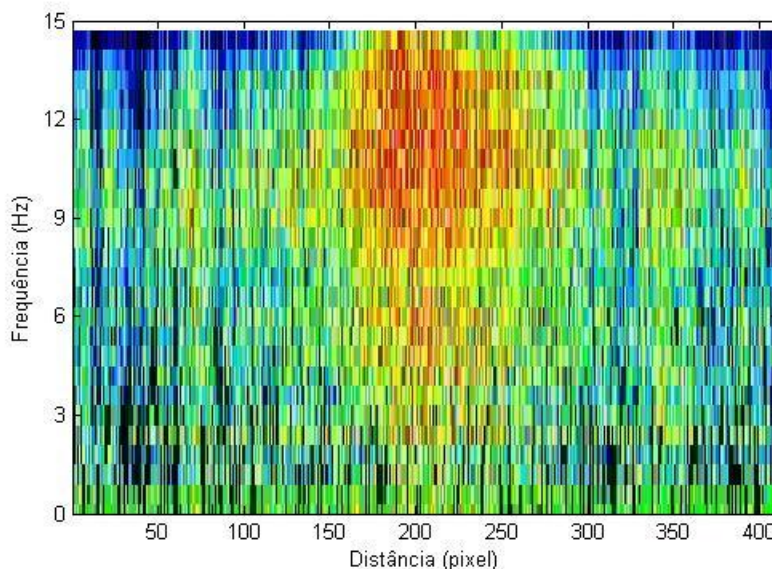


Figura 36 – **Matriz 3s** gerada apartir das imagens **Fujii** de uma semente com uma gota de **TZ** no centro (pixel 200), no momento que a gota foi colocada.

A atividade observada na Figura 36 é decorrente principalmente do processo de evaporação presente na gota de **TZ** e da movimentação natural decorrente dos gradientes hídricos existentes na semente, bem como do movimento browniano presente nas partículas em suspensão no líquido.

A Figura 37 permite observar o resultado da **matriz 3s** da mesma semente, porém quatro horas após a gota ter sido colocada em contato com a semente.

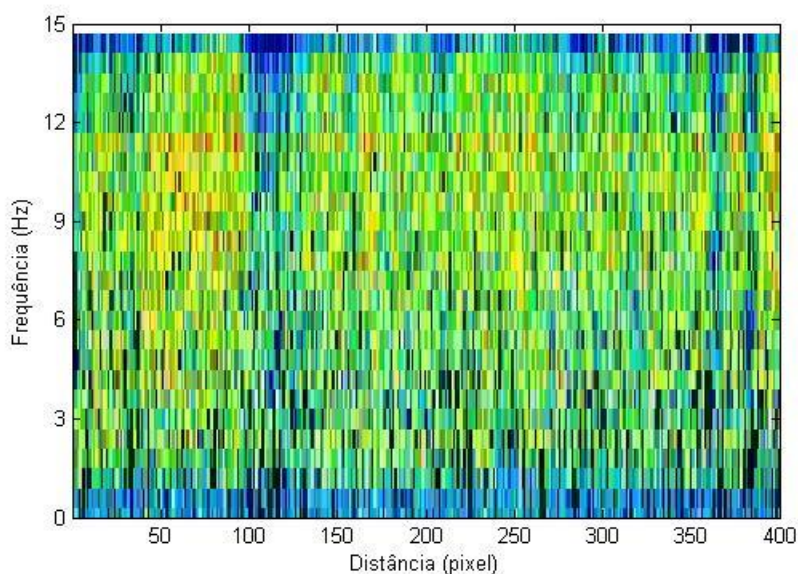


Figura 37 – **Matriz 3s** gerada apartir das imagens **Fujii** de uma semente com uma gota de **TZ** no centro (pixel 200) quatro horas após a gota ter sido colocada.

Como pode ser observado na Figura 37, não é possível identificar, quatro horas após a gota ser colocada, nenhuma atividade diferenciada em termos de frequência no ponto onde a gota se encontrava. Este resultado está compatível com aquele observado com a análise sem frequência e mostra que a diminuição de atividade provocada pela reação do **TZ** na semente, caso tenha influenciado no nível de atividade, foi sutil a ponto de não ser detectada pelo método de análise. Na Figura 38 e na Figura 39 podem ser observadas as **matrizes 3s** do momento inicial e final, respectivamente, porém usando o processamento em **DG**.

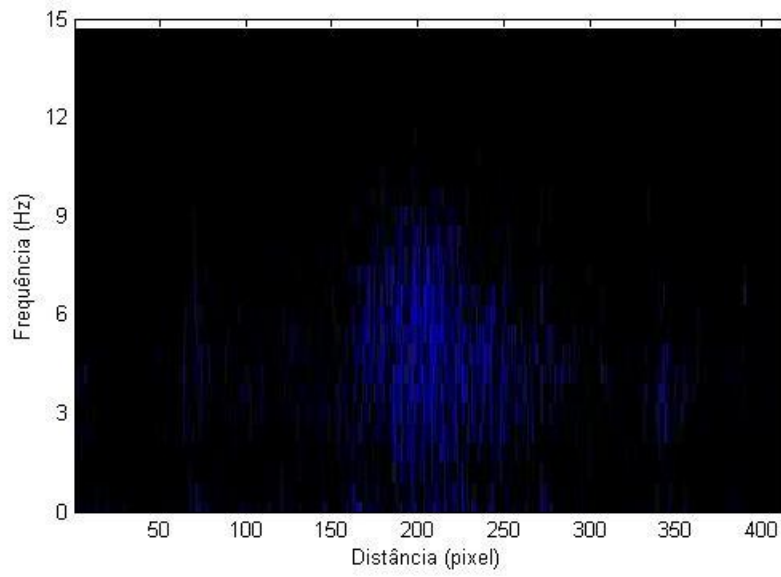


Figura 38 – **Matriz 3s** gerada apartir das imagens **DG** de uma semente com uma gota de **TZ** no centro (pixel 200), logo após o momento em que a gota foi colocada.

Neste caso, pode-se observar uma diferença entre a **matriz 3s** gerada apartir das imagens **DG** daquela gerada apartir das imagens **Fujii**. Nota-se que a **matriz 3s** gerada apartir do **Fujii** detectou a atividade da gota de **TZ** em uma faixa de frequências maior do que a **matriz 3s** proveniente das imagens **DG**, sendo que esta, apenas detectou a atividade da gota nas baixas frequências indo de aproximadamente 2 até 9 **Hz**, enquanto que a **matriz 3s** proveniente do **Fujii** detectou a atividade da gota nas frequências que vão de 2 até aproximadamente 15 **Hz**.

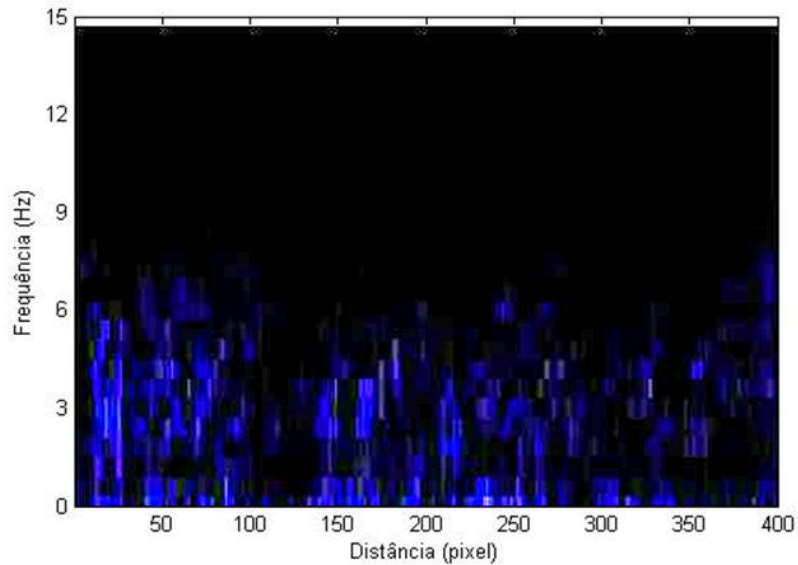


Figura 39 – **Matriz 3s** gerada apartir das imagens **DG** de uma semente com uma gota de **TZ** no centro (pixel 200) quatro horas após a gota ter sido colocada.

A Figura 39, assim como a Figura 37, não permite identificar nenhuma atividade diferenciada em termos de frequência no ponto onde a gota se encontrava quatro horas antes. No entanto, no caso das do processamento com base nas imagens **DG**, pode se notar atividade apenas nas baixas frequências, sendo ainda que estas atividades estão se apresentando de forma tênue.

Estes resultados são importantes, pois permitem verificar que o processamento **DG** e o processamento **Fujii** são complementares, sendo que, dependendo do tipo de processamento (**Fujii** ou **DG**) o resultado em termos de frequência pode se apresentar de forma diferente. Isso fica claro, por exemplo, ao comparar a Figura 36 com a Figura 38, onde nota-se que o **Fujii** realça a presença da gota em faixas de frequências adicionais quando comparado com o processamento **DG**. Os resultados completos podem ser observados no **APÊNDICE E**.

5.4. Experimento 4 – Reação química pontual com sal de frutas ($\text{NaHCO}_3 + \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 + \text{Na}_2\text{CO}_3$) e gota de água

5.4.1. Resultados do teste DG e Fujii sem filtragem

A Figura 40 permite observar a imagem proveniente do processamento **DG** sem filtro de um cotilédone com uma gota de sal de frutas em sua superfície.

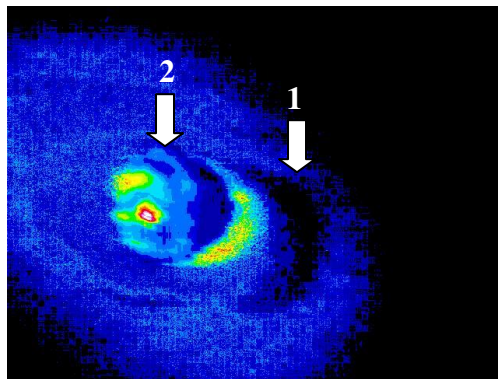


Figura 40 – **DG** de um cotilédone com uma reação química ocorrendo no centro da mesma.

Como pode ser observado na Figura 40, é possível notar uma atividade intensa no centro da reação, e alguns pontos de atividade intermediária nas extremidades da gota. A seta número 1 corresponde a uma sombra devido ao ângulo de projeção do laser com relação a gota de reagente. A seta número 2 corresponde a gota contendo o sal de frutas e água. Nota-se que a atividade na gota não é uniforme, isto em parte se deve ao fato de ocorrer intensa movimentação do líquido durante a reação química, sendo que parte do reagente acaba se concentrando em pontos específicos da gota. Além disso, a movimentação intensa das bolhas em determinadas partes e sua concentração de forma estacionária em determinados pontos, faz com que haja áreas de maior atividade nos pontos onde estas se movimentam e pontos de baixa atividade onde não há movimentação das mesmas. Nos pontos estacionários, podem ainda ocorrer a saturação positiva no sensor da câmera, devido ao reflexo especular, fazendo com que as atividades em que este fenômeno ocorre não sejam registradas pela câmera.

A Figura 41 permite observar o mesmo mapeamento, porém agora realizado com a técnica de **Fujii**.

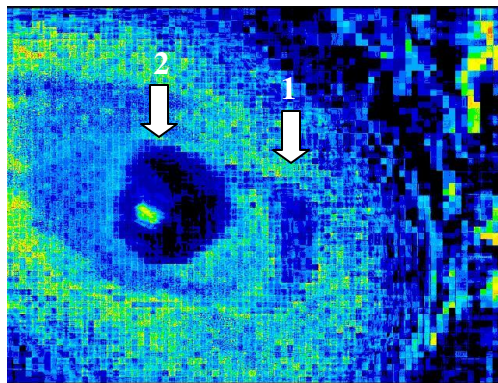


Figura 41 – **Fujii** de um tegumento com uma reação química ocorrendo no centro da mesma.

No caso da Figura 41, proveniente do tratamento **Fujii**, nota-se que, é possível observar a área referente à sombra (1) mencionada anteriormente, bem como a área correspondente a gota de reagente (2). No entanto, nota-se que algumas regiões da gota que puderam ser observadas com atividades distintas na Figura 40 não puderam ser notadas aqui. Estes resultados mais uma vez apontam no sentido de que os testes **Fujii** e **DG** são complementares e devem ser usados em conjunto para se obter o maior número de informações sobre o material que se está analisando.

5.4.2. Resultados do teste DG e Fujii com filtragem

A Figura 42 permite observar a **matriz 3s** proveniente das imagens **Fujii** do cotilédone com a gota de sal de frutas em sua superfície. O pixel de número 184 passa exatamente pelo centro da gota onde ocorre a reação química. Pode se observar pela análise da Figura 42 que há uma atividade no ponto central da gota que aparece de forma intensa em todas as faixas de frequências. Este ponto (pixel 180) é onde ocorre a conjunção de diversos fenômenos interagindo juntamente, sendo eles: reação química proveniente do sal de frutas, movimentação de gota devido ao fluxo gerado pela liberação de gases provenientes da reação e atividade de água. Este fato justifica o motivo de haver influência em várias faixas de frequências. O diâmetro da gota vai aproximadamente do pixel 138 ao pixel 230, onde nota-se que houve uma atividade expressiva nas faixas de frequências mais baixas, indo de 0 a aproximadamente 3 Hz. Acredita-se que esta atividade seja decorrente da gota do sal de frutas,

uma vez que abrange toda a extensão da gota, apresentando um ponto de intensidade mais forte no centro, sendo que, provavelmente, este ponto central de alta atividade se trata da atividade própria da gota do sal de frutas mais os fenômenos ocasionados pela reação (como a movimentação de gotas).

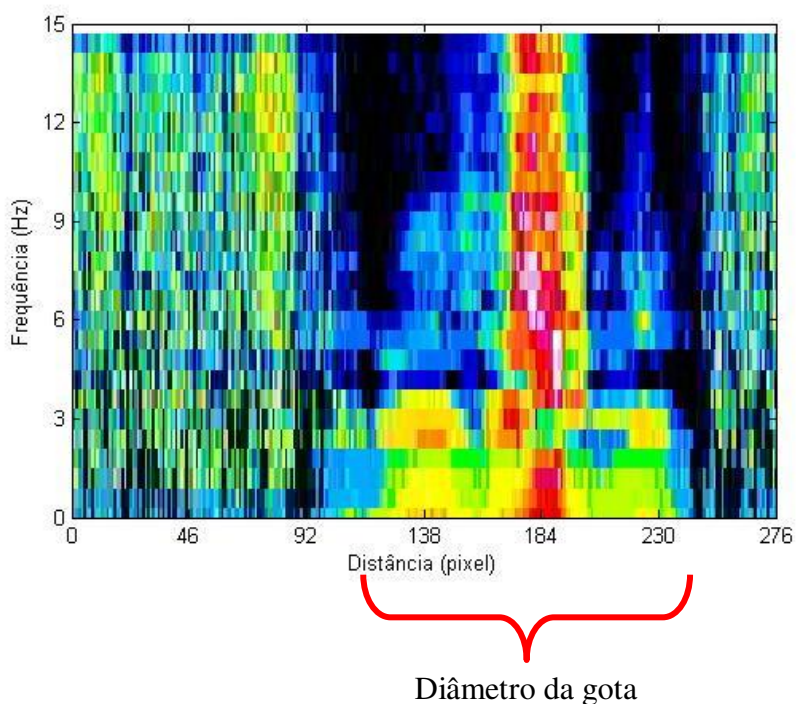


Figura 42 – **Matriz 3s** gerada a partir das imagens **Fujii** de uma semente com uma gota de sal de frutas em sua superfície (pixel 184).

As observações e discussões levantadas para a Figura 42 podem ser reforçadas pela análise da Figura 43, onde se encontra a representação da **matriz 3s** proveniente das mesmas imagens capturadas, porém agora utilizando o processamento em **DG**. Nota-se que assim como na Figura 42, também é possível observar uma faixa de atividade que se apresenta mais elevada em todas as faixas de frequências, sendo que está fica concentrada em torno do pixel 184 que corresponde ao centro da gota de sal de frutas. Também à área correspondente ao diâmetro da gota, que vai, aproximadamente, do pixel 138 até o pixel 230, pode ser notada nas baixas frequências (abaixo de 3 **Hz**).

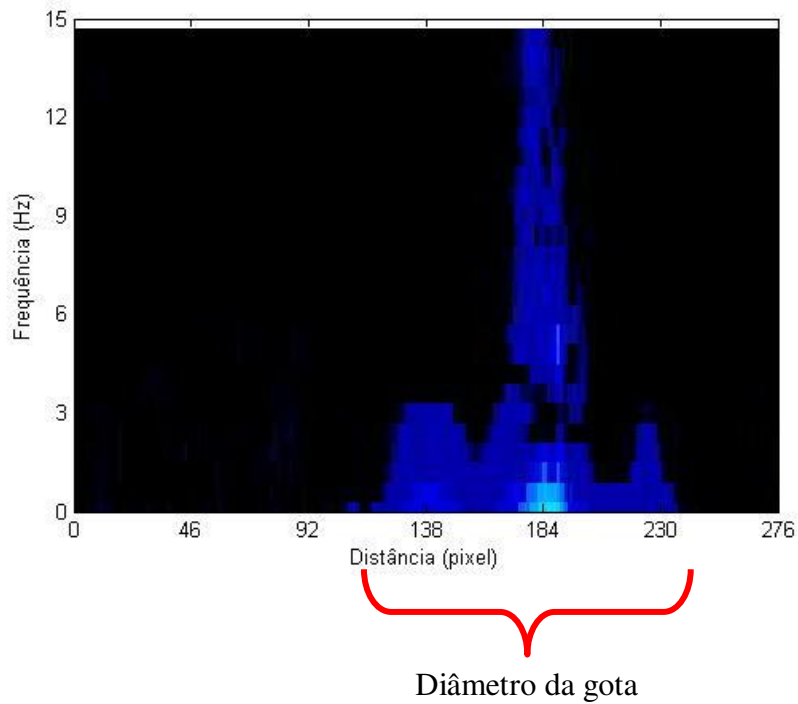


Figura 43 - **Matriz 3s** gerada a partir das imagens **DG** de uma semente com uma gota de sal de frutas em sua superfície (pixel 184).

No **APÊNDICE F** encontra-se o resultado completo com todas as frequências para esta semente e uma repetição.

5.5. Considerações finais

Levando se em conta os resultados apresentados, pode-se dizer que, embora os danos possam ser notados sem a utilização do procedimento de filtragem em frequência, quando este procedimento é executado, melhora consideravelmente a qualidade da informação, permitindo que sejam realizadas análises e inferências mais precisas sobre o material analisado, como exemplo pode-se observar os resultados da Figura 21 e Figura 22.

A **matriz 3s** se apresenta como uma poderosa ferramenta de análise, permitindo visualizar de forma compacta a distribuição de atividades nas faixas de frequências.

Os danos naturais presentes nas sementes de feijão se apresentam nas imagens provenientes do *biospeckle*, com níveis de atividades mais baixas do que as áreas vizinhas a

eles, podendo ser notados nas análises, como por exemplo, o resultado referente à plúmula morta da Figura 23 e o ponto de atividade intermediária, visto na mesma amostra. Pode-se notar também que existe uma correspondência entre os resultados observados no teste **TZ** e os resultados decorrentes do método *biospeckle* laser.

Quanto aos danos térmicos no tecido da semente, apresentam uma atividade mais elevada no ponto de contato com a agulha, no entanto, a região imediatamente em torno do ponto de contato, apresenta-se nas medições com **DG** e **Fujii** como áreas de atividade reduzida.

A gota de **TZ** é claramente notada nas imagens **DG** e **Fujii**, tanto filtradas como sem filtragem, no início da reação, porém quatro horas após, nota-se apenas uma redução sutil no nível de atividade observado pelas metodologias de análise. Esta diminuição de atividade não é notada quando se aplica o processamento em frequências, mostrando que o fenômeno ocorre de forma espalhada em todas as faixas de frequências.

O experimento realizado provocando uma reação química localizada com o sal de frutas foi importante para atestar a eficácia do método em diferenciar atividades que ocorrem em baixas frequências daquelas que ocorrem em frequências mais elevadas.

Os testes **DG** e **Fujii** se mostram complementares como metodologias de análise, sendo que resultados processados em frequências podem apresentar diferenças significativas em função do método que se utiliza para efetuar o mapeamento.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que.

- A técnica de filtragem por **TW** pode ser aplicada na identificação de danos naturais e mecânicos em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.);
- Os danos nas sementes ocasionados por uma agulha em alta temperatura podem ser identificados pela metodologia proposta;
- Atividades decorrentes de reações químicas superficiais também são passíveis de análise pela técnica de filtragem por **TW**.
- A técnica de filtragem por **TW** apresenta grande potencialidade na identificação de fenômenos de baixa e alta atividade nas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e, seus resultados, podem ser correlacionados com danos e contaminações.

7. TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se como trabalhos futuros, a separação dos mapas de atividades gerados pelas técnicas **DG** e **Fujii** em áreas de interesse, realizando o somatório da intensidade de pixels dessas áreas a fim de se obter uma quantificação do nível de atividade de cada área específica da semente. Estas áreas poderiam ser correlacionadas com informações referentes à anatomia e fisiologia da semente estudada, possibilitando que sejam atribuídos pesos diferenciados para os pixels de determinadas áreas da semente, como por exemplo, o eixo embrionário. Esta etapa poderia ser complementada pela utilização de um algoritmo baseado em Redes Neurais Artificiais que possibilitasse o reconhecimento de padrões nos mapas de atividades correlacionando estes padrões com a probabilidade de uma dada semente germinar ou não. Para isso, o algoritmo deveria ser alimentado com os mapas de atividades de uma dada semente, bem como, com informações referentes a dados coletados a partir do teste de germinação desta mesma semente.

Adicionalmente, a elaboração de um único software que integre todas as etapas do processamento, bem como a adoção de processadores mais rápidos, poderia elevar a técnica ao nível de aplicação, possibilitando a construção de um equipamento de coleta de dados que, uma vez acoplado ao computador, possibilitasse a extração de informações sobre a qualidade de uma semente, de forma rápida e automática.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMALVY, J. I.; LASQUIBAR, C. A.; ARIZAGA, R.; RABAL, H.; TRIVI, M. 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.

BORÉM, Flávio Meira. **Processamento de Produtos Agrícolas 1**.Lavras: Ufla, 2001. 149 p

BRAGA JR, R. A.; RABELO, G. F.; GRANATO, L. R.; SANTOS, E. F.; MACHADO, J. C.; ARIZAGA, R.; RABAL, H. J.; TRIVI, M. Detection of Fungi in Beans by the Laser Biospeckle Technique. **Biosystems Engineering**, San Diego, v. 91, n. 4, p. 465-469, Ago. 2005.

BRAGA Jr., 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.

BRAGA JÚNIOR, R. A.; BOREM, F. M.; FABBRO, I. M. D.; ARIZAGA, R.; RABAL, H. J.; TRIVI, M. R. Seeds characterization by dynamic speckle patterns: a proposal. In: PHOTONICS EAST 2000 ENVIRONMENTAL AND INDUSTRIAL SENSING, 2000, Boston. **Environmental and Industrial Sensing...** Boston : Spie, 2000.

BRAGA JÚNIOR, R. A.; BOREM, F. M.; RABELO, G. F.; FABBRO, I. M. D.; ARIZAGA, R.; RABAL, H. J.; TRIVI, M. R. Seeds analysis using bio-speckle. IN: RIAO, 2001, Tandil. **SPIE – RIAO...** Tandil: Spie, 2001.

BRAGA, R. A.; HORGAN, G. W.; MIRON, D.; RABELO, G. F.; BARRETO FILHO, J. B. Biological feature isolation by wavelets in biospeckle laser images. **Computers and Eletronics in Agriculture**, New York, v. 58, n. 2, p. 123-132, Sept. 2007.

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

BRIERS, J. D. Speckle fluctuations and biomedical optics: implications and applications. **Optical Engineering**, Boston, v. 32, n. 2, p. 277 - 281, 1993.

BRIERS, J. D. Time-varying laser speckle for measuring motion and flow. **Optical Engineering**, Saratov, p. 3-6, Out. 2000.

BRIERS, J. D.; WEBSTER, S. Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA): A Nonscanning, Full – Field Technique For Monitoring Capillary Blood Flow. **Journal of Modern Optics**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 174-178, 1995.

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.; RABELO, G. F.; BRAGA JÚNIOR, R. A.; RODRIGUES, S. 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.

FUJII, Hitoshi et al. Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing.: Part. 1. **Applied Optics**, [s.l.], v. 26, n. [s.n], p.5321-5325, 1987. Disponível em: <<http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?URI=ao-26-24-5321>>. Acesso em: 26 mar. 2011.

GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U.; SALDANHA, T. C. B.; VISANI, V.; PIMENTEL, M. F. Estudo comparativo sobre filtragem de sinais instrumentais usando Transformadas de Fourier e Wavelet. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 6, Nov./Dec. 2001.

HOGERT, M.A.; LANDAU, E. N.; REBOLLO, N; GAGGIOLI, G. Speckle movement due to a transversal displacement and a rotation of a rough surface. **J. Mod. Optics**, [s.l.], v. 41, p. 2229-2232, 1994.

LEHMANN, M. Measurement optimization in speckle interferometry: the influence of the imaging lens aperture. **Optical Engineering**, [s.l.], v. 36, n.4, p.1162 –1168, 1997.

LOAN, C. V. Computational frameworks for the Fast Fourier Transform. **Society for Industrial and Applied Mathematics**, Philadelphia, 1992. (Frontiers in applied mathematics, 10).

MALLAT, S. A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation. **IEEE Pattern Anal. and Machine Intell**, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 674-693, 1989.

Marques, J. K. **Identificação de diferentes atividades em biofilmes por meio do *biospeckle* e da transformada de *wavelets***. 2009. 61 p. Dissertação (mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

MEYER, C. Matrix analysis and applied linear algebra. Philadelphia: Transform. **Society for Industrial and Applied Mathematics**, 2000.

MIZUKAMI, A.; MURAMATSU, M.; SOGA, D. Correlação de speckle dinâmico produzido por espalhamento de luz laser por partículas num meio líquido. In: ENCONTRO NACIONAL

DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, n. 19, 1997, Caxambu. **Anais...**Caxambu: 1997.

MOREIRA, M. F. B.; BRAGA JÚNIOR, R. A.; BOREM, F. M.; RABAL, H. J.; RABELO, G. F.; FABBRO, I. M. Dal; TRIVI, M. R.; ARIZAGA, R. 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.

NASCIMENTO, Álvaro Leonardo do; COSTA JUNIOR, Antonio Tavares; RABELO, Giovanni Francisco and BRAGA JUNIOR, Roberto Alves. **Desenvolvimento de um modelo para o biospeckle na análise de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. *Ciênc. agrotec.* [online]. 2007, vol.31, n.2, pp. 456-461. ISSN 1413-7054.

OPPENHEIM, A.; SCHAFER, R.; BUCK, J. **Discrete-time signal processing**. Upper Sadle River, NJ: Prentice Hall, 1999.

OULAMARA, A.; TRIBILLON, G.; DUVERNOY, J. Biological activity measurement on botanical specimen surface using temporal decorrelation effect of laser *speckle*, **Journal of Modern Optics**, London, v. 36, n. 2, p. 165-179, Feb. 1989.

PAJUELO, M.; BALDWIN, G.; RABAL, H.; CAP, N.; ARIZAGA, R.; TRIVI, M. 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.

PASSONI, L. I.; DAI PRA, A.; RABAL, H.; TRIVI, M.; ARIZAGA, R. Dynamic speckle processing using wavelets base entropy. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 246, n. 1/3, p. 219-228, Feb. 2005.

PATORSKI, K. OLSZAK, A. digital in-plane eletronic speckle pattern chearing interferometry. **Optical Engineering**, [s.l.], v. 36, n. 7, p. 2010 –2015, 1997.

PRESS, W. **Numerical Recipes in C: the art of scientific computing**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 309 p.

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.; ARIZAGA, R.; CAP, NELLY; GRUMEL, E.; TRIVI, M. 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.; BRAGA Jr., R. A.; TRIVI, M. R.; DAL FABBRO, I. M. O Uso do Laser na Agricultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 27., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: Sociedade Brasileira de Engenharia, 1998. 1CD-ROM.

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.

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.

RIVEST, R. L.; SHAMIR, A.; ADLEMAN, L. A method of obtaining digital signatures and public-key cryptosystems. **Communications of the ACM**, New York, v. 21, n. 2, p. 120-126, 1978.

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

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

RUIZ, B.; CAP, N.; RABAL, H. Local correlation in dynamic speckle. **Optics Communications**, [s.l.], v. 245, p. 103 – 111, 2005.

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.

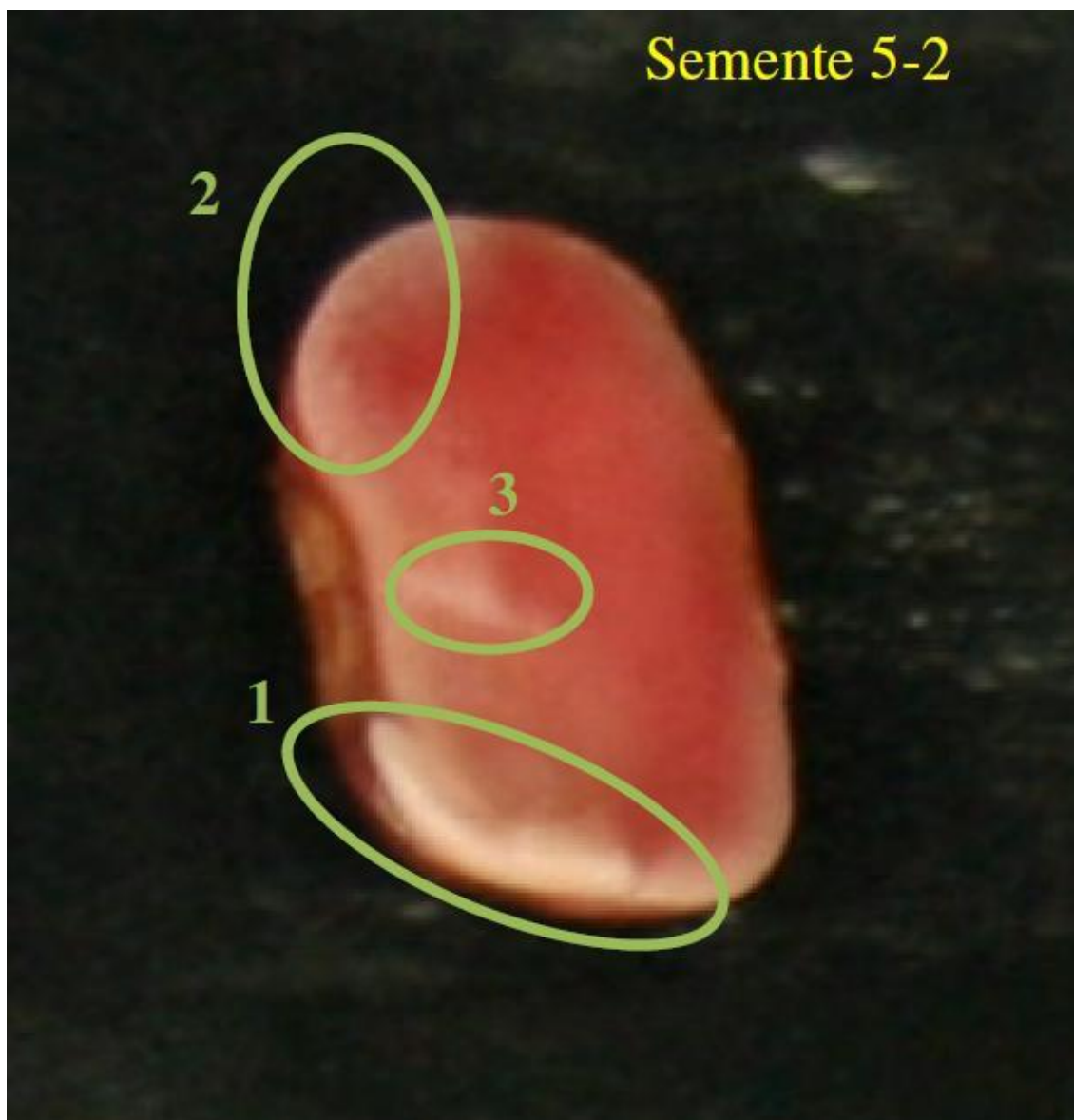
SUZUKI T., SASAKI O., MARUYAMA T. Real-time vibration measurement using a feedback type of laser diode interferometer with an optical fiber. **Optical Engineering**, v. 36, n. 9, p. 9 – 11, 1997.

WANG, L.; JAMBUNATHAN, K.; DOBBINS, B. N. measurement of three-dimensional surface shape and deformations using phase stepping speckle interferometry. **Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers**, [s.l.], v. 36, n. 2333, p. 110 – 126, 1996.

XU, Z. J.; JOENATHAN, C.; KHORANA, B. M. Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens. **Optical Engineering**, Bellingham, v. 34, n. 5, p. 1487-1502, Mai. 1995.

9. APÊNDICES

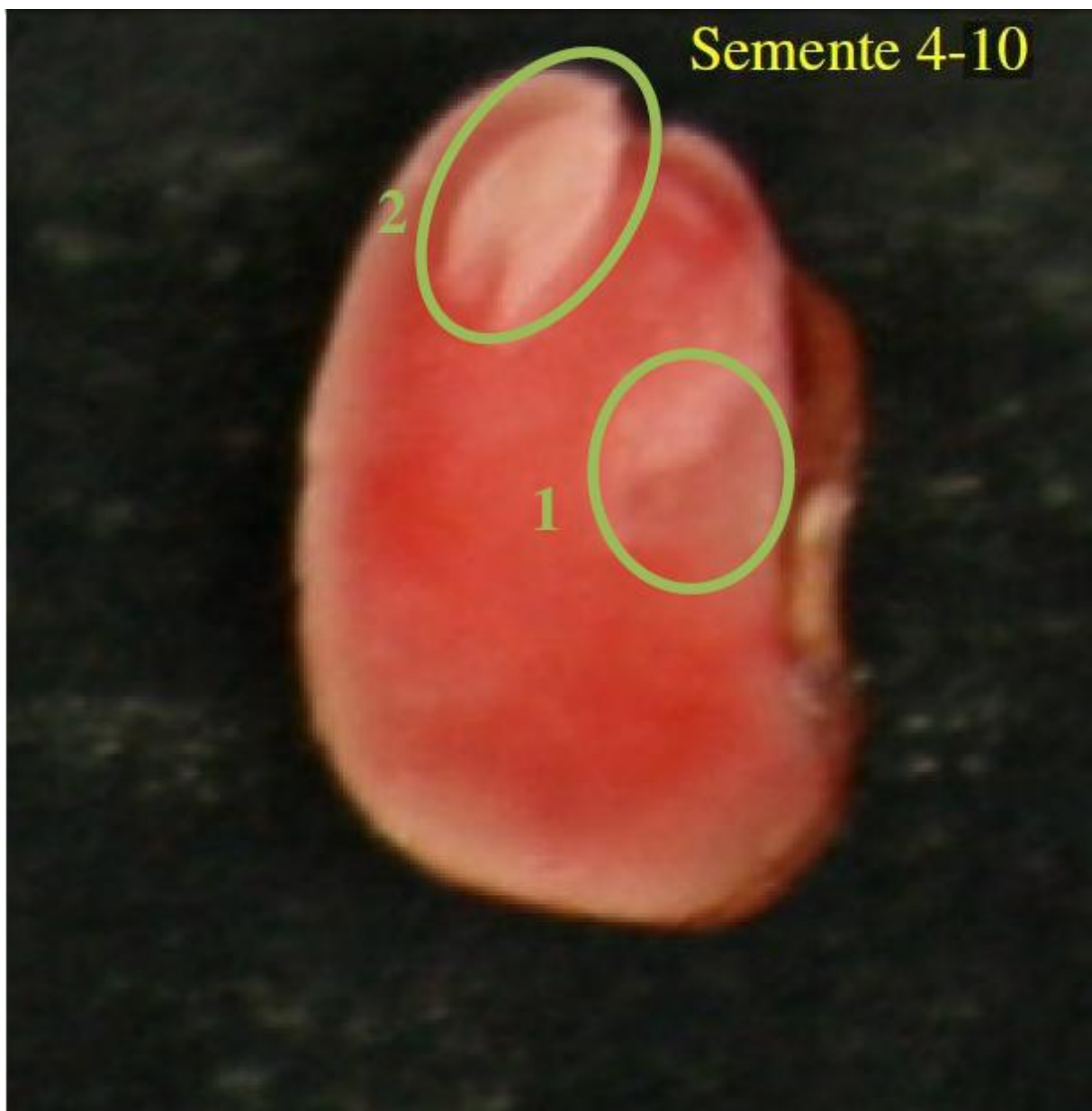
APÊNDICE A – Resultados do teste de tetrazólio (TZ).



Condição: Inviável.

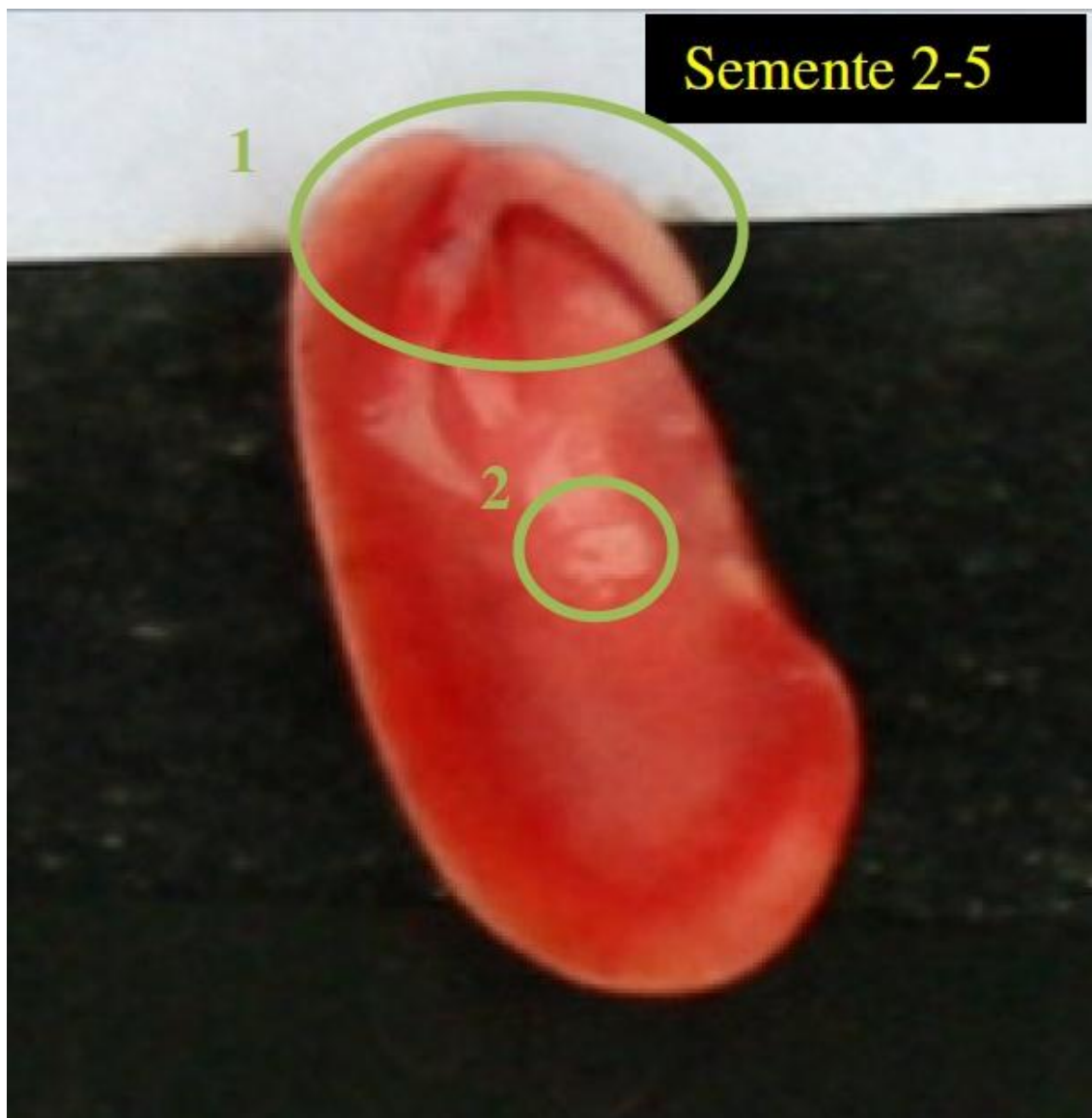
OBS: Eixo embrionário morto (1). Apresenta dano periférico (2). Linha branca na parte interna do cotilédone corresponde a uma área de baixa atividade (3), podendo ser decorrente

de uma trinca ou dano hídrico. Área de coloração rosa corresponde ao tecido vivo saudável, com atividade mais elevada do que a dos tecidos esbranquiçados.



Condição: Inviável.

OBS: Metade do eixo embrionário vivo. Tecido do tegumento vivo. Danos com atividades diferenciadas (1) e (2).



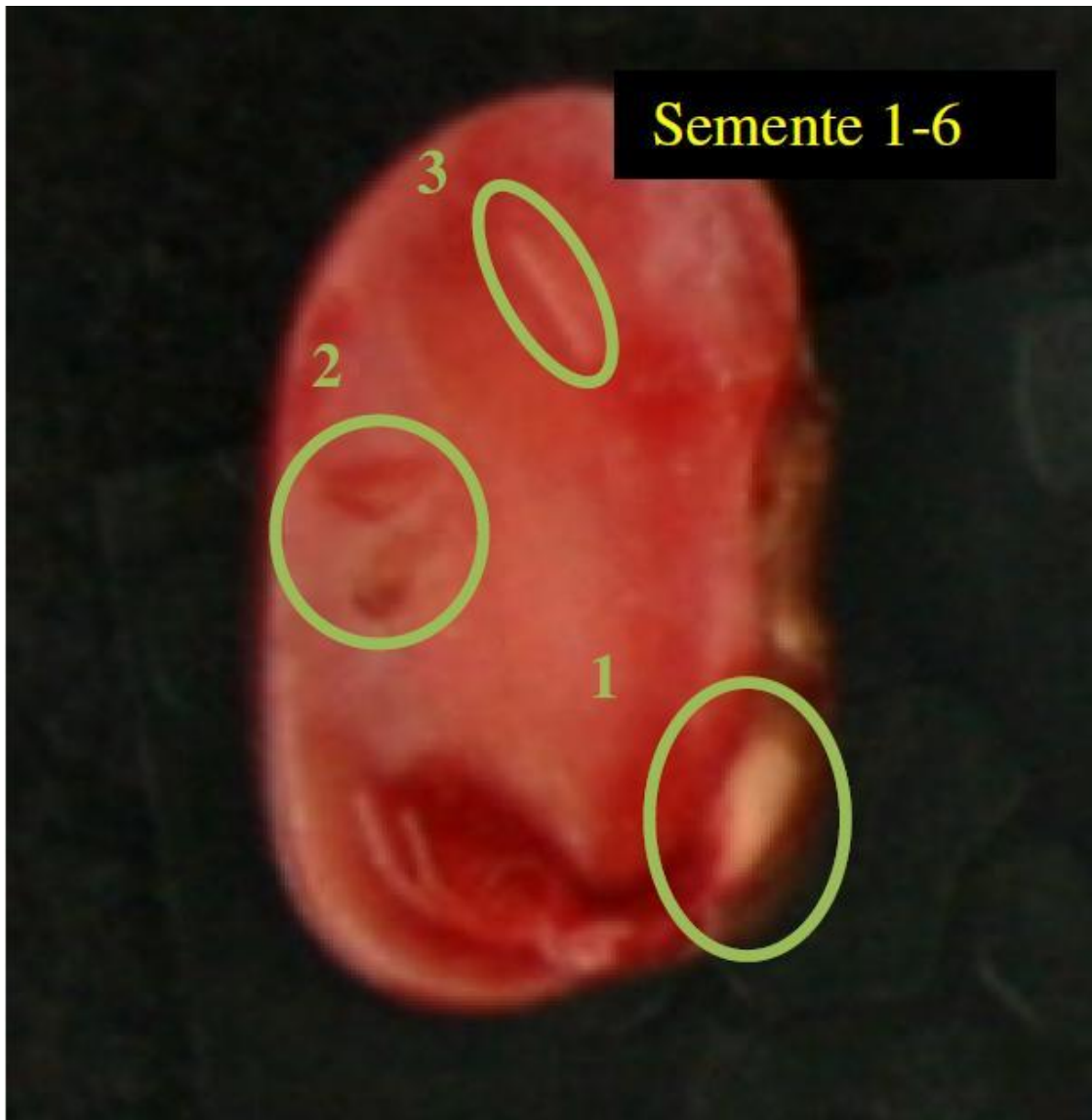
Condição: Viável com baixo vigor.

OBS: Eixo embrionário com partes danificadas apresentando diferentes níveis de coloração (1). Dano central de baixa atividade respiratória (2).



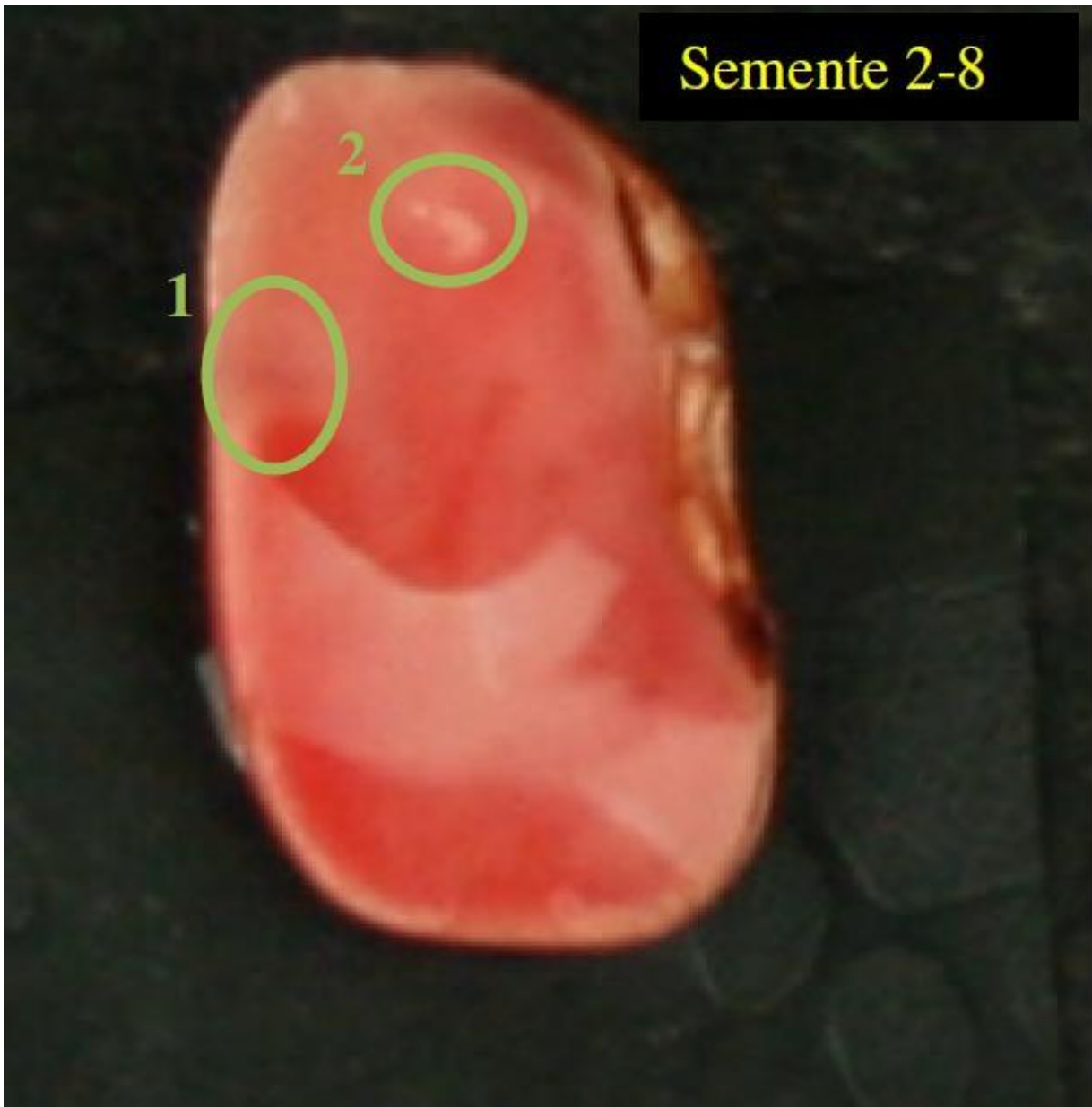
Condição: Tecido saudável.

OBS: Tecido saudável, porém o eixo embrionário falta uma parte (1), o que a torna inviável. Apresenta um pequeno dano na periferia.



Condição: Inviável.

OBS: Tecido com taxa respiratória elevada, caracterizando um processo avançado de degradação celular. Dano lateral no eixo embrionário (1) e algumas situações diferenciadas na parte interna da semente (2) e (3).

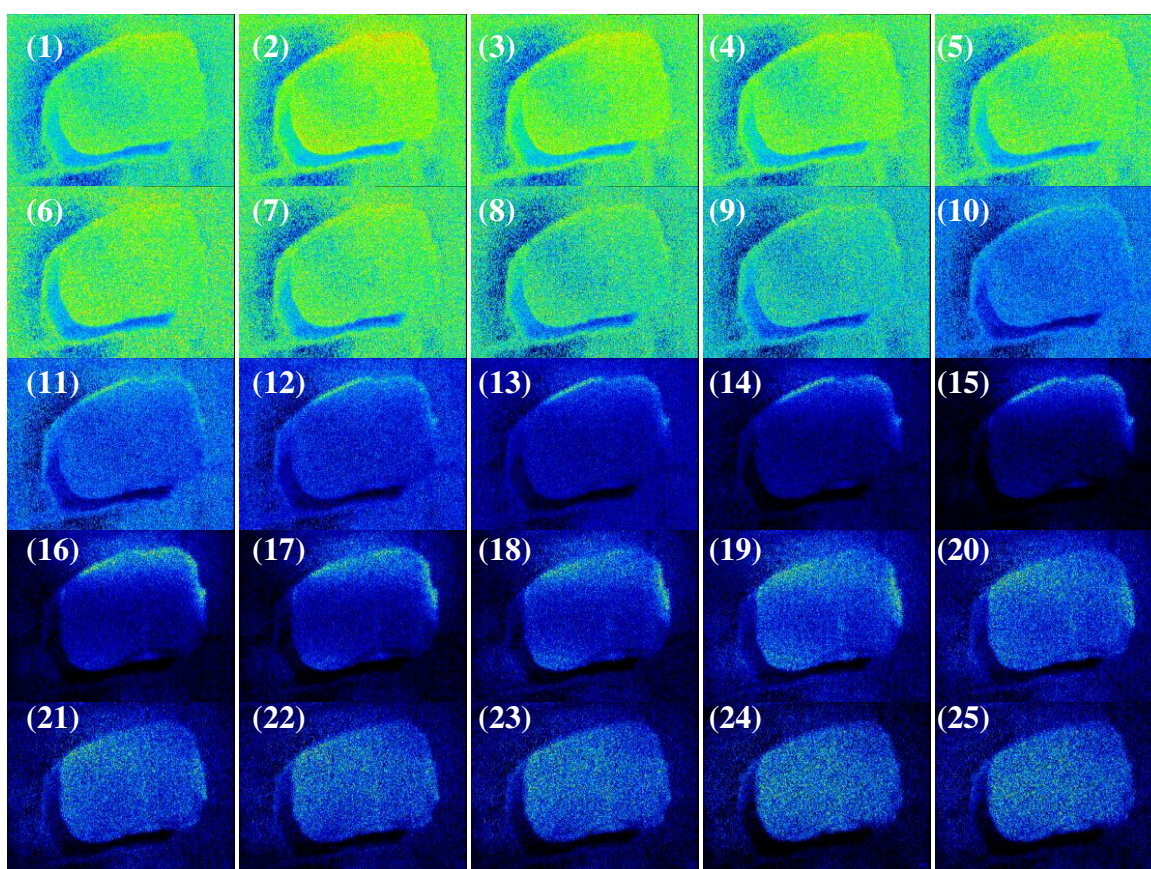
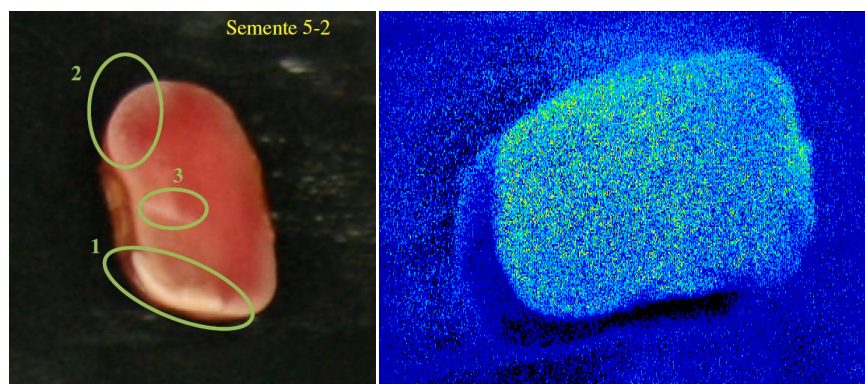


Condição: Inviável.

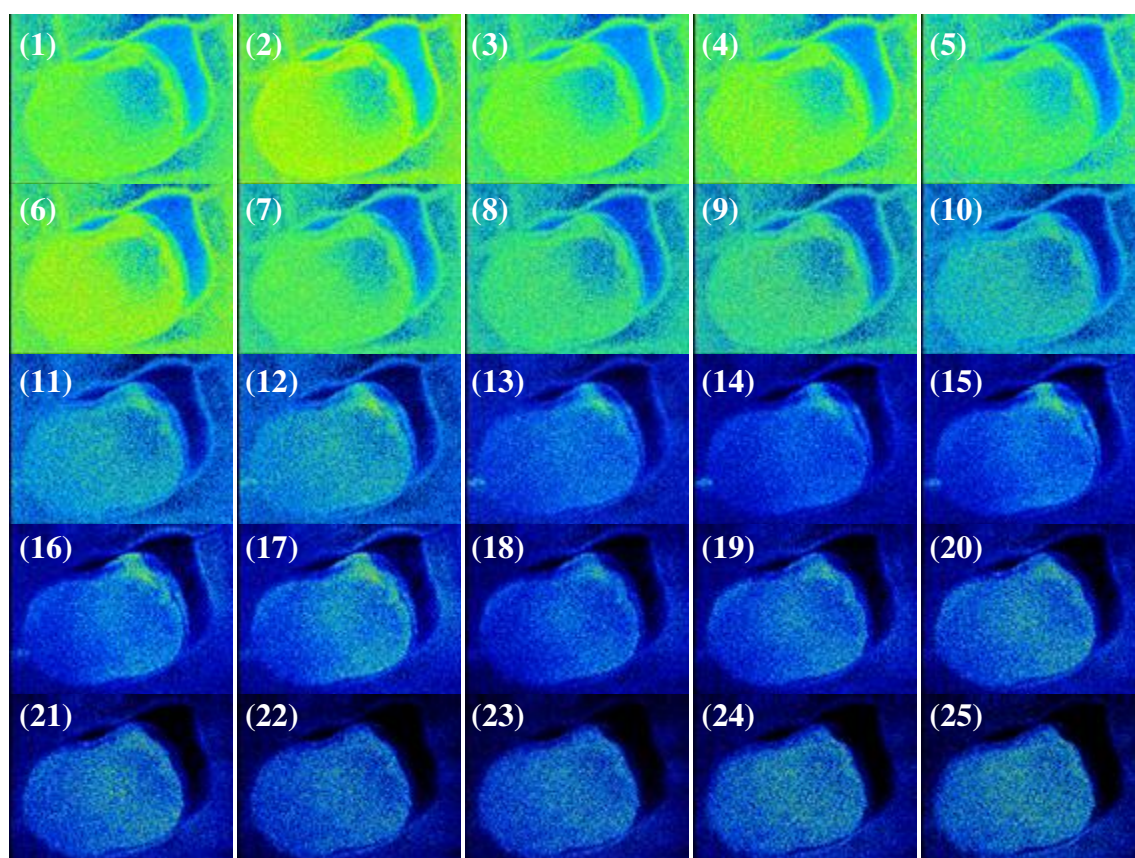
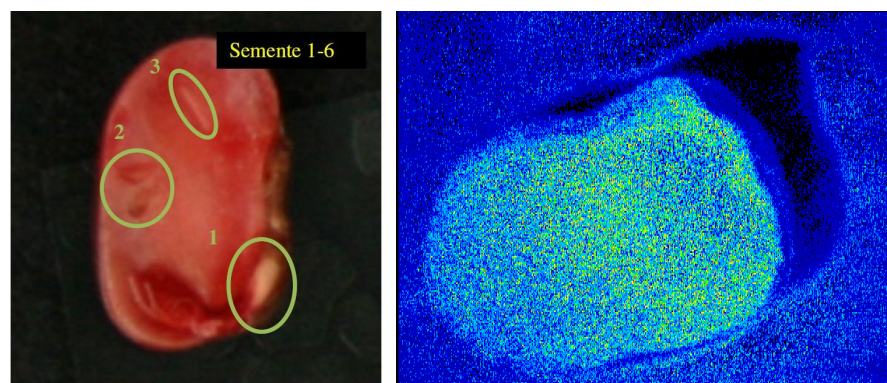
OBS: Tecido com atividade normal e homogênea, sem grandes danos. As áreas com atividades diferenciadas encontram se circuladas (1) e (2). O fato de ser inviável ocorre não pela má qualidade do tecido vegetal, mas sim pela ausência do eixo embrionário.

APÊNDICE B – Resultados do teste de Diferenças Generalizadas.

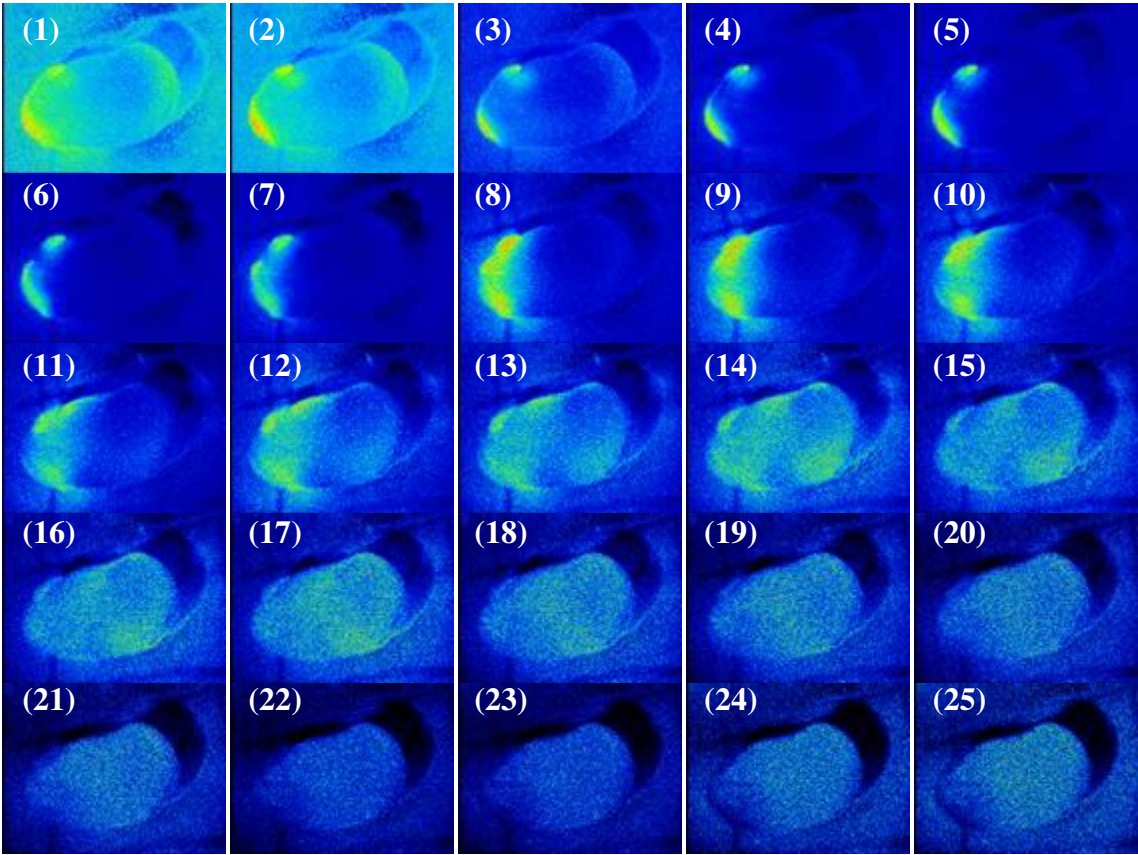
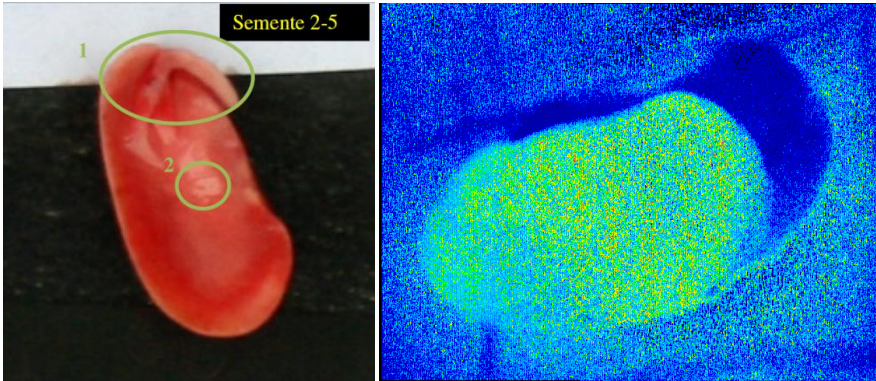
Semente 5-2



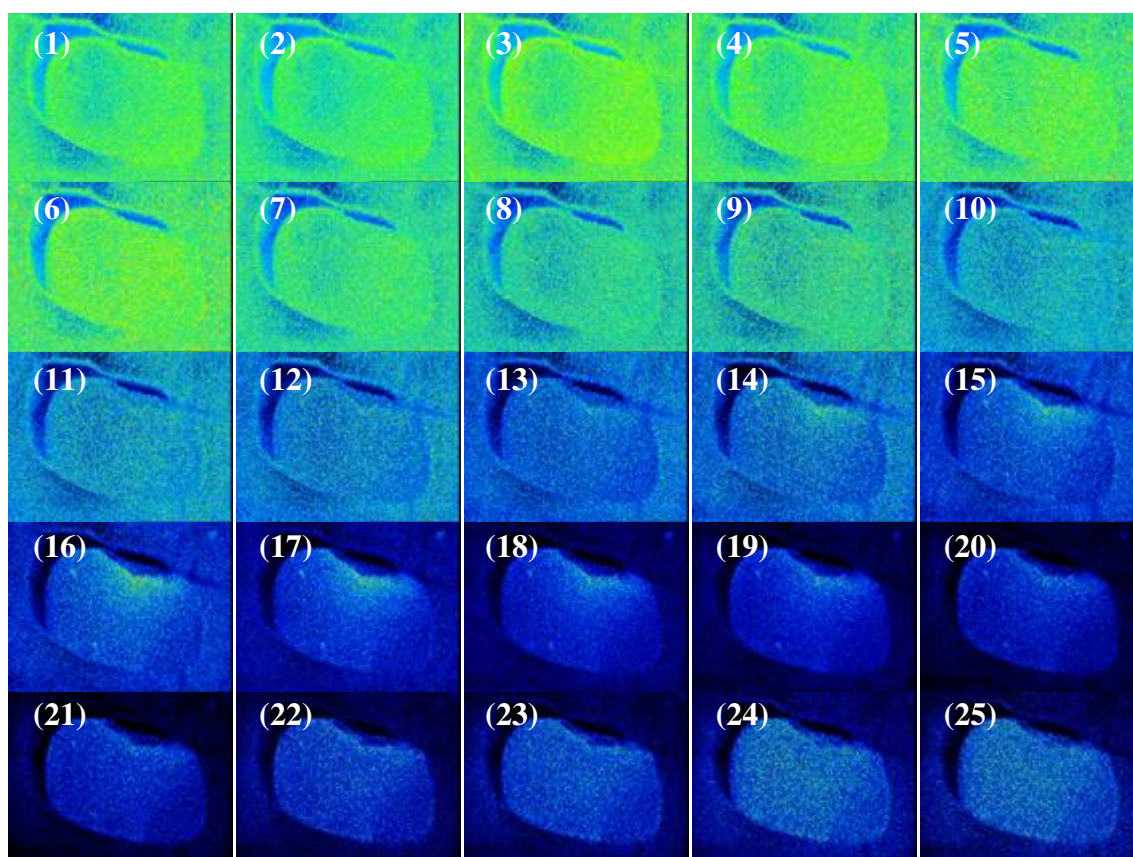
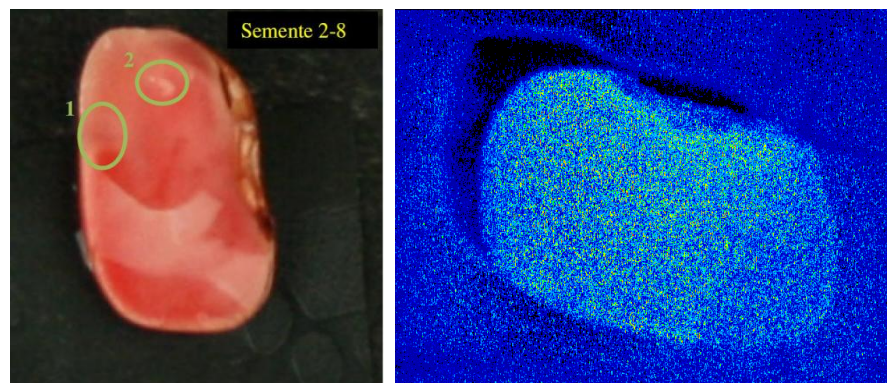
Semente 1-6



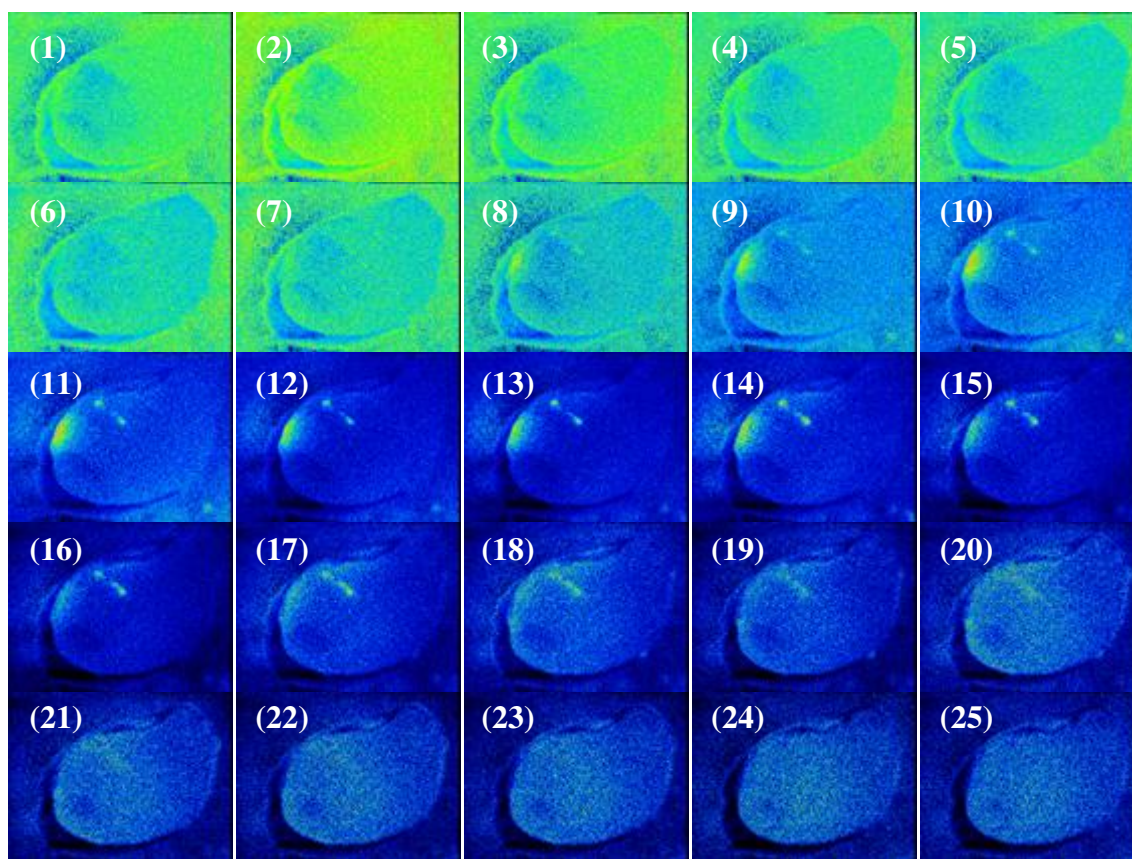
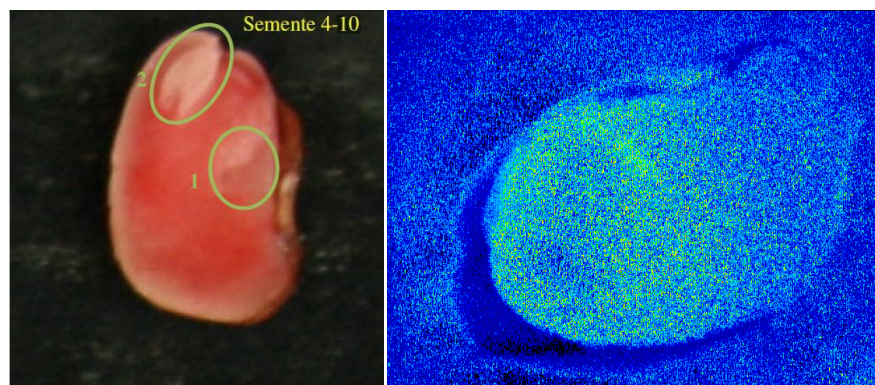
Semente 2-5



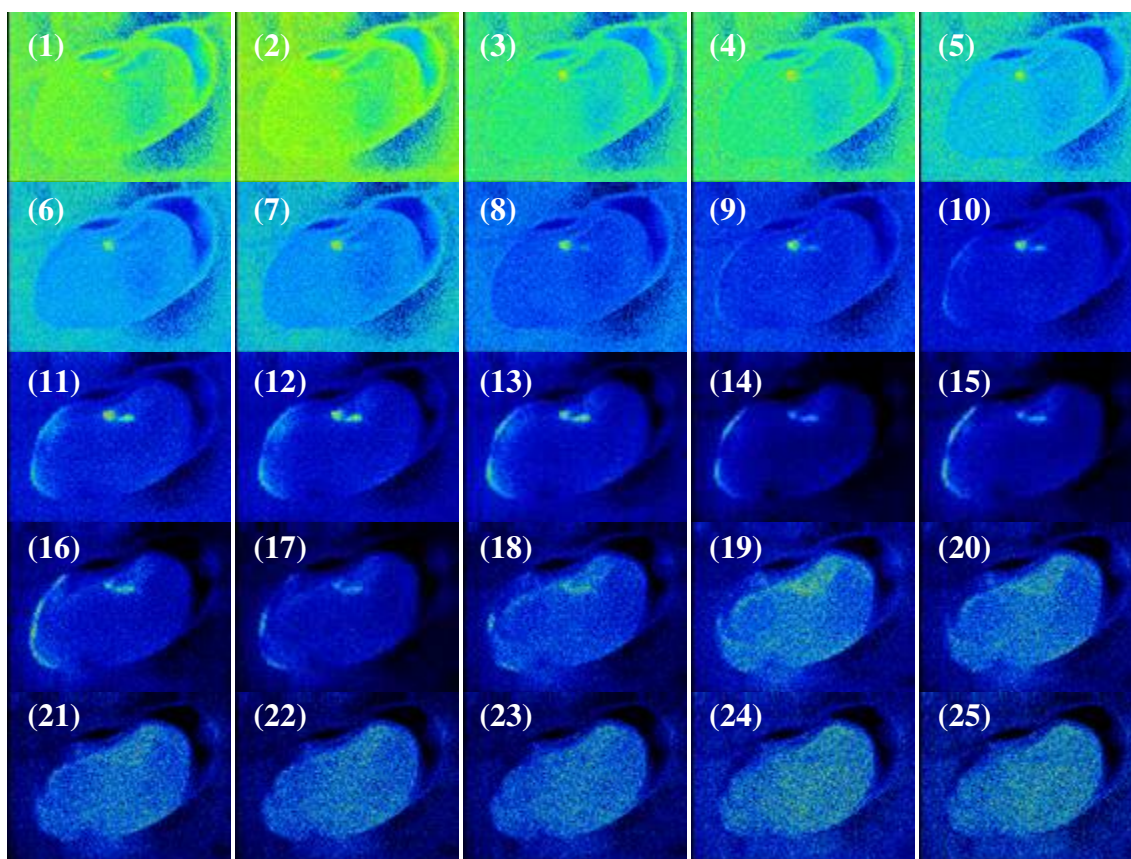
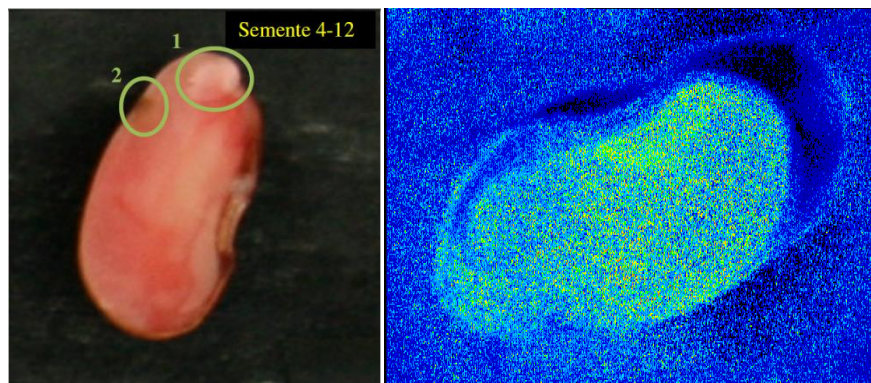
Semente 2-8



Semente 4-10

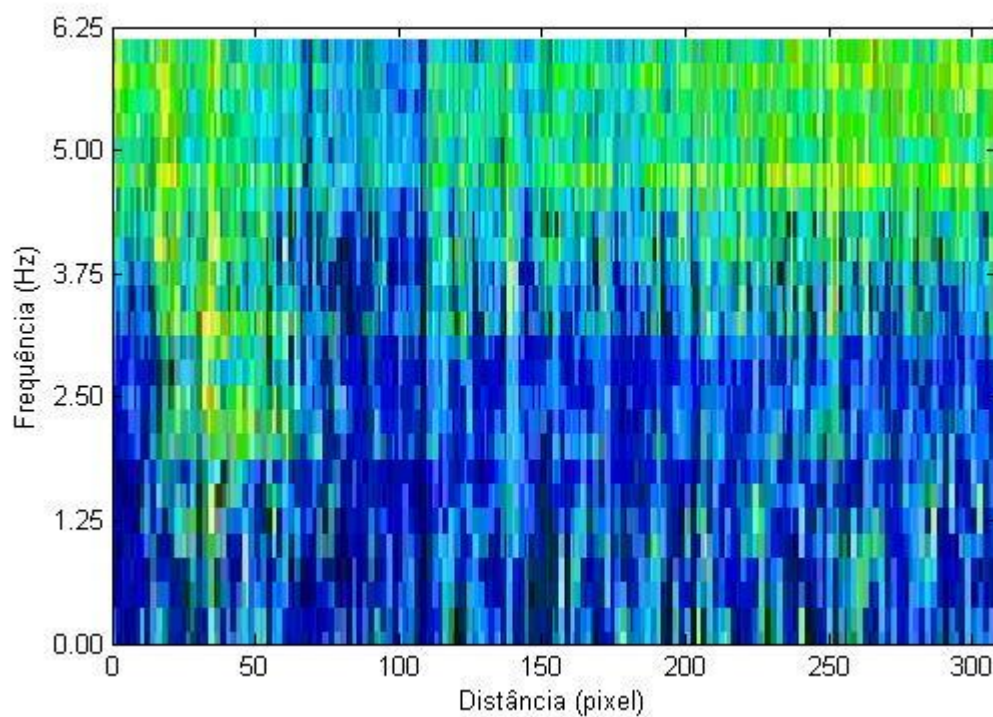
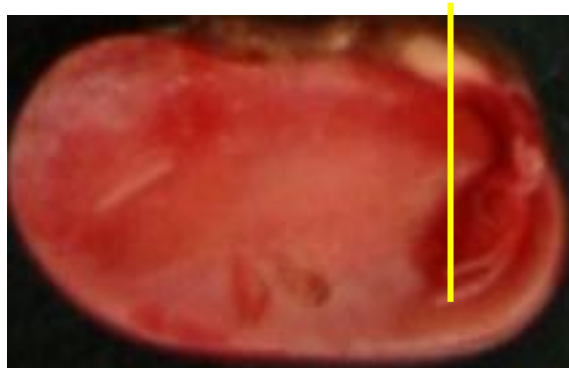


Semente 4-12



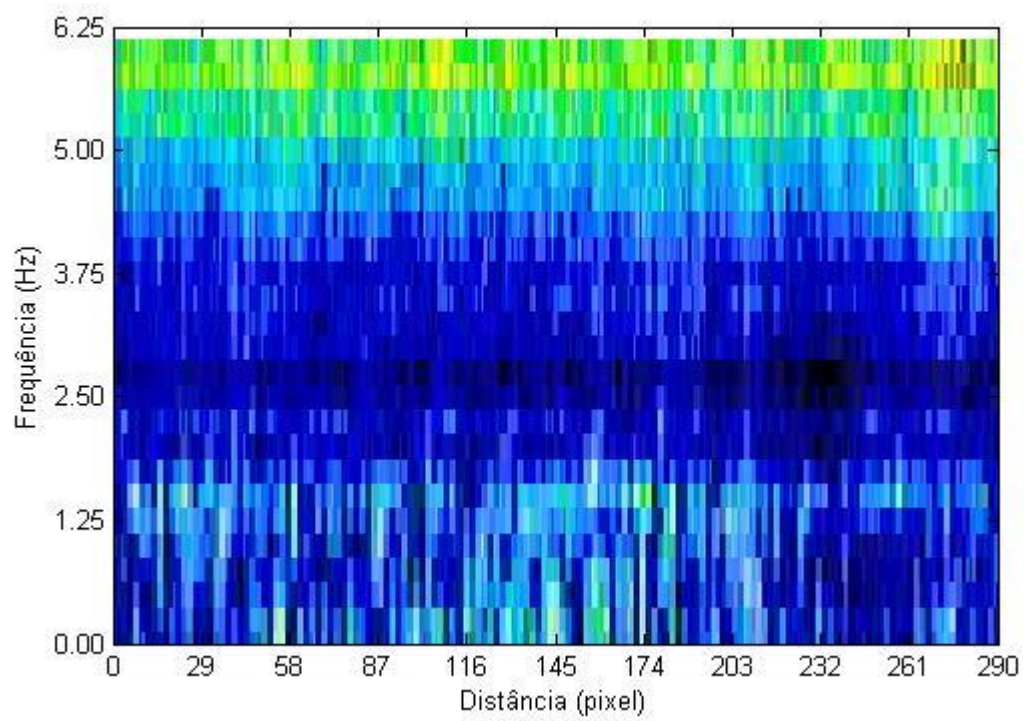
APÊNDICE C – Histogramas de Diferenças Generalizadas.

S1-6



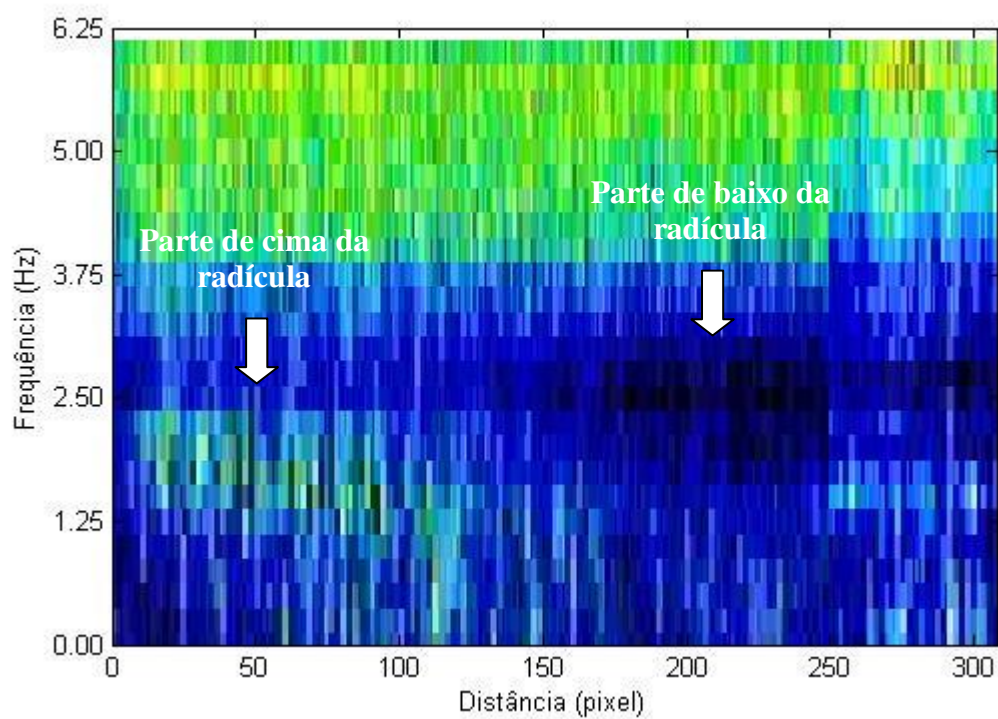
Nestas imagens é possível observar que há atividade maior nas altas frequências, e que a linha passa por uma área mais escura que nas altas frequências tem sua atividade reduzida. Esta área está nas imediações do pixel 100 e passa pelo dano indicado na figura TZ pela área branca.

S4-12



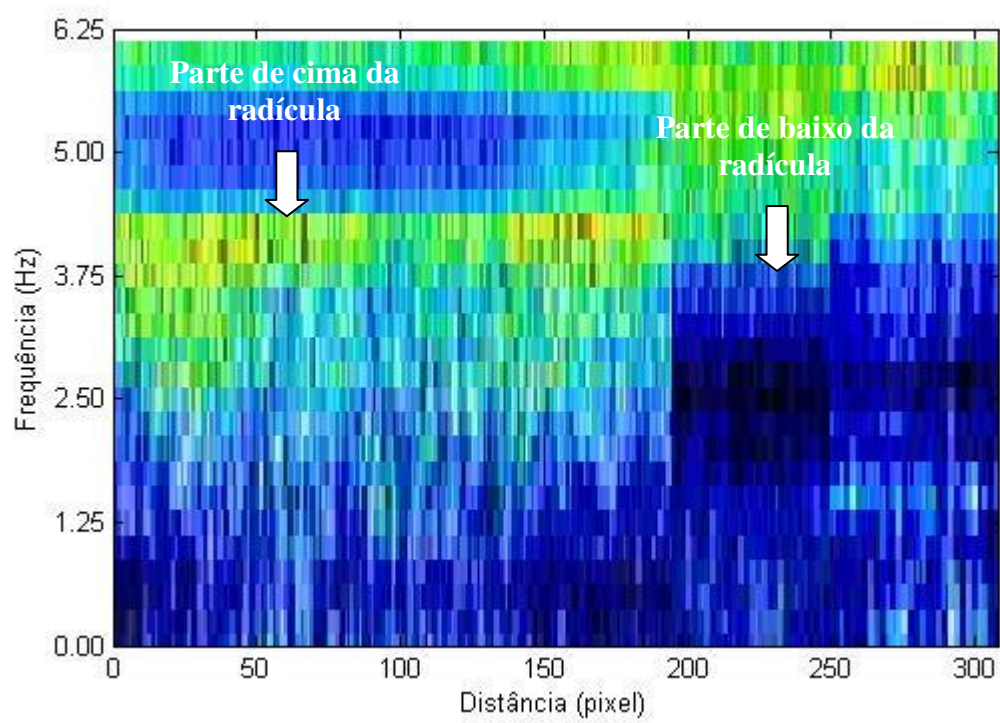
O dano pode ser visto no histograma na coordenada de aproximadamente 2,50 Hz e pixel 232.

S5-2

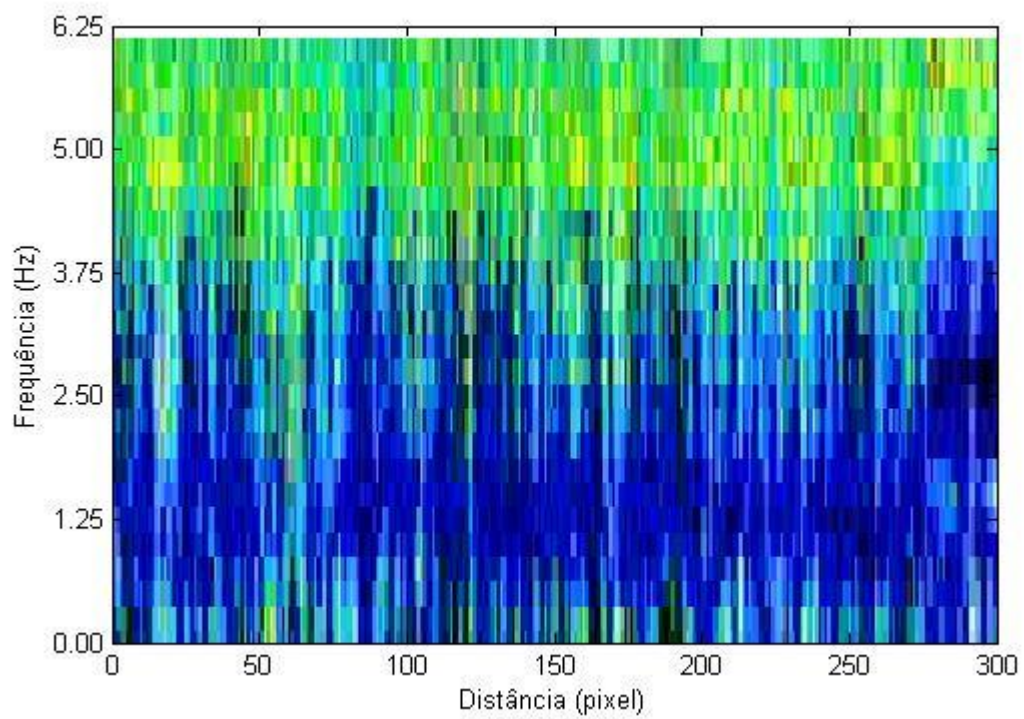
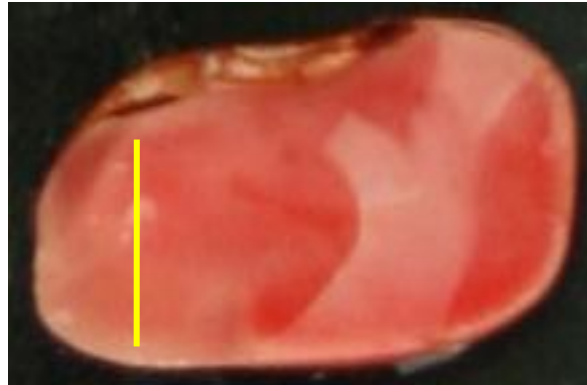


As setas indicam na figura o que corresponde cada parte do histograma na semente, sendo que a parte de cima da radícula aparece em faixas de frequências diferentes da parte de baixo da radícula.

S2-5



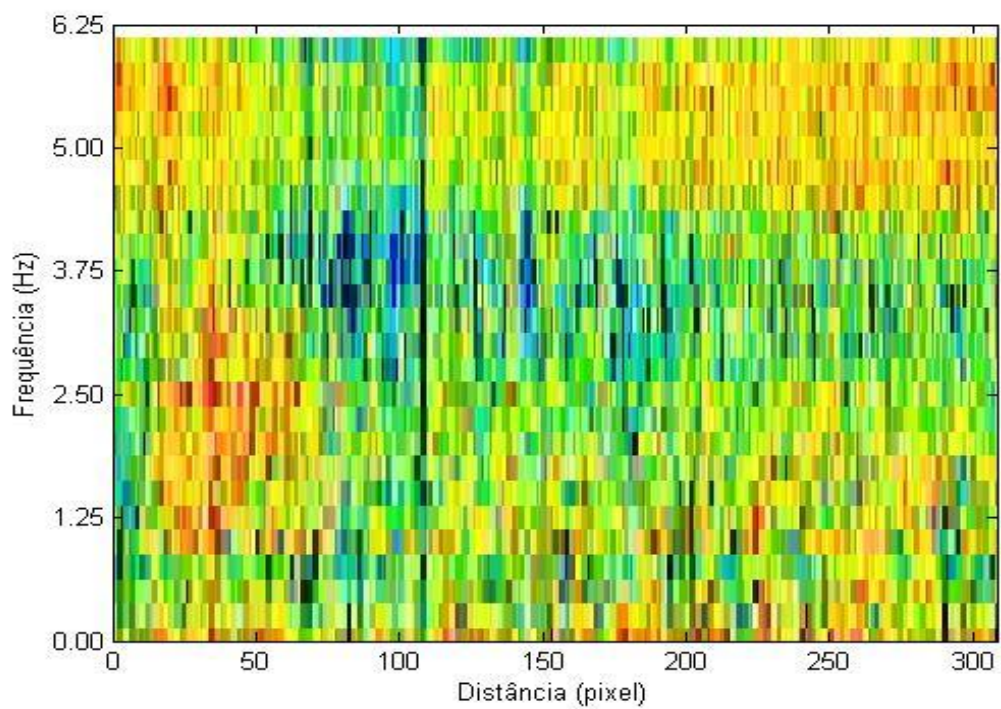
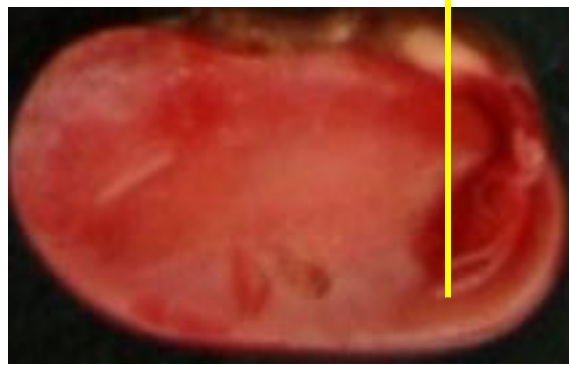
S2-8



O dano aparece na distancia de aproximadamente 50 pixels abaixo da frequencia de aproximadamente 3,75 Hz.

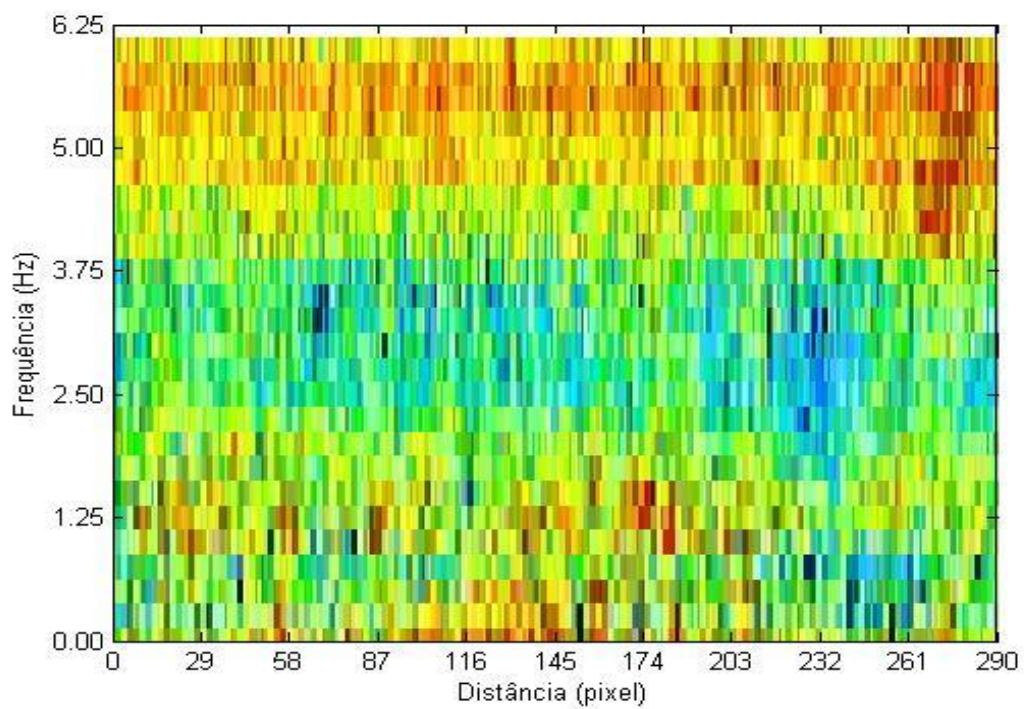
Histogramas de Fujii.

S1-6



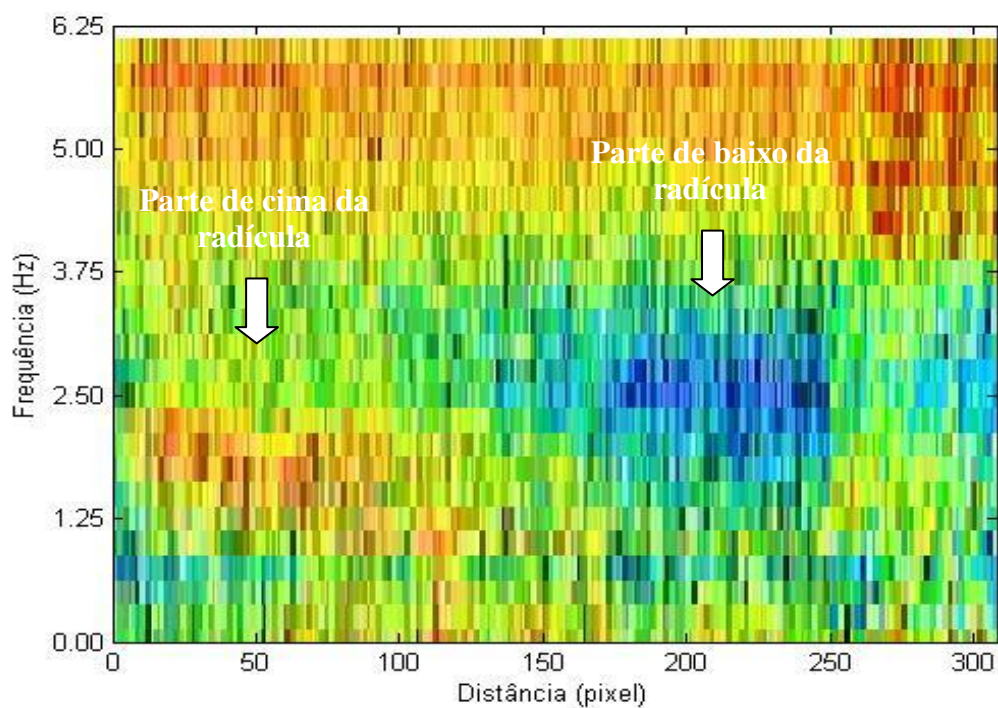
Nestas imagens é possível observar que há atividade maior nas altas frequências, e que a linha passa por uma área mais escura que nas altas frequências tem sua atividade reduzida. Esta área está nas imediações do pixel 100 e passa pelo dano indicado na figura TZ pela área branca.

S4-12



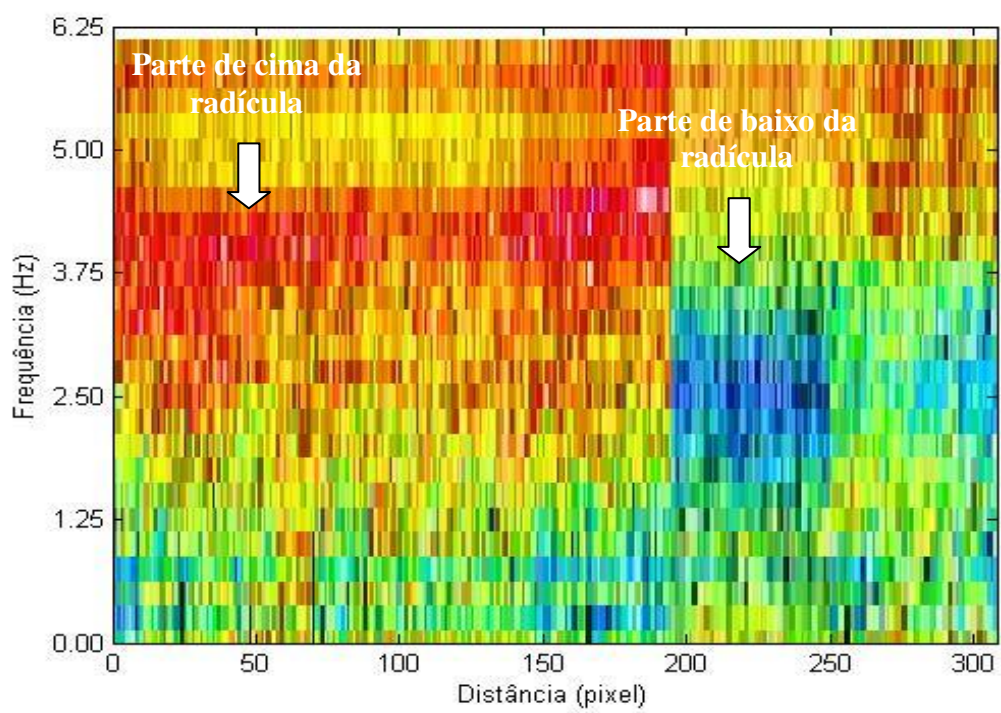
O dano pode ser visto no histograma na coordenada de aproximadamente 2.50 Hz e pixel 232.

S5-2

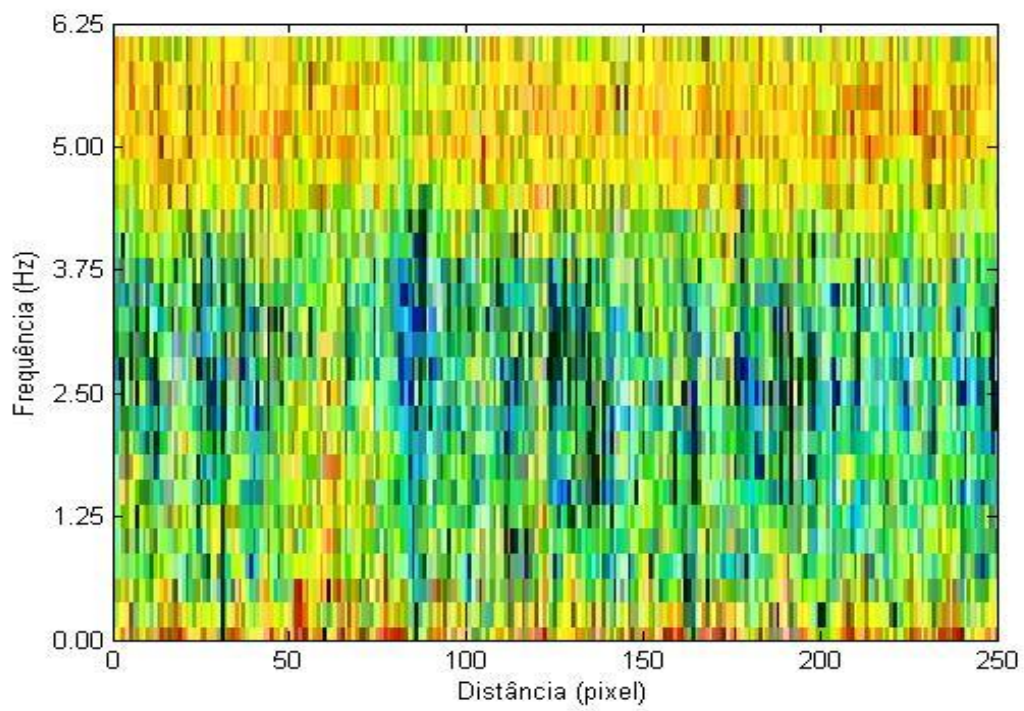
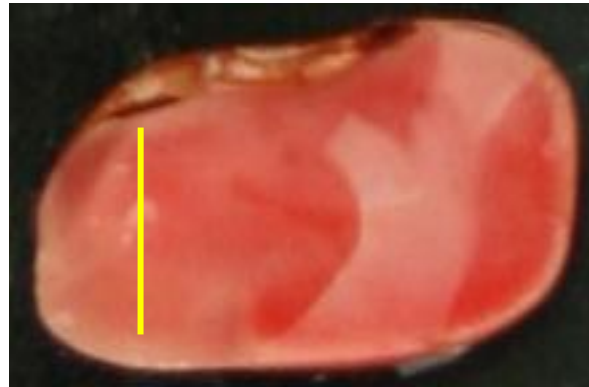


As setas indicam na figura o que corresponde cada parte do histograma na semente, sendo que a parte de cima da radícula aparece em faixas de frequências diferentes da parte de baixo da radícula.

S2-5

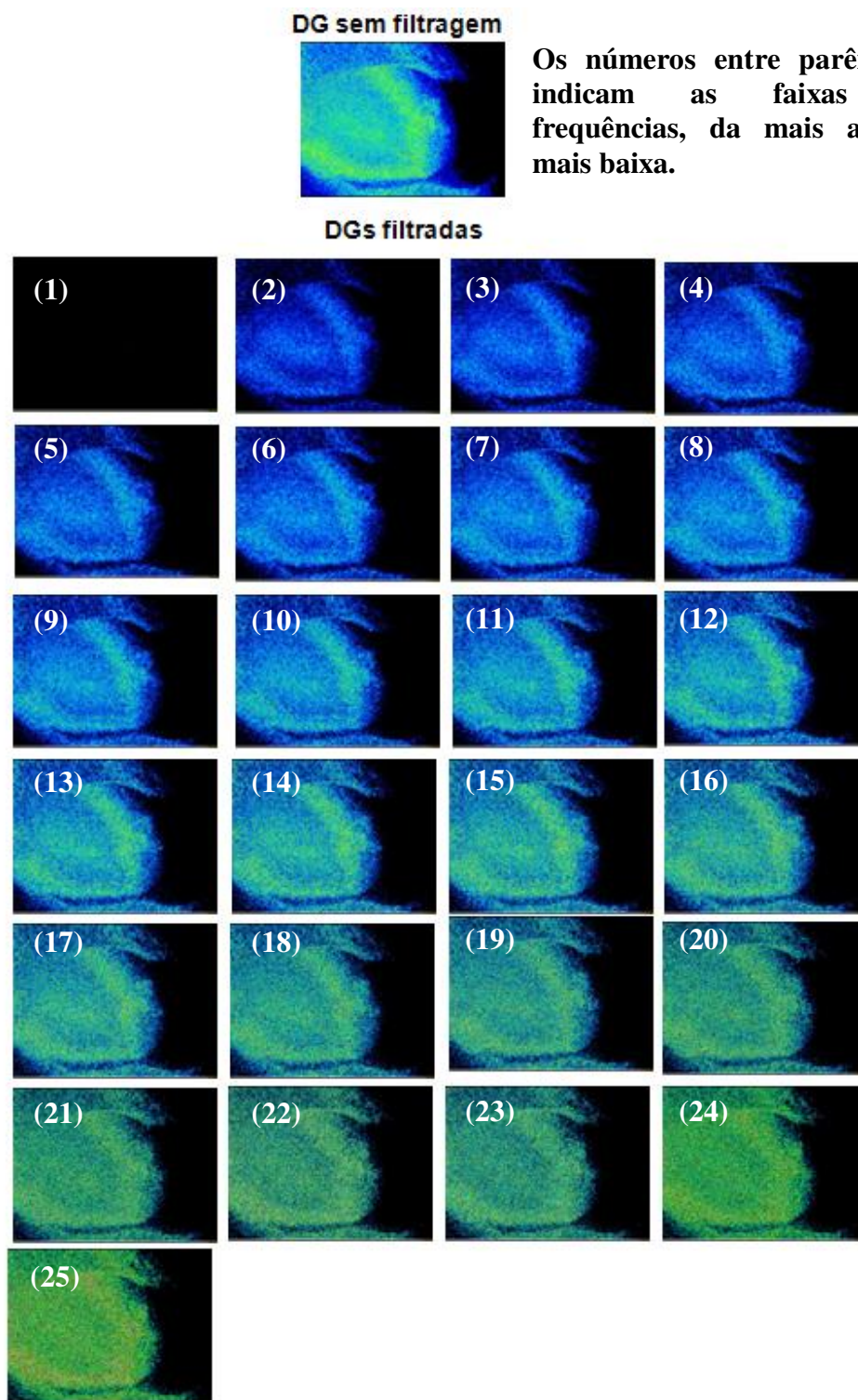


S2-8

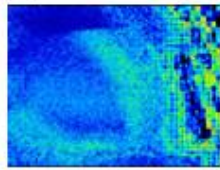


O dano aparece na distancia de aproximadamente 50 pixels abaixo da frequencia de aproximadamente 3,75 Hz.

APÊNDICE D – Mapas de Diferenças Generalizadas (DG) e Fujii para sementes com danos térmicos.

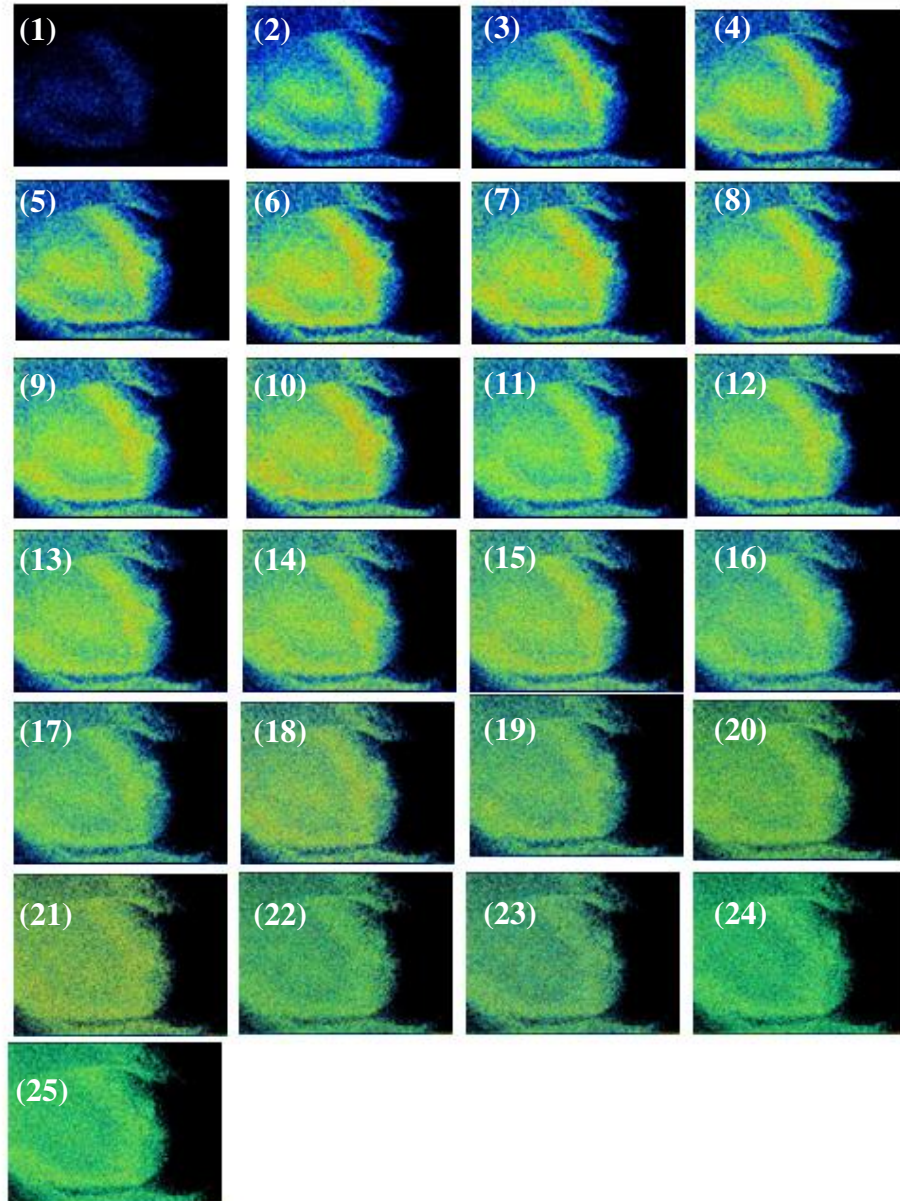


Fujii sem filtragem

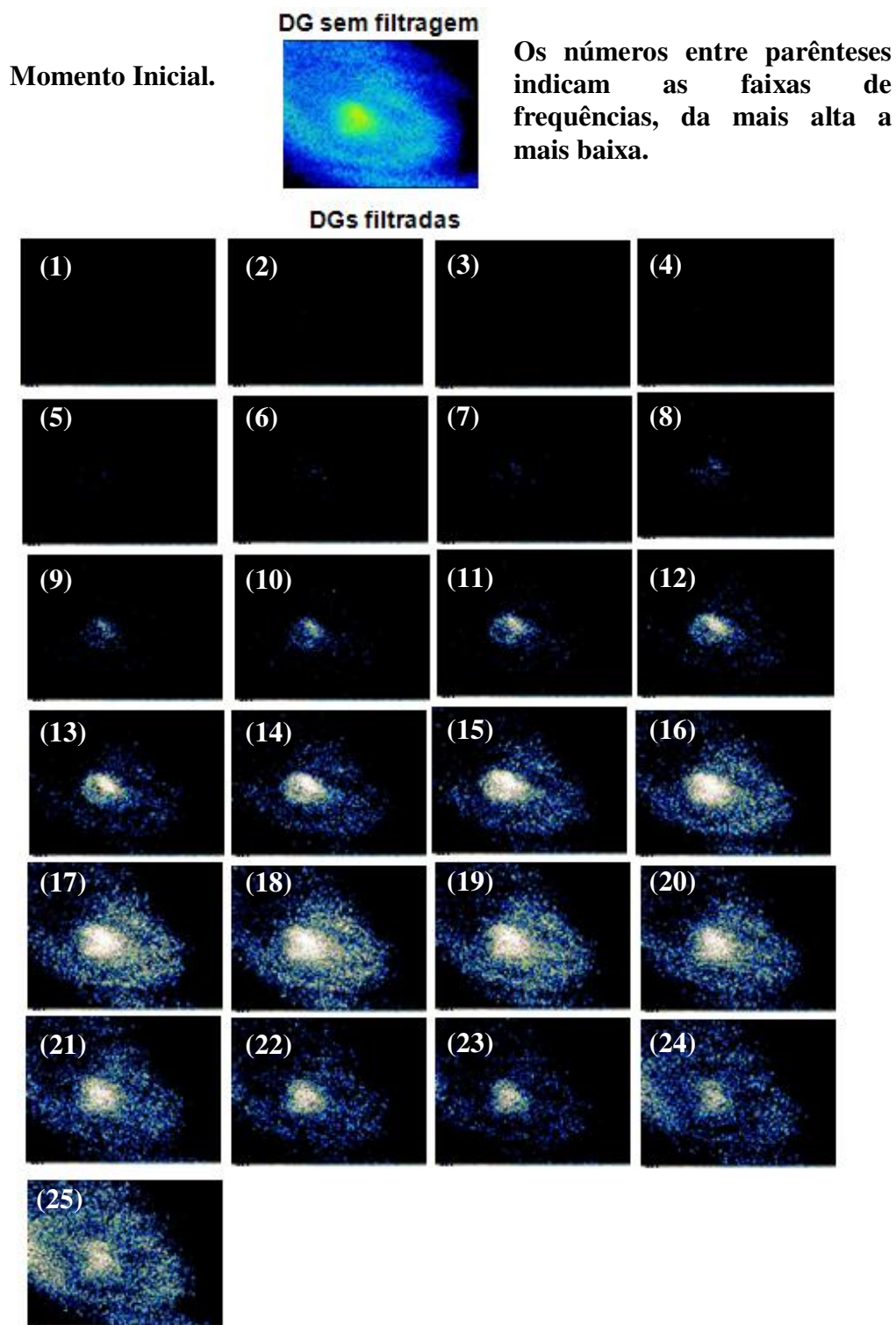


Os números entre parênteses indicam as faixas de frequências, da mais alta a mais baixa.

Fujiis filtradas

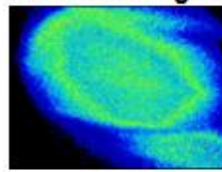


APÊNDICE E – Mapas de Diferenças Generalizadas (DG) e Fujii para sementes com gota de Tetrazólio no momento inicial e final.



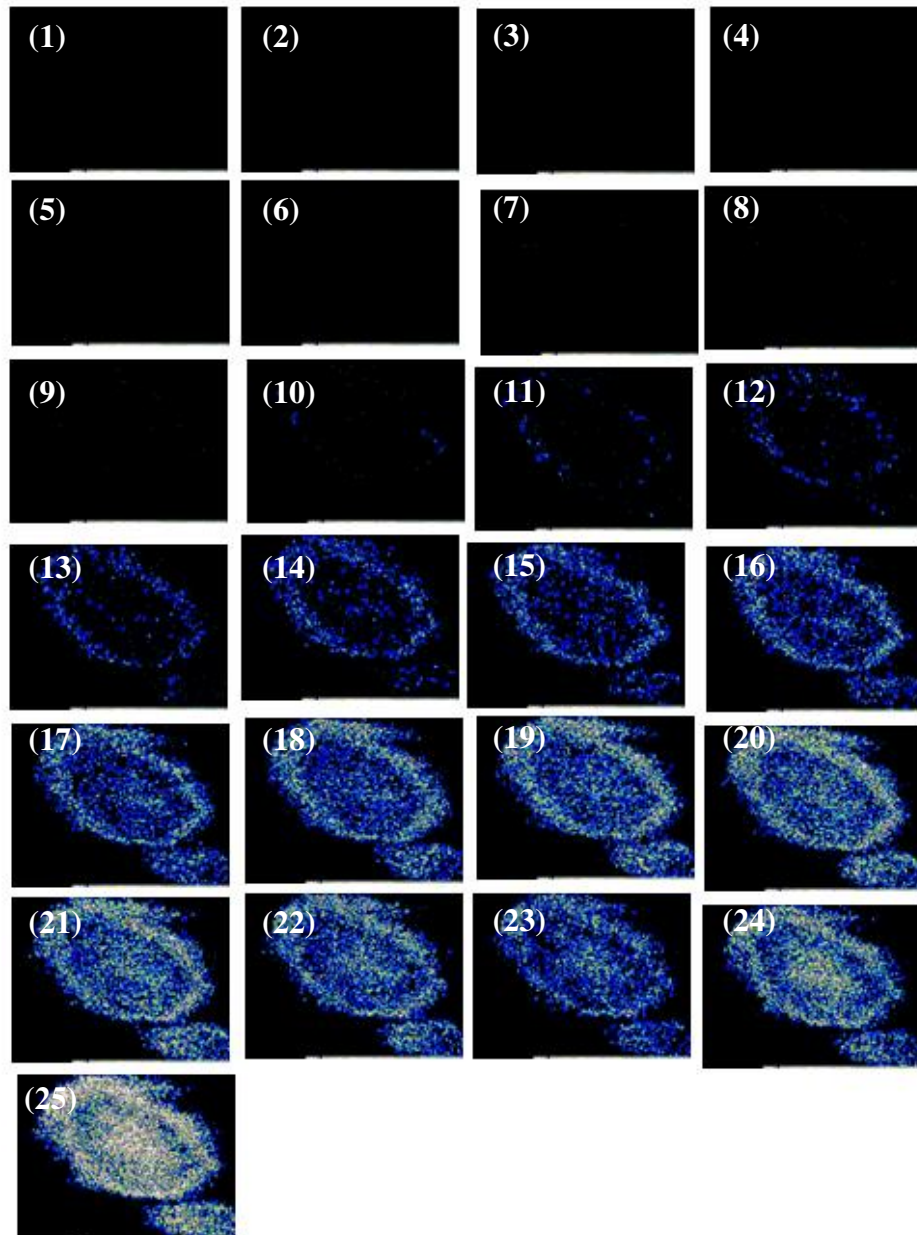
Momento Final.

DG sem filtragem



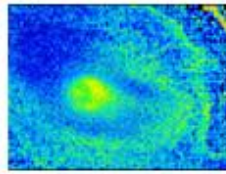
Os números entre parênteses indicam as faixas de frequências, da mais alta a mais baixa.

DGs filtradas



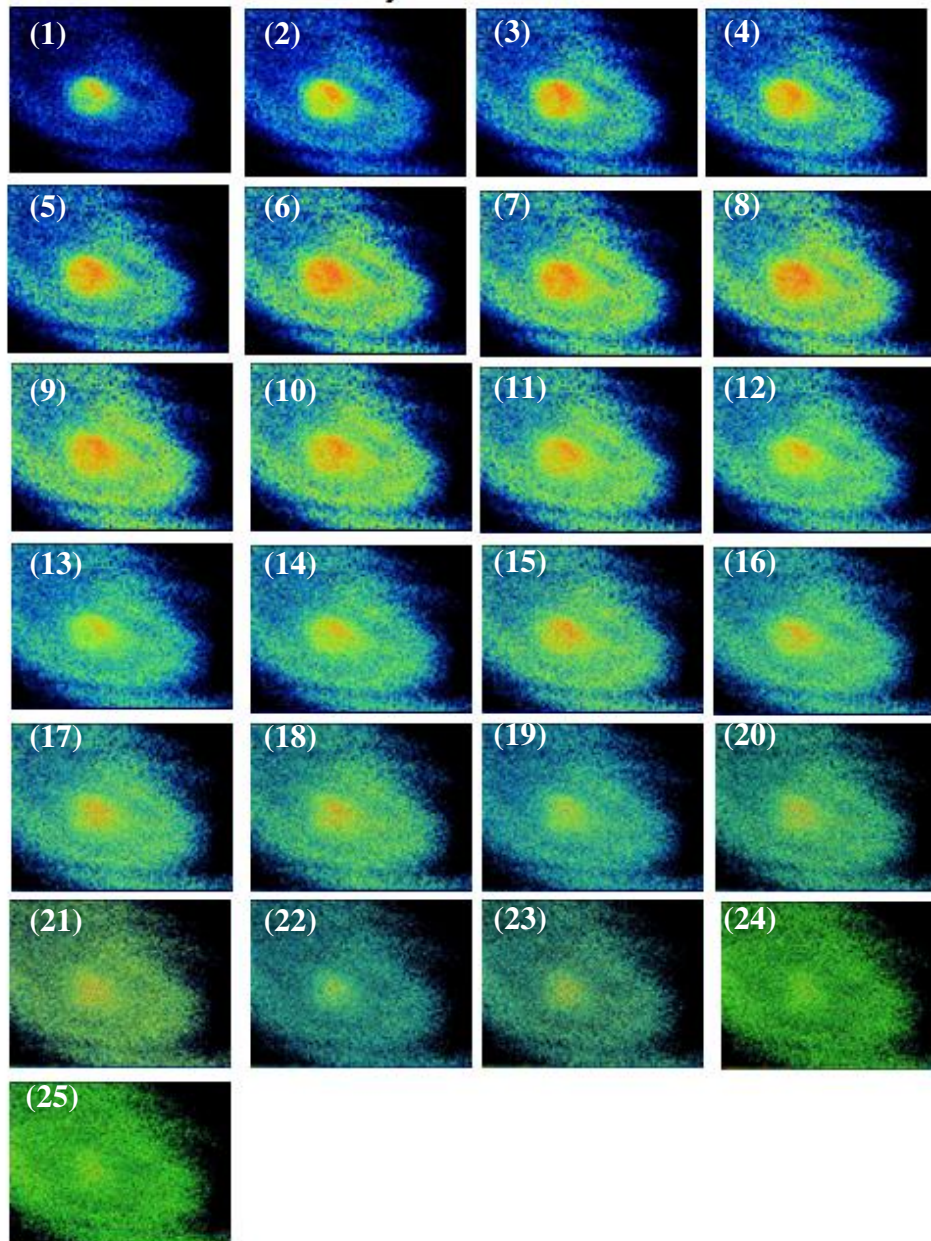
Momento Inicial.

Fujii sem filtragem



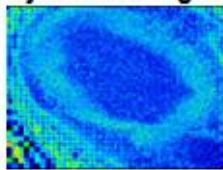
Os números entre parênteses indicam as faixas de frequências, da mais alta a mais baixa.

Fujiis filtradas



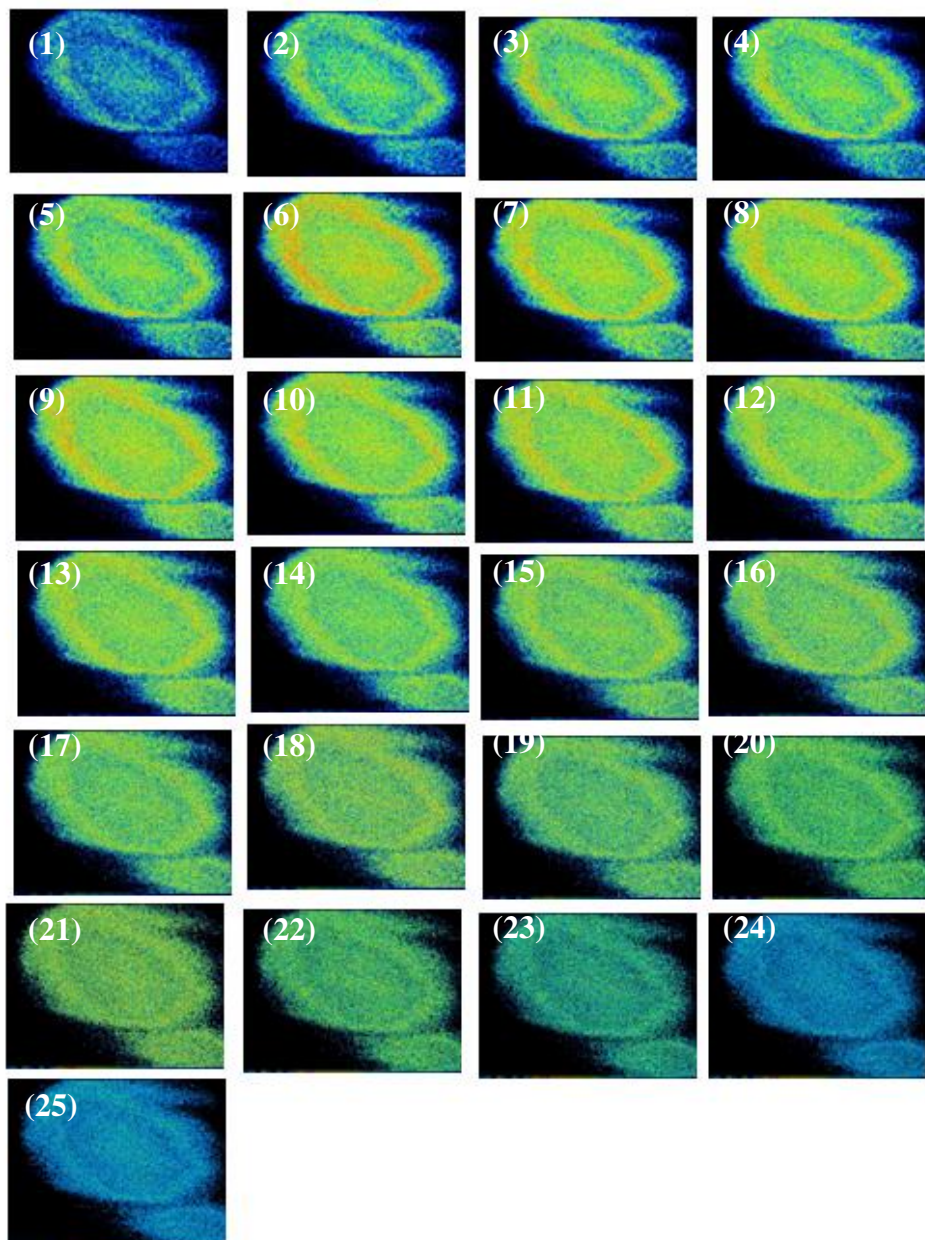
Momento Final.

Fujii sem filtragem

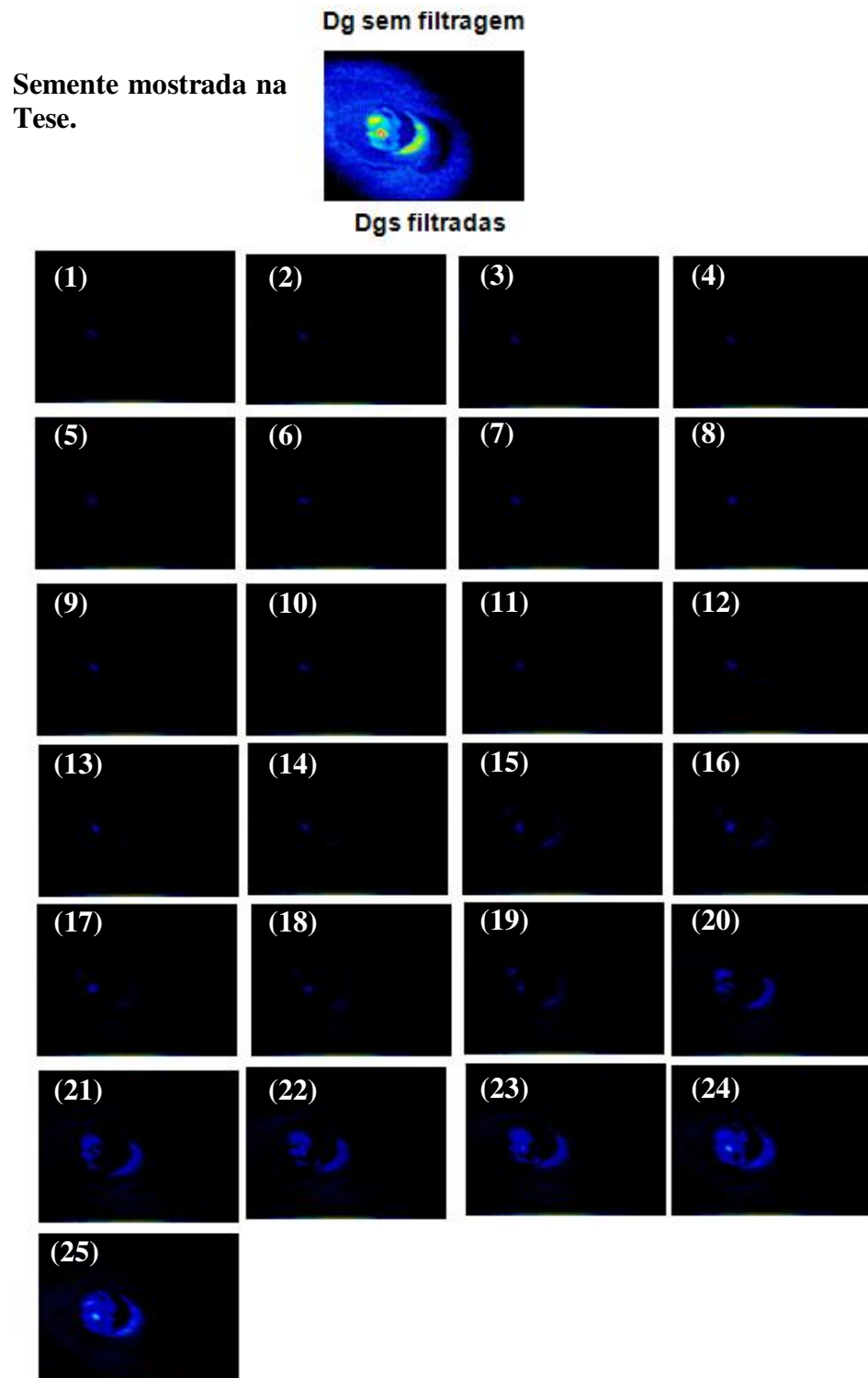


Os números entre parênteses indicam as faixas de frequências, da mais alta a mais baixa.

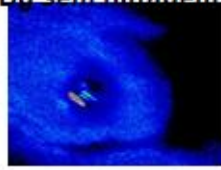
Fujiis filtradas



APÊNDICE F – Mapas de Diferenças Generalizadas (DG) e Fujii para sementes com reação química no momento inicial e final.

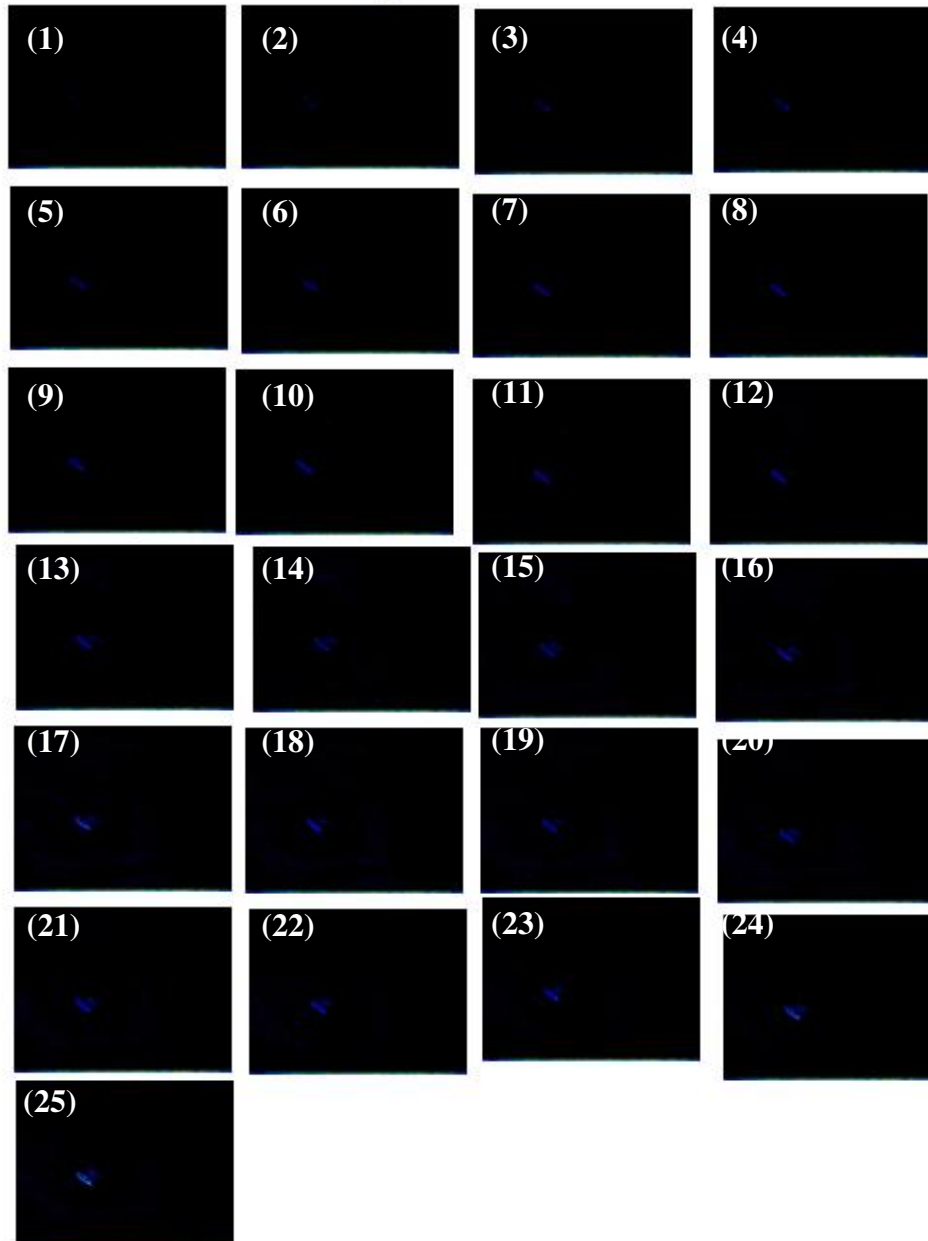


Dgs sem filtragem



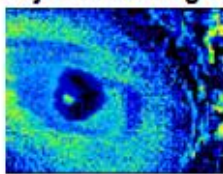
Repetição do experimento de reação química realizado com outra semente.

Dgs filtradas

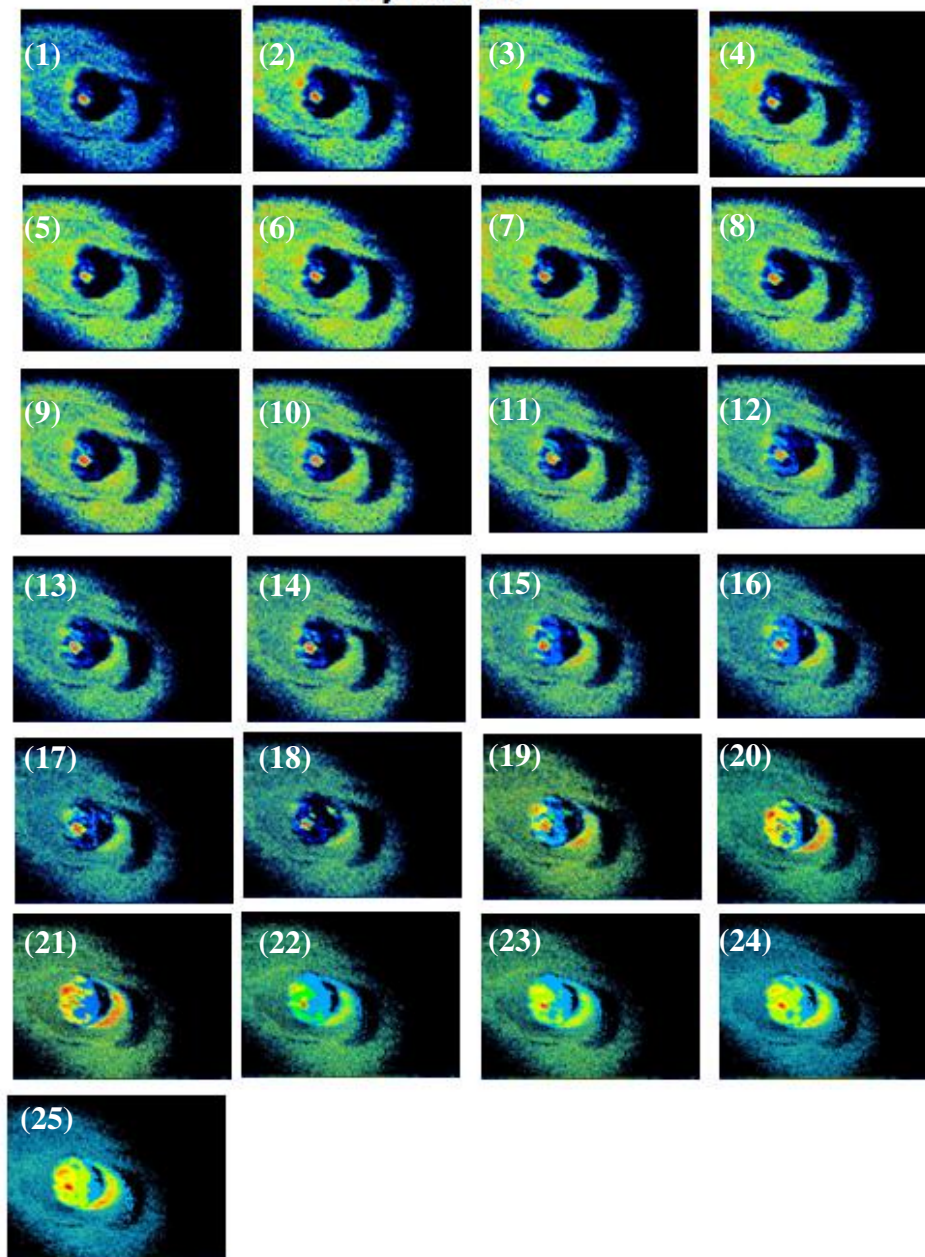


Semente mostrada na
Tese.

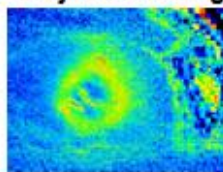
Fujii sem filtragem



Fujii filtrados



Fujii sem filtragem



Repetição do experimento de reação química realizado com outra semente.

Fujii filtrados

