

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA  
DEPARTAMENTO DE MÁQUINAS AGRÍCOLAS

**"Bio-Speckle" : uma Contribuição para o Desenvolvimento de uma  
Tecnologia Aplicada à Análise de Sementes**

Autor: Roberto Alves Braga Júnior  
Orientador : Prof. Dr. Inácio Maria Dal Fabbro  
Co-orientador: Prof. Dr. Hector Jorge Rabal

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Agrícola - UNICAMP, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola.

CAMPINAS, Setembro 2000

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

B73b

Braga Júnior, Roberto Alves

Bio-Speckle : uma contribuição para o desenvolvimento de uma tecnologia aplicada à análise de sementes / Roberto Alves Braga Júnior.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientadores: Inácio Maria Dal Fabbro, Hector Jorge Rabal.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. Speckle. 2. Sementes. I. Dal Fabbro, Roberto Braga. II. Rabal, Hector Jorge. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. IV. Título.

## **PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese de doutorado defendida por Roberto Alves Braga Júnior e aprovada pela Comissão Julgadora em 6 de setembro de 2000. Campinas, 28 de setembro de 2000.

Prof. Dr. Inácio Maria Dal Fabbro  
Presidente da Banca

Dedico aos meus filhos, Matheus e Lucas, e  
à minha esposa, Vanessa



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Inácio Maria Dal Fabbro, pela orientação, confiança no trabalho proposto e fundamental apoio, sempre com muita amizade;

Ao Dr. Hector Jorge Rabal, pela orientação, disponibilidade e amizade;

Ao Amigo Giovanni Francisco Rabelo, pelo companheirismo, incentivo, apoio e acolhida em Campinas;

Ao Colega Gilberto Lage, pelo apoio nos primeiros passos;

Ao Colega Nilson Salvador, que me incentivou a ir à Argentina em 1996 e conhecer esta nova técnica, além de, como Coordenador do Curso de Engenharia Agrícola, remanejar horários de aulas na UFLA para que eu pudesse ir para Campinas;

Aos Dr's Mario Gallardo, Marcelo Ricardo Trivi e Ricardo Arizaga, que confiaram no nosso trabalho, e abriram as portas do CIOp, apoiando-me em diversos experimentos, sendo hoje grandes parceiros

À Profª. Maria das Graças, que acreditou no projeto e foi grande incentivadora;

À Profª. Laene, pelo apoio com material sobre sementes;

Ao Amigo Flávio Meira Borém, pelo fundamental apoio na fase experimental;

Ao Prof. Daniel, pelo apoio na parte estatística;

A Profª. Telma, pelo apoio no entendimento de formulações estatísticas;

Ao Prof. Antônio Maciel, pela simpática acolhida e participação na orientação;

Ao Pesquisador Dario Sassi Thober, que incentivou o trabalho;

À Ana Paula Montagner, secretária da CPG que, com amizade, foi importante em diversos momentos de dificuldades;

À FEAGRI, que me acolheu e apoiou meu trabalho;

Ao Departamento de Máquinas da FEAGRI, que me acolheu;

Aos meus "afilhados", Helbert, Calabria, Brener e Rodrigo, que me acolheram muitas vezes em sua casa;

Ao Departamento de Engenharia da UFLA, que me liberou antes do previsto e confiou em minha proposta de realizar o doutorado sem me desligar das atividades na UFLA;

Aos meus alunos de IC : Adriano, Mônica e Bruno, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao programa PIBIC/CNPq/UFLA, que me ajudou com bolsas de IC para meus orientados;

À Reitoria da UFLA, pelas passagens de ônibus que recebi como apoio a viagens à UNICAMP;

E ao Departamento de Solos, pela permissão de uso do Laboratório de Informática.

# SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE EQUAÇÕES	xv
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>03</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>04</b>
3.1 Considerações Iniciais	04
3.2 Teoria Básica	09
3.2.1 O Laser	
3.2.2 Tipos de Laser	
3.2.3 O Laser e a Física Óptica	
3.3 Vigor e Viabilidade de Sementes	25
3.4 O Laser em Materiais Biológicos	29
3.5 Métodos de Análise do Speckle Dinâmico	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
4.1 Considerações Iniciais	49
4.2 Investigação de viabilidade de uso do Speckle Dinâmico	49
4.2.1 Monitoramento de Secagem de Pintura	

4.2.2 Aplicação em Sementes	
4.3 Efeito da Umidade	54
4.4 Experimentos Complementares	58
4.4.1 Tetrazólio <i>versus</i> Speckle Dinâmico	
4.4.2 Semente Morta e Semente Viva	
4.4.3 Sementes com tempos de umedecimento diferentes	
4.4.4 Evaporação em sementes viva e morta	
4.4.5 Avaliação da transmissão do laser através da semente	
<b>5. RESULTADOS OBTIDOS / DISCUSSÕES</b>	<b>65</b>
5.1 Investigação de viabilidade de uso do Speckle Dinâmico	65
5.2 Efeito da Umidade	72
5.3 Experimentos Complementares	86
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>99</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>101</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE TABELAS

<b>Número e Descrição</b>	<b>Página</b>
Tabela 5.1. Análise de Variância para $\ln(\text{Momento de Inércia})$	72
Tabela 5.2 Análise de Variância para o desdobramento de Umidade em cada nível de Filme	73
Tabela 5.3 Análise de Variância para o desdobramento de Filme em cada nível de Umidade	75
Tabela 5.4 Teste de t de Student para o desdobramento de Filme em cada nível de Umidade	76
Tabela 5.5 Análise de Variância do desdobramento do tratamento Tempo de Exposição dentro de cada nível de Umidade	78



## LISTA DE FIGURAS

<b>Número e Descrição</b>	<b>Página</b>
Figura 3.1 Ação do espectro de luz na estimulação da corrente citoplasmática e da atividade dos cloroplastos	07
Figura 3.2 Esquema de amplificação da luz no laser	11
Figura 3.3 Esquema de níveis de energia	12
Figura 3.4 Esquema básico de um laser de rubi	13
Figura 3.5 Distribuição dos comprimentos emitidos em torno de 632,8159nm	13
Figura 3.6 Esquema básico do máser de amoníaco	15
Figura 3.7 Diagrama esquemático de um laser de HeNe	18
Figura 3.8 Trens de onda com diferentes durações	20
Figura 3.9 Esquema básico para avaliar a coerência temporal	21
Figura 3.10 Esquema da formação da Figura de Interferência	22
Figura 3.11 Esquema de scattering	23
Figura 3.12 Padrão de Speckle formado em um vidro iluminado por laser HeNe	24
Figura 3.13 Embrião do milho	31
Figura 3.14 Região de transição entre o endosperma e o embrião]	32
Figura 3.15 Grânulos de amido no endosperma, (a) úmidos, (b) secos	33
Figura 3.16 Grânulo de amido no detalhe	34
Figura 3.17 Distribuição da dispersão	36
Figura 3.18 Distribuição angular de dispersão da luz	36
Figura 3.19 Imagens consecutivas de uma iluminação fictícia	39

<b>Número e Descrição</b>	<b>Página</b>
Figura 3.20 Resultado do Método de Diferenças Generalizadas	39
Figura 3.21 Resultado do Método de Fujii	43
Figura 3.22 Resultados STS em uma casca de uva (a) seca, (b) recém cortada	44
Figura 3.23 Matriz de ocorrência	45
Figura 3.24 Curvas de autocorrelação para semente com diferentes níveis de umidade	47
Figura 4.1 Detalhe de preparação da chapa de alumínio	51
Figura 4.2 Esquema básico de iluminação da chapa pintada	51
Figura 4.3 Esquema básico de iluminação da semente	53
Figura 4.4 Esquema básico de experimento	55
Figura 4.5 Dano Simétrico	59
Figura 4.6 Simulação da contribuição de camadas inferiores	60
Figura 4.8 Esquema básico do experimento de transmissão	63
Figura 5.1 Imagem Processada de experimento de secagem de pintura	65
Figura 5.2 – Semente de milho com a região iluminada pelo laser dentro de um retângulo	67
Figura 5.3 – Resultado do processamento da área iluminada pelo laser	68
Figura 5.4 Semente de Milho Processada pelo Bio Speckle e com Tetrazólio	69
Figura 5.5 Semente do Soja processada pelo Bio-Speckle e com o Tetrazólio	70
Figura 5.6 Semente de Soja processada pelo Bio-Speckle e com o Tetrazólio	71
Figura 5.7 STS de sementes com diversas umidades e com e sem filme	83
Figura 5.8 Cotilédone com dano evidenciado pelo tetrazólio e Cotilédone utilizado no Speckle Dinâmico	87
Figura 5.9 Figura analisada pelos Métodos de Diferenças Generalizadas e Fujii	87

<b>Número e Descrição</b>	<b>Página</b>
Figura 5.10 Semente avaliada segundo o Método de Diferenças Generalizadas com pequeno escurecimento na região do dano	88
Figura 5.11 Semente analisada pelo Speckle Dinâmico e pelo Teste do Tetrazólio	89
Figura 5.12 Semente analisada segundo o teste de Fujii	89
Figura 5.13 Método de Fujii em sementes de alto vigor e mortas	90
Figura 5.14 Resultado de iluminação de 3 cotilédones com umedecimentos diferentes	93
Figura 5.15 Intensidade da luz percebida após atravessar 1mm de lâmina de semente	96
Figura 5.16 Intensidade da luz percebida após atravessar 2mm de lâmina de semente	96
Figura 5.17 Intensidade da luz percebida após atravessar 1mm de lâmina de semente a 9,5% de umidade b.u.	97
Figura 5.18 Intensidade da luz percebida após atravessar 1mm de lâmina de semente a 23,5% de umidade b.u.	97



## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Número e Descrição</b>	<b>Página</b>
Gráfico 5.1 - Análise de regressão para o desdobramento de Umidade dentro da condição Sem Filme	74
Gráfico 5.2 - Análise de regressão para o desdobramento de Umidade dentro da condição Com Filme	74
Gráfico 5.3 - Tendência das médias dos valores de Momento de Inércia para cada valor de umidade com e sem filme	77
Gráfico 5.4 - Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 13% b.u.	79
Gráfico 5.5 - Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 13% b.u.	80
Gráfico 5.6 - Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 30% b.u.	80
Gráfico 5.7 - Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 37% b.u.	81
Gráfico 5.8 - Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 46% b.u.	81
Gráfico 5.9 - Valores médios das curvas de autocorrelação sem filme	82
Gráfico 5.10 - Evolução do momento de inércia em sementes viva e morta perdendo água	95



## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Descrição</b>		<b>Página</b>
$N_{1,\rho} ( \nu_{21} ) B_{12} = N_{2,A_{21}} + N_{2,\rho} ( \nu_{21} ) B_{21}$	(Equação 3.1)	11
$\mu_{tr} = \mu_s' + \mu_a \cdot \mu_s'$	(Equação 3.2)	35
$\mu_s' = ( 1 - g ) \cdot \mu_s$	(Equação 3.3)	35
$d = 2.44 \left( \frac{\lambda \cdot Z}{D} \right)$	(Equação 3.4)	37
$D = D_0 \left[ 1 - \exp \left( - \frac{T}{T_0} \right) \right]$	(Equação 3.5)	37
$I ( x, y ) = \sum   I_k ( x, y ) - I_{k+1} ( x, y )  $	(Equação 3.6)	38
$I(x, y) = \sum \left  \frac{I_k(x, y) - I_{k+1}(x, y)}{I_k(x, y) + I_{k+1}(x, y)} \right $	(Equação 3.7)	41
$MOC = [ N_{ij} ]$	(Equação 3.8)	44
$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}}$	(Equação 3.9)	45
$IM = \sum M_{ij} (i - j)^2$	(Equação 3.10)	46
$C_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^N I(k, i) I(k, i + j)}{\left[ \sum_{k=1}^N I^2(k, i) \sum_{k=1}^N I^2(k, i + j) \right]^{1/2}}$	(Equação 3.11)	46
$C_j = \sum_{i=1}^{M/2} C_{ij}$	(Equação 3.12)	47

## RESUMO

Este trabalho apresentou contribuição para o desenvolvimento da tecnologia laser como instrumento de análise de atividade em material biológico, e em especial na área de sementes. A motivação de trabalhar com sementes se deu em função da necessidade evidenciada de melhoria das metodologias existentes, bem como ao incentivo para o aparecimento de novas técnicas que permitam a análise do vigor e da viabilidade de sementes de forma objetiva e otimizada. O fenômeno do speckle dinâmico produzido pela iluminação de material biológico pelo laser, também denominado bio-speckle, apresenta-se como uma potencial metodologia para a quantificação e determinação de áreas com diferentes atividades biológicas em uma semente, que é fundamental para a análise do vigor e viabilidade. A complexidade da interação do laser com a semente tem trazido obstáculos para a imediata conclusão sobre a viabilidade da aplicação, o que tem obrigado à execução de experimentos específicos para a determinação de fatores que interferem na interação do laser com a semente. Um experimento foi conduzido no sentido de verificar a interferência da umidade nos resultados, e mostrou que a tese de que a umidade na semente interfere nos resultados por meio de fenômenos, como a evaporação e a circulação da água nos tecidos, é verdadeira. Experimentos complementares ao da avaliação de efeito da umidade nos resultados também foram conduzidos e reforçaram a tese defendida, além de apresentar novos desafios para trabalhos futuros.



## **ABSTRACT**

This work shows some contributions to permit the use of the laser technology as an analysis instrument of activity in biological material, in special in seeds area. The motivation of deal with seeds came from the explicit needs to make better the actual methodologies, as well as based in the incentive to appearing new techniques that make possible to analyses the vigour and the viability of seeds in objective and optimized ways. The dynamic speckle phenomena produced by the laser illumination of the biological material, also called bio-speckle, presents as a potential methodology to quantify and determine different biological activity areas in a seed, that is fundamental to proceed the vigour and viability analysis.. The complexity of the interaction of the laser with the seed, brings difficulties to conclude if it is possible the use of the laser technology in seed analyses, and force the adoption of specific experiments in order to determine the factors that interfere in that interaction. An experiment was conducted to define the moisture influence and shows that the thesis that the moisture interfere in the results by evaporation and water movements in the tissues is true. Others experiments was conducted and reinforced the thesis, beyond presented new challenge to future works.

# 1 INTRODUÇÃO

O laser tem se apresentado como uma ferramenta aplicável ao monitoramento de atividade biológica, e isso graças às características especiais da luz emitida por ele, associadas a fenômenos ópticos que permitem uma série de aplicações. As aplicações na área biológica têm se tornado cada vez mais pesquisadas, e na área de sementes, o laser e os fenômenos observados por ele apresentam-se como uma potencial ferramenta para analisar o vigor e a viabilidade delas.

A escolha da área de sementes como base para este trabalho ocorreu em virtude de dois fatos: a identificação de aplicação da técnica em estudo de forma mais imediata, e o conhecimento de que existe uma busca para melhoria dos métodos de análise de sementes atualmente utilizados.

A necessidade de avaliar a semente passa a ser cada vez mais uma regra dentro do círculo de produção. A grande competição no mercado tem exigido um maior controle da produção, permitindo a detecção de falhas nas diversas etapas, correções, e certificando a qualidade do lote produzido. O controle permite uma redução de custos e garante o aumento da qualidade, o que facilmente justifica esse investimento. No caso da produção de sementes, uma das etapas do controle é a da inspeção da viabilidade e do vigor das sementes do lote.

Existem muitos testes que há muito tempo têm sido utilizados para se obter o vigor e a viabilidade de uma semente, sendo que nenhum consegue substituir os outros, em função da grande complexidade que se tem em prever a capacidade que uma semente terá para germinar vigorosamente. A utilização do speckle dinâmico em sementes apresenta-se como uma proposta inovadora que deve ser pesquisada e trabalhada para que possa converter-se em metodologias e equipamentos comerciais que representem alternativas às análises subjetivas, lentas e não automáticas de monitoramento de viabilidade de sementes atualmente utilizadas.

Por tratar de uma nova linha de pesquisa, os experimentos realizados até o momento têm sido importantes para definir a influência das diversas variáveis envolvidas. Este trabalho buscou oferecer uma contribuição para o desenvolvimento da tecnologia que

aplica o laser e o fenômeno conhecido como bio-speckle na análise de sementes de forma específica, mas permitindo a sua adoção em materiais biológicos em geral. A apresentação dos experimentos realizados foi dividida em três partes, com o intuito de seguir a ordem cronológica do desenrolar dos trabalhos e de facilitar o entendimento. A primeira etapa consistiu na investigação de viabilidade de uso do bio-speckle, que é um termo mais específico e ligado a material biológico do que ao termo geral Speckle Dinâmico, para a análise de sementes, o que permitiu dominar mais essa técnica, além de definir alguns pontos críticos. Um ponto crítico muito evidente foi o do desconhecimento do efeito da umidade nos resultados. Esse foi, então, o desafio que norteou a segunda etapa deste trabalho. Um experimento bem definido, considerando toda a grande variabilidade de materiais biológicos, foi conduzido, buscando responder de forma conclusiva uma pergunta que até o momento estava sem resposta : "O teor de água na semente influencia nos resultados obtidos a partir da iluminação da semente pelo laser?".

Outros experimentos foram realizados e confirmaram a hipótese da influência da umidade. Alguns experimentos complementares serviram também para preparar o caminho para novas pesquisas que permitirão viabilizar e proporcionar maior domínio da metodologia proposta.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar se o laser e os fenômenos ópticos produzidos por ele, neste caso o speckle dinâmico, podem ser utilizados como ferramenta para análise de sementes.

### 2.2 Específicos

2.2.1 Determinar o efeito da umidade nos resultados

2.2.2 Comparar os resultados obtidos pelo speckle dinâmico com um teste de análise de sementes

2.2.3 Realizar experimentos que permitam melhor entendimento do fenômeno com fins de modelamento

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Considerações Iniciais

A área de ciências agrárias, como qualquer área do conhecimento, vive um momento de busca de ferramentas e técnicas que permitam um melhor conhecimento dos processos e elementos, visando a melhorar a qualidade e a reduzir custos de produção. Ao conhecer as aplicações do laser em diversas áreas, verificou-se que no meio agrícola essas aplicações poderiam trazer inúmeros benefícios. Nesse sentido, o que se tem procurado é identificar essas possíveis aplicações e avaliar seu grau de benefício, para que, então, se desenvolvam técnicas próprias e padrões de trabalho utilizando essa ferramenta, o que será iniciado com a avaliação da técnica do speckle dinâmico como metodologia de monitoramento de sementes em complemento às técnicas atuais.

Os atuais testes para análise de vigor e viabilidade de sementes têm um desafio que, segundo MARCOS FILHO (1999), é a capacidade de em apenas um teste indicar o desempenho da semente baseando-se nas distintas características avaliadas pelos mesmos. Dessa forma, faz-se necessário conhecer bem o que cada teste avalia, conseguir quantificar o vigor e padronizar os diversos testes. O teste que vai ser usado como referência para a proposta do speckle dinâmico é o do Tetrázólio.

O Speckle Dinâmico apresenta-se como um teste similar ao do tetrázólio, sendo o que se procura é a identificação de áreas de dano na semente e avaliar a sua gravidade em função do tipo de dano e do local onde ele se encontra. O Teste de Tetrázólio é considerado um dos mais rápidos no momento para esse tipo de análise, sendo que muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para sua melhoria, como apontou HAMPTON (1996), uma vez que esse ainda está distante do que se desejaria como ideal. O teste apresenta subjetividade de análise, necessitando de pessoal especializado. Nesse sentido, trabalhos como o de NEUROHR (1991) buscaram correlacionar a emissão de luz em sementes ("delayed light emission") com aspectos de qualidade, e têm sido propostos objetivando, neste caso especial, a realização de um teste não-destrutivo. Como o próprio autor evidenciou, ainda é

muito cedo para qualquer conclusão. Ainda segundo HAMPTON (1996), o mais importante é a busca constante por melhorias dos testes atuais ou por novas técnicas. Uma outra proposta de melhoria do teste do tetrazólio foi feita por HOWARTH e STANWOOD. (1993) e caminha no sentido de viabilizar a substituição humana na análise dos resultados, o que seria feito então por um processamento de imagem da semente já devidamente colorida pelo tetrazólio. Nesse caso, o autor não propõe a análise por um mapeamento das áreas, e sim uma razão da área viva pela área total. Essa proposta reflete um grande passo no sentido da adoção de técnicas como as da visão artificial e inteligência artificial.

Uma análise de viabilidade, no entanto, necessita de uma identificação exata do dano, pois a razão entre área viva e área total pode ser alta, mas a existência de um dano em uma região vital da semente pode torná-la não viável. Nesse sentido, um passo natural nesta proposta seria a realização de mapeamento de área e julgamento de viabilidade baseado em banco de dados e em programas computacionais dentro da linha de inteligência artificial.

A Técnica do Speckle Dinâmico, também conhecida como Bio-Speckle, baseia-se na utilização do laser a partir da física óptica e de tratamento de imagens, buscando identificar as características da semente em análise pela mudança da figura de interferência formada pela bioatividade do material. Dessa forma, a visão que se tem da semente passa a ser outra, uma vez que serão visualizadas áreas de diferentes atividades após tratamento de imagem. A Técnica do Bio-Speckle apresenta características interessantes, acrescentando ao teste de viabilidade de semente um caráter mais automatizado, independente do julgamento humano e, portanto, subjetivo, além de permitir maior velocidade ao teste. Este ainda necessita de corte da semente, após sua devida embebição em água. Em ARIZAGA et al. (1998), pode-se observar um experimento envolvendo o bio-speckle, também chamado de speckle dinâmico, em que se obteve resultados de iluminação de sementes e de secagem de pinturas. OULAMARA et al. (1989) e XU et al. (1995) propuseram uma técnica para análise de imagens obtidas por meio da iluminação laser de material biológico e da formação do padrão que representa o "Spatial Temporal Speckle" ( STS ). Em RABAL et al. ( 1998 ), a técnica do Bio-Speckle foi apresentada como uma metodologia potencial para a análise de sementes, porém indicando a necessidade de maior domínio dos diferentes

fatores que podem estar interferindo no fenômeno. Segundo ARIZAGA et al (1999), as imagens também podem ser analisadas usando o Momento de Inércia que está relacionado à atividade presente no material iluminado. RABELO (2000) constatou que o Momento de Inércia em frutos variava com a umidade superficial e com o tempo de exposição. ARIZAGA et al (1998), acompanhando a secagem de pintura em uma superfície irregular por meio de iluminação laser e processamento de imagens, evidenciaram que o nível de atividade era maior nos locais onde ainda ocorria a secagem da tinta.

Apesar de existirem trabalhos que visem a influenciar o metabolismo de sementes por meio de iluminação laser, como se observa em VASILENKO (1992), TOTH et al. (1993), DROZD (1994), DUDIN et al. (1995), ou trabalhos que verifiquem o efeito da radiação laser em sementes, causando mutações, como visto em RYBINSKI et al. (1993), pode-se afirmar que o efeito da luz em algumas faixas de frequência não afeta a velocidade das correntes citoplasmáticas, nem a atividade dos cloroplastos, segundo apresentou SEITZ (1979). Essa afirmação pode ser vista na Figura 3.1, a seguir.

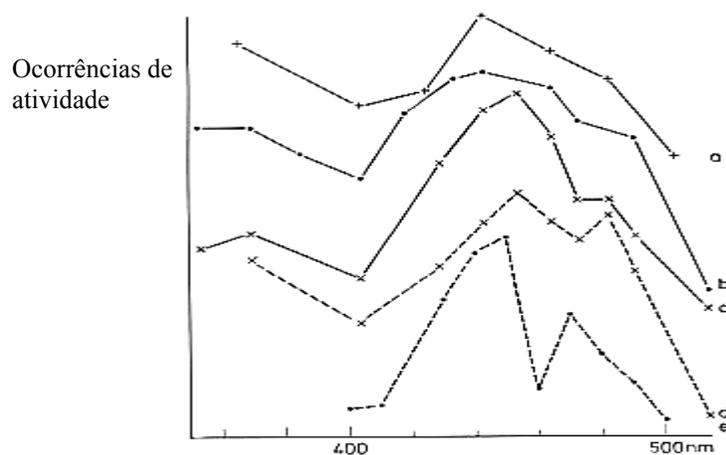


Figura 3.1 Ação do espectro de luz na estimulação da corrente citoplasmática e da atividade dos cloroplastos em (a) corrente citoplasmática ; (b)(c) ciclose de cloroplasto; (d) centrifugação de cloroplasto e (e) centrifugação de cloroplasto

Essa constatação é muito importante para os trabalhos com laser em sementes porque permite definir o trabalho com um laser com faixa de frequência que não afete a semente, evitando, assim, mascaramento dos resultados, principalmente no que se refere à movimentação intra e intercelular.

### 3.2 Teoria Básica

O laser sempre foi visto como uma ferramenta muito complexa, e suas aplicações ficaram inicialmente restritas a pesquisas realizadas por físicos. Porém, por se tratar de um instrumento muito útil, este foi se adaptando aos desenvolvimentos tecnológicos nas mais diversas áreas, e passou a ser comercialmente desenvolvido para aplicações simples e complexas. O seu uso vai desde a caneta laser, para servir de apontadora em palestras, e o disco laser ( CD ), passando pelas aplicações na medicina, na indústria, nas áreas de corte de chapas e de precisão, nas telecomunicações por fibra óptica, até a área militar, como no programa de “Guerra nas Estrelas” dos EUA.

As principais características que estimularam o uso do laser podem ser assim enumeradas:

- fonte de luz que não apresenta risco à saúde ( não é insalubre );
- alta direcionalidade do feixe;
- alta intensidade do feixe;
- capacidade de controle da cor e intensidade;
- coerência e monocromaticidade;
- o tamanho pode ser reduzido;
- a potência pode ser de mW até alguns MW;

Essas características proporcionam condições que viabilizam inúmeras aplicações. O importante, neste caso, é observar que, apesar de características favoráveis citadas anteriormente, a manipulação do laser exige certos cuidados que, dependendo da aplicação, pode comprometer os resultados esperados. Além disso, a pesquisa nessa área é muito dinâmica, tanto na área de desenvolvimento de novos tipos de laser ( menores, maiores, mais potentes, ... ) como também nas aplicações.

### 3.2.1 O Laser

A palavra laser é uma sigla que representa : "Light Amplification by the Stimulated Emission Radiation", sendo, portanto, um tipo de luz que permite um certo controle, além de apresentar características importantes, como é o caso da quasi-monocromaticidade e da coerência.

A cor da luz do laser está relacionada a um comprimento de onda que é selecionado e amplificado pela óptica interna e pela natureza do material estimulado, que são partes constituintes do equipamento. A óptica é uma importante ferramenta para a manipulação do laser, pois se trata de um fenômeno eletromagnético de natureza ondulatória e visível (luz).

Todo átomo tem uma quantidade de energia interna que se encontra em equilíbrio no estado de mínima energia, chamado estado fundamental ("ground state"). Ao receber energia externa, o átomo irá passar para um estado de maior energia, que corresponde à transição dos elétrons a órbitas superiores, ou seja, mais distantes do núcleo, processo este chamado de absorção.

Como o átomo tende ao equilíbrio, os elétrons tenderão a retornar para as órbitas inferiores, perdendo energia, porém não de uma só vez. Nessa transição, passa a existir, então, um estado chamado estado meta estável("Metastable state"), em que, de forma intermediária, esses elétrons permanecem antes de retornarem ao estado original ("ground state"). Do estado estimulado ao meta estado, o elétron emite radiação não estimulada ou espontânea. Neste momento, procura-se fornecer uma referência para a energia que será emitida do "Metastable state" para o "Ground state", estimulando a emissão de fótons com a frequência desejada por meio de uma outra fonte externa.

Os fótons emitidos estarão restritos a uma cavidade óptica que visa amplificar a frequência desejada pela ressonância entre os fótons e essa cavidade, que é munida de espelhos dispostos frente a frente, para refletirem entre si o comprimento de onda que será amplificado. A Figura 3.2 apresenta um esquema desta amplificação.

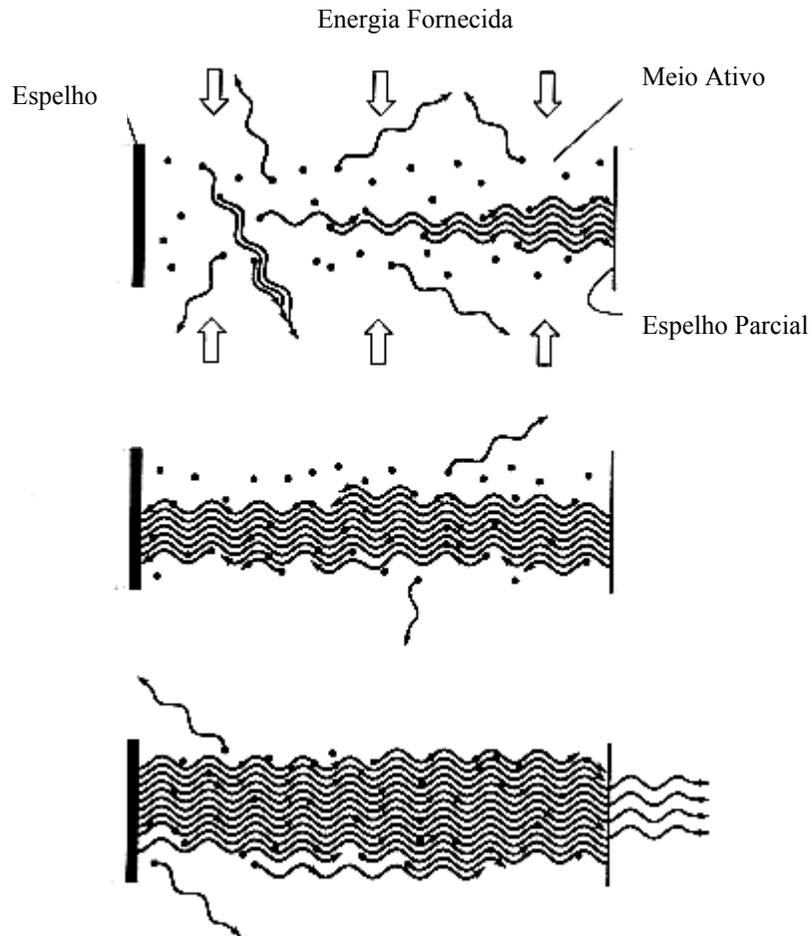


Figura 3.2 Esquema de amplificação da luz no laser (HECHT, 1998)

Além da amplificação, a cavidade permite que apenas a parcela de luz que está em ressonância, e axialmente disposta possa sair e, então, formar o feixe de luz laser quasi-monocromático, altamente direcionado e com grande intensidade. Uma equação básica que define essas três situações, em caso de equilíbrio, é:

$$N_1 \cdot \rho(\nu_{21}) B_{12} = N_2 A_{21} + N_2 \cdot \rho(\nu_{21}) B_{21} \quad (\text{Equação 3.1})$$

em que :

- $N_1 \cdot \rho(\nu_{21}) B_{12}$  , termo relativo à absorção
- $N_2 A_{21}$  , termo relativo à emissão espontânea
- $N_2 \cdot \rho(\nu_{21}) B_{21}$  , termo relativo à emissão estimulada

Sendo,

$N_1$  : número de elétrons nos níveis de menor energia

$N_2$  : número de elétrons nos níveis de maior energia

$\rho(\nu_{21}) B_{12}$  : probabilidade de absorção de energia por unidade de tempo

$\rho(\nu_{21}) B_{21}$  : probabilidade de transição estimulada

$A_{21}$  ,  $B_{12}$  ,  $B_{21}$  : coeficientes de Einstein

A Figura 3.3 apresenta um esquema básico de níveis de energia que representa as etapas de absorção, emissão estimulada e emissão espontânea. Esse é um comportamento típico do laser de rubi, sendo que existem algumas variações para outros tipos de laser.

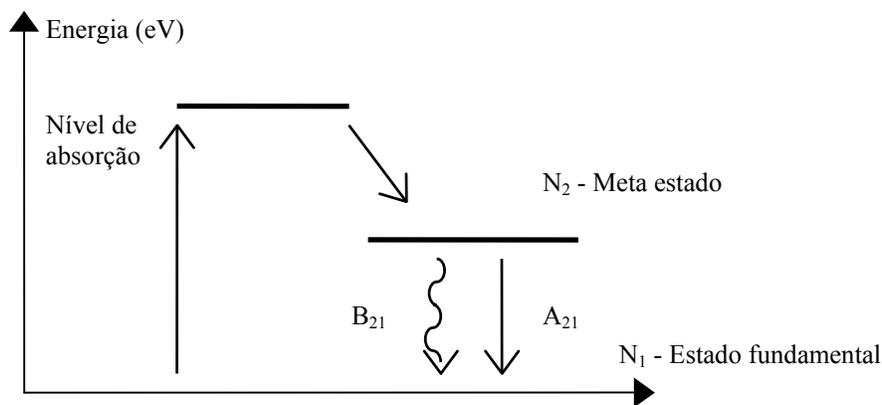


Figura 3.3 Esquema de níveis de energia

A Figura 3.4 apresenta o corte de um laser a rubi com seus componentes básicos.

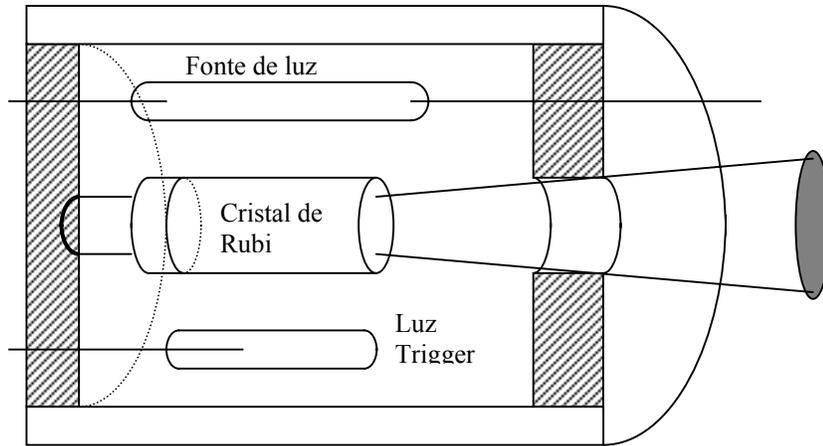


Figura 3.4 Esquema básico de um laser de rubi

O feixe emitido é dito quasi-monocromático porque, além do mesmo ser formado por uma faixa de frequência muito estreita, a cavidade permite oscilar somente alguns poucos modos, dos quais um é o predominante, como se vê na Figura 3.5, em que o modo predominante é relativo a  $\lambda = 633 \text{ nm}$  do laser He.Ne, vermelho.

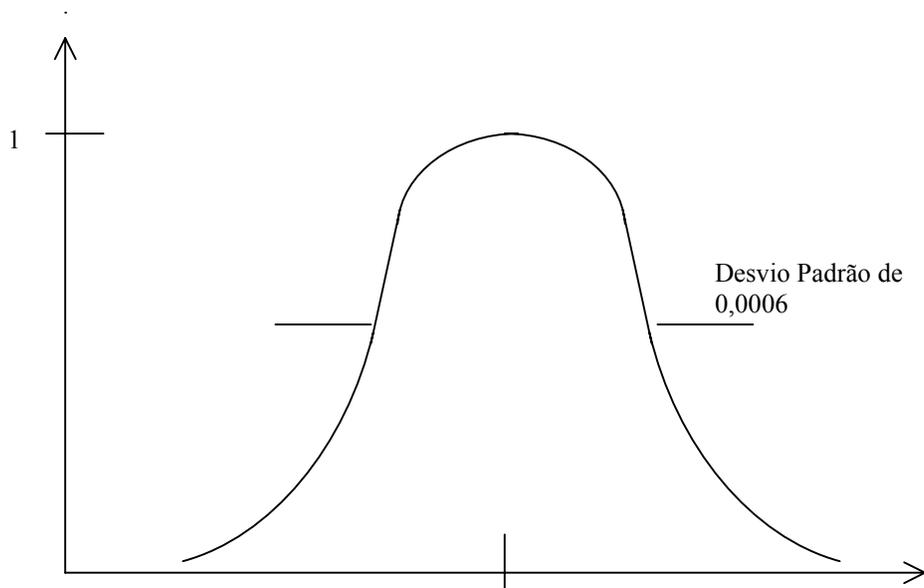


Figura 3.5 Distribuição dos comprimentos de onda emitidos em torno de  $632,8159 \text{ nm}$  ( CIOp, 1997)

O fornecimento de energia para que os elétrons possam saltar do estado de menor energia ( "ground state" ) para um estado de maior energia, fenômeno conhecido como absorção, é frequentemente realizado por meio de luz ou descargas elétricas. Para estimular o fóton na frequência desejada, o que se utiliza como fonte de energia é também uma fonte de luz.

É interessante ressaltar que para conseguir uma certa energia em forma de luz em um laser, é necessário fornecer uma energia ainda maior para excitar e estimular os elétrons. A luz laser pode ser utilizada então de diversas formas, sendo que em algumas se faz uso de aparato óptico, constituído basicamente de lentes de várias características, além de utilizar fenômenos como a difração, a interferência e o speckle produzidos pela luz coerente.

Pode-se dizer que as primeiras teorias que deram um melhor entendimento sobre a noção de probabilidade de transição e a da emissão estimulada de radiação foram apresentadas por Einstein em 1916 (CIOp, 1997). Desde então, iniciaram-se a busca pela observação da emissão estimulada e as tentativas para a sua amplificação.

A primeira tentativa experimental de amplificar a luz foi registrada por Fabrikant, em sua tese de doutorado em 1940, porém ainda sem sucesso. E, somente em 1954, foi conseguida a amplificação de radiação pelo processo de emissão estimulada por C.H. Townes et al. (CIOp, 1997). Um feixe de moléculas de amoníaco era obrigado a atravessar um campo elétrico não-homogêneo. Esse se dividia em dois : um divergente com moléculas de amoníaco normais e outro convergente em que as moléculas tinham um átomo de nitrogênio no nível de energia superior. Um esquema desse dispositivo está representado na Figura 3.6.

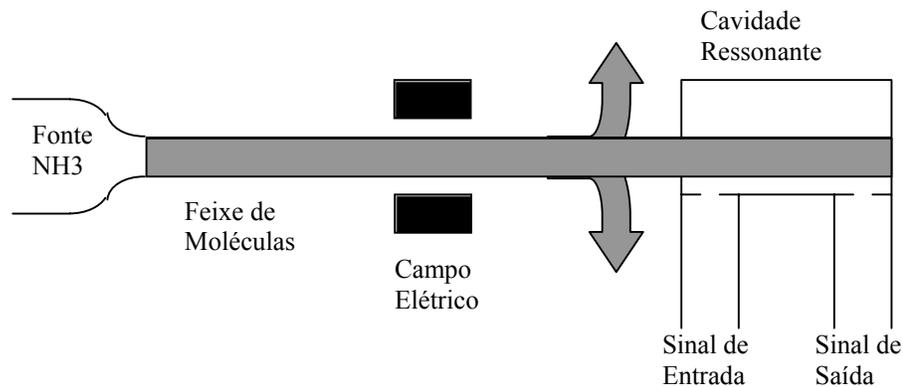


Figura 3.6 Esquema básico do máser de amoníaco ( CIOp, 1997)

A amplificação foi denominada máser e operava na região de microondas. Assim, iniciou-se o caminho que permitiu a montagem de um máser óptico para produzir luz coerente e monocromática na região óptica do espectro eletromagnético.

As pesquisas que foram decisivas para o desenvolvimento do máser óptico, o então denominado laser, se devem a A.L. Schawlow e C.H. Townes, em 1958, e a G. Gould, em 1959 (CIOp, 1997).

Segundo CIOp (1997), Maiman (1960) anunciou o primeiro laser em operação ( laser de rubi ) e, logo depois, em 1961, Ali Javan et al. anunciaram a operação de um laser de He-Ne de 1152,3nm. Desse momento em diante, o que se viu foi um grande e contínuo desenvolvimento do laser, na busca de novos tipos, tamanhos e potências, com o objetivo de se adaptar melhor às diversas aplicações.

### 3.2.2 Tipos de Lasers

*“Desde el funcionamiento exitoso del primer láser em 1960, se inició una espiral siempre creciente de interacción direta entre : aplicaciones → láser adecuado → nuevas aplicaciones → láseres más perfeccionados. Se puede decir que siempre se puede adaptar mejor um láser a los problemas planteados.” (CIOp, 1997).*

Um laser pode ser classificado por :

- sua frequência de emissão;
- tipo de emissão ( contínua ou pulsada );
- nível de potência;
- material ativo e
- tipo de excitação.

A classificação mais adotada refere-se ao estado do material ativo, que pode ser sólido, líquido ou gasoso, porém antes de apresentá-los de acordo com essa classificação, vale analisar o tipo de emissão contínua e pulsada.

A emissão contínua limita-se à obtenção de uma potência de saída mais elevada, o que pode ser conseguido pela emissão pulsada. Em ambos os casos, é possível produzir pulsos de alta potência por meio de uma técnica de chaveamento chamada Q-switching.

Esses pulsos são obtidos quando se coloca um obstáculo na cavidade ressonante, que varia a sua habilidade de permitir ou não a passagem da luz laser. Ao impedir a reflexão, o número de elétrons no meta-estado aumenta consideravelmente, e quando o obstáculo muda sua condição, permitindo a passagem da luz, ocorre uma avalanche, criando um pulso de alta potência, que pode atingir vários MW.

A mudança de estado desse obstáculo é denominada de switching ou chaveamento e pode ser conseguida por prismas e espelhos rotativos, choppers mecânicos, polarizadores, obturadores ópto-elétricos, etc.

#### a-Laser de Estado Sólido

O meio ativo deste tipo de laser é um cristal que pode ser dopado com um certo elemento que é responsável pelo efeito que se deseja conseguir, sendo o cristal apenas um hospedeiro. Os mais representativos são o laser de rubi, neodímio e titânio-zafiro. Outros tipos de laser de estado sólido são os lasers de semicondutor.

### b- Laser de Estado Líquido

Os lasers líquidos baseiam-se em um meio de compostos orgânicos, podendo trabalhar em frequências desde UV a IR. Seu regime é geralmente pulsado.

Existe a possibilidade de construção de lasers que permitem a mudança da cor emitida. Isso em virtude da natureza do material de preenchimento do meio ativo, o que possibilita selecionar a ação desse laser em uma faixa de pequenos comprimentos de onda. Essa possibilidade de sintonia em faixas menores do que 100nm faz desses lasers dispositivos extremamente versáteis em ciência e tecnologia. Essa flexibilidade em mudança de coloração emitida permite aplicações interessantes, como a da detecção de contaminantes, fluorescência de amostras biológicas e determinação de substâncias a distância.

### c- Lasers de Estado Gasoso

Existem lasers de estado gasoso muito comuns na atualidade e com importantes aplicações, como é o caso do laser de HeNe, Excímero, Argônio e CO<sub>2</sub>. Esses dispositivos utilizam a excitação com descargas elétricas e, em alguns casos, com canhão de elétrons.

O laser de HeNe é de grande popularidade, principalmente no comprimento de onda de 632,8 nm, fornecendo alguns miliwatts de potência contínua. Trata-se de um dispositivo de baixo custo, emissor de luz coerente e de alta qualidade, comumente utilizada em aplicações industriais e comerciais, como alinhamento, interferometria, leitora de códigos de barras, shows artísticos, etc.

O princípio de funcionamento baseia-se na excitação do átomo de He que, no meta-estado, coloca seus elétrons no mesmo nível de energia dos níveis 2s e 3s do átomo de Ne. Ocorre, então, uma colisão entre esses elétrons, que fornecem aos elétrons de Ne energia para transitarem a níveis mais elevados e, de forma espontânea, geram uma reação em cadeia, iniciando a emissão estimulada. Uma diferença entre o laser de HeNe e o rubi é que

a emissão estimulada do HeNe ocorre entre níveis mais elevados, enquanto que, no rubi, ocorre entre um nível elevado e o estado fundamental.

É possível encontrar a emissão laser de HeNe em IR e verde, porém a emissão em luz vermelha ( 632,9nm ) é a mais comumente utilizada em laboratórios. Na Figura 3.7 observa-se um esquema básico da composição deste laser.

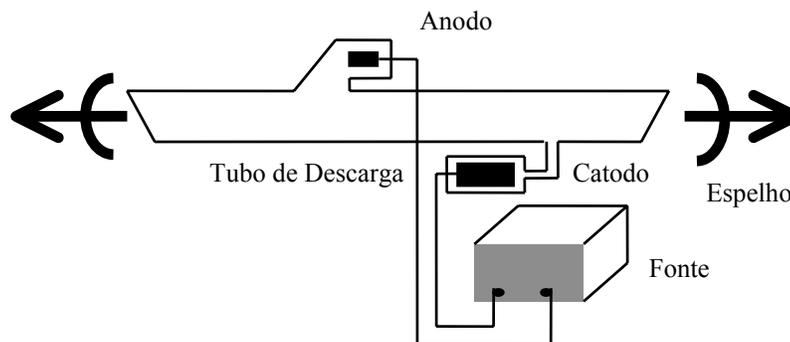


Figura 3.7 Diagrama esquemático de um laser de HeNe

### 3.2.3 - O Laser e a Física Óptica

O laser é uma fonte de luz com características peculiares e que permite uma série de aplicações. Características como a coerência permitem o uso de fenômenos ópticos, como o "speckle" e o "speckle" dinâmico. E para melhor conhecer esses fenômenos, é necessário iniciar definindo a coerência, a interferência e o "scattering".

#### a) Coerência

A coerência é uma importante característica da luz emitida por um laser e que permite muitas aplicações. Segundo HECHT (1998), o estudo sobre coerência é antigo e vem desde 1860, com Emile Verdet, sendo que ainda hoje é motivo de pesquisa. Alguns autores costumam denominar uma fonte como coerente ou não-coerente, porém a coerência é resultado de uma conjugação de fatores que tornam uma fonte mais ou menos coerente,

dependendo do ponto de vista. Por exemplo, em experimento de Verdet, pode-se constatar que uma luz considerada como incoerente, que é o sol, apresenta resultados próprios de coerência. Nesse caso, Verdet iluminou um anteparo com dois furos bem próximos ( $<0,05\text{mm}$ ) e observou que do outro lado se formava uma figura de interferência com franjas bem definidas, que é característica básica de uma luz coerente. Por isso, é que existe o conceito de coerência parcial. A coerência é dividida de forma acadêmica em duas: a coerência temporal e a espacial. A primeira está relacionada com a limitada faixa de frequência da fonte, e a Segunda, com a limitada extensão espacial.

De outra forma, pode-se dizer que a coerência temporal é "o intervalo sobre o qual pode-se prever a fase de uma onda luminosa em um dado ponto do espaço", sendo esse intervalo definido como  $\Delta t_c$ .

Multiplicando-se  $\Delta t_c$  pela velocidade da luz ( $c$ ) tem-se  $c\Delta t_c$ , sendo essa identidade definida como o comprimento da coerência. Se o valor de  $c\Delta t_c$  for muito maior do que a distância entre dois pontos no espaço, nesse domínio se terá uma luz com alto índice de coerência. É por isso que a coerência temporal também é denominada decoerência longitudinal.

De uma outra forma, verifica-se que as emissões luminosas são realizadas em trens de onda e que, portanto, apresentam duração limitada, implicando em um espectro de frequência com muitos componentes. Se a fonte emite um trem de onda que se apresenta com grande duração ou que, no limite, tende ao infinito, essa emissão terá apenas um componente de frequência, sendo assim, monocromática. Dessa forma, o grau de monocromaticidade de uma fonte está relacionado com a sua coerência temporal ou, em outras palavras, com sua coerência na direção de propagação.

Na Figura 3.8 pode-se observar trens de onda com durações variadas e seus respectivos espectros de frequência.

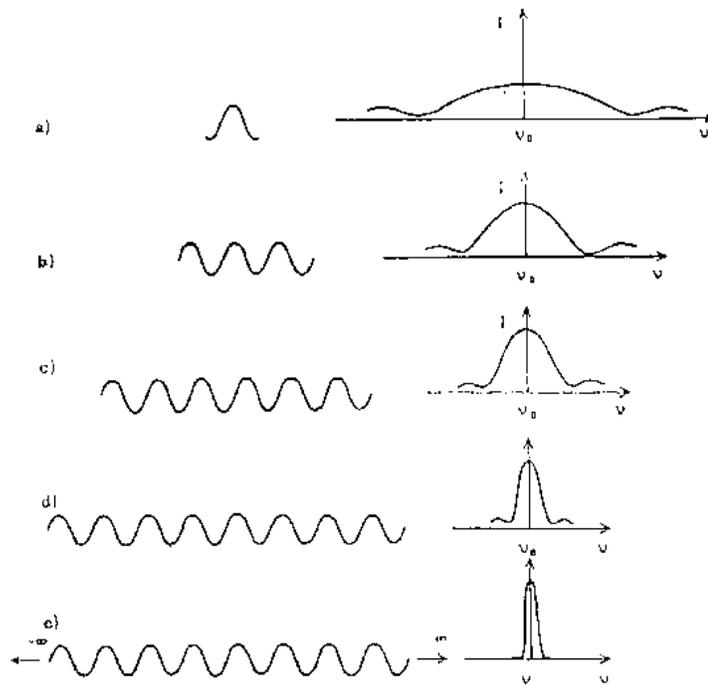


Figura 3.8 Trens de onda com diferentes durações,(CIOp, 1997)

Um trem de onda com grande duração permite verificar que, em um dado ponto do espaço, é possível saber o estado da onda ( fase ) em diferentes instantes. E quanto maior esse intervalo, maior será a coerência da onda. Experimentalmente pode-se medir esse tempo por meio do dispositivo da Figura 3.9, em que um feixe de luz é dividido em dois por um separador de feixe, forçando para que os dois feixes apresentem trajetórias diferentes. Dessa forma, o grau de coerência temporal será medido em função das franjas de interferência. Quando a distância a ser percorrida aumentar, ao ponto de começarem a desaparecer as franjas, se terá a chamada longitude de coerência.

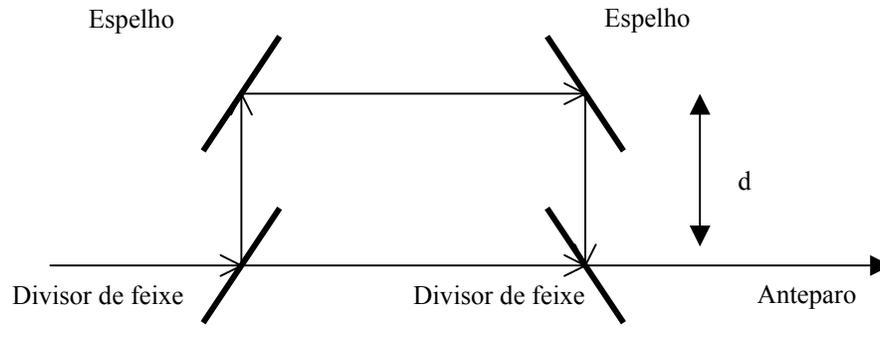


Figura 3.9 Esquema básico para avaliar a coerência temporal

Para as ondas quasi-monocromáticas, a longitude de coerência é grande, o que é uma característica básica dos lasers.

A coerência espacial está relacionada com a área em que a luz do laser é capaz de se manter coerente, por exemplo, ao incidir em um objeto. Isso coloca a coerência espacial intimamente relacionada com a direcionalidade do feixe. O laser se apresenta como uma fonte altamente coerente por causa da grande direcionalidade de seus feixes.

Um experimento que permite maior entendimento da coerência espacial, que está relacionada com o comportamento da onda na direção perpendicular à sua propagação, é baseado na experiência de Young (HECHT, 1998). Ao se mudar a distância entre dois orifícios em um anteparo, com um deles sendo mantido fixo, e o outro sendo movimentado, pode-se verificar o momento em que, a partir de uma certa distância máxima, as franjas de interferência desaparecem. A área máxima em que são obtidas franjas é chamada de área de interferência, medindo-se, assim, a coerência espacial ou transversal de uma onda.

## b) Interferência

A interferência é um fenômeno que depende da coerência, uma vez que ela mostra a superposição de duas ondas formando raias, franjas, claras e escuras. Caso as ondas em questão não sejam coerentes, a interferência das ondas não podem ser observadas na forma

de franjas e sim por uma parcela iluminada do espaço sem qualquer definição de áreas claras e escuras. Na Figura 3.10 pode-se observar um esquema básico da formação dessas raias por meio da interferência de duas ondas provenientes de uma mesma fonte coerente, separada em outras duas pela difração em um obstáculo com dois furos.

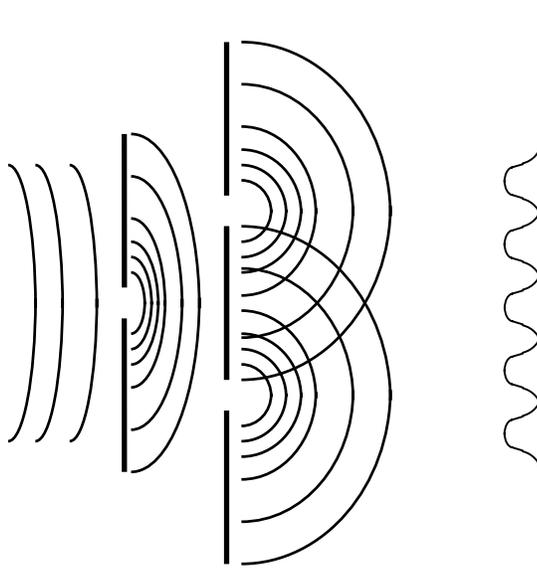


Figura 3.10 Esquema da formação da Figura de Interferência

A interferência é o fenômeno básico para a formação do "speckle", que será definido a seguir.

### c) Scattering

O "scattering" foi definido por HECHT (1998) como a absorção e pronta re-emissão da radiação eletromagnética por elétrons associados a átomos e moléculas. Dessa forma, os processos de transmissão, reflexão e refração da luz são manifestações macroscópicas do scattering, ocorrendo em um nível submicroscópico. Na Figura 3.11 pode-se observar a chegada da luz em um átomo e os processos de excitação dos elétrons e desexcitação,

produzindo uma emissão da luz primária na forma de luz secundária em uma direção qualquer.

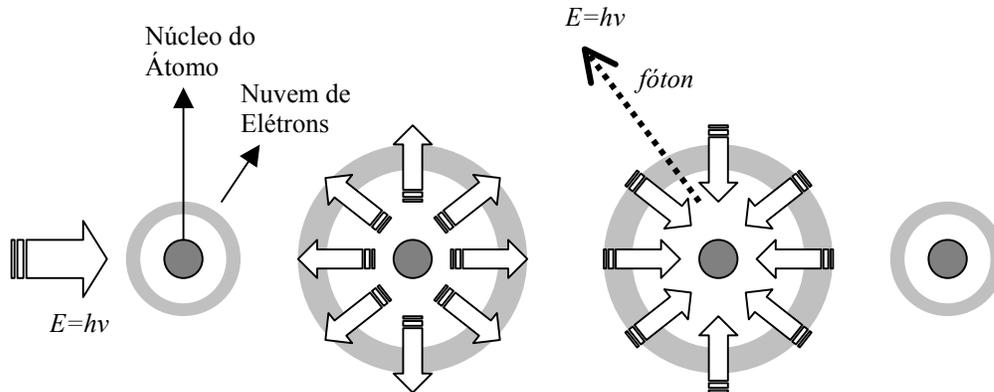


Figura 3.11 Esquema de scattering

Ao conhecer o processo de formação do speckle dinâmico, a interação luz-matéria deve ser muito bem dominada e tratada ao nível do scattering, uma vez que cada componente do material biológico contribui de forma diferenciada para o espalhamento da luz incidente.

#### d) Speckle

O “speckle”, que pode ser entendido como granulado, é um fenômeno que inicialmente era considerado como um ruído que atrapalhava os trabalhos de óptica. Esse fenômeno ocorre somente pelo fato de a luz ser coerente, e que quando ilumina um objeto, observa-se algo diferente, Figura 3.12. Nesse caso, o objeto é um vidro iluminado por um laser de HeNe.

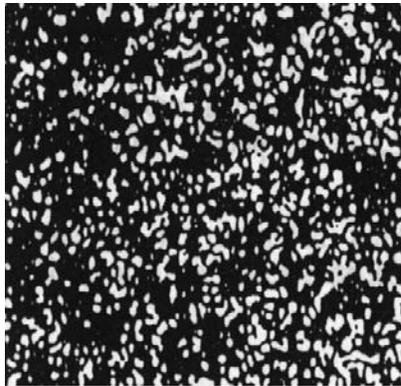


Figura 3.12 Padrão de Speckle formado em um vidro iluminado por laser HeNe (CIOp, 1997)

O efeito que se registra é a interferência dos diversos feixes que retornam do material iluminado. A figura de interferência muda, então, de acordo com o ponto de observação, mudando também se a superfície mudar de posição.

As pesquisas para eliminar o speckle dos resultados dos experimentos ópticos acabaram por conhecer melhor esse fenômeno, e assim o mesmo passou a ser visto não mais como um fenômeno indesejado. Muitas aplicações foram descobertas, entre elas na área de metrologia e nos novos desenvolvimentos referentes ao bio-speckle, que fazem parte deste trabalho, com aplicações em sementes.

### e) Speckle Dinâmico

A utilização do speckle na área biológica tem sido uma nova linha de grande potencial, sendo que ainda nem todas as aplicações foram desenvolvidas completamente, bem como ainda não se conseguiu mapear todas as reais viabilidades (RABAL et al, 1998). O speckle dinâmico, quando proveniente de material biológico, é também conhecido como bio-speckle, que é um termo que representa bem o que se deseja denominar. Por outro lado, apesar de existir uma tradução tanto para speckle (granulado) como para speckle dinâmico (fervilhamento), os termos originais são notórios e, portanto, adotados também neste trabalho. O termo bio-speckle é definido como sendo a figura de interferência formada ao incidir o laser em um processo dinâmico, e observar o chamado fenômeno do fervilhamento. Esse processo dinâmico pode ser uma pintura sendo seca, a transmissão de calor em uma chapa ou a atividade de um organismo vivo.

A bio-atividade faz com que a luz retorne do material biológico, ocorrendo contribuição do exterior e interior do mesmo, e o padrão de interferência varie de acordo com a movimentação de todas as moléculas presentes nesse material. Essa modificação pode ser frenética ou mais lenta, representando a atividade do material biológico (XU et al, 1995).

As imagens devem então ser obtidas com a maior taxa de aquisição possível para acompanhar a mudança de direção das dispersões, o que força a necessidade, em alguns casos, de um equipamento de aquisição de imagens mais rápido. Como várias imagens serão então obtidas para o acompanhamento do movimento, faz-se necessário também maior capacidade de memória. Um outro limite que deve ser considerado é o limite gerado pelo ruído dos equipamentos e pelo objeto iluminado. Com relação ao equipamento, BERGKVIST(1997) avaliou o nível de ruído gerado pelos vários equipamentos que compõem uma montagem experimental para coleta das imagens. O mesmo concluiu que a taxa sinal ruído está na faixa de 1000 vezes, o que seria o bastante para um estudo de nível de atividade. O ruído gerado pelo material biológico iluminado pode mascarar os resultados e ainda é indefinido. Esse ruído deve ser determinado para garantir resultados de nível de

atividade mais confiáveis. ROMERO (1999) também consegue separar o ruído produzido pela montagem experimental e mostra por meio do espectro de frequências que os módulos desses ruídos são menores que os do sinal proveniente do material biológico, e para o seu caso específico, ficou na faixa de 100 vezes.

Por ser dinâmico, o bio-speckle deve ser analisado com técnicas de processamento de imagem e tratamento estatístico, uma vez que a observação visual permite apenas a identificação da existência do fervilhamento, mas não permite quantificá-lo. Existem assim várias técnicas para tratar as imagens que, compostas, expressam o fervilhamento ( speckle ), permitindo sua quantificação.

### **3.3 Vigor e Viabilidade de Sementes**

Esses termos, segundo MARCOS FILHO ( 1999 ), apresentam alguma controvérsia quanto a sua paternidade, mas o mesmo apresenta o fim do século XIX e o início do século XX como fase para o surgimento das idéias sobre a análise do vigor e viabilidade de sementes. Entende-se por viabilidade , segundo BASU (1984), "a propriedade de a semente germinar sob condições favoráveis", enquanto o vigor é definido por Heydecker (1972), segundo BASU (1984), como "um atributo quantitativo da semente que está intimamente relacionado com a sua viabilidade, sendo que uma perda de viabilidade é usualmente precedida de uma perda do vigor".

A partir de então, houve uma busca por testes de análise do vigor que devem ter como objetivos básicos, ainda segundo MARCOS FILHO ( 1999 ), os seguintes pontos:

- a) "Avaliar ou detectar diferenças significativas na qualidade fisiológica de lotes com germinação semelhante";
- b) "Distinguir, com segurança, lotes de alto dos de baixo vigor";
- c) "Separar ( ou classificar ) lotes em diferentes níveis de vigor, de maneira proporcional ao comportamento quanto à emergência das plântulas, resistência ao transporte e potencial de armazenamento".

Apesar de muito bem definidos os objetivos, atingi-los é um desafio para os testes existentes, que têm dificuldade de, em apenas um teste, indicar o desempenho das sementes a partir das distintas características a avaliar. Em relação à característica avaliada, é importante também conhecer bem o que cada teste é capaz de observar. Essa diversidade de parâmetros acaba por apresentar diferentes análises em função do teste utilizado.

Outros dois grandes desafios são a quantificação do vigor e a padronização das metodologias dos testes.

Um teste de vigor precisa ser muito bem definido teoricamente, inclusive quanto à metodologia utilizada. Além disso, ele deve apresentar características como simplicidade, rapidez, baixo custo, objetividade, reprodutividade e permitir comparação com emergência no campo.

Existe uma série de métodos para análise do vigor, como classificados a seguir MARCOS FILHO ( 1999 ):

- a) Testes Físicos: avaliam aspectos morfológicos ou características físicas das sementes possivelmente associadas ao vigor.
  - Tamanho das sementes;
  - Peso unitário das sementes;
  - Densidade das sementes;
  - Coloração das sementes;
  - Testes de raios X.
  
- b) Testes Fisiológicos: procuram determinar atividade fisiológica específica, cuja manifestação depende do vigor.
  - Classificação do vigor das plântulas;
  - Primeira contagem de germinação;
  - Velocidade de germinação ou de emergência de plântulas
  - Transferência de matéria seca;
  - Teste de exaustão;
  - Crescimento das plântulas.

- c) Testes Bioquímicos: avaliam alterações bioquímicas associadas ao vigor das sementes
  - Teste de respiração
  - Teste ADAG
  - Teste de tetrazólio
  - Teste de condutividade elétrica
  - Teste de lixiviação de potássio
  - Teste dos aldeídos voláteis
  - Teste dos ácidos graxos livres
  
- d) Testes de Resistência: avaliam o desempenho de sementes expostas a estresses.
  - Germinação a baixas temperaturas
  - Imersão em água quente
  - Teste de submersão
  - Imersão em solução osmótica
  - Imersão em soluções tóxicas à semente
  - Teste de tijolo moído ( teste de Hiltner )
  - Envelhecimento acelerado
  - Teste de frio

Dentre os mencionados, atualmente, os comitês de vigor da International Seed Testing Association (ISTA) e da Association of Official Seed Analysts (AOSA) consideram os seguintes testes como os mais convenientes para a avaliação do vigor:

- a) ISTA: - Taxa de crescimento de plântulas
  - Classificação do vigor de plântulas
  - Envelhecimento acelerado
  - Teste de frio
  - Teste do tijolo moído ( teste de Hiltner )

- Teste de deteriorização controlada
- Teste de tetrazólio
- Condutividade elétrica
- Teste de tetrazólio na camada de aleurona

b) AOSA: - Classificação do vigor de plântulas

- Taxa de crescimento de plântulas
- Envelhecimento de plântulas
- Teste de frio
- Germinação a temperatura subótima
- Teste de tetrazólio
- Condutividade elétrica

O Teste do Tetrazólio, segundo BHÉRING (1996), é um teste que se destaca como um teste considerado rápido, possibilitando a avaliação do vigor e da viabilidade, identificando fatores que influenciam a qualidade das sementes, como é o caso dos danos mecânicos, dos ocasionados por secagem e daqueles produzidos por insetos e pela umidade. Este teste baseia-se na coloração dos tecidos vivos presentes no interior da semente por uma solução de sal de tetrazólio, que é um indicador oxidante redutor, desenvolvendo uma cor vermelha no tecido vivo, diferenciando-se do tecido morto, que não sofre alteração na coloração. O mapeamento das áreas vivas e mortas permite, assim, determinar o grau de comprometimento da semente e definir sua viabilidade e seu vigor. As enzimas desidrogenases é que catalizam a reação de redução do sal de tetrazólio ( 2, 3, 5 trifetil cloreto de tetrazólio ) nas células vivas. Quando as sementes são imersas na solução de tetrazólio, esta difunde-se pelos tecidos, promovendo nas células vivas a reação de redução, resultando na formação de um composto vermelho conhecido por formazan. A coloração dos tecidos após a reação varia entre o vermelho carmim e branco leitoso, que respectivamente, correspondem a tecidos vivos e mortos. Pelas da coloração dos tecidos é

possível constatar, dependendo do local e da coloração, o grau de viabilidade e vigor para a semente analisada.

### **3.4 O Laser em Materiais Biológicos**

Os materiais biológicos apresentam uma característica peculiar em relação aos outros materiais, uma vez que os mesmos, segundo BERGKVIST (1997), apresentam-se como meios de grande dispersão da luz (scattering). E, dessa forma, esses materiais apresentam uma grande complexidade no que se refere à interação da luz com seus diversos constituintes, o que é amplificado pela complexa movimentação interna. Essa movimentação, proveniente da atividade metabólica, pode ser maior ou menor, dependendo do estágio de maturação, crescimento ou deterioração do material biológico, bem como da quantidade de água, temperatura e iluminação.

A complexa constituição dos tecidos biológicos acaba sendo a base para um intrincado funcionamento biológico que dificulta a relação causa-efeito. Em CARVALHO et al. (1999), pode-se observar algumas imagens obtidas com microscopia eletrônica de sementes de milho (*ZEA mays* L.), evidenciando uma complexa e diferenciada constituição. A Figura 3.13 mostra o embrião do milho, com o eixo embrionário e o escutelo evidenciados, podendo-se observar um tecido com muitas descontinuidades. Pela Figura 3.14 verifica-se a região de transição entre o endosperma e embrião, e na Figura 3.15 pode-se observar os grânulos de amido constituintes do endosperma, sendo que em (a) o tecido está seco, e em (b), está úmido. Um grânulo de amido pode ser visto no detalhe na Figura 3.16, sendo seu tamanho de alguns micrômetros.

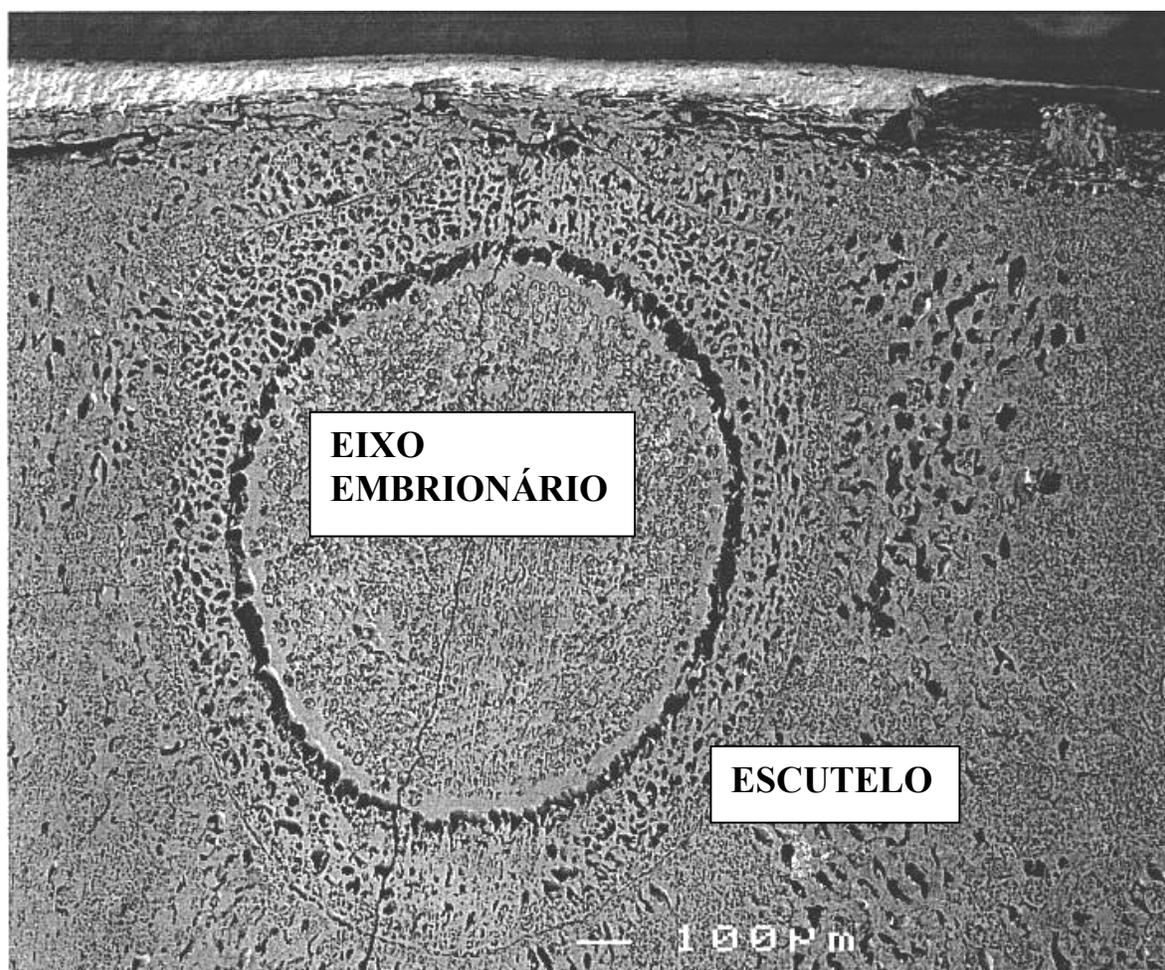


Figura 3.13 Embrião do milho

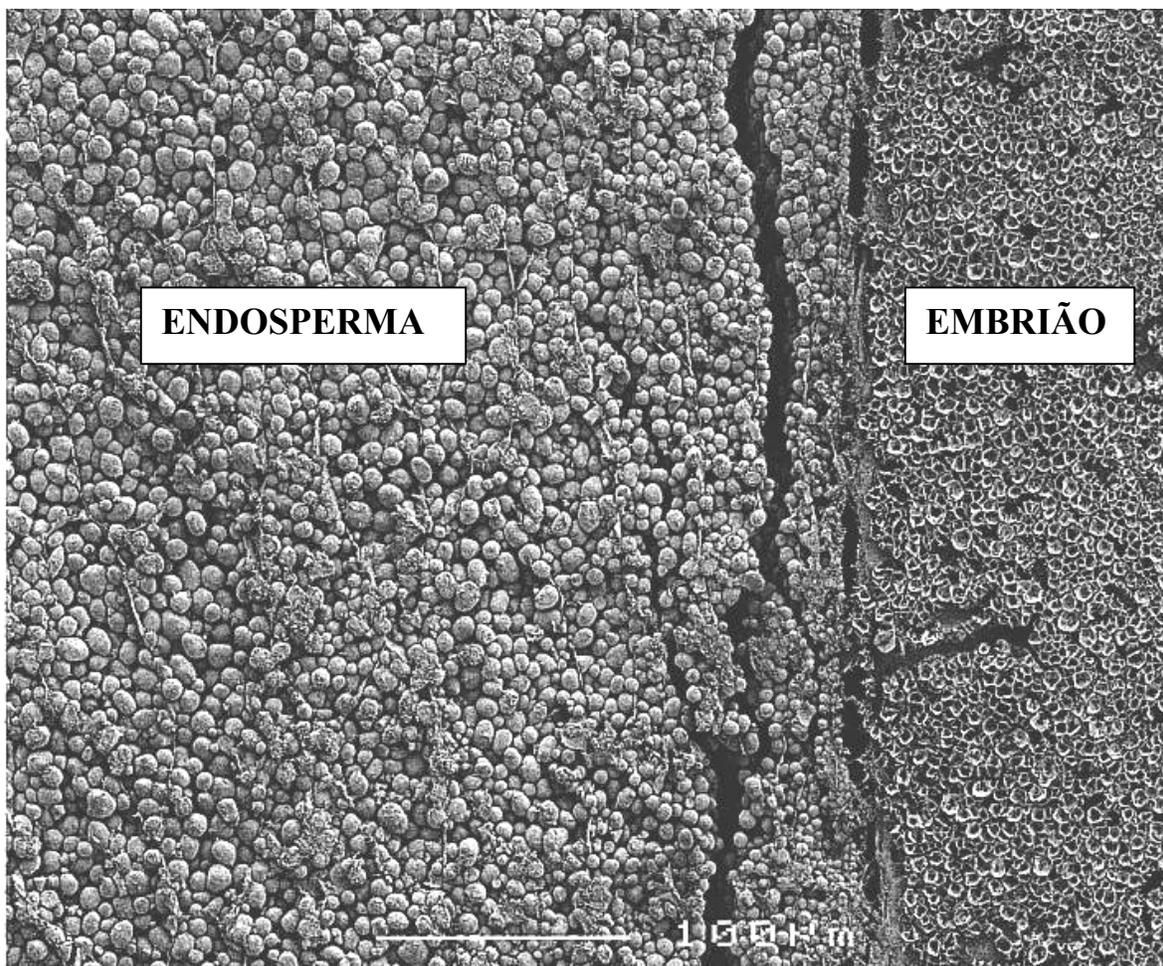
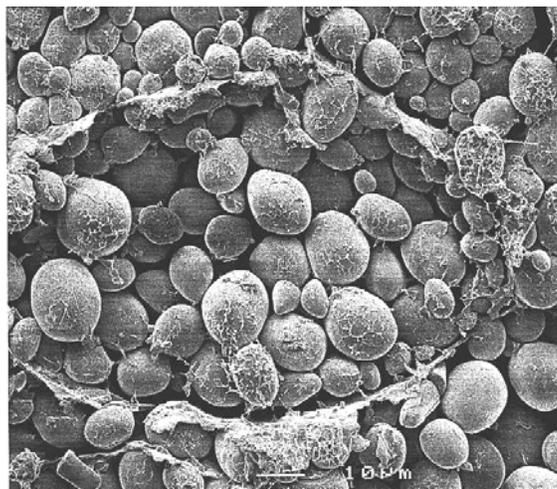
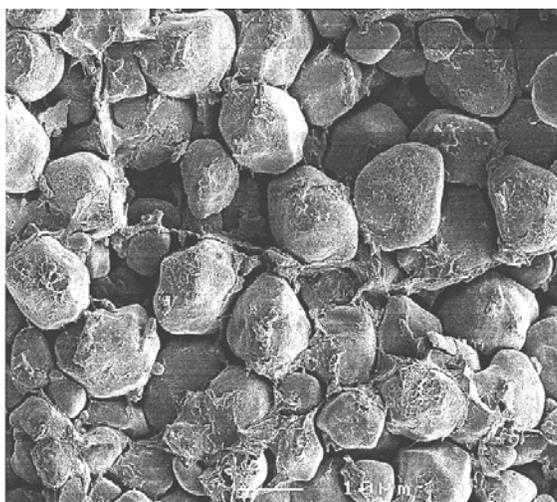


Figura 3.14 Região de transição entre o endosperma e o embrião



(a) grânulos de amido úmidos



(b) grânulos de amido secos

Figura 3.15 Grânulos de amido no endosperma, (a) úmidos, (b) secos

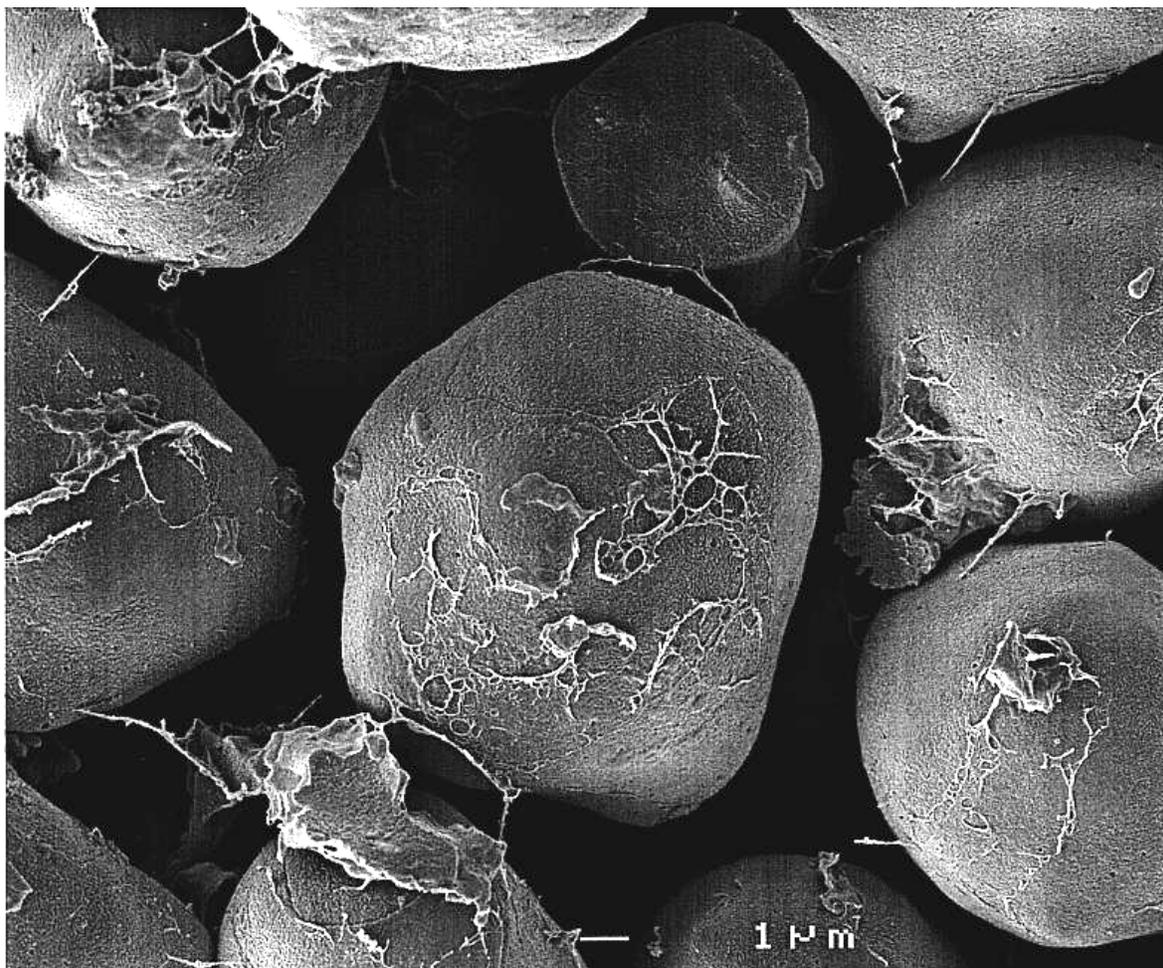


Figura 3.16 Grânulo de amido no detalhe

O tamanho dos elementos constituintes da célula é de grande importância para avaliar o efeito da interação laser com a matéria biológica. Erickson (1989), segundo RABELO(2000), mostra que as unidades constituintes das células vegetais apresentam tamanhos diversos, maiores e menores que o comprimento de onda da luz laser.

Tabela 3.1 Partes constituintes de uma célula vegetal com respectivos diâmetros e número

<b>Partes constituintes</b>	<b>Diâmetro</b>	<b>Número por célula</b>
Núcleo	5 - 20 $\mu$ m	1
Cloroplasto	5 - 10 $\mu$ m	20 - 200
Mitocôndria	1 - 5 $\mu$ m	500 - 2000
Ribossomas	25 $\eta$ m	5x10 <sup>5</sup> - 5x10 <sup>6</sup>
Enzimas	2 - 10 $\eta$ m	5x10 <sup>8</sup> - 5x10 <sup>9</sup>

A água é um constituinte básico de materiais biológicos, e segundo BERGKVIST (1997), não absorve a luz do laser de HeNe a 632 nm. Por outro lado, em uma semente, a quantidade de água está relacionada com a intensidade do processo metabólico.

Em experimentos e de forma intuitiva, observa-se que o teor de água está relacionado com a transmissão da luz pelo material biológico, especificamente a semente. Segundo ROMERO (1999), a transmissão da luz pelos materiais biológicos pode ser representada pela Equação 3.2:

$$\mu_{tr} = \mu_s' + \mu_a \cdot \mu_s' \quad (\text{Equação 3.2})$$

em que:

- $\mu_{tr}$  é o coeficiente de transmissão da luz
- $\mu_s'$  é o coeficiente de dispersão reduzida
- $\mu_a$  é o coeficiente de absorção

O coeficiente de dispersão reduzido é definido pela Equação 3.3 como :

$$\mu_s' = (1 - g) \cdot \mu_s \quad (\text{Equação 3.3})$$

sendo:

- $\mu_s$  o coeficiente de dispersão e
- $g$  o fator de anisotropia

O fator de anisotropia ( $g$ ) é definido como o valor médio do cosseno do ângulo de dispersão e pode tomar valores entre -1 e 1. Pela Figura 3.17 observa-se que quando  $g$  é igual a 1 ( $g = 1$ ), ocorre uma transmissão completa da luz, e quando é igual a 0 ( $g = 0$ ), ocorre uma dispersão uniforme.

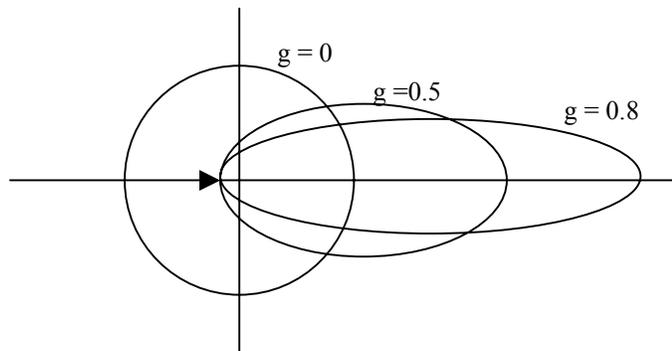


Figura 3.17 Distribuição da dispersão

Joyce (1992), segundo RABELO (2000), apresentou o esquema de dispersão angular mostrado na Figura 3.18 de forma simplificada.

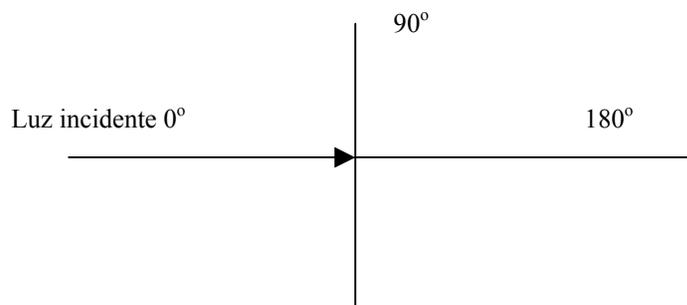


Figura 3.18 Distribuição angular de dispersão da luz

A interação da luz com o material biológico apresenta algumas características peculiares, como a que evidencia BERGVIST (1997), com relação à despolarização da luz de forma exponencial à penetração no tecido biológico. De outra forma, segundo XU et al. (1995), a luz que é refletida ao incidir no material biológico mantém a sua polarização quando vem da superfície. XU et al. (1995) ainda demonstraram que a contribuição do interior de um fruto produz um speckle de tamanho médio menor daquele que é atribuído à superfície. Essa afirmação concorda com Briers (1993), citado por RABELO (2000), sendo que BERGVIST (1997) apresenta a Equação 3.4 do disco de Airy como forma de conhecer o diâmetro do speckle :

$$d = 2.44 \left( \frac{\lambda \cdot z}{D} \right) \quad (\text{Equação 3.4})$$

em que :

- d é o diâmetro do speckle
- z é a distância do observador
- D é o diâmetro da área iluminada

XU et al (1995) apresentaram a Equação 3.5, que relaciona o tamanho da área iluminada pelo laser e a sua profundidade de penetração em um fruto.

$$D = D_0 \left[ 1 - \exp\left(-\frac{T}{T_0}\right) \right] \quad (\text{Equação 3.5})$$

em que:

- D é o diâmetro da região iluminada
- T é a profundidade e
- T<sub>0</sub> é uma constante igual a 1,6mm

### 3.5 Métodos de Análise do Speckle Dinâmico

O speckle dinâmico pode ser utilizado de formas distintas como fonte de informação. Quando se deseja obter informações de níveis de atividade diferentes em um corpo iluminado pelo laser, o que se utiliza são procedimentos de processamento de imagens que geram um mapa indicando em tons de cinza os níveis de atividade. Os métodos abordados neste trabalho são o de Diferenças Generalizadas e o de Fujii, também atribuído a Asakura. Por outro lado, quando a informação requerida é uma quantificação da mudança do padrão de speckle formado durante uma observação, o que tem sido proposto pela literatura são os métodos de Momento de Inércia e Autocorrelação.

#### 3.5.1 Método de Diferenças Generalizadas

Cada semente apresenta características diferentes e deve ser mapeada também de forma diferenciada, indicando sua viabilidade e os seus níveis de vigor. O Método de Diferenças Generalizadas permite indicar áreas que apresentam diferentes níveis de atividades relacionadas à mudança do padrão de speckle observado.

Esta metodologia baseia-se em trabalhar a imagem obtida do corpo iluminado, identificando a intensidade luminosa de cada pixel que a compõe, sendo que essa intensidade é expressa por  $I(x,y)$ , em que  $(x,y)$  são as coordenadas da imagem. O que se faz, então, é realizar uma soma das diferenças de intensidade entre uma imagem e a sua subsequente (ARIZAGA et al, 1998). O resultado será uma nova imagem e um clareamento dos pixels que apresentarem mudanças de intensidade, representado pela Equação 3.6.

$$I(x,y) = \sum_k \sum_l |I_k(x,y) - I_{k+1}(x,y)| \quad (\text{Equação 3.6})$$

sendo  $k$  e  $l$  as imagens.

Esta é a técnica que está sendo proposta para a análise de viabilidade e vigor de sementes, identificando áreas com níveis de atividade diferentes, realizando, assim, um

mapa que permitirá inferir sobre o vigor da mesma. A técnica de Diferenças Generalizadas é uma das técnicas de tratamento de imagem que serve para esse propósito, sendo que existe uma variação da Técnicas de Diferenças Generalizadas conhecida como Método de Fujii.

Um exemplo do funcionamento do Método de Diferenças Generalizadas pode ser visto a seguir, em que o mesmo será aplicado para as três imagens consecutivas mostradas na Figura 3.19.

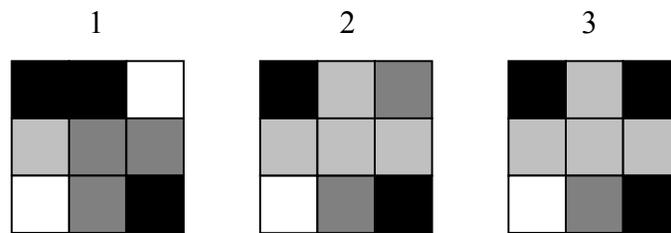


Figura 3.19 Imagens consecutivas de uma iluminação fictícia

O resultado do processamento do método pode ser visto na Figura 3.20, pela qual se vê que as unidades que mais modificaram sua intensidade de cinza ficaram mais claras de acordo com a amplitude de modificação.

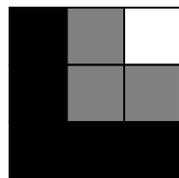


Figura 3.20 Resultado do Método de Diferenças Generalizadas

Atribuindo valores às intensidades de cinza das imagens anteriores, e considerando que o valor 1 representa o máximo de claridade ( branco ) e 0,01 representa a referência (negro), valores maiores do que 1 são convertidos automaticamente em 1, uma vez que ocorre uma saturação da imagem.

IMAGEM 1

0,01	0,01	1
0,25	0,5	0,5
1	0,5	0,01

IMAGEM 2

0,01	0,25	0,5
0,25	0,25	0,25
1	0,5	0,01

IMAGEM 3

0,01	0,25	0,01
0,25	0,25	0,25
1	0,5	0,01

Resolvendo por Diferenças Generalizadas, tm-se os seguintes passos:

$k = 1$  e  $l = 1$

0	0,24	0,5
0	0,25	0,25
0	0	0

$k = 1$  e  $l = 2$

0	0,24	0,99
0	0,25	0,25
0	0	0

$k = 2$  e  $l = 1$

0	0	0,49
0	0	0
0	0	0

SOMA

0	0,48	1
0	0,5	0,5
0	0	0

### 3.5.2 Método de Fujii

Este método baseia-se na mesma filosofia que é adotada para o Método de Diferenças Generalizadas, porém apenas com uma mudança no tratamento da imagem onde ocorre uma ponderação das diferenças, conforme FUJII et al (1987) e AIZU e ASAKURA (1991). A Equação 3.7 mostra como funciona esta ponderação.

$$I(x, y) = \sum \frac{|I_k(x, y) - I_{k+1}(x, y)|}{|I_k(x, y) + I_{k+1}(x, y)|} \quad (\text{Equação 3.7})$$

Resolvendo o mesmo exemplo que foi realizado por Diferenças Generalizadas pelo Método de Fujii, têm-se os seguintes passos:

$$k = 1 \text{ e } l = 1$$

0	0,92	0,33
0	0,33	0,33
0	0	0

$$k = 1 \text{ e } l = 2$$

---

0	0,92	0,98
0	0,33	0,33
0	0	0

$$k = 2 \text{ e } l = 1$$

0	0	0,96
0	0	0
0	0	0

SOMA

0	1,84	2,27
0	0,66	0,66
0	0	0

Como 1 representa o valor máximo de claridade, ocorre a saturação quando existe um valor maior que este.

0	1	1
0	0,66	0,66
0	0	0

E a imagem que resulta é a que é mostrada na Figura 3.21.

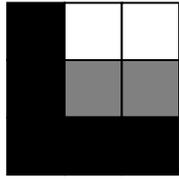


Figura 3.21 Resultado do Método de Fujii

A diferença entre os dois métodos está mais ressaltada, neste caso, no elemento da coluna dois e linha um, em que o valor em diferenças generalizadas foi de 0,48, quando no método de Fujii o valor foi de 1. Esse é um problema do método de Fujii em que, para pequenas intensidades o efeito das diferenças fica maior do que para intensidades, maiores. Esse efeito é interessante em alguns casos, mas traz informações erradas em outros, como ocorreu no exemplo.

### 3.5.3 Momento de Inércia

Para a análise de nível de atividade de um material biológico, o que se tem proposto com o uso do laser, até o momento, é a análise das informações retiradas do Spatial Temporal Speckle proposto por OULAMARA et al.(1989).

O Spatial Temporal Speckle (STS) constitui-se de uma manipulação das diversas imagens obtidas da superfície do objeto iluminado pelo laser. De cada imagem conseguida, retira-se apenas uma linha que estará ao lado da linha da imagem seguinte. O resultado desse conjunto de linhas é chamado então de STS, uma vez que ele representa como se comportou uma linha da área iluminada nas imagens conseguidas durante o tempo de exposição. Nesse caso, se ocorreu algum movimento na superfície do material, essa mudança será transmitida para a figura do speckle formado e, conseqüentemente, a linha observada será diferente da anterior. Essa é uma forma de se avaliar o nível de atividade de um fruto, pois se o resultado apresentar uma figura completamente distorcida, é sinal de que o movimento está intenso. 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 nível de cinza de antes. Isso pode ser visto na Figura 3.22, a seguir.

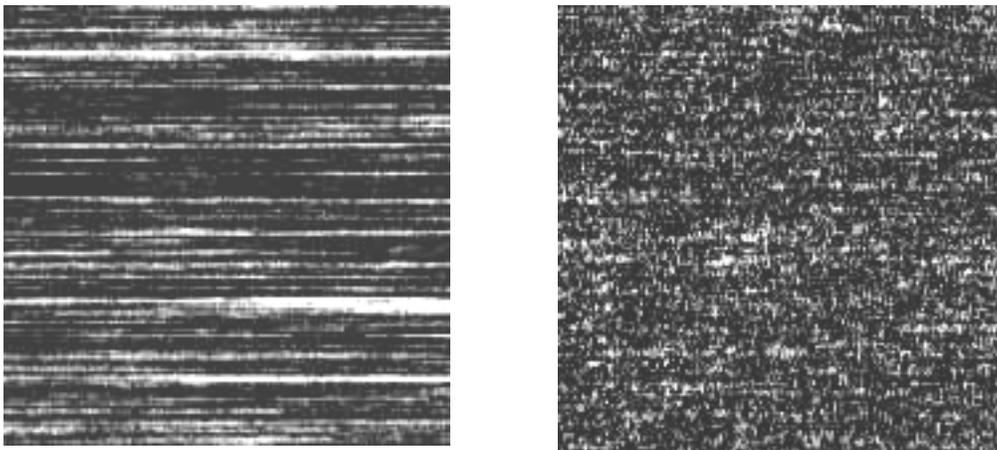


Figura 3.22 Resultados STS em uma casca de uva (a) seca, (b) recém-cortada

Um resultado da análise do STS é o Momento de Inércia que, de acordo com ARIZAGA et al (1999), permite apresentar uma interpretação quantitativa para o STS, baseado nas ocorrências de valores de intensidade sucessivos dos pixels que compõem o STS. RABELO (2000) denominou essa técnica como Fator de Dispersão; porém, como o mesmo tem sido tratado pela literatura como Momento de Inércia, este será o termo utilizado para se referir a essa técnica. Este método forma uma matriz com as ocorrências de intensidade sucessivas e que é denominada matriz de ocorrências ( MOC ), definida assim pela Equação 3.8 :

$$\mathbf{MOC} = [ N_{ij} ] \quad (\text{Equação 3.8})$$

Nessa equação,  $N_{ij}$  representa uma lógica que identifica quantas vezes ocorreu a intensidade  $i$ , seguida da intensidade  $j$ , e em uma matriz de  $256 \times 256$  ( em que de 0 a 256 tem-se a faixa de intensidades codificadas em segundo 8 bits ) faz-se o cômputo de todas as ocorrências. Uma vez montada a MOC, observa-se que a diagonal principal está relacionada com intensidades que não variaram no tempo, enquanto fora da mesma aparecem as ocorrências que caracterizam uma mudança no tempo. Dessa forma, quanto

mais afastado da diagonal principal estiver a ocorrência, maior a mudança na intensidade do pixel  $i$  para o pixel  $j$ . Assim, com a Matriz de Ocorrência é possível analisar o nível de alteração do speckle observado no tempo. Essa observação pode ser facilitada com a representação gráfica das ocorrências como pode ser constatado na Figura 3.23.

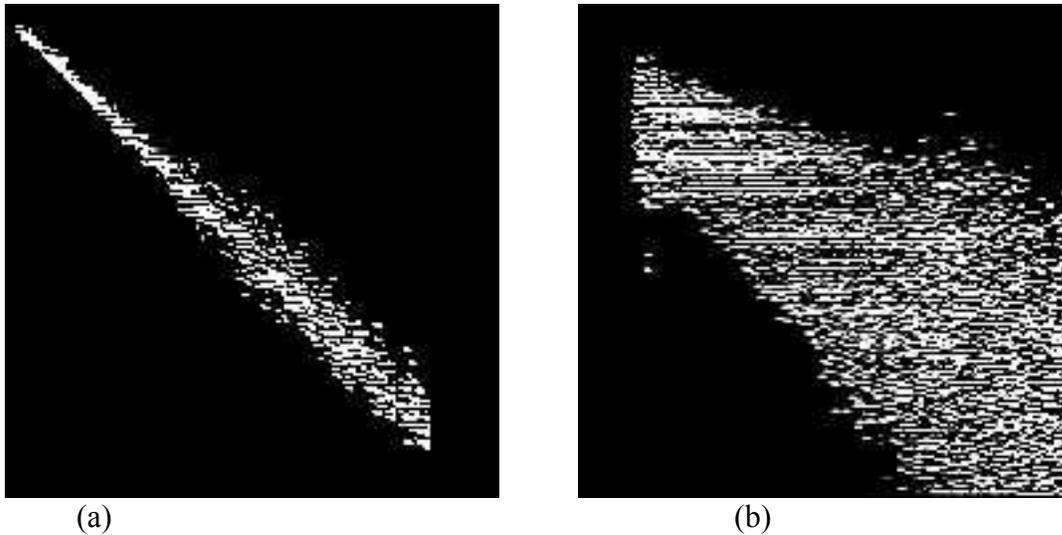


Figura 3.23 Matriz de ocorrência de (a) uma caixa de papel, e (b) de uma laranja

Porém, como o interesse é quantificar a mudança do padrão de speckle, a MOC é utilizada para obter o momento de segunda ordem, assim denominado de momento de inércia. A Equação 3.9 mostra a técnica utilizada, que consiste no somatório do produto dos valores de ocorrência pelo quadrado da diferença entre as coordenadas, que representa a distância da diagonal principal.

$$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}} \quad (\text{Equação 3.9})$$

Normalmente, o que se faz primeiro é normalizar a MOC, transformando a mesma em uma matriz que identifica na forma de intensidades ( 0 a 256 ) os valores das ocorrências. Essa nova matriz (MOCN) passa a ser utilizada para plotar o gráfico que representa o grau de dispersão em torno da diagonal e dessa forma, o Momento de Inércia pode ser também calculado baseando-se na mesma.

Numericamente, essa matriz pode ser avaliada segundo ARIZAGA (1999), como mostra a Equação 3.10.

$$IM = \sum M_{ij}(i - j)^2 \quad (\text{Equação 3.10})$$

### 3.5.4 Autocorrelação

Um outro resultado numérico pode ser conseguido pela realização da correlação existente entre um ponto e os seguintes. Isso normalmente é feito tomando um número de pontos ( pixels ), retirando-se sua média e comparando esses valores médios pela correlação representada pela Equação 3.11.

$$C_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^N I(k,i)I(k,i+j)}{\left[ \sum_{k=1}^N I^2(k,i) \sum_{k=1}^N I^2(k,i+j) \right]^{1/2}} \quad \text{Equação 3.11}$$

Em que o termo  $C_{ij}$  é o coeficiente de correlação da distribuição de intensidade de uma dada linha, sendo que  $i$  e  $j$  estão relacionados aos tempos de ocorrência ( $t_0+i\Delta t+j\Delta t$ ).  $I(x,y)$  é a intensidade do pixel em  $(x,y)$  do padrão STS de tamanho  $M \times N$ . Para reduzir a flutuação de  $C_{ij}$ , implementa-se a média de  $C_{ij}$ , e obtém-se o coeficiente  $C_j$ , ao longo do tempo, definido pela Equação 3.12.

$$C_j = \sum_{i=1}^{M/2} C_{ij} \quad (\text{Equação 3.12})$$

em que,  $j = 0, 1, \dots, M/2$

A Figura 3.24 mostra dois STS's com suas respectivas funções de autocorrelação.

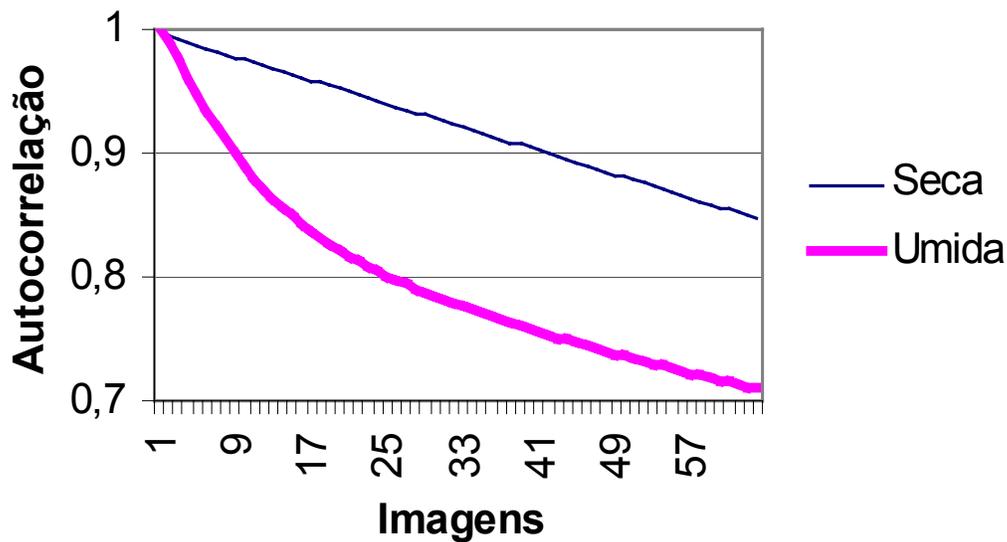


Figura 3.24 Curvas de autocorrelação para semente com diferentes níveis de umidade

Como não se consegue utilizar uma função como um valor definido, o que se tem feito segundo RABAL (1996) é a retirada de um valor da curva que possa representar a atividade expressa pela curva de autocorrelação. Esse valor é o conhecido como o "Full With at Half Maximum", que é a largura na metade da altura máxima. Um desdobramento dessa técnica é conhecido como Cumulantes Estatísticos (ROMERO,1999), que se referem a ajustes das funções de autocorrelação por funções exponenciais decrescentes ou gaussianas.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações Iniciais**

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios da Universidade Federal de Lavras e no Laboratório de Óptica do Centro de Investigaciones Ópticas de La Plata -Argentina. O trabalho foi dividido em três fases:

- Investigação de viabilidade de uso do Speckle Dinâmico em sementes,
- Efeito da Umidade
- Realização de experimentos complementares.

### **4.2 - Investigação de Viabilidade de Uso do Speckle Dinâmico**

Esta etapa foi de fundamental importância para o início dos trabalhos, em que procurou-se conhecer a aplicação da técnica. Os objetivos principais foram a verificação do potencial de aplicação do speckle dinâmico em sementes, o domínio da tecnologia laser/óptica e a identificação de limites e variáveis que influenciavam os resultados. Muitos experimentos foram conduzidos com o intuito de conhecer o que ocorria com a semente, e estabelecer uma linha básica de conduta. Para visualizar áreas de diferentes níveis de deterioração em uma semente, como ocorre no Teste do Tetrazólio, iniciou-se com o estudo da variação do speckle na secagem de pintura, que serviu de parâmetro para a configuração experimental. Um segundo passo, após a definição da configuração experimental com a secagem de pintura, foi buscar identificar em sementes áreas internas que apresentassem constituição bem distinta, como é o caso de tecido vivo e morto. A semente utilizada foi a de milho, na qual, é possível separar embrião de tecido de reserva. A comparação da técnica de Speckle Dinâmico com o Teste do Tetrazólio foi a terceira etapa desta fase, e buscou correlacionar os resultados de um teste conhecido com o proposto.

### 4.2.1 Secagem de Pintura

O experimento com a secagem de pintura foi realizado no Laboratório de Informática do Departamento de Solos (UFLA). Este experimento definiu uma montagem ( configuração experimental ) que serviria de base para a utilização também em sementes. Para tanto utilizaram-se:

- a) laser de diodo
- b) câmara CCD digital
- c) microcomputador com software básico para tratamento de imagem
- d) lentes

O desafio era registrar a acomodação da camada de tinta de forma diferenciada em uma superfície com uma fina lâmina de tinta a óleo. A diferença na acomodação da tinta foi conseguida pela irregularidade introduzida na superfície por meio de uma punção. Assim, onde existia maior volume de tinta, ocorria uma secagem mais lenta. A diferenciação das áreas de atividade diferentes ( secagem ) foi implementada pelo Método de Diferenças Generalizadas. Pela Figura 4.1 verifica-se como foi conseguida a depressão na superfície da chapa de alumínio, e na Figura 4.2 constata-se o esquema da montagem para a iluminação laser e a captura das imagens.

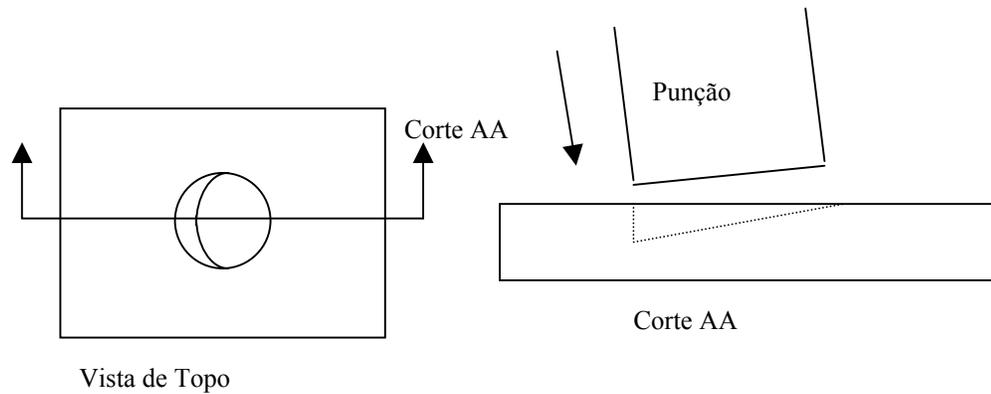


Figura 4.1 Detalhe de preparação da chapa de alumínio

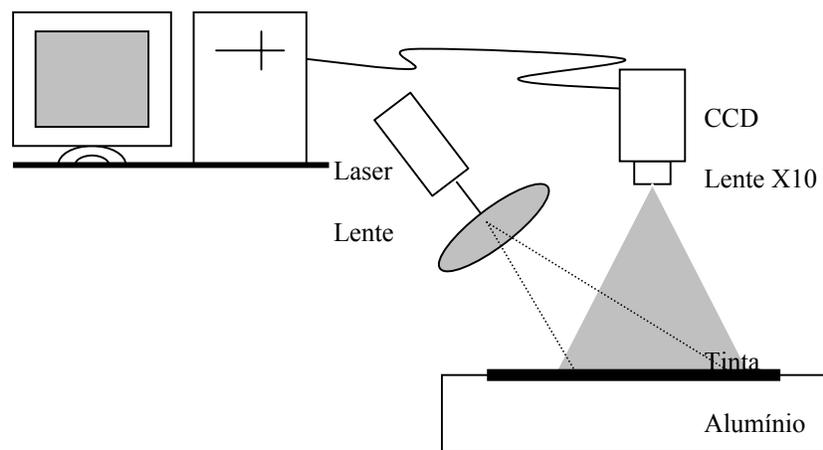


Figura 4.2 Esquema básico de iluminação da chapa pintada

Após pintar a superfície com uma fina lâmina de tinta óleo, foi necessário esperar um tempo para que a grande quantidade de produtos voláteis se desprendessem, o que poderia mascarar o resultado. O tempo utilizado foi de 10 minutos, obtido de forma empírica após inúmeras repetições. O laser, que já estava ligado para evitar transitórios, foi direcionado e iluminou a superfície, e as imagens foram capturadas por uma câmera CCD digital, com aumento de 10 vezes. O registro foi realizado tomando-se várias imagens com intervalo

entre elas de 1,4 segundos perfazendo um total de 60 imagens. Iniciou-se então a fase de processamento das imagens, em que a técnica proposta foi a de Diferenças Generalizadas. Esta metodologia foi implementada pelo desenvolvimento de um programa editado dentro do aplicativo computacional ImagePro, constituindo-se assim em uma macro.

#### **4.2.1 Aplicação em Sementes**

Este experimento foi realizado no Laboratório de Informática do Departamento de Solos da UFLA, e contou com o mesmo aparato do experimento com secagem de pintura. Na Figura 4.3 verifica-se o esquema da montagem utilizado.

A metodologia foi a mesma realizada na observação da secagem de pintura, exceto pelo material a ser iluminado. Nesse caso, a semente escolhida foi a de milho, na qual existe duas regiões distintas : o embrião e o tecido de reserva. O embrião apresenta vida e o tecido de reserva não, permitindo, assim, o teste da metodologia do speckle dinâmico.

Para observar via speckle dinâmico, a semente deve ser cortada longitudinalmente após sua embebição em água. O umedecimento da semente é necessário para aumentar a atividade da semente, além de facilitar seu corte e, quando for o caso, prepará-la para a embebição na solução de tetrazólio.

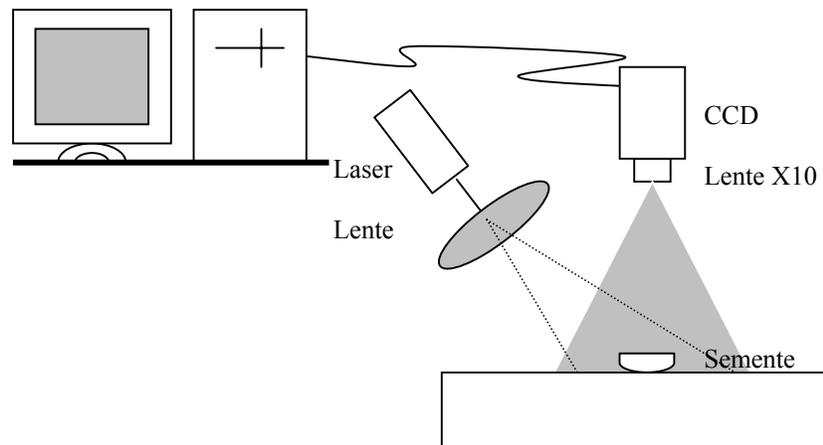


Figura 4.3 Esquema básico de iluminação da semente

Após ser cortada, a semente ficou exposta ao ambiente para eliminar o efeito transitório ocorrido após o corte. Para maior confirmação dos resultados, introduziu-se na semente uma impureza de material inerte ( fragmentos de látex ).

O passo seguinte após a identificação de áreas com atividades conhecidas em uma semente com áreas de tecido vivo e morto, baseou-se na avaliação da metodologia para diferenciar áreas com danos dentro do embrião. Nesse caso, o desafio foi observar a morte de uma área de um tecido vivo. O experimento foi realizado no Laboratório de Óptica de CIOp - La Plata Argentina, utilizando-se sementes de milho e soja. A referência neste experimento foi o teste do tetrazólio, conduzido após a iluminação de cada semente. O procedimento utilizado foi :

- a) embebição da semente em água por 12 h;
- b) corte;
- c) evaporação da água em excesso por 2 horas;
- d) realização da iluminação laser, coleta de 100 imagens;
- e) embebição no tetrazólio.

Foram analisadas 10 sementes de milho e 10 sementes de soja, sendo que as sementes de milho foram cortadas longitudinalmente e as de soja separando os cotilédones. As imagens foram analisadas pelo método proposto por FUJII et al. (1987) e a montagem utilizada foi semelhante àquela implementada na UFLA, utilizando um laser de HeNe ( 632 nm ).

### 4.3 Efeito da Umidade

Este experimento buscou avaliar a influência da umidade da semente no speckle dinâmico. A avaliação deste efeito foi então conduzida por meio de um experimento realizado no Laboratório de Óptica do CIOp. O experimento iniciou-se na UFLA com a determinação do teor de água na semente a ser ensaiada e com o estabelecimento da metodologia a ser adotada para a obtenção dos seus diversos teores de água. A semente escolhida foi a de feijão, em função de o mesmo apresentar um embrião que está presente em toda a semente, facilitando, assim, a iluminação e a coleta das imagens, o que não é possível na semente de milho.

O experimento utilizou um laser de He-Ne, lente de dispersão do feixe e um sistema de aquisição digital de imagem composto de uma câmera CCD (charge coupled device), processador de imagens, microcomputador e aplicativo computacional desenvolvido em C++ para tratamento de imagem, como mostrado esquematicamente na Figura 4.4.

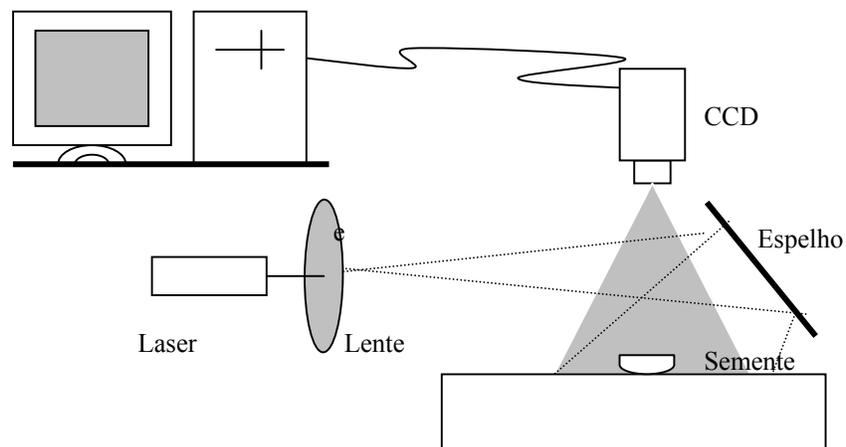


Figura 4.4- Esquema básico de experimento

As sementes de feijão analisadas foram colhidas um mês antes do experimento e seu teor de água determinado, colocando o lote em estufa por 24h a 105° Celsius, e comparando os pesos da amostra antes e depois da secagem. As sementes foram separadas em cinco lotes, sendo que cada um foi colocado em um nível de umidade conhecido (13, 20, 30, 37, 46 % b.u). Os níveis de umidade foram obtidos em uma estufa com circulação forçada de ar, regulada em 35° Celsius, controlando-se a perda de peso. Para tanto, foi realizada uma embebição dos lotes em papel de germinação por 16 horas. O lote com o nível de 13% b.u. foi separado antes do umedecimento, enquanto o lote com o nível de 46% b.u. foi obtido imediatamente após o umedecimento. Durante o umedecimento, usou-se Captam, na dosagem 1:1000 (p/p), com o objetivo de evitar a ocorrência e a interferência de fungos nos resultados. Os níveis intermediários foram obtidos a partir da secagem controlada, pesando-se o lote de semente a cada minuto, verificando assim sua perda de peso. Cada unidade amostral foi composta de cinco sementes, sendo que cada semente foi iluminada 3 vezes consecutivas com o objetivo de permitir a eliminação de algum efeito transitório. E a repetição para cada nível de umidade foi de três vezes. Para proceder à iluminação, foram retiradas, aleatoriamente, cinco sementes de cada nível de umidade. Cada semente foi dividida em seus dois cotilédones, recobrando-se um dos cotilédones com o filme de pvc. As imagens obtidas foram processadas a partir do STS formado após a aquisição de 512 imagens de cada semente. O nível de atividade foi obtido pela determinação do momento de inércia, segundo ARIZAGA et al (1999).

O recobrimento com o filme de pvc foi utilizado para buscar conhecer a interferência da evaporação. O lote de semente utilizado foi avaliado previamente pelo método do Tetrázólio indicando alto vigor, permitindo, assim, um trabalho com material mais uniforme e com comportamento conhecido.

Além da análise dos resultados do momento de inércia, os mesmos foram tratados de forma a apresentar a autocorrelação, que também foi avaliada estatisticamente.

O delineamento estatístico usado foi o fatorial inteiramente casualizado, sendo que os efeitos dos tratamentos foram avaliados de acordo com a técnica da análise de variância, que permite a realização de um teste de significância ao nível de 5% para a hipótese de não existir diferenças entre os tratamentos, GOMEZ E GOMEZ (1984).

Todos os dados foram analisados antecipadamente para a verificação das hipóteses que devem ser satisfeitas para a realização da Análise de Variância. Quando o erro não apresentou uma distribuição diferente da distribuição Normal, os dados foram transformados segundo algumas funções conhecidas.

## 4.4 Experimentos Complementares

Os experimentos complementares apresentaram caráter exploratório, servindo como uma referência e motivação para trabalhos futuros.

### 4.4.1 Tetrazólio *versus* Speckle Dinâmico

A comparação dos resultados do speckle dinâmico com o Teste do Tetrazólio foi um procedimento que até o momento tem sido considerado importante para obter uma referência nas análises dos resultados. O desafio, então, foi preparar um experimento que permitisse identificar em um dos cotilédones da semente, por meio do Teste do Tetrazólio, um dano que pudesse estar presente também no outro cotilédone, que seria, então, iluminado pelo laser e avaliado pelo speckle dinâmico.

Apesar de considerar que este experimento deva ser realizado somente quando estiverem dominadas as diversas questões que ainda envolvem a aplicação da técnica, essa comparação visa a buscar um estímulo, pois caso exista alguma semelhança entre os métodos, ficaria mais fácil justificar e motivar os trabalhos.

O experimento constou da análise de 20 sementes de feijão em um lote que já estava colhido há um ano e, nesse caso, apresentava maior probabilidade de encontrar danos nas mesmas. As sementes foram embebidas por 12 horas em água, e cortadas de forma a separar seus cotilédones, sendo que um foi colocado em tetrazólio por 4 horas, e o outro colocado em água destilada devidamente identificado. Após 4 horas de imersão na solução de tetrazólio, foram separados os cotilédones que apresentaram danos simétricos. Dessa forma, com a garantia de existência de dano, a parte que não passou pelo tetrazólio foi iluminada e analisada pela metodologia do speckle dinâmico.

Na Figura 4.5 pode ser visto que alguns danos são simétricos nas sementes de feijão e que permitem esse tipo de metodologia.

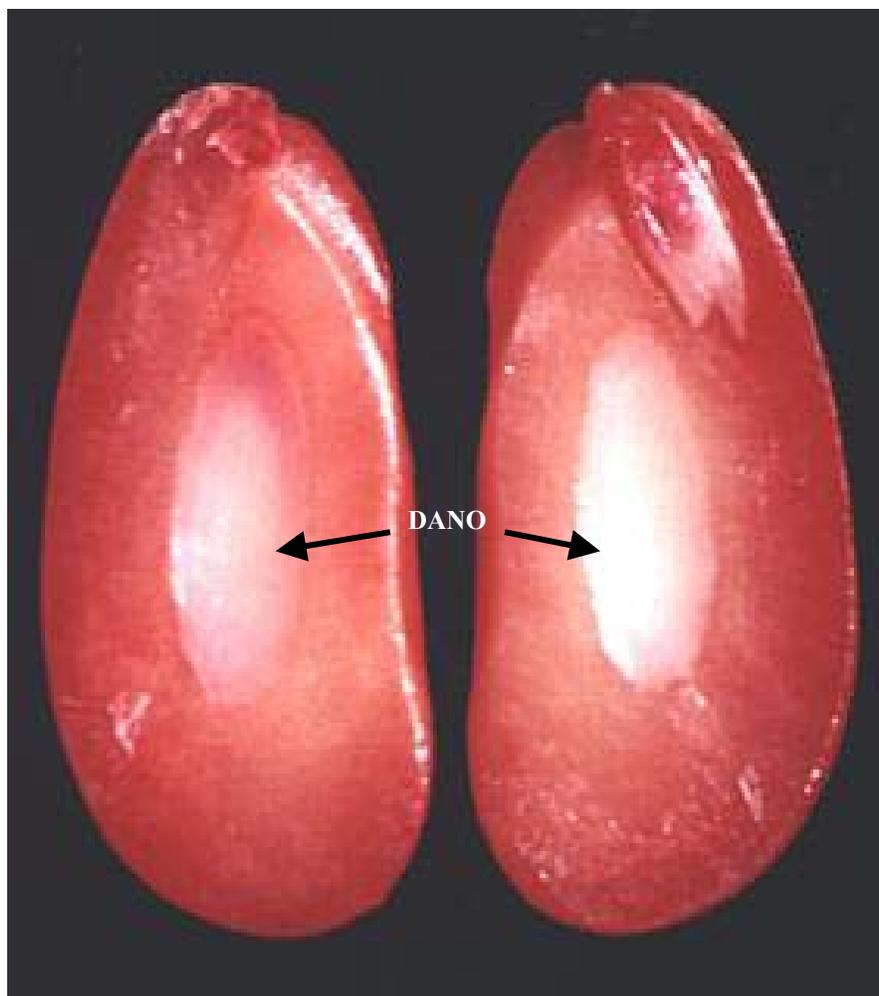


Figura 4.5 Dano Simétrico

Para avaliar se o dano que fica nas camadas mais superficiais do cotilédone sofre interferência das partes internas da semente e até mesmo das laterais, foi realizado um corte na semente de forma a deixar uma lâmina que contivesse apenas o dano. Na Figura 4.6 pode ser observado um cotilédone com a simulação do efeito das outras camadas e o corte da lâmina.

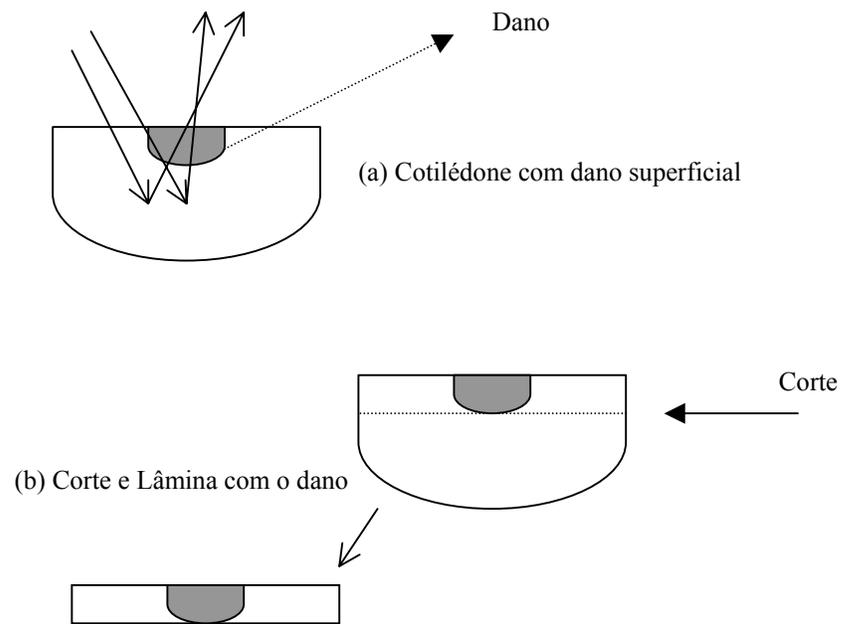


Figura 4.6 Simulação da contribuição de camadas inferiores (a), e corte de uma camada delgada da semente(b)

#### **4.4.2 Semente Morta e Semente viva**

Na avaliação, a atividade de uma semente viva com uma semente morta foi implementada por um experimento que consistiu em avaliar a diferença de atividade dessas sementes. As sementes mortas foram conseguidas em um lote que estava há muito tempo armazenado e que, após o teste do tetrazólio em uma unidade amostral de 100 sementes, comprovou-se que o lote tinha baixo vigor. O lote de sementes chamadas vivas foi obtido de sementes com um mês após a colheita e também testadas pelo teste do Tetrazólio. Os cotilédones das sementes mortas foram colocados juntos aos das sementes vivas ( com alto vigor ) e então iluminados com laser HeNe na mesma configuração experimental utilizada para análise do efeito da umidade. Todos estavam com o mesmo teor de água, isto é, em torno de 35% b.u.. As imagens foram tratadas com os Métodos de Diferenças Generalizadas e Fujii.

#### **4.4.3 Sementes com tempos de umedecimento diferentes**

Este experimento buscou verificar o resultado da iluminação laser em sementes com tempos de umedecimento diferentes. Foram iluminadas as sementes que foram colocadas em papel umedecido por 2 e 12 horas e também sementes sem o umedecimento. As sementes foram colocadas juntas para serem iluminadas utilizando a mesma configuração experimental da avaliação do efeito de umidade, sendo as imagens tratadas pelos Métodos de Diferenças Generalizadas e Fujii.

#### **4.4.4 Evaporação em semente viva e morta**

Este experimento procurou visualizar a diferença da atividade medida pelo speckle dinâmico para semente morta e semente viva em processo de perda de água para o ambiente. Dois cotilédones de feijão, de semente viva e morta, foram colocados em água e depois de 12 horas de umedecimento foram iluminados por 240 minutos, com intervalos de medição de 10 minutos entre cada uma. A configuração experimental foi a mesma da avaliação do efeito de umidade, sendo o nível de atividade de cada semente avaliado segundo o Método de Momento de Inércia.

#### **4.4.5 Avaliação da transmissão do laser pela semente**

Este experimento avaliou o grau de transmissão da luz laser pelo tecido da semente. Foram iluminadas 5 sementes cortadas em 3 espessuras diferentes, aproximadamente 1mm, 2mm e 4mm, respectivamente, utilizando 2 níveis de teor de água, 9.5%b.u. e 25%b.u. Na Figura 4.7 pode ser vista a configuração experimental montada na UFLA e utilizada para iluminar a semente, sendo que a mesma foi colocada sobre um anteparo com um pequeno orifício visando a eliminar o efeito da fonte do laser. A imagem da semente iluminada foi coletada por uma câmara CCD que, por meio do Programa Image Pro, permite saber o nível de cinza existente na imagem capturada.

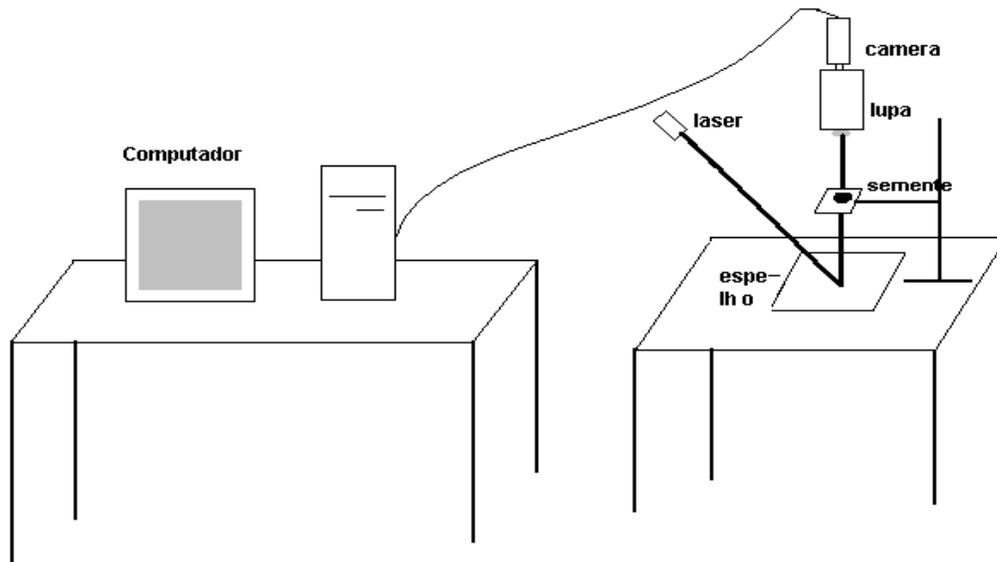


Figura 4.7 Esquema básico do experimento de transmissão

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Investigação de Viabilidade de Uso do Speckle Dinâmico

#### 5.1.1 Secagem de Pintura

Este experimento mostra a capacidade de diferenciar áreas de atividades distintas; neste caso, relativas à diferenciada secagem da tinta. A área de maior deposição de tinta pode ser visualizada na Figura 5.1, pela área mais clara, evidenciando maior atividade. Esse resultado serviu de base para a montagem de uma configuração experimental para ser adotada em sementes. O resultado pode ser visto na Figura 5.1.

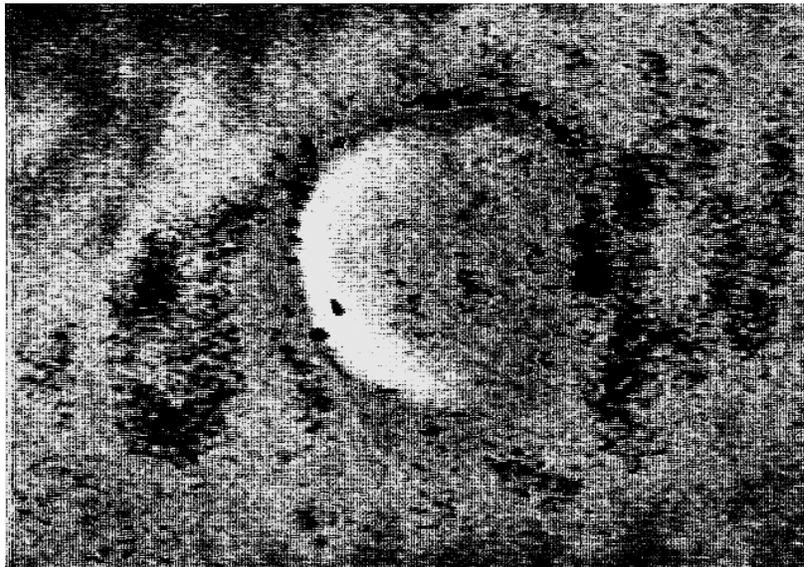


Figura 5.1 - Imagem Processada de experimento de secagem de pintura

Um experimento como este exige cuidados, como o tempo adequado para observar o fenômeno, o processamento da imagem para evitar mascaramento de resultado em função do número de imagens utilizadas e a velocidade de captura de imagens. Todas essas variações foram testadas antes de conseguir chegar ao resultado mostrado na Figura 5.1.

Neste caso, o tempo para iniciar a coleta de imagens foi estabelecido baseando-se em testes preliminares, sendo definido em 10 minutos. Esse tempo foi suficiente para que a lâmina de látex se estabilizasse do ponto de vista de volatilização mais instensa de solvente. No processamento das imagens, observou-se que, ao avaliar movimento relativo de áreas, um maior número de imagens nem sempre é a melhor alternativa. Neste caso, o que se fez foi utilizar apenas 30 imagens. Com 60 imagens, o resultado mostrava-se como um padrão muito claro ( nível de cinza ), sem definição de áreas, o que não ocorreu com 30 imagens como observado na Figura 5.1. A explicação deve-se ao fato de que o tempo de aquisição de imagens foi muito lento (1,4s), o que resultou em uma dificuldade em observar o fenômeno por muito tempo (mais imagens). Apesar de uma área estar movimentando mais que a outra, como toda a tinta estava em processo de acomodação ao processar as imagens pelo Método de Diferenças Generalizadas, o que se observou foi que ambas saturaram ( branco ). Essa é uma informação importante para estudo de movimento relativo muito próximos.

Esses resultados serviram de base para a aplicação em sementes, além de permitir maior contato com a tecnologia e suas peculiaridades.

### **5.1.2 Aplicação em Sementes**

Os experimentos com sementes, baseados na experiência obtida com a secagem de pintura, podem ser resumidos na Figura 5.2, que apresenta uma dessas sementes com a área iluminada marcada pelo retângulo. A área iluminada representa a transição entre o embrião e o endosperma.

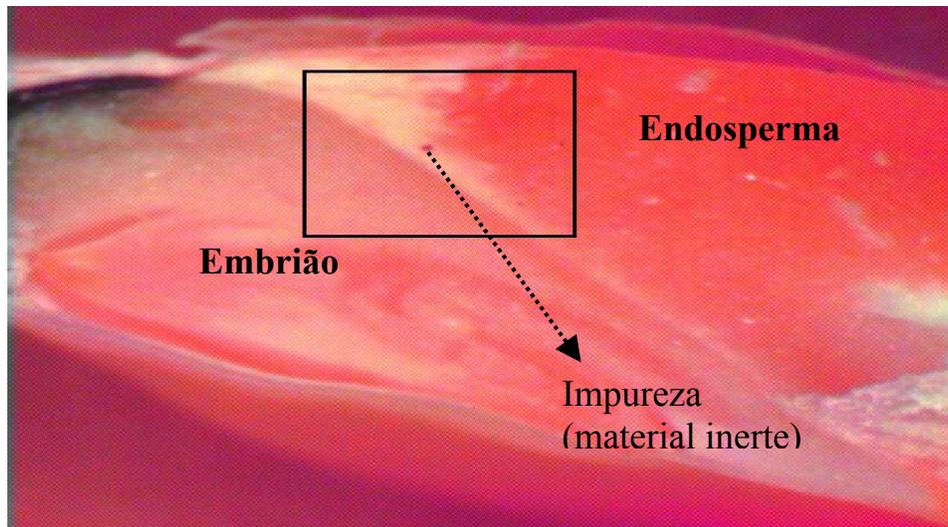


Figura 5.2 – Semente de milho com a região iluminada pelo laser dentro de um retângulo

Após o processamento das imagens pelo Método de Diferenças Generalizadas, observou-se um padrão de cinza mais claro na área com tecido embrionário ( vivo ), e cinza mais escuro na área do endosperma ( morto ), o que é mostrado na Figura 5.3.

Esse é um resultado que evidencia a possibilidade de mapear áreas ou tecidos de diferentes comportamentos metabólicos e que apontam para a possibilidade de correlacionar movimento resultante de diferentes níveis de atividade biológica com nível de cinza após processamento das imagens. Observa-se também a presença de pequenas áreas mais escuras no centro, indicando a presença de material inerte colocado com a intenção de mostrar mais um nível de atividade.

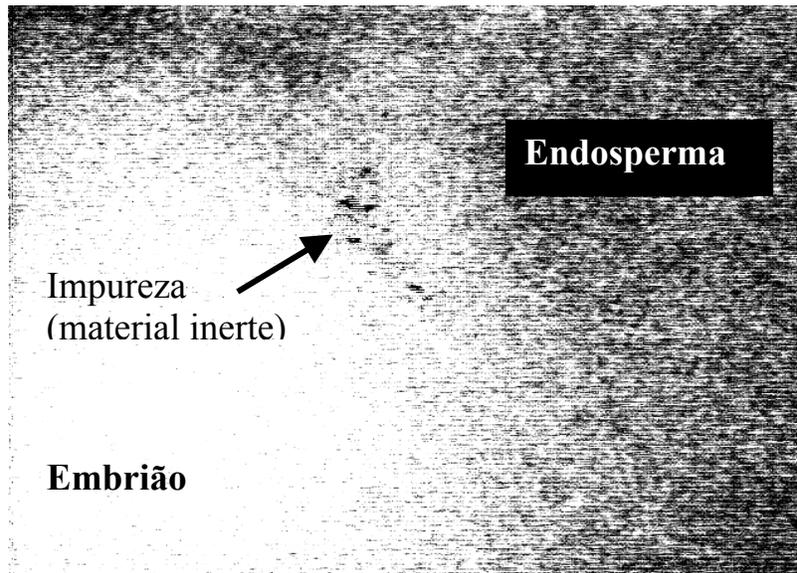


Figura 5.3 – Resultado do processamento da área iluminada pelo laser

Uma vez identificadas as áreas com níveis de atividade conhecidamente diferentes, o maior desafio passou a ser então identificar em um mesmo tecido (região viva da semente) áreas de movimento relativo bem similar, mas que, por exemplo, pelo teste do tetrazólio, apresentam tecidos em diferentes graus de deterioração.

Os resultados obtidos na Argentina repetiram os que foram conseguidos no Brasil, diferenciando áreas com diferentes composições.

Na Figura 5.4 observa-se uma semente de milho após o teste do Tetrazólio e a sua imagem processada pelo Método de Fujii. É possível observar o embrião e o endosperma pelo processamento segundo o Método de Fujii, sendo que o embrião se apresenta de forma mais clara e o endosperma mais escuro. Observa-se também maior claridade no local da trinca do milho, local onde, a princípio, não era esperado nenhuma atividade, mas que levou a hipótese da influência da evaporação, uma vez que nesse local a troca de vapor de água com o ambiente é mais intenso. Com a metodologia adotada, não foi possível observar nenhum dano no embrião das sementes de milho pelo Teste do Tetrazólio que permitisse comparar com a análise do speckle dinâmico.

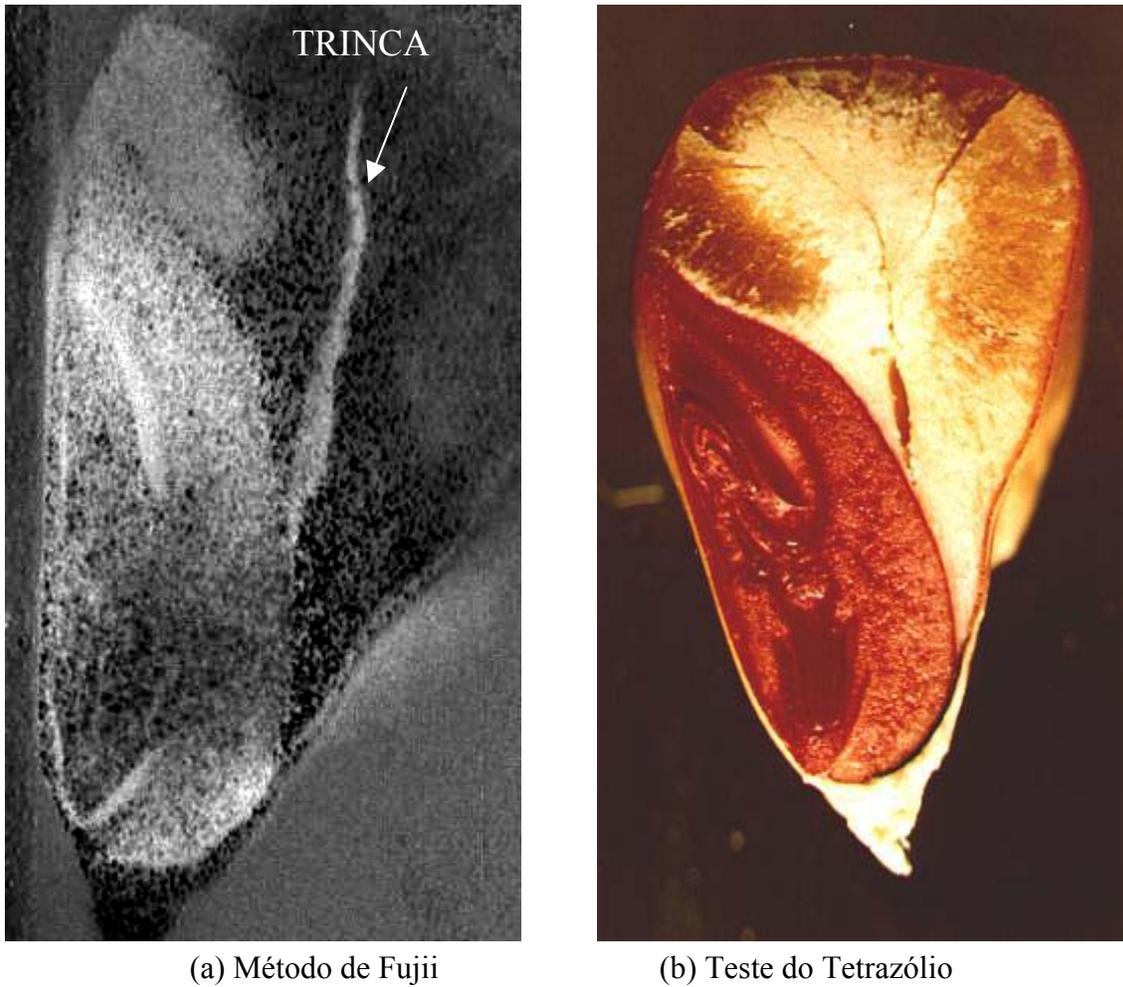


Figura 5.4 Semente de Milho Processada pelo (a) Método de Fujii e pelo (b) Tetrazólio

Para as sementes de soja, foi possível identificar pelo Teste do Tetrazólio, em duas delas, graves danos que deveriam estar apontados como áreas escuras no teste do Speckle Dinâmico, o que não ocorreu.. Isso pode ser observado nas Figuras 5.5 e 5.6.

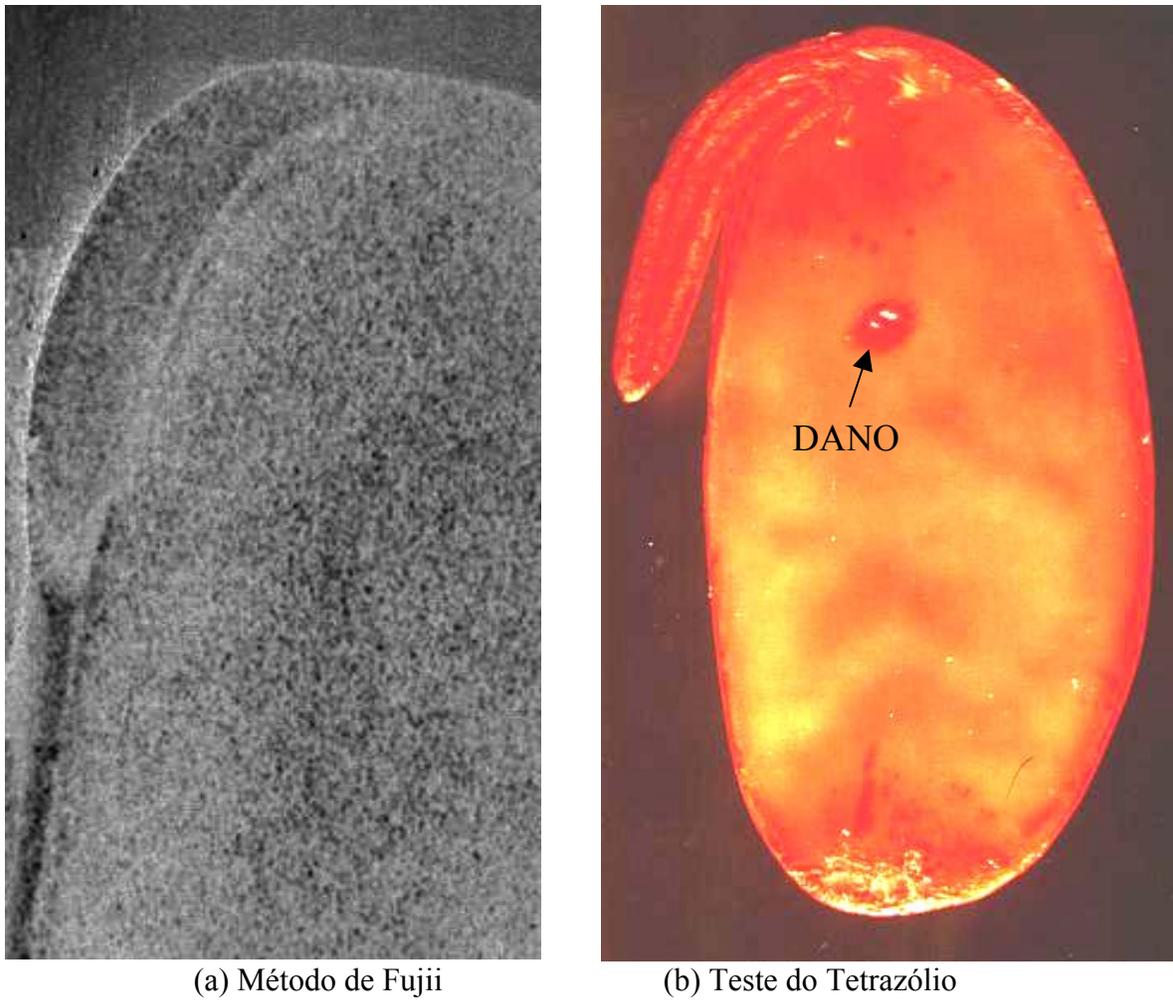
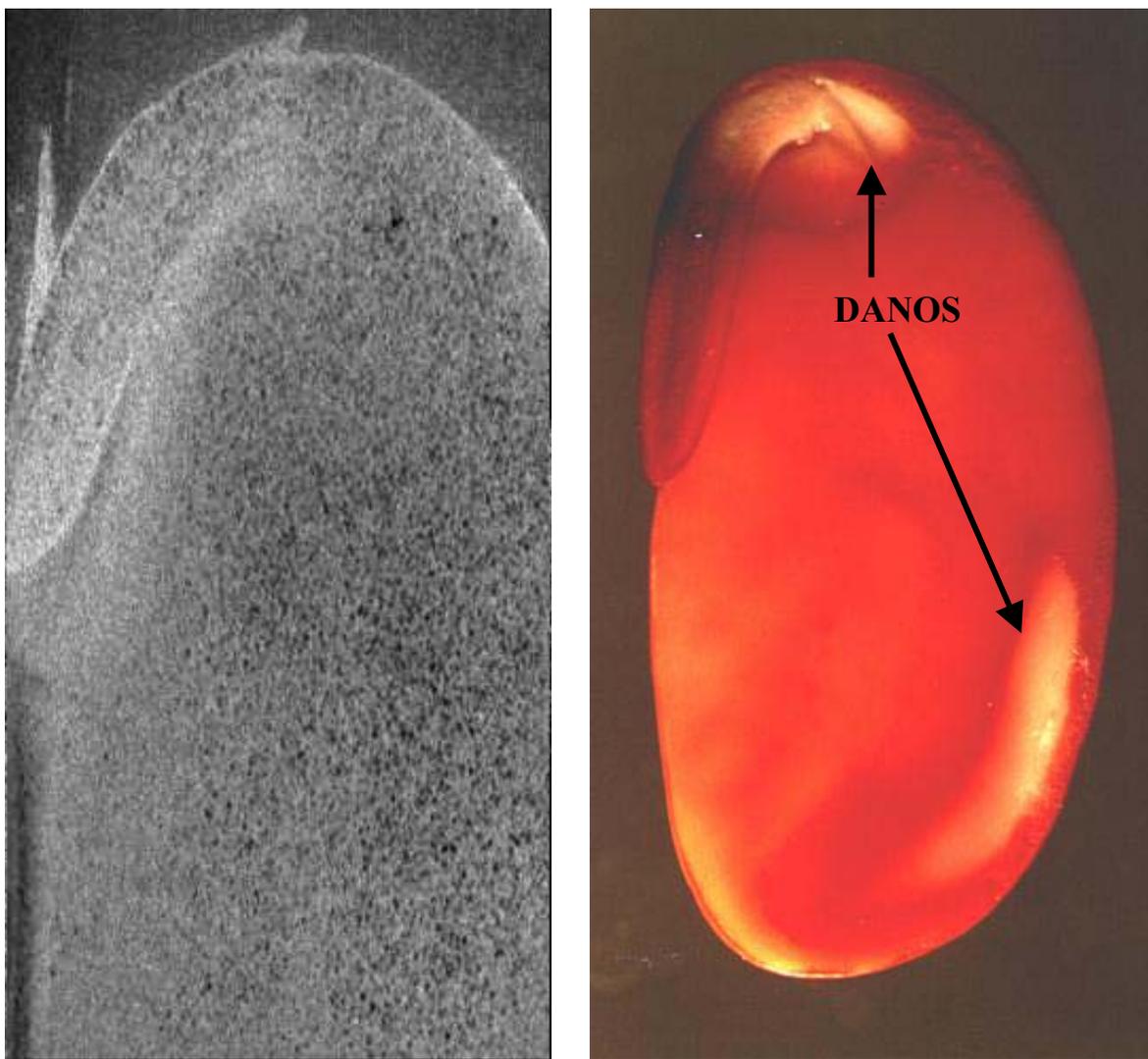


Figura 5.5 Semente do Soja processada pelo Bio-Speckle e com o Tetrazólio



(a) Método de Fujii

(b) Teste do Tetrazólio

Figura 5.6 Semente de Soja processada pelo (a) Método de Fujii e pelo (b) Tetrazólio

## 5.2 Efeito da Umidade

Os resultados relativos ao experimento que avaliou o efeito da umidade no speckle dinâmico de sementes podem ser resumidos pela Análise de Variância dos valores de Momentos de Inércia. Os resultados obtidos com base nas curvas de autocorrelação também foram avaliados, porém não satisfazem os critérios para a implementação da Análise de Variância que, neste caso, foi a não-normalização dos erros

Na Tabela 5.1 pode-se observar a Análise de Variância para os valores de Momento de Inércia transformados pela função  $\ln$ .

Tabela 5.1. Análise de Variância para  $\ln$ (Momento de Inércia)

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Umidade	4	52.672920	13.168230	23.501	0.0000
Filme	1	19.901556	19.901556	35.518	0.0000
Umidade*Filme	4	8.733335	2.183334	3.897	0.0169
Erro 1	20	11.206540	0.560327		
Tempo	2	0.244462	0.122231	93.249	0.0000
Tempo*Umidade	8	0.055210	0.006901	5.265	0.0002
Tempo*Filme	2	0.008202	0.004101	3.128	0.0547
Tempo*Umidade*Filme	8	0.017595	0.002199	1.678	0.1340
Erro 2	40	0.052432	0.001311		

Total corrigido

89

CV 1 (%) = 21.99

CV 2 (%) = 1.06

Média geral: 3.4042883      Número de observações: 90

Sendo que

- FV - Fonte de Variação
- GL - Grus de Liberdade
- SQ - Soma de quadrados, que é a soma dos quadrados das diferenças entre cada observação e a média geral do experimento
- QM - Quadrados Médios, que é obtido pela razão entre a Soma de Quadrados e o respectivo número de Graus de Liberdade

- Fc - Valor de F calculado
- Pr>Fc - Nível de significância
- CV - Coeficientes de Variação

Baseando-se na análise de variância, foi constatado significância na interação Umidade e Filme, ao nível de 5% de probabilidade, como também na interação Tempo de Exposição e Umidade, ao nível de 1% de probabilidade. Esses resultados confirmam a hipótese de que a umidade influencia no speckle dinâmico. Essas informações são melhor entendidas nos desdobramentos apresentados a seguir.

A análise de variância do desdobramento de Umidade dentro de cada nível de Filme (com e sem filme) é apresentada na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Análise de Variância para o desdobramento de Umidade em cada nível de Filme

<b>FV</b>	<b>Filme</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
Umidade	Sem	4	48.173800	12.043450	21.494	0.0000
Umidade	Com	4	13.232454	3.308114	5.904	0.0026
Resíduo		20	11.206540	0.560327		

A análise de regressão para o desdobramento de Umidade dentro da condição Sem Filme pode ser vista no Gráfico 5.1, e na condição Com Filme, no Gráfico 5.2.

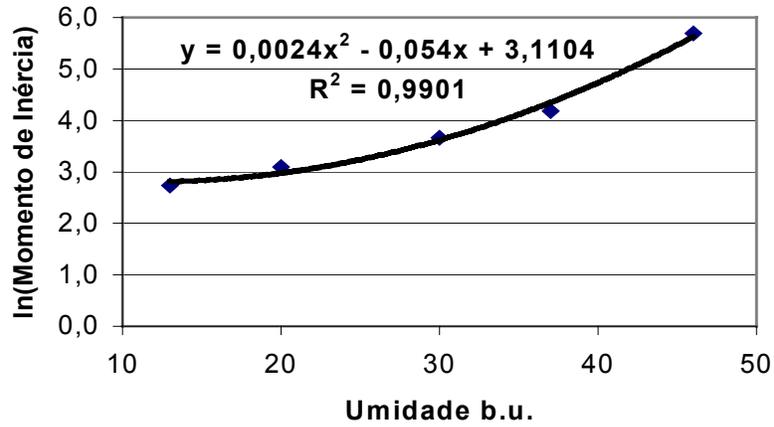


Gráfico 5.1 - Análise de regressão para o desdobramento de Umidade dentro da condição Sem Filme

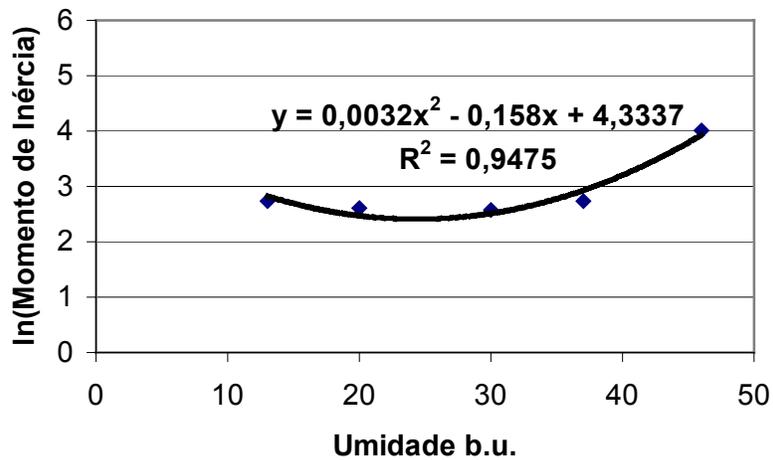


Gráfico 5.2 - Análise de regressão para o desdobramento de Umidade dentro da condição Com Filme

Nos Gráficos 5.1 e 5.2 observa-se a diferente evolução do Momento de Inércia, transformado pela função  $\ln$ , para o tratamento Filme nos 5 níveis de umidade, evidenciando que o filme influenciou na evaporação que, portanto, deixou de afetar o speckle dinâmico.

Um desdobramento do tratamento Filme dentro de cada nível de Umidade também foi implementado e analisado segundo o método de t de Student, que é um método para análise de comparações múltiplas. A Análise de Variância para esse desdobramento pode ser vista na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 Análise de Variância para o desdobramento de Filme em cada nível de Umidade

<b>FV</b>	<b>Umidade</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
Filme	13	1	0.000176	0.000176	0.000	0.9860
Filme	20	1	1.050966	1.050966	1.876	0.1860
Filme	30	1	5.343907	5.343907	9.537	0.0058
Filme	37	1	9.511910	9.511910	16.976	0.0005
Filme	46	1	12.727931	12.727931	22.715	0.0001
Resíduo		20	11.206540	0.560327		

O resultado dessa análise apresenta significância para os níveis de 30, 37 e 46 % de umidade. Neste caso, o efeito do filme nos níveis de 13 e 20% não foram significativos, uma vez que nesses casos a evaporação não está presente na intensidade que ocorre nos valores mais elevados de umidade. O teste de t de Student para esse desdobramento pode ser visto na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Teste de t de Student para o desdobramento de Filme em cada nível de Umidade

<b>Umidade b.u.</b>	<b>Filme</b>	<b>Médias</b>	<b>Resultado do teste</b>
13	Sem	2.734144	a1
13	Com	2.740394	a1
20	Sem	2.612533	a1
20	Com	3.095801	a1
30	Sem	2.575478	a1
30	Com	3.665219	a2
37	Sem	2.730940	a1
37	Com	4.184816	a2
46	Sem	4.010883	a1
46	Com	5.692676	a2

Na Tabela 5.4 os valores a1 e a2 indicam se as médias diferem ou não entre si; assim, se para um valor de umidade com e sem filme a média não alterou, a indicação vai ser repetida, mas se a média for diferente, a indicação será a1 para sem filme e a2 para com filme.

De forma ilustrativa, o Gráfico 5.3 apresenta a tendência das médias dos valores do Momento de Inércia para cada valor de umidade com e sem filme. Observa-se então que sem o filme as sementes apresentam níveis de atividade diferentes e de forma tendenciosa, indicando que quanto maior a umidade maior o Momento de Inércia. Com o filme, o Momento de Inércia ficou estabilizado, indicando que a atividade observada antes sem o filme foi mais intensa e ascendente com o aumento da umidade, o que não ocorreu quando o filme foi colocado, reforçando e comprovando a hipótese da influência da evaporação.

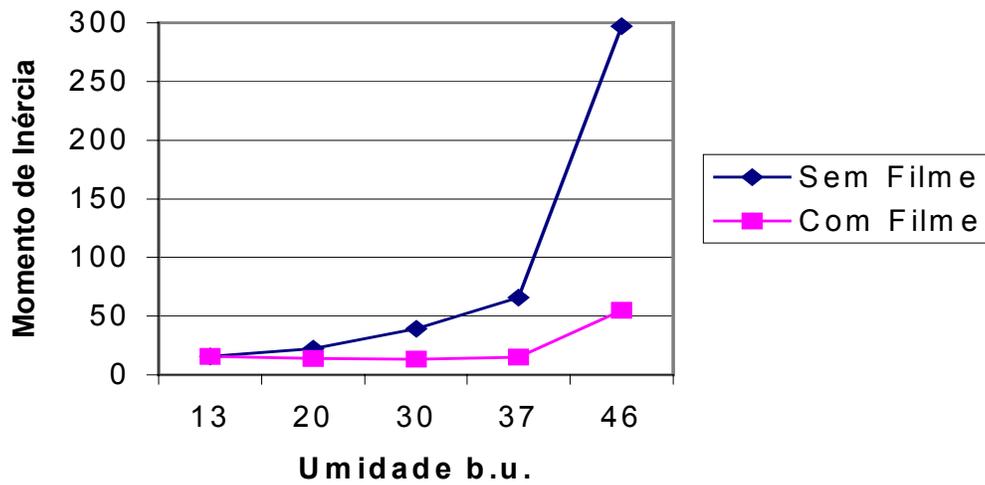


Gráfico 5.3 - Tendência das médias dos valores de Momento de Inércia para cada valor de umidade com e sem filme

O desdobramento do tratamento Tempo de Exposição dentro de cada nível de Umidade pode ser visto a nar da Tabela 5.5 com a Análise de Variância.

Tabela 5.5 Análise de Variância do desdobramento do tratamento Tempo de Exposição dentro de cada nível de Umidade

<b>FV</b>	<b>Umidade</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr &gt; Fc</b>
Tempo	13	2	0.000269	0.000134	0.102	0.9040
Tempo	20	2	0.074272	0.037136	28.331	0.0000
Tempo	30	2	0.077042	0.038521	29.388	0.0000
Tempo	37	2	0.075292	0.037646	28.720	0.0000
Tempo	46	2	0.072797	0.036398	27.768	0.0000
Resíduo		40	0.052432	0.001311		

Esses resultados evidenciam que, apesar de pequenos, os intervalos entre medições repetidas produzem alterações nos valores de momento de inércia, indicando um claro efeito da busca de equilíbrio nas sementes com teor de água diferente daquele encontrado em situação estável.

O resultado da análise mostra que a relação é significativa para todas as Umidades, exceto para a de 13% b.u.. Nos Gráficos 5.4 a 5.8 podem ser observadas as análises de regressão para esse desdobramento.

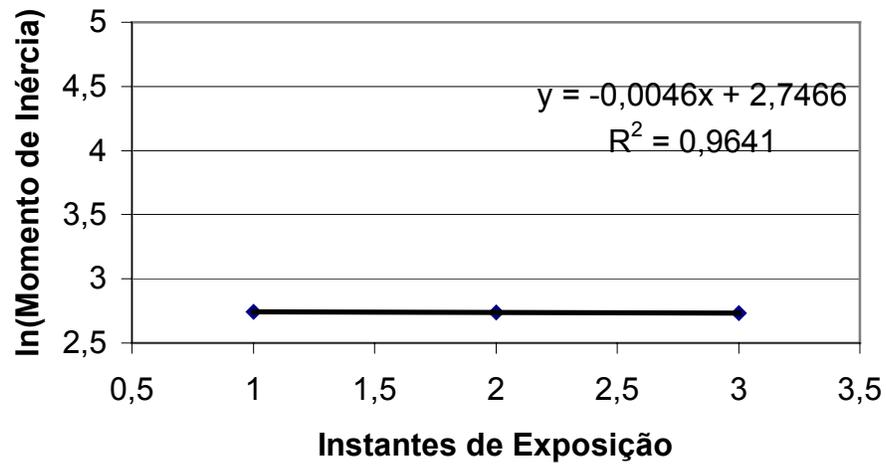


Gráfico 5.4 Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 13% b.u.

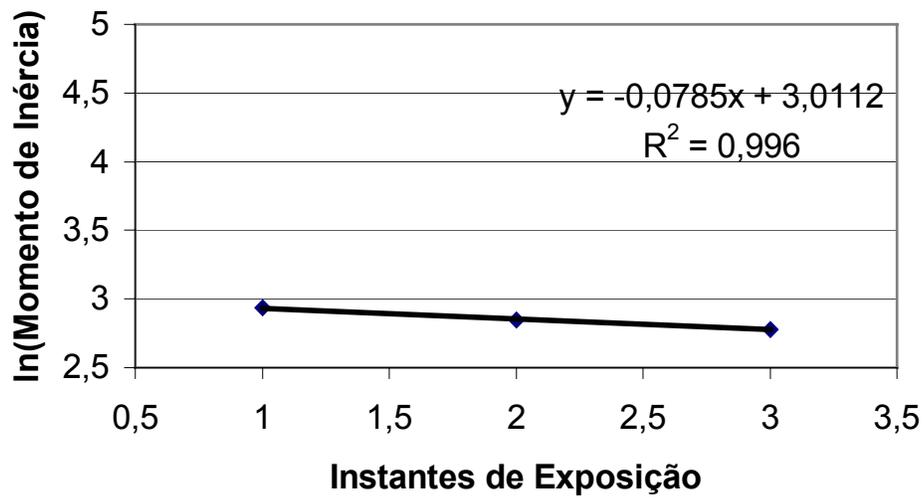


Gráfico 5.5 Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 13% b.u.

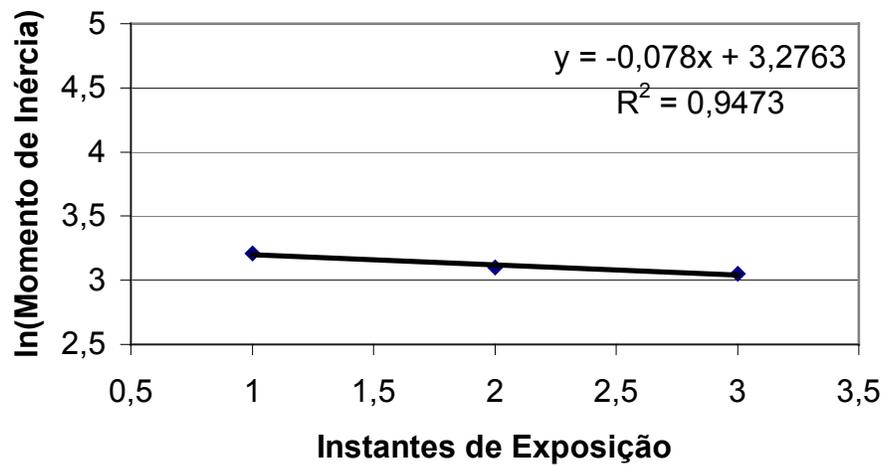


Gráfico 5.6 Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 30% b.u.

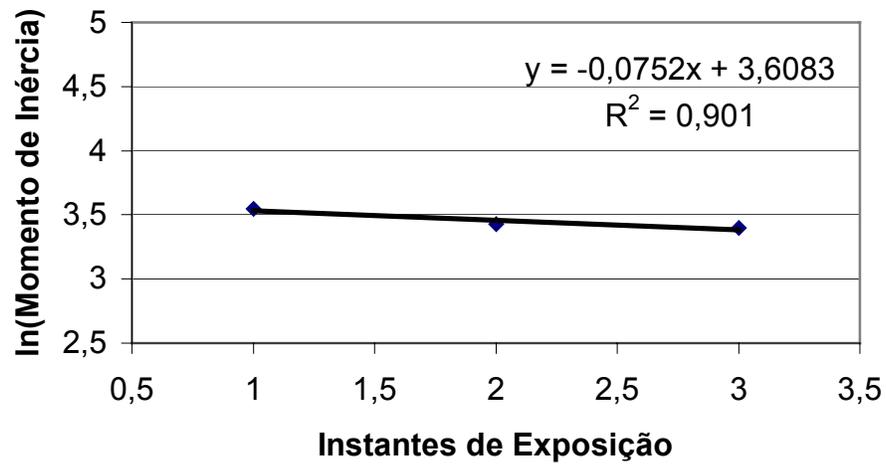


Gráfico 5.7 Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 37% b.u.

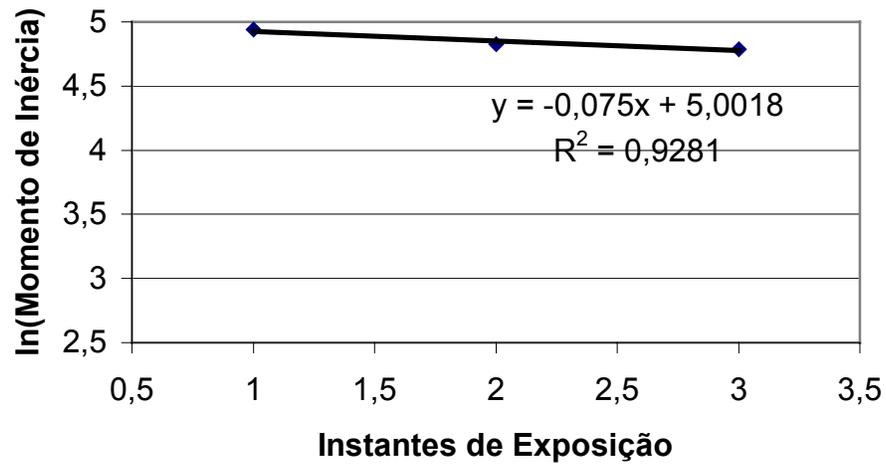


Gráfico 5.8 Regressão para o desdobramento de Tempo de Exposição para o nível de Umidade 46% b.u.

Os dados obtidos pela Autocorrelação também foram avaliados para verificar se o erro do modelo estatístico seguia um padrão de distribuição normal, o que é condição necessária para a análise de variância dos dados. Foi observado que os erros estavam em distribuição normal, porém com a ocorrência de curtosis, que é um fenômeno que apresenta um grande estreitamento dos erros em torno da média, ficando inviável realizar a análise de variância. Para resolver esse problema, aplicaram-se as funções  $\ln$ ,  $\sqrt{rt}$ ,  $\arcsin(\sqrt{rt})$ ,  $1/\sqrt{rt}$  nos dados, resultando em uma não-eliminação do fenômeno da curtosis. A Análise de Variância não foi implementada, uma vez que seus resultados não seriam confiáveis, mostrando que os valores de Autocorrelação, da forma como foram utilizados, não permitem analisar o fenômeno. No Gráfico 5.9 podem ser vistos os valores médios das curvas de autocorrelação.

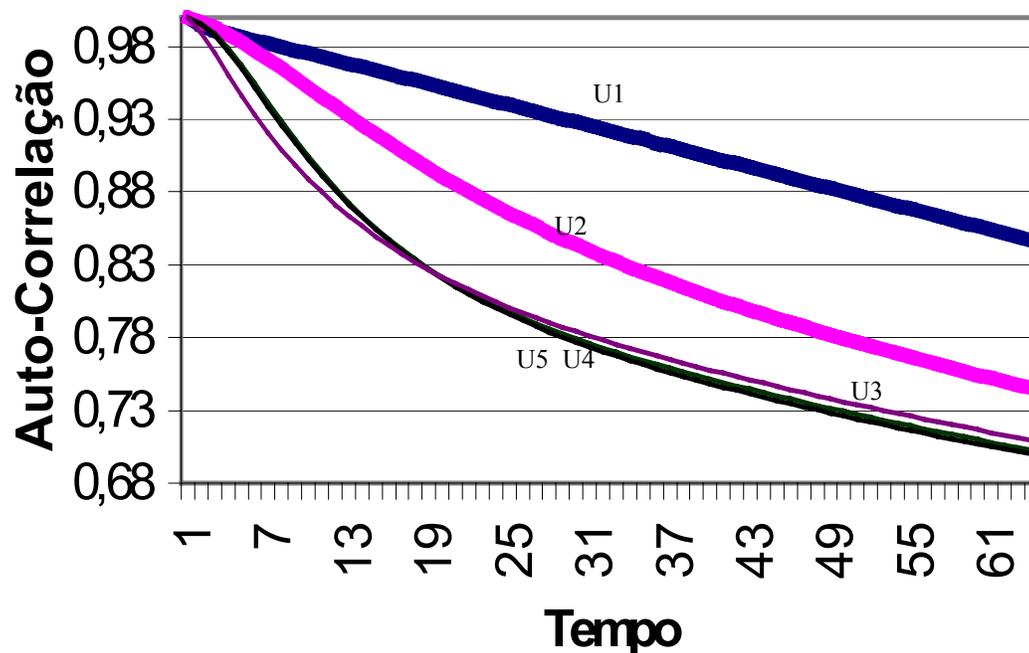


Gráfico 5.9 Valores médios das curvas de autocorrelação sem filme

Os padrões de STS analisados para a obtenção do Momento de Inércia e Autocorrelação podem ser vistos de forma ilustrativa na Figura 5.10, observando-se uma maior descontinuidade das linhas para os dados de maior umidade. Os gráficos que reproduzem a matriz de ocorrência podem ser vistos no Anexo A.

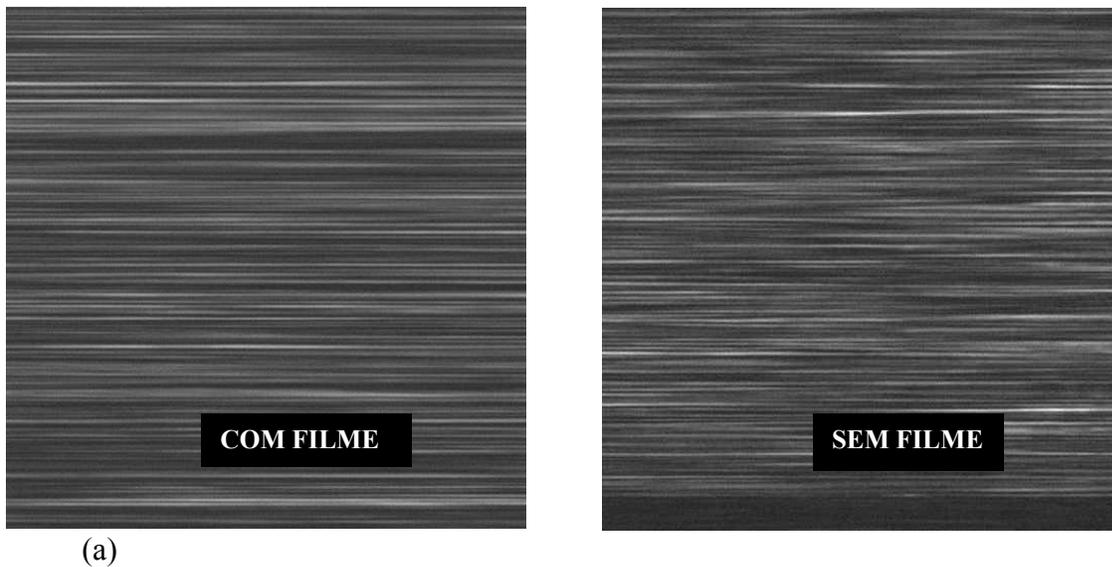


Figura 5.7 STS de sementes com diversas umidades e com e sem filme (a) sementes na umidade de 13% b.u. ,

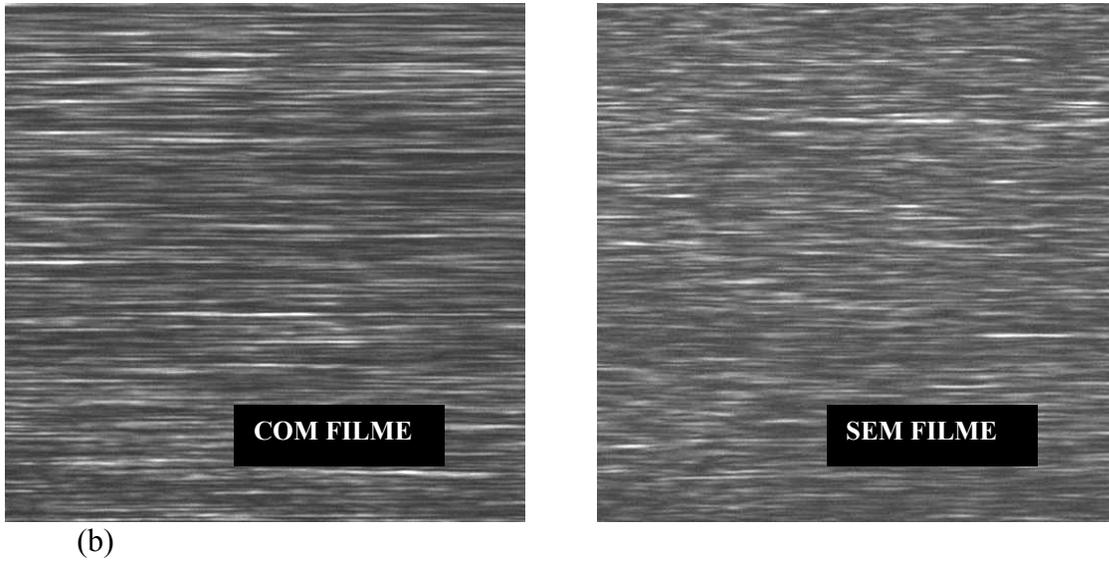


Figura 5.7 STS de sementes com diversas umidades e com e sem filme (b) sementes na umidade 20% b.u. ,

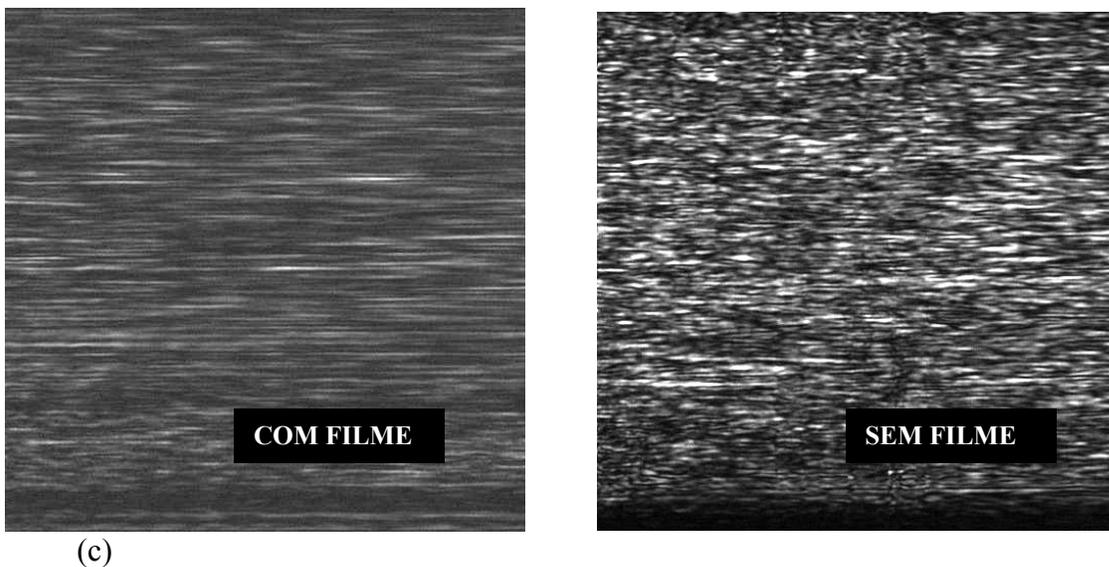
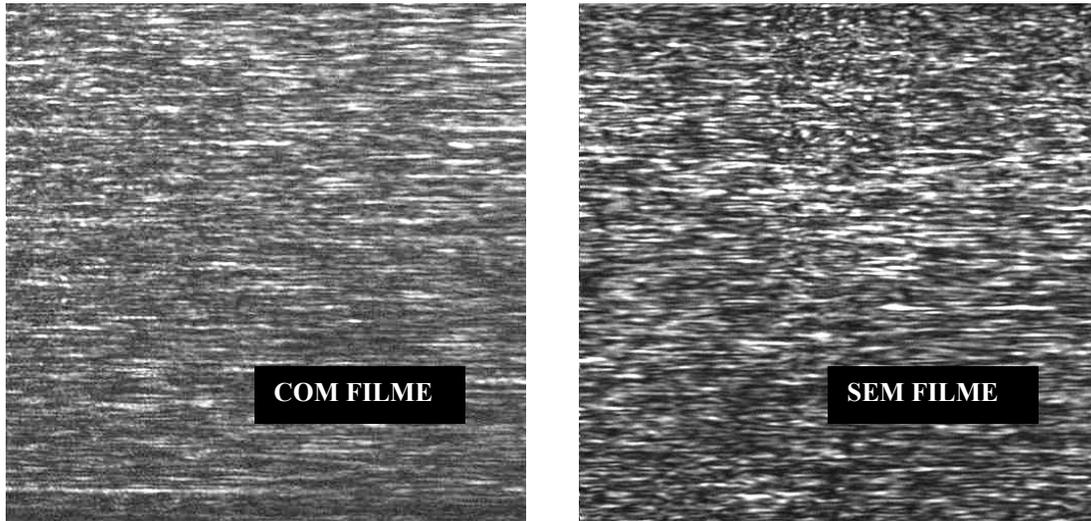
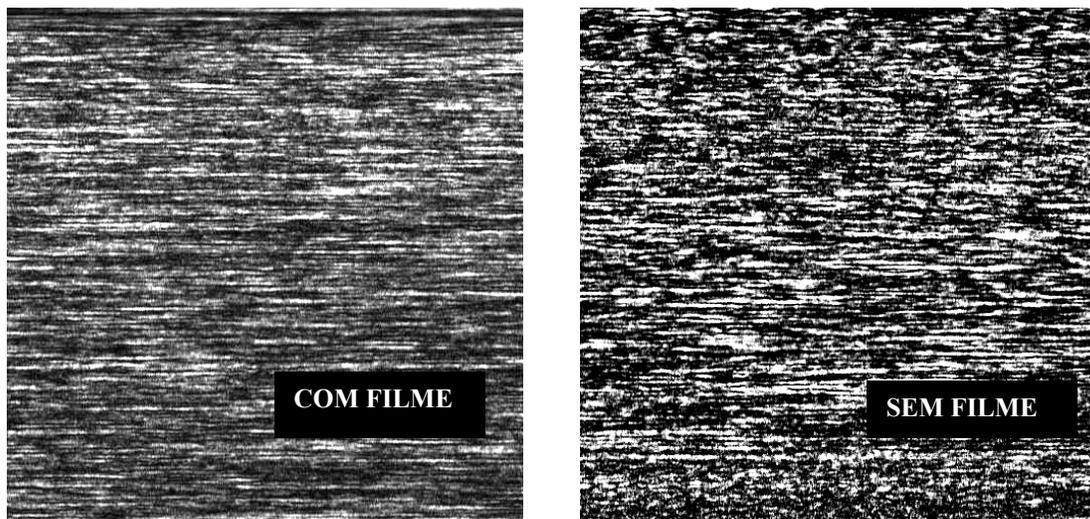


Figura 5.7 STS de sementes com diversas umidades e com e sem filme (c) sementes na umidade 30% b.u. ,



(d)

Figura 5.7 STS de sementes com diversas umidades e com e sem filme (d) sementes na umidade 37% b.u.



(e)

Figura 5.7 STS de sementes com diversas umidades e com e sem filme (e) sementes na umidade 46% b.u.

## **5.3 Experimentos Complementares**

### **5.3.1 Tetrazólio e Speckle Dinâmico**

Os resultados da comparação do Teste do Tetrazólio em sementes com danos e o Speckle Dinâmico podem ser vistos nas Figuras 5.8 a 5.11. Na Figura 5.8 observa-se uma semente com um dano que tem características simétricas, ou seja, está presente em ambos os cotilédones. Um dos cotilédones analisados pelo Teste do Tetrazólio evidenciou o dano. O outro cotilédone foi avaliado pelo Speckle Dinâmico. As imagens desse cotilédone foram processadas segundo o Método de Diferenças Generalizadas e Fujii. Na Figura 5.9 observa-se que os métodos utilizados não conseguiram mostrar o dano, o que se repete nas Figuras 5.11 e 5.12.



Figura 5.8 Cotilédone com dano evidenciado pelo tetrazólio e cotilédone utilizado no Speckle Dinâmico

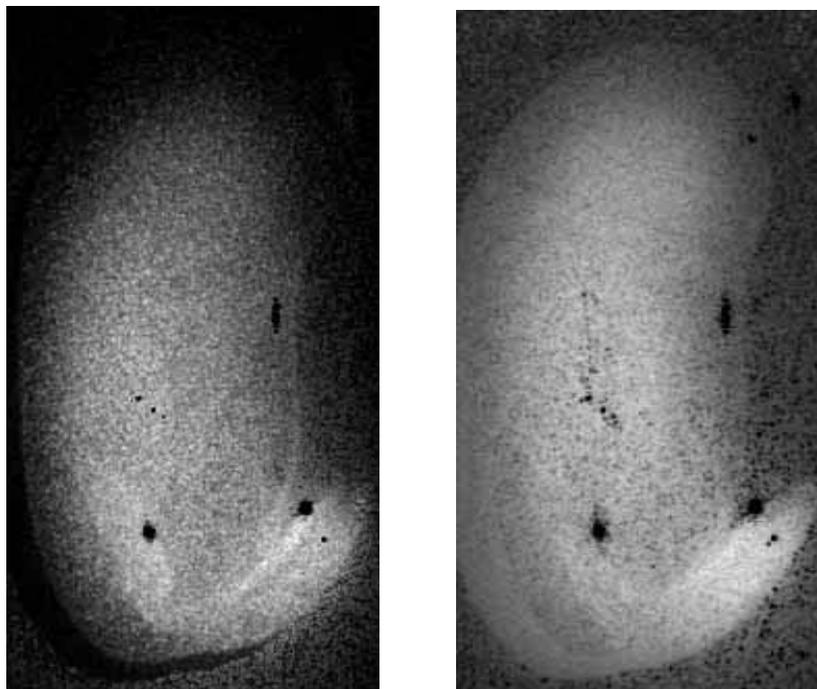


Figura 5.9 Figura analisada pelos Métodos de Diferenças Generalizadas e Fujii

A semente da Figura 5.8 teve o cotilédone sem tetrazólio cortado em uma camada que compreendia o dano. A análise mostra (Figura 5.10) um pequeno escurecimento na região do dano, mas ainda com pouca definição.

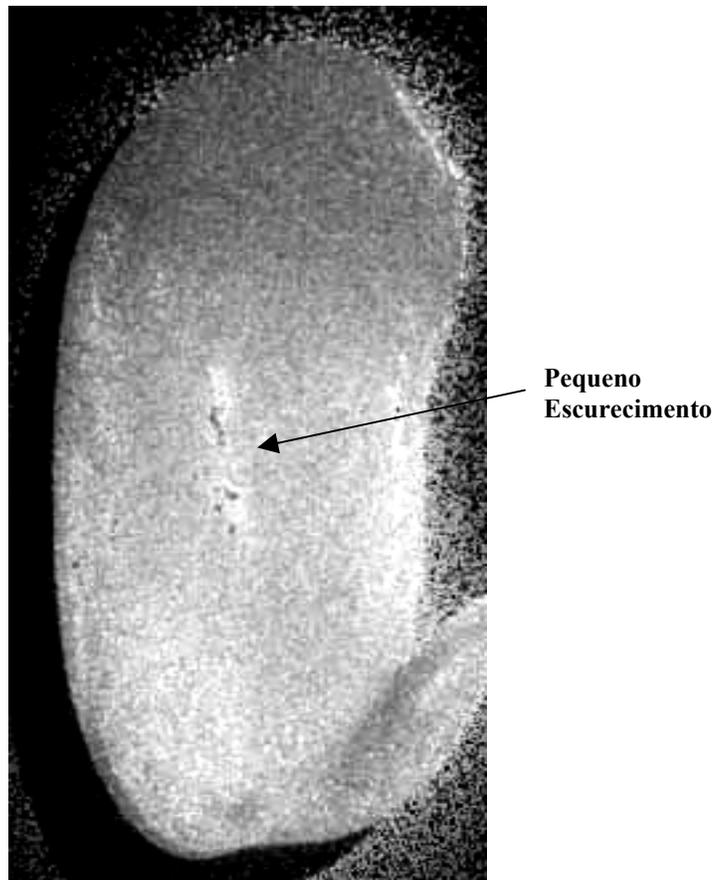


Figura 5.10 Semente avaliada segundo o Método de Diferenças Generalizadas com pequeno escurecimento na região do dano

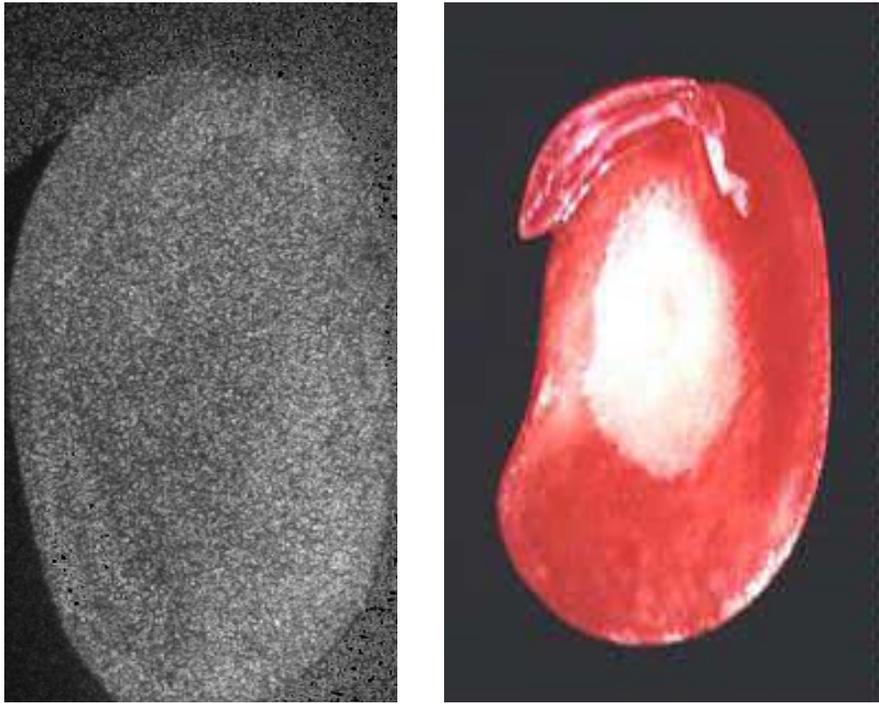


Figura 5.11 Semente analisada pelo Speckle Dinâmico e pelo Teste do Tetrazólio

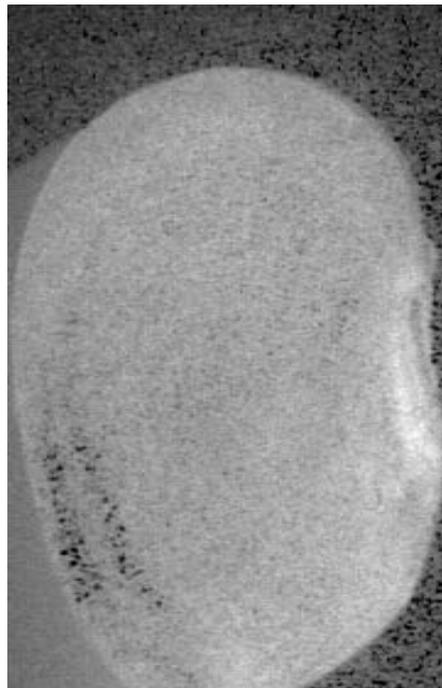


Figura 5.12 Semente analisada segundo o teste de Fujii

### 5.3.2 Semente Viva e Semente Morta

O resultado apresenta uma diferença de nível de cinza entre as sementes vivas e mortas, sendo que pela Figura 5.13 pode-se observar que as três sementes superiores apresentam um nível de cinza mais claro, ao contrário das imagens das sementes inferiores. Nesse caso, portanto, as sementes com nível de cinza mais claro, pelo tratamento de imagem, apresentam maior nível de atividade do que as que se encontram com nível de cinza mais escuro. Isso confirma o esperado, uma vez que as sementes superiores são de alto vigor, e as sementes que se encontram na parte inferior da imagem são mortas.

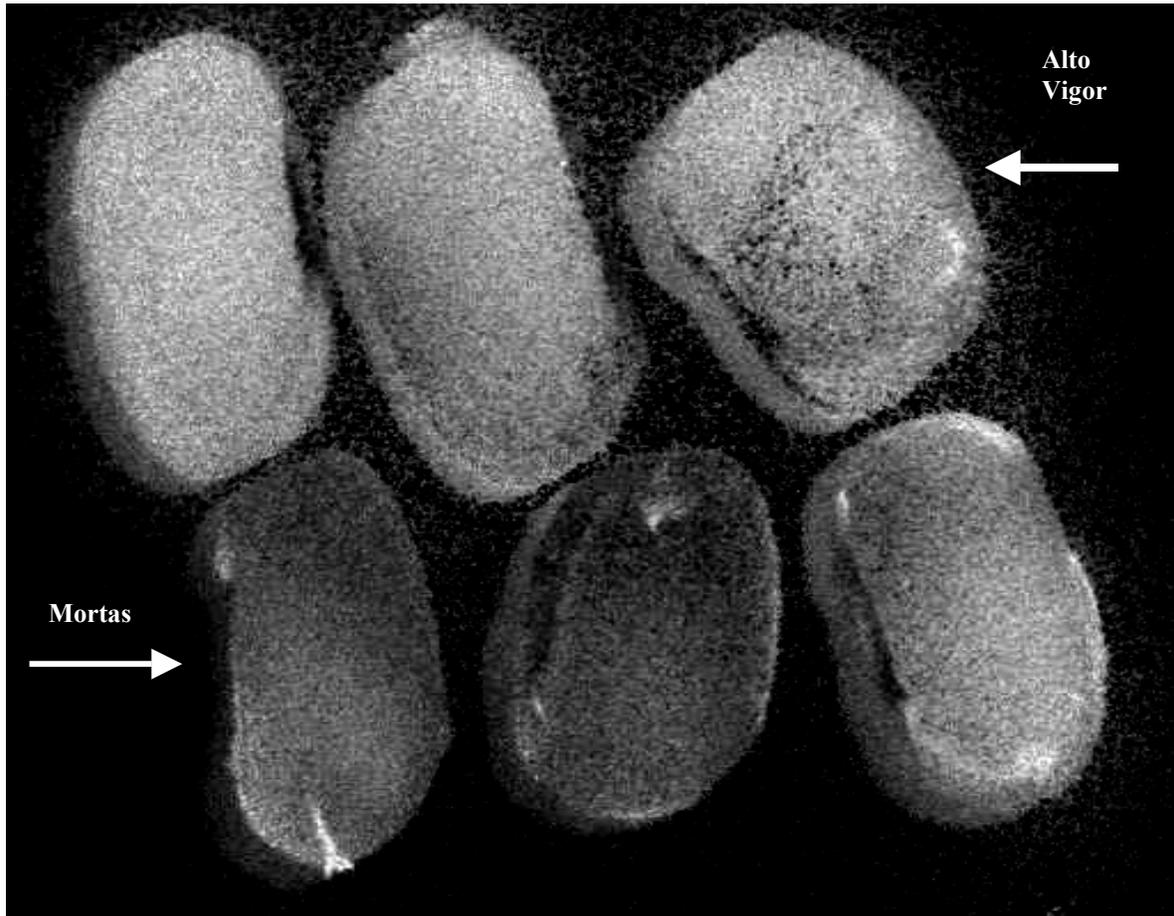


Figura 5.13 Método de Fujii em sementes de alto vigor e mortas

A Figura 5.13 mostra também que a diferença não apresentou um bom contraste porém, como já se sabe, a influência da evaporação interfere no resultado, o que faz com que se observe atividade de evaporação no lugar de atividade interna relacionada a um tecido vivo. Isso pode ser visto principalmente na terceira semente morta, na fileira inferior. Apesar de se ter conseguido diferenciar semente morta de semente com alto vigor, ainda existe um grande desafio, que é o desenvolvimento da técnica para permitir reforçar ainda mais as diferenças, bem como conseguir identificar diferenças menos contrastantes com relação ao nível de atividade.

### **5.3.3 Semente com diversos tempos de umedecimento**

O resultado de iluminação de três cotilédones com diferentes tempos de umedecimento pode ser visto na Figura 5.14 por meio de intensidade de cinza. A semente à esquerda foi umedecida por 24 horas e apresentou maior atividade, representada por um nível de cinza tendendo ao branco. À direita, a semente na parte superior foi umedecida por 2 horas, mostrando que a atividade se encontra maior na área externa e menor no centro. À direita, a semente na parte inferior não foi umedecida e apresentou um nível de cinza mais escuro, indicando uma baixa atividade. A Figura 5.14 mostra ainda que nas sementes umedecidas as regiões que deveriam apresentar maior atividade biológica, nos eixos embrionários, estão muito claras, evidenciando que a técnica do speckle dinâmico permite evidenciar a atividade biológica. O método utilizado foi o de Diferenças Generalizadas

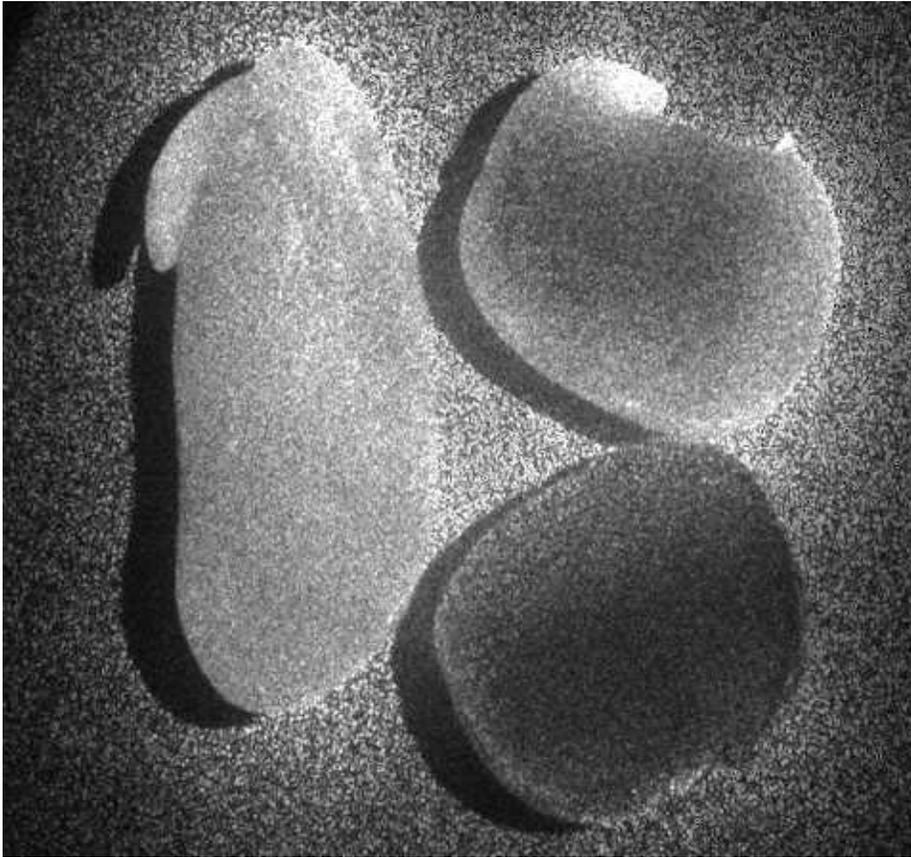


Figura 5.14 Resultado de iluminação de 3 cotilédones com umedecimentos diferentes

### **5.3.4 Evaporação em sementes viva e morta**

Este experimento permite a visualização da diferença da atividade medida pelo speckle dinâmico para semente morta e viva em processo de perda de água para o ambiente. Pelo Gráfico 5.13 verifica-se que as curvas iniciam o processo de perda de água com valores de atividade diferentes e que essa diferença vai se reduzindo ao longo do tempo. E, baseando-se nele pode-se concluir que :

- a umidade influencia nos resultados e
- a atividade observada não é somente resultado da evaporação e movimento da água

A influência da água foi bem definida no experimento que avaliou a influência da umidade, e esse resultado somente ratificou essa informação. Quanto à segunda afirmação, ela é muito importante, uma vez que se os resultados fossem somente dependentes da água (evaporação e movimentação interna), os objetivos de avaliação de sementes estariam comprometidos.

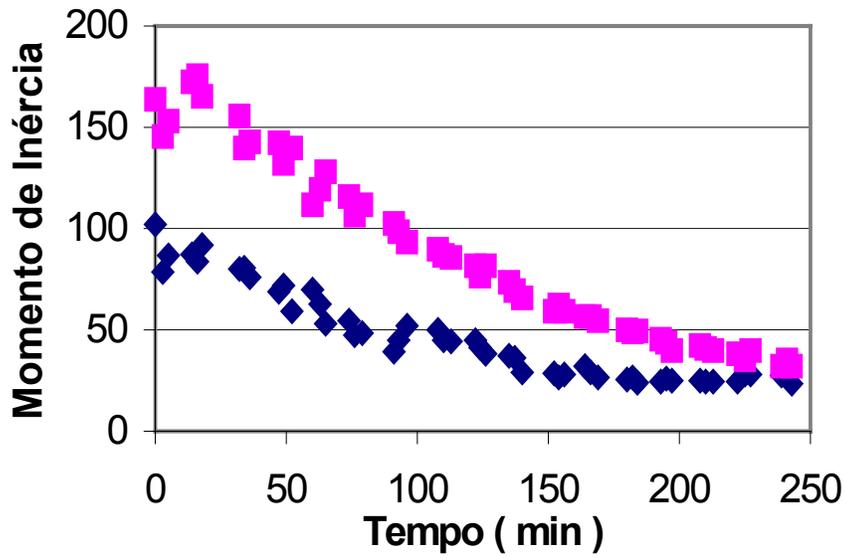


Gráfico 5.13 Evolução do momento de inércia em sementes viva e morta perdendo água

### 5.3.5 Transmissão do Laser através da Semente

Os resultados deste experimento evidenciam que a luz penetra na semente e que essa transmissão está de acordo com a profundidade e com a umidade. Nas Figuras 5.15 a 5.16 pode-se observar a transmissão em função da espessura, que foi de 1mm e 2mm, respectivamente, para uma mesma umidade ( 9,5% b.u. ). Pelos gráficos constata-se que o laser não consegue penetrar além de 2mm nessas condições de umidade.

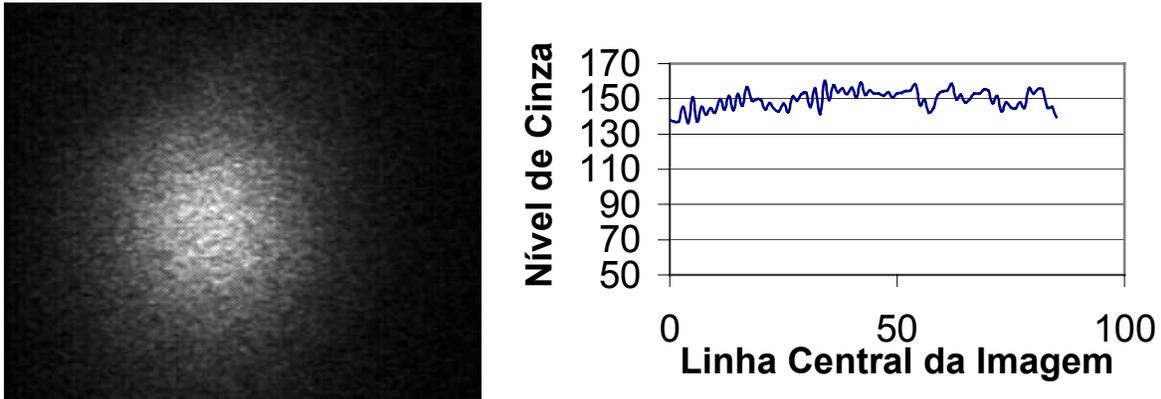


Figura 5.15 Intensidade da luz percebida após atravessar uma lâmina de semente de 1mm

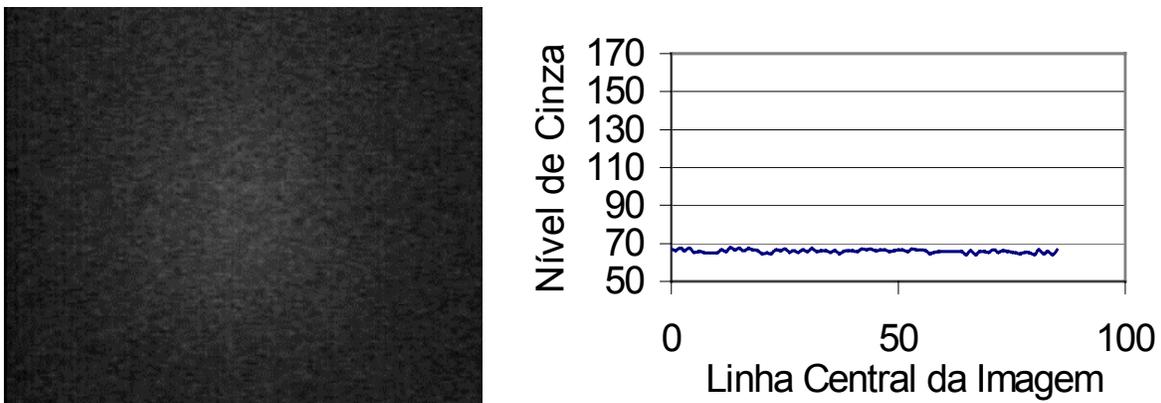


Figura 5.16 Intensidade da luz percebida após atravessar uma lâmina de semente de 2mm

Outra observação pode ser tomada com base nas Figuras 5.17 e 5.18. Para uma mesma espessura de lâmina de semente, tem-se que o nível de umidade (9,5% e 23,5%) influencia na transmissão da luz laser, o que reforça a importância da água nos resultados.

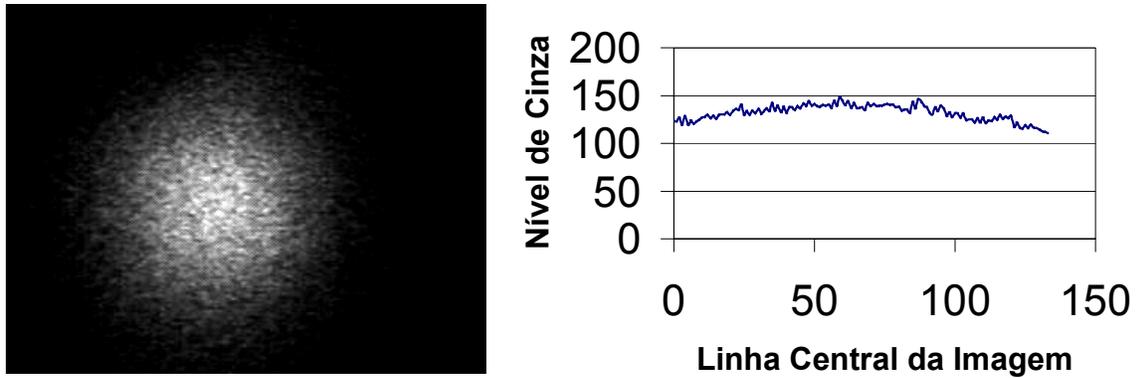


Figura 5.17 Intensidade da luz percebida após atravessar 1mm de lâmina de semente a 9,5% de umidade b.u.

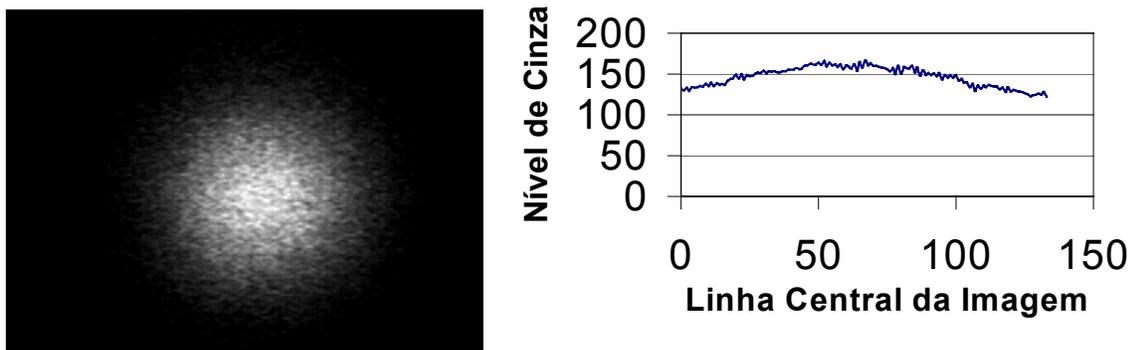


Figura 5.18 Intensidade da luz percebida após atravessar 1mm de lâmina de semente a 23,5% de umidade b.u.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho evidenciou a possibilidade de utilização do Speckle Dinâmico para medir a atividade biológica, passando a ser chamado, então, de bio-speckle. A aplicação em sementes apresentou resultados que incentivaram novas pesquisas, seja para a obtenção de uma metodologia de análise de vigor e/ou viabilidade, ou seja para o desenvolvimento de outras aplicações.

Por tratar de um fenômeno muito complexo, o domínio da técnica passou a ser prioridade, buscando a interpretação dos resultados e a relação causa-efeito. Neste sentido, o efeito da umidade nos resultados se tornou imediatamente um ponto crítico e, dessa forma, neste trabalho, foi avaliado com prioridade. Os experimentos realizados permitiram comprovar de forma conclusiva a direta influência do teor de água na semente nos resultados do Speckle Dinâmico.

O experimento com umidade acabou permitindo o surgimento de uma nova aplicação dessa tecnologia. Essa aplicação refere-se à proposta de uma nova metodologia e equipamento para a determinação do teor de água na semente por meio do bio-speckle, que proporcionaria uma interessante alternativa aos equipamentos comerciais existentes.

O desafio relativo ao teor de água na semente e seu efeito nos resultados passa a ser o de determinar o nível adequado da umidade para a realização dos experimentos de análise de vigor e viabilidade, bem como o de desenvolver uma metodologia que permita a proposta de um equipamento para medir esse nível.

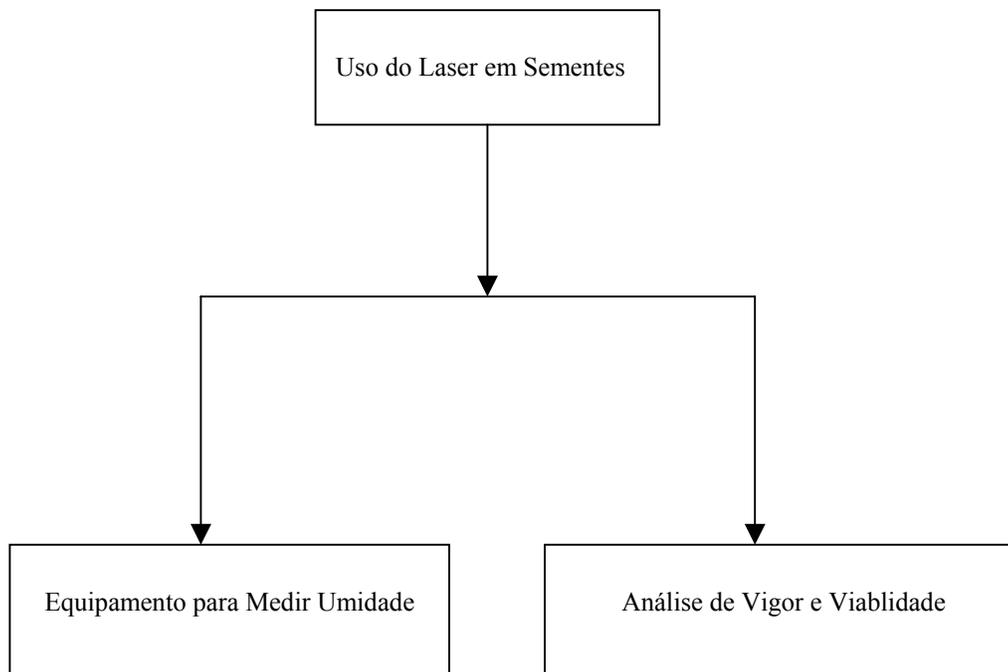
Com relação às análises de vigor e/ou viabilidade, os experimentos que compararam o bio-speckle com o teste do Tetrazólio ainda não permitiram uma correlação dos resultados. Os experimentos, até o momento, não foram suficientes para viabilizar ou inviabilizar o uso do bio-speckle, uma vez que existem ainda mais dúvidas do que certezas sobre a interação do laser com a semente.

As pesquisas futuras deverão permitir a solução das inúmeras incertezas sobre o que está ocorrendo, de forma a dominar as principais variáveis e permitir um modelo do sistema.

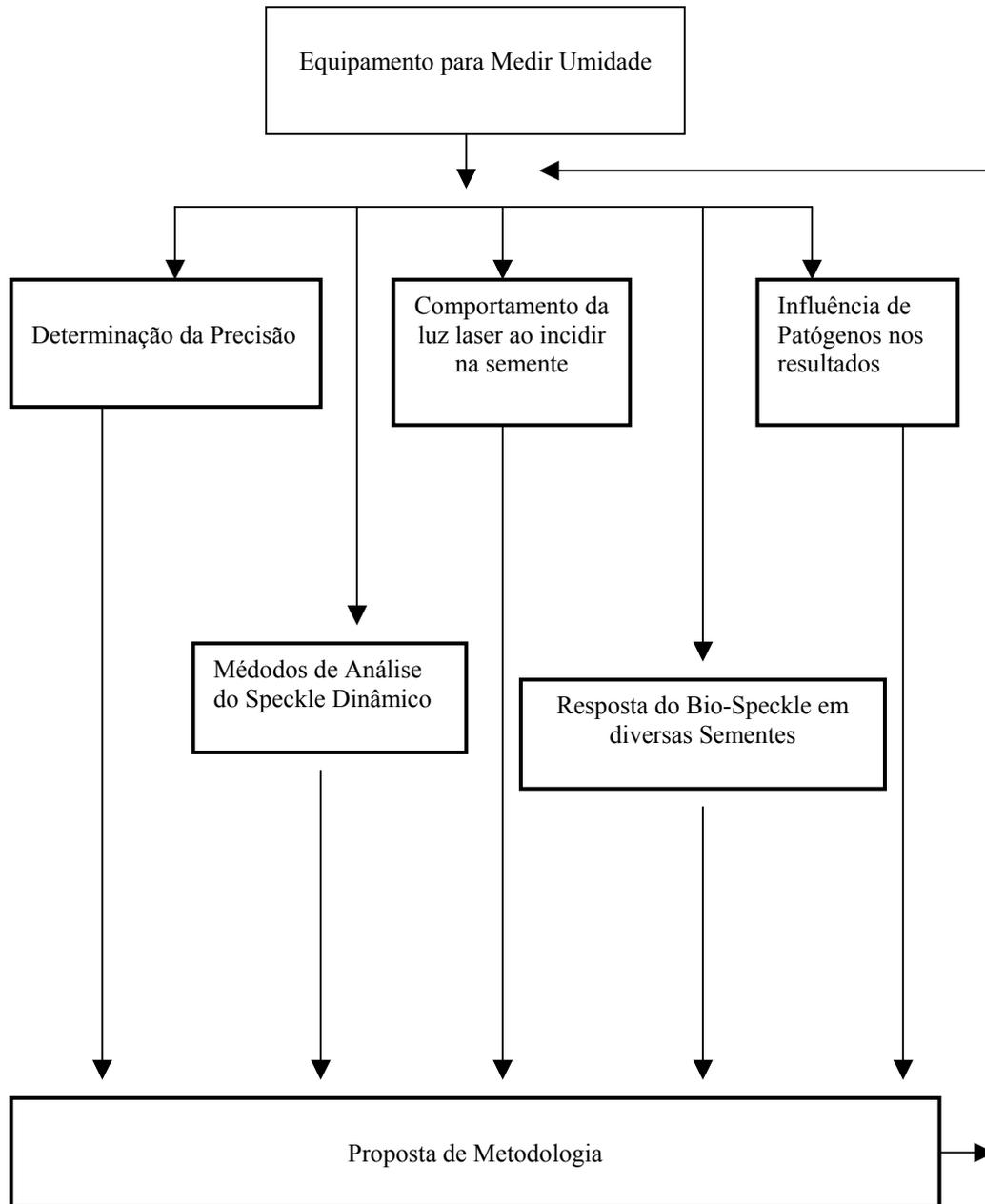
## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O desenvolvimento desta nova aplicação do laser e do bio-speckle na área de sementes apresenta uma série de desafios, uma vez que se trata de um fenômeno muito pouco dominado. A interação da luz laser com a semente ainda precisa ser muito bem estudada, e diversas variáveis que podem estar influenciando nos resultados devem ser conhecidas e dominadas. Este trabalho deu um importante passo ao provar que a umidade da semente interfere no speckle dinâmico.

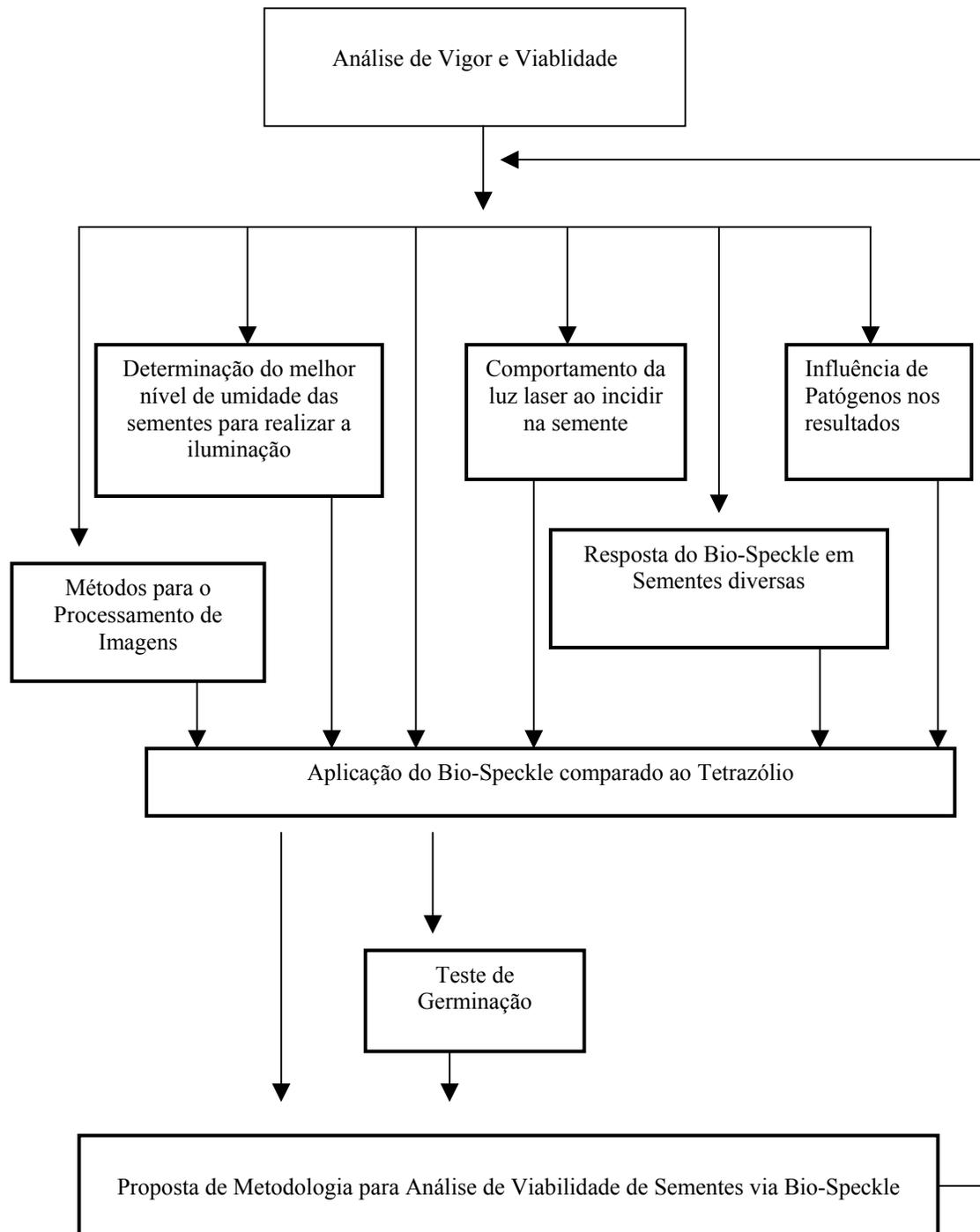
Como forma de delinear os trabalhos futuros, os Fluxogramas a seguir apontam as diversas linhas de pesquisa que devem ser adotadas.



Fluxograma 7.1 Linhas de pesquisa



Fluxograma 7.2 Proposta de Pesquisas para o Desenvolvimento de Equipamento para Medir Umidade de Sementes



Fluxograma 7.3 Proposta de Pesquisas para o Desenvolvimento do Teste de Viabilidade e Vigor de Sementes por meio do Bio-Speckle

## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ARIZAGA, R.; CAP, N.; RABAL, H.; TRIVI, M.. Activity image in Dynamical speckle 3rd. **Iberoamerican Optics Meeting**, A. Guzman Ed. Proceeding SPIE 3572, 310-314, (1999).
- ARIZAGA, R.; CAP, N.; RABAL, H.; TRIVI, M.; BALDWIN, G. Dynamic speckle segmentation. **Proceeding of Laser Metrology 99**, A. Albertazzi Ed, 5.73-5.79 (1999).
- ARIZAGA, R.,TRIVI, M.R., RABAL, H.J. Speckle time evolution characterization by co-ocurrence matrix analis. **Optics & Laser Technology**, v.4-5, n.3, p.1-7, 1999;
- ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H.. Analisis de diagramas de speckle dinamicos utilizando la matriz de coocurrencia. **III RIAO- Encuentro Ibero-Americano de Óptica** Cartagena das Indias 1998;
- AIZU,Y.; ASAKURA,T. Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow. **Optics & Laser Technology**, v.23, n.4, p.205-219 1991;
- BERGKVIST, A. **Biospeckle-based study of the line profile of light scattered in strawberries**. Dissertação de Mestrado Faculty of Technology at Lund University, 1997
- BHÉRING,M.C. et al. **Avaliação da viabilidade e do vigor das sementes de feijão-de-vagem ( *Phaseolus vulgaris* L.) pelo Teste de Tetrazólio**. UFV, 1996;
- BASU,R.N. Seed Viability. In: BARSA,A.S. **Seed Quality:Basic Mechanisms and Agricultural Implications** Food products Press, 1984;
- CARVALHO, M.L.M.; VAN AELST, A. C.; VAN ECK, J.W.; HOEKSTRA, A. F. Pre-harvest stress cracks in maize ( *Zea mays* L.) kernels as characterization by visual, X-ray and low temperature scanning electron microscopical analysis: effect on kernel quality. **Seed Science Research**, 9, 227-236, 1999.
- CIOp **Laser Y Optica en Ingenieria..** La Plata Argentina, 1997.
- DROZD, D. The effect of laser radiation on spring wheat properties. **International Agrophysics**. 1994, 8: 2, 209-213.
- DUDIN, G.D.; LOGINOV, D.A.; KRIVOSHEINA, O.S. **Irradiation of barley seeds with laser and red lighth**. Zemledelie. 1995. No 1, 33.

- FUJII, H. et al. Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing. **Applied Optics**, v.26, n.24, p. 5321-5325
- GOMEZ, K.A., GOMEZ, A.A. **Statistical Procedures for Agricultural Research**. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, New York, 1984, 680p.
- HAMPTON, J.G et al. Quality seed – from production to evaluation. **Seed Science & Technology**, v.24, p393-407,1996;
- HECHT, E. **Optics**. 2ed Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Co., 1987.
- HOWARTH, M.S. STANWOOD, P.C. Tetrazolium staining viability seed test using color image processing. **Transactions of the ASAE**, v.36, p 1937-1940, 1993;
- LEE, J.W. et al **Nondestructive Firmness Measurement of Apples Using Laser Vision System**. ASAE Annual International Meeting, Minneapolis, USA, 1997.
- MARCOS FILHO, J. Testes de Vigor: Importância e Utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes** ABRATES, 1999;
- NEUROHR, R. ET AL. Photon Emission-A new method for scanning the quality of Food. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, 78-82, mar 1991;
- OULAMARA, A., TRIBILLON G., DUVERNOY, J. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. *Journal of Modern Optics*, v. 36, n. 2, 165-179, 1989
- RABAL, H.J. et al Transient phenomena analysis using dynamic speckle patterns. **Optical Engineering**, vol 35, 57-62, jan 1996.
- RABAL, H.J. et al Laser na Agricultura. In: Energia, Automação e Instrumentação. XXVII CONBEA, Poços de Caldas 1998.
- RABELO, G.F. **Avaliação da aplicação do Speckle Dinâmico no monitoramento da qualidade da laranja**. FEAGRI UNICAMP, Tese de Doutorado, 2000, 149p;
- ROMERO, G.G. **Estudio y caracterizacion de patrones de speckle que varian en el tiempo**. Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Física, Universidade Nacional de Salta, Argentina, 1999, Tese de Doctorado, 133p;
- SEITZ, K. Cytoplasmic Streaming and Cyclosis of Chloroplasts. In: HAUPT, W. & FELNLEIB, M.E. **Physiology of Movements** Volume 7, Springer-Verlag, 1979;
- TOTH, M.; KERPESI, I.; KOZMA, L.; KLUJBER, L. Influence of wavelenght laser ligths on the carbohydrate metabolism in germinating maize seeds. **Acta Botanica Hungarica**. 1993, 38: 1-4, 421-430.

- VASILENKO, A.V. Accelerating the growth of Scots pine seedlings. **Lesnoe Khozyaistvo**. 1992, No 1, 39-40.
- XU, Z. JOENATHAN, C.; KHORANA, B. M. Temporal and Spatial Proprieties of the Time-Varing Speckles of Botanical Specimens. **Optical Engineering**, vol 34, no. 5 / 1487, may 1995.

## ANEXO A- Matrizes de Ocorrências

Umidade 13%b.u., com filme



Umidade 13%b.u., sem filme



Umidade 20%b.u., com filme



Umidade 20%b.u., sem filme



Umidade 30%b.u., com filme



Umidade 30%b.u., sem filme



Umidade 37%b.u., com filme



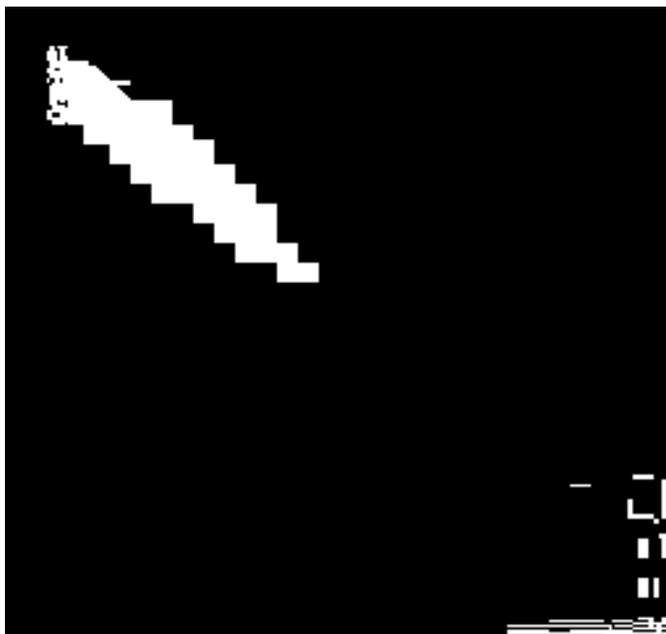
Umidade 37%b.u., sem filme



Umidade 46%b.u., com filme



Umidade 46%b.u., sem filme



**ANEXO - B****Dados dos Momentos de Inércia utilizados no experimento de umidade**

Umidade (%) b.u.	Repetição	Com Filme			Sem Filme		
		Instante de Iluminação			Instante de Iluminação		
		1	2	3	1	2	3
13	1	13,06	13,19	12,68	12,55	12,68	12,59
13	1	15,62	13,46	13,04	13,51	13,03	12,58
13	1	13,41	13,53	13,84	12,54	12,33	12,32
13	1	13,42	13,15	13,89	12,41	12,55	12,51
13	1	12,86	12,86	12,69	12,18	11,94	12,04
13	2	14,45	13,82	14,1	12,48	12,03	12,11
13	2	13,49	13,16	12,8	15,27	14,45	14,82
13	2	13,92	13,54	13,36	17,76	18,03	18,72
13	2	12,49	12,76	12,8	12,12	12,13	12,14
13	2	13,13	13,11	13,34	12,38	12,96	12,44
13	3	16,07	18,57	17,48	24,58	26,77	28,19
13	3	23,33	20,76	20,97	17,9	17,15	16,78
13	3	25,9	27,07	24,55	17,04	16,54	15,68
13	3	17,66	16,7	16,43	22,89	26,08	26,32
13	3	22,5	21,95	22,41	19,22	18,37	19,2

Umidade (%) b.u.	Repetição	Com Filme			Sem Filme		
		Instante de Iluminação			Instante de Iluminação		
		1	2	3	1	2	3
20	1	13,23	12,76	12,95	12,05	12,1	12,69
20	1	14,82	14,14	13,62	13,96	13,84	13,14
20	1	16,11	14,21	13,62	14,44	15,68	13,47
20	1	15,49	14,99	13,83	13,12	12,9	12,54
20	1	14,61	14,22	13,33	13,25	13,52	13,19
20	2	14,03	12,53	12,36	36,56	32,31	29,02
20	2	13,39	11,81	11,7	19,5	16,31	15,67
20	2	12,47	11,73	11,75	28,51	24,79	20,77
20	2	11,87	11,55	11,58	41,31	43,78	26,55
20	2	14,31	11,76	11,67	24,82	18,86	18,1
20	3	17,38	12,85	12,55	32,56	25,94	25,55
20	3	14,38	13,07	12,98	52,24	56,44	42,33
20	3	22,06	15,56	15,36	29,48	23,51	23,74
20	3	14,82	12,88	12,72	30,63	29,47	28,41
20	3	15,96	13,88	13,95	21,82	21,31	21,13

Umidade (%) b.u.	Repetição	Com Filme			Sem Filme		
		Instante de Iluminação			Instante de Iluminação		
		1	2	3	1	2	3
30	1	12,3	12,12	12,1	46,28	37,77	35,01
30	1	13,9	12,1	11,93	30,11	24,94	23,54
30	1	12,73	12,07	12,1	34,1	30,95	26,14
30	1	13,37	12,15	12,1	21,94	19,57	18,57
30	1	12,11	12,08	12	35,23	30,47	30,14
30	2	14,11	13,29	13,09	51,75	46,13	40,64
30	2	14,52	13,93	13,79	52,49	45,49	41,52
30	2	14,82	13,47	13,26	76,15	57,36	48,05
30	2	14,23	13,44	13,21	116,36	133,68	106,3
30	2	15,03	12,71	12,64	84,03	74,34	67,42
30	3	12,63	11,78	11,73	24,3	21,87	20,72
30	3	11,86	11,69	11,66	26,46	23,36	22,47
30	3	12,22	12,03	11,98	27,99	23,82	27,77
30	3	16,58	15,94	16,38	33,97	33,48	30,68
30	3	19,74	12,9	12,61	51,89	36,73	34,3

Umidade (%) b.u.	Repetição	Com Filme			Sem Filme		
		Instante de Iluminação			Instante de Iluminação		
		1	2	3	1	2	3
37	1	13,89	11,91	11,8	33,63	24,53	23,77
37	1	14,6	13,18	13,15	48,26	42,75	41,3
37	1	12,2	11,78	11,66	42,05	30,96	26,42
37	1	15,47	15,48	14,89	76,82	69,24	65,12
37	1	12,31	11,71	11,71	29,08	26,44	25,04
37	2	22,07	14,87	14,23	75,98	70,89	61,71
37	2	16,35	14,35	14,09	51,57	45,51	47,75
37	2	16,43	16,16	15,92	75,44	71,15	71,31
37	2	15,6	14,48	14,31	50,17	49,04	45,63
37	2	23,45	22,83	21,83	129,34	123,89	117,25
37	3	17,64	15,85	15,66	85,02	76,76	67,41
37	3	21,99	15,38	14,99	90,59	78,76	74,2
37	3	14,29	13,94	13,79	73,84	54,6	62,24
37	3	13,67	13,79	13,25	58,39	49,15	45,7
37	3	20,63	19,47	19,37	241,534	204,43	205,12

Umidade (%) b.u.	Repetição	Com Filme			Sem Filme		
		Instante de Iluminação			Instante de Iluminação		
		1	2	3	1	2	3
46	1	116,78	94,17	101,2	745,47	645,5	659,37
46	1	140,75	132,69	127,89	286,61	264,5	250,72
46	1	42,92	38,95	36,89	305,91	277,51	230
46	1	72,3	66,91	62,76	475,07	445,23	430,64
46	1	33,89	30,26	29,19	249,54	227,93	210,85
46	2	26,8	26,22	24,63	251,23	211,53	211,79
46	2	32,2	16,38	15,61	92,86	95,46	85,33
46	2	26,02	24,05	22,67	180,47	162,22	150,62
46	2	26,83	24,5	22,33	131,95	121,36	99,31
46	2	18,08	16,89	16,53	111,02	119,98	98,51
46	3	143,57	103,55	125,19	650,51	695,99	640,07
46	3	88,3	79,71	70,57	426,62	399,84	393,35
46	3	143,09	142,05	145,5	368,47	372,02	378,31
46	3	89,26	78,72	76,93	426,02	379,73	315,31
46	3	75,93	68,55	63,84	689,49	575,5	601,58