

**ANÁLISE DE RESPOSTA EM FREQUÊNCIA  
DO *BIOSPECKLE* LASER**

**ADILSON MACHADO ENES**

**2006**

**ADILSON MACHADO ENES**

**ANÁLISE DE RESPOSTA EM FREQUÊNCIA DO *BIOSPECKLE*  
LASER**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Engenharia Agrícola.

Orientador

Giovanni Francisco Rabelo

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Enes, Adilson Machado

Análise de resposta em frequência do *biospeckle* laser / Adilson  
Machado Enes. – Lavras : UFLA, 2006.

48 p. : il.

Orientador: Giovanni Francisco Rabelo.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Frequência. 2. Semente - Análise. 3. *biospeckle* laser. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.521

**ADILSON MACHADO ENES**

**ANÁLISE DE RESPOSTA EM FREQUÊNCIA DO *BIOSPECKLE* LASER**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Engenharia Agrícola.

APROVADA em

Prof. Doutor Giovanni Francisco Rabelo UFLA

Prof. Doutor Roberto Alves Braga Júnior UFLA

Prof. Doutor Giovanni Francisco Rabelo

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

por sempre ter iluminado o meu caminho;

**OFEREÇO**

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Olávio Machado Enes e Maria Leida Meri  
Enes;

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter iluminado o meu caminho.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Olávio Machado Enes e Maria Leida Meri Enes, pelo apoio, incentivo e dedicação, sem os quais teria sido impossível a realização deste curso.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Engenharia pela realização do curso de Mestrado em Engenharia Agrícola.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de mestrado permitindo a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Giovanni Francisco Rabelo, pela orientação, dedicação, compreensão e, sobretudo, pela amizade demonstrada dentro e fora do âmbito profissional.

Ao professor, e meu Co-orientador, Roberto Alves Braga Júnior, pela Co-orientação, dedicação, amizade e, sobretudo, por sua atenção e ajuda constante, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor José da Cruz Machado, pela orientação dada em patologia de sementes e por ter disponibilizado o Laboratório de Patologia de Sementes para que as amostras fossem preparadas.

À estudante de agronomia Michelle Vilela, por ter sido “o meu braço direito” no Laboratório de Patologia de Sementes e cuja dedicação foi fundamental para o sucesso da preparação das amostras.

À Professora Maria Laene Moreira de Carvalho, por ter permitido que as análises de Tetrazólio fossem realizadas pela equipe técnica do Laboratório de Análises de Sementes da UFLA.

Ao professor Daniel Furtado Ferreira e aos Monitores de estatística da Pós-graduação do DEX, pela orientação nas análises estatísticas e delineamento experimental.

Aos amigos, colegas e ex-colegas do Laboratório de Laser e Óptica, em especial a Silvestre Rodrigues, Túlio Seabra Gomes, e a toda a equipe de computação; Rodrigo, Bruno e Ricardo

pelo auxílio e criação das rotinas computacionais, permitindo que parte do processo fosse automatizado.

Ao professor Flávio Meira Borém, pela oportunidade dada a mim de conduzir uma disciplina na graduação, agregando aprendizado e experiência à minha formação.

Aos amigos do 308, Nicolau Macedo Santos, Marciel José Ferreira, Paulo Ademar Avelar Ferreira, Carlos Henrique, Luciano, Natanael, Fábio Araújo Medeiros, Allan Patric, Carlos Vinícius, Esdras Henrique e a todos os outros com quem tive a felicidade de compartilhar o mesmo teto.

Aos amigos e companheiros de república, Natalino Martins Gomes, José Zilton Lopes Santos e Jozinaldo Araújo.

Aos amigos Adilson Donizeti e Ezequiel de Oliveira, cuja amizade se faz presente mesmo quando estão longe.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação.

À secretária da Pós-Graduação; Daniela, e as secretárias da graduação; Juliana e Sandra.

A todos os amigos que estiveram comigo durante este período.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	2
2.1 Introdução .....	2
2.2 Métodos empregados na avaliação do <i>biospeckle</i> .....	2
2.3 Análise de frequência do Padrão Temporal do <i>Speckle</i> .....	3
2.4 <i>Biospeckle</i> laser em sementes .....	6
2.5 Identificação de fungos em sementes.....	8
2.5.1 Método do <i>Blotter-test</i> .....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1 Descrição dos equipamentos utilizados .....	10
3.2 Aferição dos aparatos experimentais .....	11
3.3 Delineamento estatístico .....	14
3.4 Preparação das amostras .....	15
3.4.1 Sementes utilizadas .....	15
3.4.2 Obtenção dos inóculos .....	15
3.4.3 Preparo do meio de cultura e restrição hídrica.....	15
3.4.4 Inoculação dos fungos em sementes de feijoeiro através da restrição hídrica .....	16
3.4.5 Teste de sanidade .....	16
3.5 Avaliação da infestação fúngica pelo <i>biospeckle</i> laser .....	17
3.5.1 Material utilizado .....	17
3.5.2 Determinação da ordem de iluminação .....	17
3.5.3 Aquisição e processamento dos dados .....	17
3.5.4 Determinação do teor de água.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.1 Resultados da aferição dos aparatos experimentais .....	20
4.2 Influência da atividade fúngica no MDI .....	21
4.3 Análise dos componentes de frequência do <i>biospeckle</i> laser .....	23
4.3.1 Análise detalhada do terceiro harmônico .....	25
4.3.2 Análise detalhada do quarto harmônico .....	26
4.3.3 Análise detalhada do centésimo harmônico .....	27
4.3.4 Considerações finais e trabalhos futuros .....	27
5 CONCLUSÃO .....	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
ANEXOS .....	34



## RESUMO

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

Este trabalho apresenta um estudo da interação da luz laser com tecidos de sementes de feijão (*Phaseolus Vulgaris* L.), contribuindo para o desenvolvimento da técnica do *biospeckle* laser para reconhecimento de tecidos vivos de sementes de feijão contaminadas com fungos e sua diferenciação pelo espectro de frequência. O *biospeckle* é um fenômeno óptico de interferência que ocorre quando a luz laser incide sobre uma superfície onde se desenvolve um processo dinâmico. Para diferenciar os dados obtidos na análise foram utilizadas as técnicas de Momento de Inércia e análises de frequência. Para a análise de frequência foi utilizada a Transformada de Fourier precedida da convolução. Um grande desafio nessa área é conseguir identificar e diferenciar os diversos elementos que contribuem para o aumento de atividade do *biospeckle*, tais como atividade de água, presença de microorganismos, entre outros. Neste sentido, este trabalho buscou dar um passo a mais visando caracterizar a interação do laser com o material biológico; para tal, amostras com tecidos vivos de feijão contaminados e não contaminados foram avaliadas quanto a sua atividade e a sua frequência. Foram utilizados três grupos de sementes: sementes contaminadas com fungo *Aspergillus*, sementes contaminadas com fungo *Fusarium* e sementes testemunhas (sem contaminação). As sementes foram iluminadas uma-a-uma em ordem aleatória. Os resultados mostraram haver diferenças nos valores médios de MI dos três grupos de sementes em todas as iluminações. Também foram analisadas as diferenças quanto à frequência para alguns harmônicos entre os grupos e diferenças entre os harmônicos para um mesmo grupo. Este trabalho permitiu confirmar que é possível diferenciar sementes contaminadas de sementes não contaminadas utilizando a análise de frequências do *biospeckle* laser.

---

\* Comitê Orientador: Giovanni Francisco Rabelo - UFLA (Orientador), Roberto Alves Braga Júnior - UFLA.

## ABSTRACT

ENES, Adilson Machado. **Frequency analysis of the biospeckle laser**. 2006. 48 p. Dissertation (Master in Agricultural Engineering) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

This work presents a study of the interaction of the laser light with tissue of beans seeds (*Phaseolus Vulgaris* L.). It is a contribution for the development of biospeckle technique applied to recognition of alive tissues of beans seeds contaminated with fungi and its differentiation by the frequency specter. Biospeckle is an interference optic phenomenon that occurs when the laser light reaches a surface where some dynamic process occurs, due to biological activities or purely physic changes. The technique involves image treatment and do distinguish the contribution of each activity material in the seeds, the technique of Inertial Moment and frequency analysis were used. For frequency analysis, the Fourier Transform preceded of the convolution was applied. A great challenge in this area is to identify the elements that contribute to increase the activity of biospeckle, such as water, microorganisms, among others. In this direction, this research work had given one more step aiming to characterize the interaction of the laser with the biological material. Three groups of bean seeds were used, one of healthy seed and two groups of seeds contaminated with *Aspergillus* and *Fusarium* fungi, and the biospeckle were analyzed considering its activity and its frequency spectra. The seeds were illuminated each-by-each in a randomly order. The results had shown differences in the average values of IM of the three groups of seeds in all the illuminations. Also, it was observed the presence of some different harmonic in the biospeckle of the groups and differences between the harmonic for seeds of the same group. This work allow to confirm that it is possible to differentiate contaminated seeds from non-contaminated seeds using frequency analysis of the biospeckle laser.

---

\* Comitê Orientador: Giovanni Francisco Rabelo - UFLA (Orientador), Roberto Alves Braga Júnior - UFLA.

## LISTA DE SÍMBOLOS

MI	Momento de Inércia
MDI	Módulo de Dispersão de Intensidades
STS	Spatial Temporal Speckle
MOC	Matriz de Ocorrências
FFT	Fast Fourier Transformer
BDA	Batata Dextrose Agar
CCD	Charge Coupled Detector
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
cv	Cultivar
BOD	Ambiente climatizado
SPPM	Aplicativo para cálculos de concentrações
2,4 - D	Herbicida comercial utilizado como restritor de germinação

# 1 INTRODUÇÃO

A técnica do *biospeckle* tem sido desenvolvida como uma ferramenta para a análise de materiais biológicos. A principal característica da técnica está relacionada à ausência de contato físico com a amostra analisada, além de permitir informações objetivas sobre os parâmetros observados sem a subjetividade da interpretação humana.

O *biospeckle* laser baseia-se na investigação dos mais diversos parâmetros físico-químicos por meio da medição do nível da atividade biológica, que proporcionam uma mudança no padrão de interferência ao observar o tecido biológico iluminado por um laser. Existem várias abordagens para analisar as imagens provenientes de iluminação de amostras, sendo que uma linha muito utilizada trata-se da análise do STS (THSP) com estatísticas de primeira e segunda ordem. Essa linha de processamento de imagens não apresenta, todavia, uma inferência das frequências que compõem os sinais presentes nos STS's, o que poderia trazer mais informações sobre os processos monitorados.

Este trabalho busca realizar análises de frequência de dados provenientes de imagens do *biospeckle* laser de materiais biológicos. A calibração da configuração experimental constituiu o primeiro passo para interpretação dos dados presentes nos sinais. A análise de frequência foi realizada em experimento controlado de sementes inoculadas com fungos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Introdução

Na última década foram desenvolvidas algumas pesquisas utilizando a luz laser como instrumento de avaliação de diversos materiais, como é o caso de Neurohr (1991), que buscou correlacionar a emissão de luz em sementes (“delayed light emission”) com aspectos de qualidade, Rabelo et al. (2005) e Braga Júnior et al. (2005), que empregaram a técnica do *biospeckle* laser na avaliação da qualidade de laranjas e sementes, respectivamente. A técnica do *biospeckle* laser baseia-se em um fenômeno óptico de interferência que ocorre quando a luz laser incide sobre uma superfície onde se desenvolve um processo dinâmico (Rabelo et al., 2005), e foi apresentada como uma metodologia potencial para a análise de sementes por Rabal et al. (1998).

Tradicionalmente, o *biospeckle* tem sido analisado com técnicas de processamento de imagens e tratamento estatístico. Neste trabalho, além das técnicas tradicionais, foram empregadas novas metodologias, como a convolução seguida da Transformada de Fourier, para a análise de frequência do *biospeckle* laser.

### 2.2 Métodos empregados na avaliação do *biospeckle*

Estudos das propriedades estatísticas da história temporal da intensidade do *speckle*, utilizando a função de autocorrelação do STS (*Spatial Temporal speckle*) como ferramenta, foram apresentados por Rabelo et al. (2005) e Romero (1999). Essa ferramenta já havia sido utilizada também por Bergkvist (1997), Oulamara et al. (1989), e por Xu et al. (1995). Para a quantificação do

fenômeno, são utilizados a função autocorrelação temporal, os cumulantes estatísticos e o momento de inércia do STS. O momento de inércia como forma de quantificação foi proposto por Arizaga et al. (1999), o qual calcula esse valor a partir da Matriz de Ocorrências (MOC). Rabelo et al. (2005) denominaram esse parâmetro de Módulo de Dispersão de Intensidades, para diferenciar do momento de inércia encontrado na mecânica.

Além das técnicas quantitativas, também são empregadas técnicas de processamento de imagens que permitem a identificação visual das áreas de maior atividade do material submetido ao *biospeckle* laser, como por exemplo; os métodos de Diferenças Generalizadas e Fujji, cuja descrição pode ser encontrada em Braga Júnior (2000) e Rabelo (2000).

### **2.3 Análise de frequência do Padrão Temporal do *Speckle***

Cada linha do STS carrega informações sobre a variação temporal da intensidade do “pixel”; essa variação, por sua vez, está relacionada com a atividade do material que está sendo iluminado. Dessa forma, é possível decompor a variação de intensidade do “pixel” em um espectro de frequência, a exemplo do que é feito na análise de um sinal de áudio. Assim, ao considerar que a linha de 512 pontos contém uma função temporal estacionária, essa função pode ser decomposta em uma série de harmônicos através da Transformada de Fourier. Como os dados se apresentam de forma discreta, utiliza-se a transformada discreta de Fourier. Esta transformada pode ser calculada para todo vetor de comprimento  $2^n$  através de um algoritmo computacional denominado “*Fast Fourier Transformer*” (FFT) ou Transformada Rápida de Fourier, conforme descrito por Loan (1992), Meyer (2000), Oppenheim et al. (1999) e Press (1992), Rivest (1978). A equação 1 representa a Transformada Discreta de Fourier.

$$X(k) = \sum_{n=0}^{N-1} x(n) \cdot e^{-i \cdot 2 \cdot \pi \cdot (k-1) \cdot \frac{n-1}{N}} \quad (1)$$

$$1 \leq k \leq N$$

Em que:  $\mathbf{X}$  é a transformada de Fourier.

$\mathbf{x}$  é o vetor inicial (função temporal).

$\mathbf{K}$  é o índice da transformada.

$\mathbf{n}$  é a variável de entrada da função  $\mathbf{x}$ , podendo ser o tempo.

$\mathbf{N}$  é o comprimento do vetor inicial.

A convolução, bem como a autocorrelação, têm sido utilizadas como forma de se conseguir uma melhor resposta do que aquela que seria obtida utilizando a Transformada de Fourier diretamente nos dados. A convolução de uma linha matricial  $\mathbf{i}$ , que possui um número  $\mathbf{c}$  de colunas, pode ser calculada, para todo  $\mathbf{k} \leq \mathbf{c}$  e  $\mathbf{L}=\mathbf{i}$ , conforme a equação 2.

$$W_{L,k} = \sum_{j=0}^k (v_{i,j} \cdot v_{i,(k-j)}) \quad (2)$$

$$\mathbf{k} \leq \mathbf{c}$$

Em que:  $\mathbf{W}$  é a convolução.

$\mathbf{V}$  é matriz de dados.

$\mathbf{L}$  e  $\mathbf{K}$  são, respectivamente, linhas e colunas da matriz convolução.

$\mathbf{i}$  e  $\mathbf{j}$  são, respectivamente, linhas e colunas da matriz  $\mathbf{V}$ .

$\mathbf{c}$  é o número de colunas da matriz  $\mathbf{V}$ .

Considerando uma matriz arbitrária  $V$  com número  $c$  de colunas, se, a partir dessa matriz for criada uma segunda matriz  $V2$  com mesmo número de colunas que  $V$ , de forma que  $V2_{i,j}=V_{i,(c-1-j)}$ , pode-se afirmar que a autocorrelação da linha  $i$  da matriz  $V$  é igual a convolução da linha  $i$  da matriz  $V$  pela linha  $i$  da matriz  $V2$ . Nestas condições, pode-se calcular a autocorrelação, para todo  $k \leq c$  e  $L=i$ , através da equação 3.

$$E_{L,k} = \sum_{j=0}^k (v_{i,j} \cdot v2_{i,(k-j)}) \quad (3)$$

$$k \leq c$$

Em que:  $E$  é a matriz autocorrelação.

$V$  é a matriz de dados.

$$V2_{(i,j)} = V_{(i,c-1-j)}$$

$L$  e  $K$  são, respectivamente, linhas e colunas da matriz autocorrelação.

$i$  e  $j$  são, respectivamente, linhas e colunas das matrizes  $V$  e  $V2$ .

$c$  é o número de colunas das matrizes  $V$  e  $V2$ .

Para situações nas quais o valor de  $k$  é maior do que o valor de  $c$ , pode-se lançar mão da lógica apresentada na seqüência abaixo para efetuar o cálculo da convolução e da correlação.

$$W(1) = V1(1).V2(1)$$

$$W(2) = V1(1).V2(2)+V1(2).V2(1)$$

$$W(3) = V1(1).V2(3)+V1(2).V2(2)+V1(3).V2(1)$$

...

$$W(k) = V1(1).V2(k)+V1(2).V2(k-1)+ \dots +V1(k).V2(1)$$



...

$$W(2.k-1) = V1(k).V2(k)$$

Na seqüência mostrada, se  $V1=V2$ ,  $W$  será a convolução de  $V1$ . Se  $V1(j)=V2(k-j)$ , então  $W$  será a autocorrelação de  $V1$ . Utilizando esta lógica é possível realizar o cálculo da convolução e da correlação de qualquer seqüência numérica cujos dados se apresentem de forma discreta, independente do tamanho da seqüência.

#### **2.4 *Biospeckle* laser em sementes**

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

Braga Júnior et al. (2005), trabalhando com sementes de feijão (*Phaseolus Vulgaris* L.) em diferentes níveis de umidade, comprovaram a influência do teor de água e da evaporação nos resultados do *biospeckle*. O autor utilizou a técnica de Diferenças Generalizadas. Posteriormente, o mesmo autor utilizou o laser para diferenciar tecidos vivos de tecidos mortos em sementes, utilizando as técnicas conhecidas como Azakura e M.I, respectivamente. Os resultados foram importantes para a pesquisa do *biospeckle* laser aplicada na análise de sementes, motivando a realização de novos experimentos aplicando a técnica do *biospeckle* para avaliar outras variáveis relacionadas com a interação entre o laser e a semente. Dessa forma, Moreira et al. (2002), realizaram um

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

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

Braga Júnior et al. (2005) aplicaram a técnica do *biospeckle* para identificar 4 fungos diferentes em tecidos de sementes de feijão que haviam sido submetidas ao congelamento em água, constituindo 4 tratamentos, a saber: tratamento 1, semente testemunha; 2, fungo *Sclerotinia*; 3, *Aspergillus* e 4, *Colletotero*. Os autores encontraram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos ao nível de 1%, evidenciando a capacidade da técnica em identificar fungos em sementes. Os resultados desenvolvidos demonstraram que foi possível diferenciar um lote de sementes sem a presença de fungos, com lotes inoculados com os 3 tipos, não sendo possível identificar o fungo *Sclerotinia*. É possível que para esse fungo, não detectado, o método do momento de inércia não seja suficientemente rápido para capturar sua atividade. Entretanto, não se tem informação sobre essa frequência, justificando a adoção de novos métodos.

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

Posteriormente, avaliando a interação dinâmica de interferência da água em tecidos vivos e tecidos mortos de sementes de feijão, Enes (2005) mostrou que a diferenciação entre tecidos vivos e tecidos mortos, utilizando a técnica do *biospeckle*, pode ocorrer em diferentes faixas de teor de água, verificando também que fatores externos às sementes, tal como a umidade relativa do ar ambiente, podem influenciar nos resultados de medição.

## **2.5 Identificação de fungos em sementes**

Entre os métodos disponíveis para detecção de fungos em sementes, os testes com papel de filtro são os mais conhecidos e utilizados (Neergaard, 1973). Esse método é o mais amplamente usado nos testes rotineiros de sanidade de sementes (Mathur, 1983), embora a incidência de muitos fungos e bactérias contaminantes, que crescem rapidamente nesse substrato, possa impedir a frutificação dos fungos-alvo, dificultando a sua identificação e quantificação, sobretudo os de crescimento lento. Nesse último caso, a incidência pode ser subestimada (Neergaard, 1973). O desenvolvimento de meios seletivos ou semi seletivos para a detecção de conídios dormentes de *B. sorokiniana* no solo (Dodman & Reinke, 1982; Filippova & Kashemirova, 1990; Kulkarni et al., 1978; Reis, 1983) tem aberto a possibilidade de seu uso na detecção desse fungo em análises rotineiras de patologia de sementes, como concluem e recomendam Reis et al. (1999).

### **2.5.1 Método do *Blotter-test***

Para a realização do Blotter-test as sementes são, geralmente, incubadas em placas de Petri, contendo algumas folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água +2,4-D. Em seguida é adicionada uma camada de BDA +2,4-D, podendo a avaliação, dependendo do objetivo pretendido, ser feita com sementes desinfestadas ou não. A descrição da metodologia se encontra em Brasil (1992).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no laboratório de Laser e Óptica do Departamento de Engenharia da UFLA, com o apoio do Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Na primeira etapa foi realizada a aferição dos aparatos experimentais, utilizando-se eventos periódicos controlados. Na segunda etapa foi realizado o experimento com biospeckle laser em sementes com fungos, procedendo ao cálculo do MDI e às análises dos dados.

#### 3.1 Descrição dos equipamentos utilizados

Foram utilizados, um microcomputador, aplicativos computacionais para processamento de imagens, uma fonte de luz laser, uma fonte de luz branca, e uma câmera CCD (*Charge Coupled Detector*).

A fonte de luz utilizada é um laser de HeNe (Hélio, Neônio) vermelho, de comprimento de onda de 632.8 nm, fabricante coherent.

Para tratamento das imagens foram utilizados aplicativos computacionais desenvolvidos em linguagem C, e na captura foi utilizada a placa de aquisição PXC200 color frame Grabber de fabricação da Imagenation.

A câmera CCD consiste basicamente em um arranjo de cerca de 780 x 480 detectores de semicondutor denominados dispositivos de carga acoplada (CCD's). O conjunto é formado por elementos detectores feitos de silício e é sensível aos comprimentos de onda que abrangem a faixa de aproximadamente 400 nm (azul) a aproximadamente 1,1  $\mu\text{m}$  (infravermelho próximo).

Foi utilizado um expensor de feixes para que se conseguisse incidir o laser em uma área maior da semente. A altura da câmera até a placa, onde se encontravam as sementes, foi de 17,2 cm.

Para garantir a estabilidade do laser, o emissor foi ligado duas horas antes do início dos experimentos.

### **3.2 Aferição dos aparatos experimentais**

Para a aferição dos aparatos experimentais, foram criados mecanismos que permitiram a elaboração de eventos periódicos conhecidos e controlados, sendo que os dados desses eventos foram coletados e, posteriormente, submetidos aos testes de análise de frequência.

O material utilizado nessa etapa constou de um motor universal com velocidade variável, uma fonte de luz branca de 10 W de potência, discos de papel com faixas alternadas, uma câmera CCD, um micro computador pessoal e aplicativos computacionais desenvolvidos pela equipe de computação do NeoLaser (Núcleo de Estudos em Laser e Óptica na Agricultura). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Laser e Óptica do Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras.

Durante os ensaios a rotação do motor estabilizou-se em torno de 0,077 Hz. O espaçamento entre as faixas do disco foi calculado em função da velocidade de giro do motor, respeitando-se a taxa de aquisição nominal da câmera (0,08 s). Foram projetadas cinco faixas de frequência, sendo elas: 6,25 Hz; 3,125 Hz; 1,562 Hz; 0,781 Hz e 0,390 Hz. Na figura 1 o disco utilizado está representado com detalhes, onde se observa que a frequência é maior na periferia e diminui à medida que se aproxima do centro.

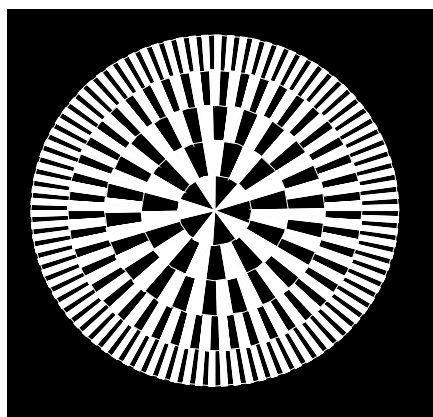


FIGURA 1 – Disco com faixas negras e faixas brancas alternadas.

O disco foi acoplado ao motor, com velocidade controlada, e colocado sob a câmera, enquanto uma fonte de luz branca iluminava a montagem a uma distancia de 17 cm acima do disco. Com o disco girando, iniciou-se a captura das imagens. O intervalo de captura utilizado foi de 0,08 s, de acordo com a máxima capacidade de aquisição de dados da câmera. Nessa etapa foram capturadas 100 imagens. A disposição dos equipamentos pode ser melhor entendida observando-se a figura 2.

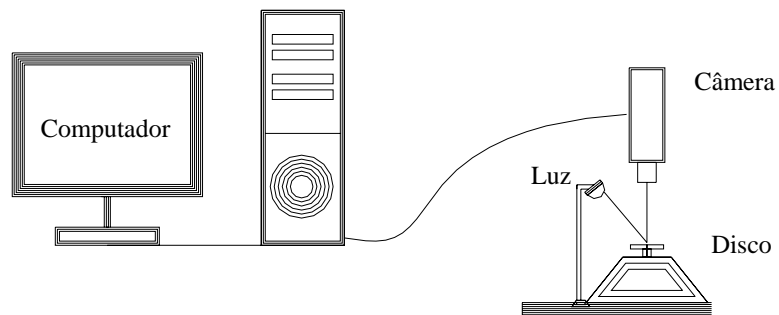


FIGURA 2 – Configuração experimental.

Apenas um pixel foi escolhido para a aferição. Utilizando-se o aplicativo MI 2.0, escolheu-se o pixel de coordenadas 200 x 200, correspondente a segunda faixa da periferia para o centro do disco, como pode ser visto na figura 3.

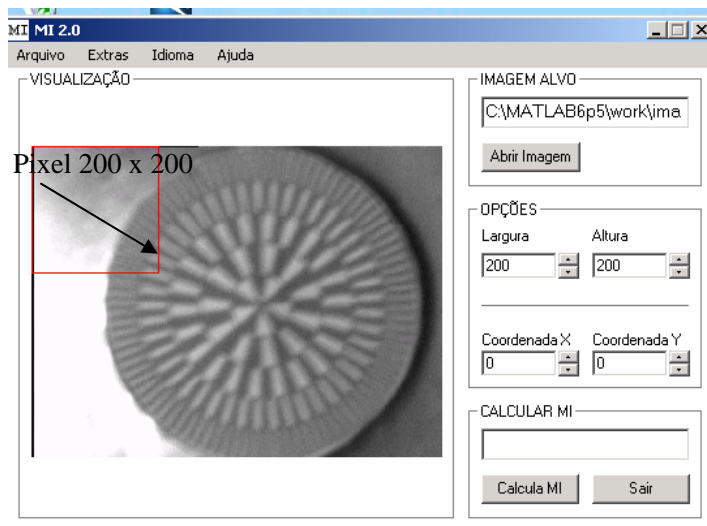


FIGURA 3 – Aplicativo MI indicando a localização do pixel 200 x 200.



Após a constatação de que o pixel 200 x 200 pertencia a faixa de frequência de 3,125 Hz, obteve-se o valor do pixel em escala de cinza. Este procedimento foi realizado para as 100 imagens, obtendo-se um vetor de 100 pixel's, sendo este vetor, posteriormente, analisado quanto a sua frequência.

### **3.3 Delineamento estatístico**

Nos experimentos com *biospeckle* em sementes, cada semente foi avaliada individualmente. Dessa forma, levando-se em conta que a parcela pode ser definida como sendo a menor unidade experimental na qual se possam aplicar tratamentos e coletar informações que sejam passíveis de análises (Pimentel-Gomes & Garcia, 2002), considerou-se no delineamento experimental que cada semente era uma parcela.

O delineamento experimental utilizado foi então definido como um DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado), com 25 repetições e três tratamentos, a saber:

T1= Sementes expostas ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*;

T2= Sementes expostas ao fungo *Aspergillus flavus*;

T3= Sementes testemunhas.

Para assegurar a casualização na obtenção dos dados, a ordem de iluminação das sementes foi obtida por sorteio. Tal procedimento caracteriza uma variação do DIC conhecida na literatura como Delineamento Inteiramente Casualizado no Tempo (Pimentel-Gomes & Garcia, 2002).

### **3.4 Preparação das amostras**

#### **3.4.1 Sementes utilizadas**

Foram utilizadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cv. Pérola.

#### **3.4.2 Obtenção dos inóculos**

As culturas puras iniciais de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Aspergillus flavus*, foram obtidas no laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras – M.G. A partir das colônias desenvolvidas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo solução de BDA, foi efetuada a repicagem definitiva do inóculo. As placas inoculadas foram colocadas em uma BOD e submetidas a uma temperatura de 20°C com fotoperíodo alternado de 12 horas. O período de incubação utilizado foi de 7 dias.

#### **3.4.3 Preparo do meio de cultura e restrição hídrica**

O meio de cultura utilizado foi o BDA (extrato de 200 g de batatas, 20 g de dextrose e 20 g de ágar) com potencial hídrico de  $-1,2$  MPa, utilizando como restritor, o soluto manitol. O cálculo da concentração de solutos de restrição hídrica foi realizado pelo software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995).

#### **3.4.4 Inoculação dos fungos em sementes de feijoeiro através da restrição hídrica**

Utilizaram-se placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo 40 mL de meio BDA a  $-1,2$  MPa. Sobre o meio foram distribuídos uniformemente 5 mL de suspensão de conídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, sendo as placas incubadas em câmara de incubação, com fotoperíodo de 12 h, à temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após o crescimento micelial do fungo, por 5 dias, foram colocadas 200 sementes em cada placa, borrifado suspensão de conídios por cima das sementes e novamente incubadas nas mesmas condições por 150 h. Utilizou-se o mesmo procedimento para a inoculação de *Aspergillus flavus*; já para as sementes testemunhas, foi colocada apenas uma solução de água e monitol com potencial de  $-1,2$  MPa.

Após 150 h de exposição ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, ao fungo *Aspergillus flavus* e sem inóculo (testemunha), 25 sementes de cada tratamento foram retiradas aleatoriamente e submetidas ao teste do *biospeckle* laser, sendo o restante das sementes distribuídas sobre papel de filtro, em temperatura ambiente para retornarem ao teor de umidade inicial. Após dois dias, as sementes foram utilizadas para a avaliação de sanidade.

#### **3.4.5 Teste de sanidade**

Para o teste de sanidade, Utilizou-se o *blotter-test* (Brasil, 1992) modificado, no qual as sementes foram incubadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água + 2,4-D e adicionada uma camada de BDA + 2,4-D.

### **3.5 Avaliação da infestação fúngica pelo biospeckle laser**

#### **3.5.1 Material utilizado**

O material utilizado nessa etapa foi basicamente o mesmo descrito na etapa 3.1, acrescido do laser HeNe vermelho (632 nm).

#### **3.5.2 Determinação da ordem de iluminação**

Para determinar a ordem na qual as sementes seriam iluminadas, foram definidas três faixas, a saber: faixa de 1 a 25 – tratamento 1, faixa de 25 a 50 – tratamento 2, e faixa de 50 a 75 – tratamento 3.

Os números de 1 a 75 foram então sorteados, obtendo-se dessa forma a ordem de iluminação e aquisição dos dados.

#### **3.5.3 Aquisição e processamento dos dados**

Após a determinação da ordem de aquisição dos dados, as sementes foram colocadas, em número de 25, em recipientes plásticos impermeáveis à água, dos quais eram retiradas uma-a-uma, conforme a ordem pré-estabelecida, e submetidas ao teste do *biospeckle* laser. O restante das sementes que ficaram nas placas de petri, foram utilizadas na determinação do teor de água. A disposição dos equipamentos laboratoriais utilizados foi semelhante àquela utilizada na etapa de aferição, conforme pode ser observado na figura 4.

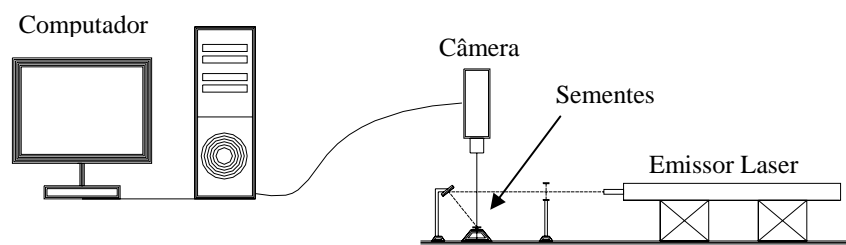


FIGURA 4 – Disposição dos equipamentos experimentais.

O intervalo de captura utilizado foi de 0,08 s. O número de imagens capturadas nesta etapa foi de 512, sendo 100 imagens reservadas para montagem de um banco de dados e posterior processamento.

Após a aquisição dos dados, as imagens foram utilizadas no cálculo do MI. Além do MI, os dados também foram avaliados quanto a sua frequência. Para a análise de frequência, cada linha da matriz STS foi submetida a convolução e a Transformada de Fourier para que pudesse ser avaliada quanto a sua frequência. Os valores obtidos da análise de frequência das linhas foram divididos pelo número de linhas da matriz, sendo que esse valor, para as matrizes utilizadas, foi de 512. Esta operação levou à obtenção de um vetor de valores médios de amplitude de harmônicos para cada Matriz. Este procedimento foi repetido para cada STS e para cada tratamento utilizado. Alguns harmônicos foram escolhidos para análise mais detalhada, tendo os seus valores tabelados e, posteriormente, submetidos ao teste de Tukey para avaliar as diferenças entre os tratamentos. Para cada harmônico analisado, obteve-se, no final, uma tabela contendo os valores referentes a esse harmônico para cada repetição e para cada tratamento empregado. Para efeito de comparação, os

procedimentos descritos foram repetidos utilizando-se a autocorrelação no lugar da convolução.

#### **3.5.4 Determinação do teor de água**

Após retirar 25 sementes de cada tratamento para a aquisição dos dados, o restante das sementes foi levado a estufa a 105 °C durante 24 horas para determinar o teor de água, conforme a metodologia descrita por Brasil(1992).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados da aferição dos aparatos experimentais

Os resultados mostraram que a frequência observada pela câmera, referente à segunda faixa da periferia para o centro do disco, foi igual a frequência esperada, atestando, assim, a capacidade da câmera em fazer aquisição de dados na faixa em torno de 3,125 Hz. Tal resultado foi importante para as análises posteriores, pois, como a máxima taxa de amostragem está em torno de 0,08 s, a faixa de frequências observadas pela câmera seria aquela entre 0 e 6,25 Hz. A taxa amostrada no ensaio é, portanto, a média da faixa possível de se trabalhar. As figuras 5 a e 5 b referem-se aos valores do pixel 200 x 200 das 100 imagens do disco plotado em função do tempo, a área circunscrita pode ser analisada em detalhes na figura 5 b.

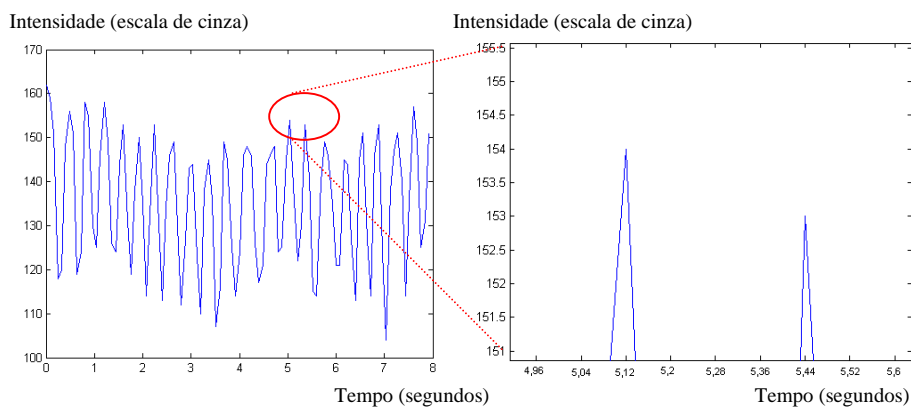


Figura 5 a. - Vetor de pixels das imagens do disco ao longo do tempo.

Figura 5 b. – Detalhe mostrando o intervalo entre dois picos (Período).

FIGURA 5 - Análise de frequência do pixel 200 x 200 ao longo do tempo.

Tomando-se os dois picos circulosados como referência, é possível observar melhor o intervalo entre eles e, conseqüentemente, averiguar a sua freqüência, o que é mostrado na figura 5 b.

#### 4.2 Influência da atividade fúngica no MDI

Foram observadas diferenças entre os três tratamentos quanto aos valores de MDI, como pode ser observado na figura 6.

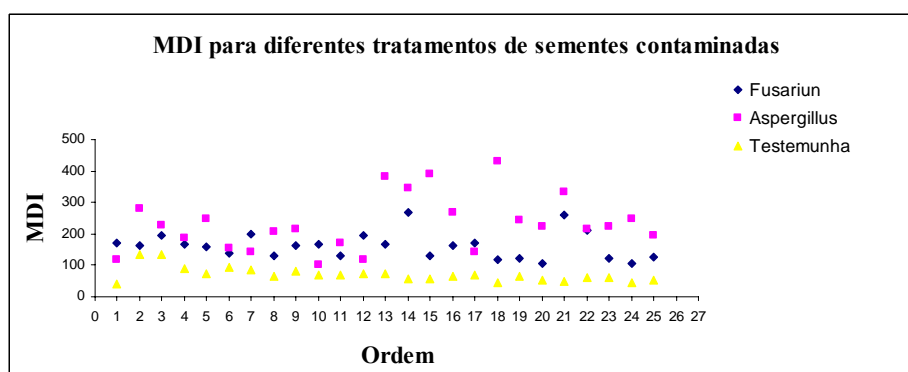


FIGURA 6 – Valores de MDI para os três tratamentos.

A análise de variância mostrou haver pelo menos uma diferença significativa entre os tratamentos. Na tabela 1, mostrada a seguir, é possível observar que a diferença entre os tratamentos foi altamente significativa.

TABELA 1 - Análise de variância dos valores de MDI para os três tratamentos

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	2	331645.57	165822.78	48.52	0.0000
erro	72	246042.27	3417.25		
T. corrigido	74	577687.85			

CV (%) = 37.76; Média geral:154.82; Número de observações: 75



Uma observação mais detalhada das diferenças foi conseguida utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, como está representado na tabela 2.

TABELA 2 - Teste de Tukey para o fator de variação tratamento

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
<i>Testemunha</i>	70.19	a
<i>Fusarium oxysporum f. sp. Phaseoli</i>	161.62	b
<i>Aspergillus flavus</i>	232.65	c

DMS: 39,57; NMS: 0,05; Erro padrão: 11,6914563930571; Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças estatísticas entre si.

Observando a tabela 2, pode-se concluir que todos os tratamentos apresentam diferenças significativas entre si, sendo que as sementes contaminadas apresentaram maiores intensidades nos valores de MDI. Isto indica que a atividade dos fungos contribui de forma significativa para o aumento de atividade observada pelo *biospeckle* laser, o que faz com que os valores de MDI observados sejam maiores em sementes nas quais os fungos estejam presentes. Além da diferença entre as sementes infectadas e a testemunha, também é possível observar diferença significativa entre as sementes contaminadas com *Fusarium oxysporum f. sp. Phaseoli* e aquelas contaminadas com *Aspergillus flavus*, sendo que estas apresentaram valores de MDI mais elevados.

Este resultado é importante, pois permite presumir que, em condições experimentais altamente controladas, é possível diferenciar quanto ao nível de atividade, sementes contaminadas com o fungo *Fusarium oxysporum f. sp. Phaseoli*, das sementes contaminadas com o fungo *Aspergillus flavus*, desde que ambas as sementes tenham o mesmo potencial de inóculo e apresentem teores de

água o mais próximo possível. No entanto, em condições não experimentais, é difícil garantir que haja uma homogeneidade das sementes quanto ao teor de água, bem como, que o potencial de inóculo das sementes analisadas seja igual. Dessa forma, torna-se necessária a extração de informações adicionais, permitindo uma melhor caracterização do *biospeckle* resultante dos materiais biológicos analisados. Nesse sentido, a análise dos componentes de frequência pode ser empregada como uma potencial ferramenta de caracterização do *biospeckle* laser de diferentes materiais, permitindo a extração de informações complementares ao MDI.

#### 4.3 Análise dos componentes de frequência do biospeckle laser

Utilizando o histograma de amplitude média de frequência, obtido para as 25 repetições de cada tratamento, observaram-se quais harmônicos apresentavam tendências diferenciadas, sendo estes escolhidos para a análise. A figura 7 ilustra as variações de amplitude média de frequência para os três tratamentos, em função dos intervalos de aquisição (0,08 s).

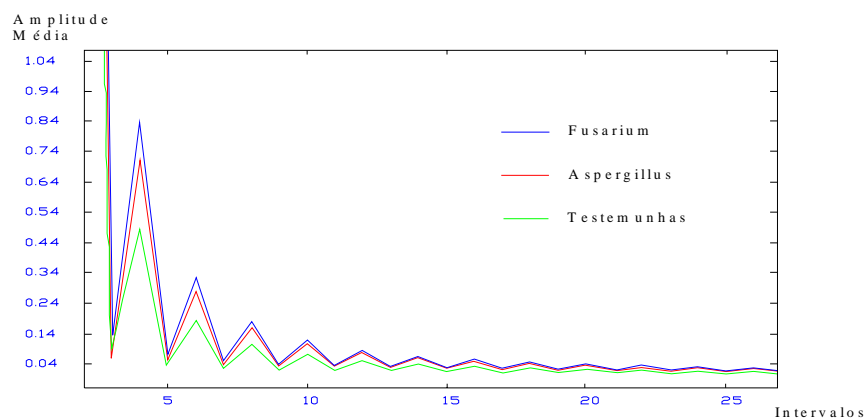


FIGURA 7 – Espectro de frequência para os três tratamentos (Sementes testemunhas, fungo *Fusarium*, fungo *Aspergillus*).

A análise da figura 7 permite constatar que, para a maioria dos harmônicos, os valores de amplitude média das sementes contaminadas por *Fusarium* se mantiveram acima dos valores de amplitude média das demais sementes, e que as sementes contaminadas por *Aspergillus* apresentaram valores intermediários entre os tratamentos *Fusarium* e *Testemunha*. No entanto, a análise detalhada permite observar duas exceções, sendo elas referentes ao terceiro harmônico, e aos valores que se encontram acima do 45º harmônico.

No terceiro harmônico houve uma inversão das médias de amplitude entre os tratamentos *Aspergillus* e as sementes *Testemunhas*. A partir do 45º harmônico também ocorreu uma inversão; porém, agora, a inversão ocorreu entre os valores de amplitude dos tratamentos *Fusarium* e *Aspergillus*, permanecendo até o harmônico 512. A figura 8 ilustra o ponto a partir do qual essa inversão ocorre.

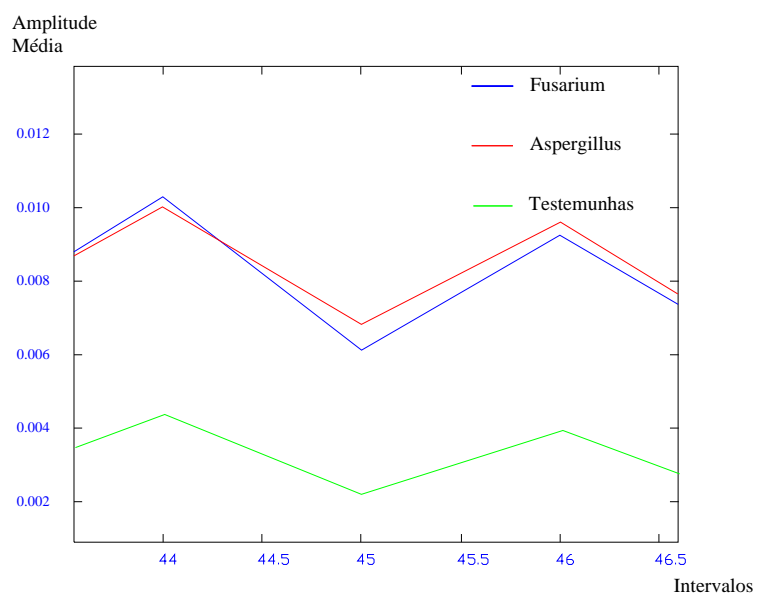


FIGURA 8 –Detalhe da inversão de amplitudes entre os tratamentos *Fusarium* e *Aspergillus*.

Com base nas observações realizadas no gráfico de amplitudes médias, escolheram-se três harmônicos para a análise de diferenciação em frequências, sendo eles: o terceiro (primeira inversão), o quarto (tendência normal) e o centésimo (após a segunda inversão).

#### 4.3.1 Análise detalhada do terceiro harmônico

Os resultados da análise estatística, utilizando as 25 repetições, mostraram que os valores de amplitude do terceiro harmônico do tratamento *Aspergillus* foram estatisticamente inferiores aos valores de amplitude do terceiro harmônico do tratamento *Testemunhas*. Tal comprovação se deu pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, como pode ser observado na tabela 3.

TABELA 3 - Teste Tukey para o fator de variação tratamento avaliando o terceiro harmônico.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
<i>Aspergillus</i>	570.04*	a
<i>Testemunha</i>	960.96	b
<i>Fusarium</i>	1186.92	b

DMS: 284,47 NMS: 0,05; Erro padrão: 84,03; Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças estatísticas entre si.\*Os valores estão multiplicados por 10<sup>4</sup>.

Com a análise da tabela 3, também é possível observar que somente o tratamento *Aspergillus* se diferencia dos demais. Para o terceiro harmônico não houve diferenças significativas entre os tratamentos *Testemunha* e *Fusarium*. Nota-se, no entanto, uma tendência de valores de amplitude mais elevados para as sementes tratadas com *Fusarium*.

Dessa forma, os resultados indicam que, valores reduzidos de amplitude no terceiro harmônico são um indicativo da presença do fungo *Aspergillus* em sementes de feijão, podendo esta informação ser utilizada para caracterizar o *biospeckle* de sementes de feijão contaminadas com este fungo.

#### 4.3.2 Análise detalhada do quarto harmônico

Para o quarto harmônico os resultados mostraram menores valores de amplitude para o tratamento *Testemunha*, seguido dos tratamentos *Aspergillus* e *Fusarium*, respectivamente. A tabela 4 contém os resultados do teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para o quarto harmônico.

TABELA 4 - Teste Tukey para o fator de variação tratamento avaliando o quarto harmônico.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
<i>Testemunha</i>	5252.00*	a
<i>Aspergillus</i>	7712.00	b
<i>Fusarium</i>	9004.00	b

DMS: 1327,81 NMS: 0,05; Erro padrão: 392,22; Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças estatísticas entre si. \*Os valores estão multiplicados por 10<sup>4</sup>.

Pela análise da tabela 4, é possível observar que apenas o tratamento *Testemunha* apresenta diferença significativa em relação aos demais tratamentos. Mais uma vez, o tratamento *Fusarium* mantém a tendência de apresentar valores mais elevados do que os demais. Porém, não é verificada diferença estatística entre os tratamentos *Fusarium* e *Aspergillus*. Estes resultados mostram que é possível utilizar esta faixa de frequência como informações adicionais para diferenciar sementes contaminadas de sementes não contaminadas, não sendo possível, neste caso, diferenciar o agente patogênico.

### 4.3.3 Análise detalhada do centésimo harmônico

No centésimo harmônico já é possível verificar a inversão ocorrida entre os tratamentos *Aspergillus* e *Fusarium*, sendo que, neste harmônico, o tratamento *Aspergillus* apresentou valores de amplitude mais elevados do que o tratamento *Fusarium*, como pode ser observado na tabela 5.

TABELA 5 – Teste de Tukey para o fator de variação tratamento avaliando o centésimo harmônico.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
Testemunha	5.52*	a
<i>Fusarium</i>	17.64	b
<i>Aspergillus</i>	28.09	c

DMS: 4,74 NMS: 0,05; Erro padrão: 1,40; Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças estatísticas entre si. \*Os valores estão multiplicados por  $10^4$ .

Nota-se, pela análise da tabela 5, que todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas com relação aos demais, sendo os menores valores de amplitude apresentados pelo tratamento *Testemunha*. As informações do centésimo harmônico complementam aquelas que foram obtidas no Terceiro harmônico, podendo ser utilizadas em conjunto com elas para permitir a diferenciação em frequência, entre sementes de feijão contaminadas com o fungo *Fusarium* e sementes de feijão contaminadas com o fungo *Aspergillus*.

### 4.3.4 Considerações finais e trabalhos futuros

A caracterização do *biospeckle* proveniente de determinado material biológico constitui parte fundamental dos esforços no sentido de tornar viável a utilização do fenômeno em aplicações reais no cotidiano da Engenharia Agrícola, bem como, de outras áreas de conhecimento. No entanto, isto é algo

extremamente complexo, envolvendo muitas variáveis, devendo, portanto, ser estudado à luz do maior número de informações possíveis, sendo necessário, assim, lançar mão de diferentes técnicas de análise, sejam relativas ao domínio da frequência, sejam relativas ao domínio do tempo, ou simplesmente valores absolutos de variação de intensidades dos pixel's das imagens do biospeckle. Dessa forma, sugere-se, em trabalhos futuros o emprego de técnicas complementares de análise, tais como a Transformada de *Wavelet* e os filtros *Butterworth*.

A Transformada de *Wavelet* é uma ferramenta de processamento de sinais que possui características interessantes quando comparadas às técnicas clássicas de Fourier, suas funções bases (*wavelets*) não pertencem a um espaço finito de soluções, isto é, existem teoricamente infinitas possibilidades de se projetar *wavelets* com propriedades especiais, voltadas para aplicações específicas. Pode-se, por exemplo, projetar *wavelets* otimizadas para realizar análises especiais, cuja característica da função base é semelhante ao sinal analisado, podendo, assim, ser plenamente empregada na análise de imagens do *biospeckle* laser.

Os Filtros *Butterworth*, por outro lado, podem ser projetados para permitir a passagem de uma banda, ou faixa, específica de frequência. Uma vez que a frequência de variação do *speckle* de um determinado material biológico seja conhecida ou estimada, os filtros *Butterworth* podem ser empregados em conjunto com outras técnicas, como DG e Fujji, permitindo, assim, a criação de mapas visuais com áreas de atividades distintas em cada faixa de frequência avaliada.

## 5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as técnicas de análise de frequência podem ser utilizadas como mais uma metodologia para a obtenção de informações relativas aos materiais submetidos ao *biospeckle* laser, trazendo informações importantes relativas aos materiais estudados, com potencial aplicação no estudo da interação entre a luz laser e o material biológico.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BERGKVIST, A. **Biospeckle-based study of the line profile of light scattered in strawberries**. 1997. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Faculty of technology at Lund University, Suécia.

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Departamento Nacional de Defesa Vegetal, 1992. 365 p.

DODMAN, R. L.; REINKE, J. R. A selective medium for determining the population of viable conidia of *Cochliobolus sativus* in soil. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 33, n. 2, p. 287-291, 1982.

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

ENES, A. M.; RABELO, G. F.; BRAGA JÚNIOR, R. A.; RODRIGUES, S. Utilização do Laser aplicado na diferenciação de tecidos vivos de tecidos mortos em sementes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 33., 2004, São Pedro. **Anais...** Campinas: Unicamp/Embrapa, 2004.

FILIPPOVA, G. G.; KASHEMIROVA, L. A. A culture medium for *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. **Mikologiya i Fitopatologiya**, Moscow, v. 24, n. 4, p. 333-335. 1990.

KULKARNI, S.; SIDDARAMAIAH, A. L.; PRASAD, K. S. K. A selective medium for isolation of *Drechslera sativum* (Pam., King & Bakke) Subram. & Jain, from soil. **Current Research**, Boston, v. 8, p. 134-135. 1978.

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

MATHUR, S. B. Testing seeds of tropical species for seed-borne diseases. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 11, p. 113-128, 1983.

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

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 126-130, Jan./Feb. 1995.

MOREIRA, M. F. B.; BRAGA JÚNIOR, R. A.; BOREM, F. M.; RABAL, H. J.; RABELO, G. F.; FABBRO, I. M. Dal; TRIVI, M. R.; ARIZAGA, R. Caracterização da Transmissão da Luz Laser em semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) . **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 119-126, 2002.

NEERGAARD, P. Detection of seed-borne pathogens by culture tests. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 1, n. 1, p. 217-254, 1973.

NEUROHR, R.; KOHLER, B.; NAGE, W.; POPP, F. A.; WALER, J. Photon Emission – A new method for scanning the quality of food. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, Stuttgart, v. 87, n. 3, p. 78-82, Mar. 1991.

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

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

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**: Exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309 p.

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

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

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

RABELO, G. F.; BRAGA JUNIOR, R. A.; FABBRO, I. M. D. . Laser speckle techniques in quality evaluation of orange fruits. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 4, 2005.

Available from:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-43662005000400021&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662005000400021&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 25 Set. 2006.

REIS, E. M. Selective medium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 1, p. 68-70, Jan. 1983.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CASA, R. T.; BLUM, M. M. C. Comparison of methods to detect leaf and head blighting fungi in small grain seeds. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 364-367, out./dez. 1999.

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

RODRIGUES, S.; BRAGA JUNIOR, R. A.; RABELO, G. F.; ENES, A. M.; BATISTA, C. A. M.; Dal FABBRO, I. M.; RESENDE, O. Efeito da umidade na determinação da atividade biológica de sementes de feijão. (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizando imagens de speckle dinâmico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa - MG, v. 30, n. 2, p. 135-139, 2005.

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

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

## ANEXOS

<b>Anexo B</b>	<b>Página</b>
Figura 1B - Diferenças entre os valores obtidos na autocorrelação e na convolução dos dados do <i>biospeckle</i> laser.....	39
<b>Anexo C</b>	
Tabela 1C - Teste de Tukey para fator de variação teor de água.....	41
Tabela 2C - Teste de tetrazólio emitido pelo laboratório de sementes – UFLA.....	42
<b>Anexo D</b>	
Figura 1D - STS de baixa e alta atividade, respectivamente. Fonte – Rabelo 2000.....	44
Figura 2D - MOC de baixa e alta atividade, respectivamente. Fonte – Rabelo (2000).....	47

## **Anexo A**

### **Fungos em Sementes**

Através das sementes infectadas, os fungos são introduzidos em áreas novas de cultivo ou em lavouras sob rotação de culturas, sendo posteriormente transmitidos para os órgãos radiculares (mesocótilo e raízes seminais) e aéreos (coleóptilo e plúmula). No trigo (*Triticum aestivum* L.), estudos sobre a eficiência de transmissão de fungos relatam valores de até 88% ao coleóptilo, 68% ao mesocótilo e 38% à plúmula (Toledo et al., 1996, citados por Barba, 2002). Reis (1987) citado por Barba (2002), considera que o controle de fungos deve ser orientado à erradicação na semente a fim de reduzir o inóculo primário na lavoura. Para isso, torna-se necessário contar com métodos de detecção mais sensíveis que permitam revelar o máximo de incidência do patógeno, proporcionando maior precisão na quantificação do fungo veiculado pela semente (Barba, 2002).

A maioria das culturas destinadas à produção de alimentos está sujeita ao ataque de doenças, sendo grande parte dos seus agentes etiológicos transmitidos pelas sementes. No caso específico do feijoeiro, mais de 50% das suas principais enfermidades têm seus agentes causais transmitidos através das sementes (Neergaard, 1979).

Segundo Filgueiras (1981), a presença de agentes causadores de doenças nas sementes de diversas culturas afeta a germinação, emergência de plântulas, vigor e produção, além de representar um perigo potencial de disseminação dos patógenos à próxima geração e às novas áreas.

A utilização de sementes com elevado padrão de sanidade é uma das medidas de controle que tem apresentado melhor resultado. Para explorar este

aspecto, é necessário contar com métodos específicos e sensíveis para detecção de patógenos em sementes. Também é muito importante correlacionar a incidência do patógeno na semente com o desenvolvimento da doença em campo, tanto para determinar a taxa de transmissão e o nível de tolerância do patógeno na semente, quanto para a definição do método mais adequado para a sua detecção na semente (Schaad et al., 1980).

É preciso ter em mente que baixo nível de inóculo, associado às sementes, quase sempre determina danos incalculáveis ao hospedeiro. Por ser agente que raramente causa morte das sementes na fase de pré-emergência no solo e que se disseminam de forma explosiva a partir de plantas jovens infectadas, torna-se evidente que o controle desses patógenos no estágio de sementes é uma medida de grande alcance.

O fungo *Fusarium oxysporum f. sp. Phaseoli* é o causador da murcha de Fusário. O patógeno é um fungo de solo onde sobrevive saprofiticamente, provavelmente por curto período de tempo, em restos de cultura, podendo, entretanto, sobreviver por vários anos na forma de clamidosporos (Kimati, 1980). Nos tecidos infectados também são produzidos micro e macroconídios. De acordo com Kendrick (1934), citado por Kimati (1980), o fungo é transportado pela semente aderindo à sua superfície.

A alta longevidade do fungo na forma de clamidosporos, seja no solo ou em restos vegetais, dificulta o seu controle, e o uso de sementes limpas passa a ter importante papel em áreas ainda não infectadas com o fungo.

## **Fungos de armazenamento**

Se a semente não estiver em boas condições, ou o armazenamento não for feito adequadamente, podem ocorrer enormes perdas. Certos fungos que invadem as sementes antes ou durante o armazenamento podem ser responsáveis pela redução da sua viabilidade. Tanaka & Corrêa (1981) constataram que o fungo *Aspergillus* pode causar a deterioração das sementes de feijão armazenadas, resultando na queda da porcentagem de germinação e emergência.

Esses fungos penetram na semente através do hilo e da micrópila ou, ainda, por meio de rachaduras no tegumento da semente. Em geral os fungos de armazenamento aumentam e a porcentagem de germinação de sementes decresce com o aumento do teor de umidade e do tempo de armazenagem (Lopez & Christensen, 1962).

Além do teor de umidade relativa e da temperatura de armazenamento, o grau de infecção inicial é fator que determina a perda da viabilidade. Impurezas, como resíduos de caule e folhas e pequenos torrões de terra, retêm umidade, criando um ambiente mais favorável ao crescimento fúngico nas sementes.

Na produção de feijão, o uso de sementes contaminadas e/ou infectadas tem sido um dos principais fatores que ocasionam o baixo rendimento da cultura em nosso país. Nessas circunstâncias é que o estudo de métodos de identificação de patógenos de sementes pode propiciar benefícios relevantes em termos do aumento da produtividade.



## **Análise de sementes**

Com base no conhecimento do processo de deterioração, os testes de vigor foram sendo desenvolvidos e aperfeiçoados pela pesquisa e introduzidos paulatinamente na rotina de controle de qualidade de sementes.

Os testes disponíveis incluem tanto os que visam avaliar o estado atual das sementes e relacioná-las com o desempenho no armazenamento ou após a semeadura (teste de tetrazólio, condutividade elétrica, respiração e classificação do vigor de plântulas), como os que procuram verificar a resposta das sementes em situações de estresse (teste de frio, germinação à baixa temperatura, imersão em soluções tóxicas, envelhecimento acelerado e deterioração controlada) (Krzyszowski et al., 1990).

Além destas características e para que venham a ser amplamente utilizados, os testes de vigor devem apresentar características, tais como: reprodutibilidade de resultados, interpretação e correlação com emergência de plântulas em campo sob ampla faixa de condições de ambientes, rapidez, objetividade, simplicidade e viabilidade econômica (Tekrony, 1983).

Os testes de vigor representam importante parâmetro para a caracterização do potencial fisiológico das sementes. Têm sido desenvolvidos para proporcionar informações adicionais ao teste de germinação, mas não para substituí-la. A escolha de determinado teste de vigor deve ser baseada no conhecimento da relação entre a resposta da semente a determinado teste com o seu comportamento em campo ou armazenamento, para que se possa dimensionar a confiabilidade das informações obtidas e aplicá-las corretamente na tomada de decisões (Marcos Filho, 1999). Os testes avaliam diferentes aspectos do comportamento das sementes, ou seja, um mesmo lote pode exibir reações variáveis em função da característica que foi avaliada e do genótipo.

Neste sentido, vários autores (Marcos Filho et al., 1984; Tekrony & Egli, 1977) destacam a utilização conjunta dos resultados de vários testes para avaliação do vigor de sementes.

### **Referências Bibliográficas**

BARBA, J. T.; REIS, E. M.; FORCELINI, C. A. Comparação de métodos para detecção de *bipolaris sorokiniana* em sementes de cevada\*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 389-393, jul./ago. 2002.

FILGUEIRAS, T. S. Seed vigor and productivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 6, p. 851-854, nov./dez.1981.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F. **Manual de fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1980. v. 2, cap. 19, p. 297-318.

KRZYZANOWSKI, F. C.; MIRANDA, Z. F. S. Relatório do Comitê de vigor. **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 7 -25, dez. 1990.

LOPEZ F., L. C.; CHRISTENSEN, C. M. Invasion of and damage to bean seed by storage fungi. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 46, n. 11, p. 785-789, Nov. 1962.

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. Londrina: ABRATES, 1999 p. 1.1-1.21.

MARCOS FILHO, J.; PESCARIN, H. M. C.; KOMATSU, Y. H.; DEMÉTRIO, C. G. B.; FANCELLI, A. L. Testes para avaliação do vigor de sementes de soja e suas relações com emergência das plântulas no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 5, p. 605-613, maio 1984.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: Mac Millan Press, 1979. 839 p.

SCHAAD, D. W.; SITTERLY, W. R.; HUMAYDAN, H. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* to black rot crucifers. **Pant Disease**, St. Paul, v. 64, n. 1, p. 91-92, Jan. 1980.

TANAKA, M. A. S.; CORRÊA, M. U. Influência de *Aspergillus* e *Penicillium* no armazenamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 451-456, out. 1981.

TEKRONY, D. M. Seed vigour testing - 1982. **Journal of Seed Technology**, Lincoln, v. 8, n. 1, p. 55-60, 1983.

TEKRONY, D. M.; EGLI, D. B. Relationship between laboratory indices of soybean seed vigor and field emergence. **Crop Science**, Madison, v. 17, n. 4, p.573-577, July/Aug. 1977.

## Anexo B

### Análise comparativa entre convolução e autocorrelação na análise do *biospeckle* laser

Os resultados da análise comparativa mostraram que o módulo dos valores obtidos quando os dados de *biospeckle* foram submetidos à convolução, seguida da Transformada de Fourier, eram iguais àqueles obtidos quando os mesmo dados eram submetidos à autocorrelação seguida da Transformada de Fourier. A figura 1B representa os valores da autocorrelação em função da convolução.

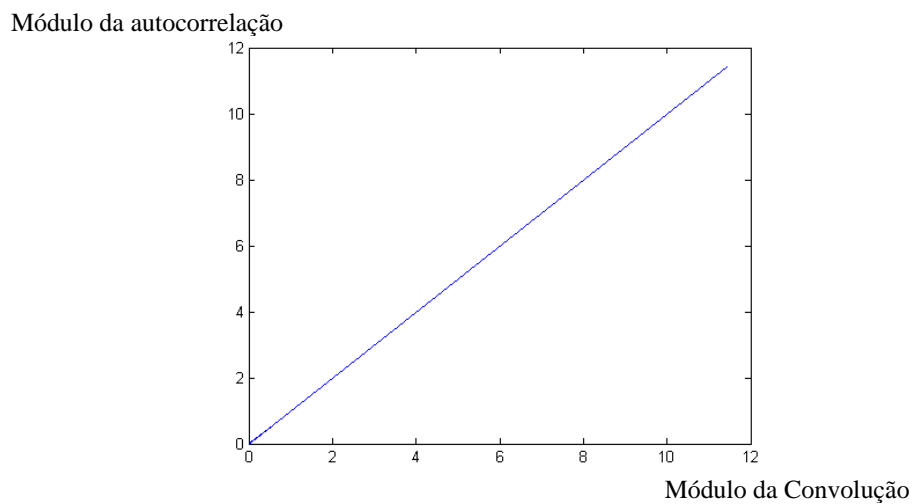


FIGURA 1B – módulo da Autocorrelação x módulo da convolução.

Observa-se, pela análise do figura 1B, que há uma linearidade, comprovando que os valores são equivalentes.

## Anexo C

### Análises qualitativas das sementes

Os resultados da análise de teor de água pelo método da estufa mostraram que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas quanto ao teor de água, indicando que o controle na manipulação e preparo das sementes foram eficientes no sentido de garantir igual contribuição da variável umidade para todos os tratamentos, evitando, assim, que essa variável pudesse comprometer as observações. A tabela 1C exibe os resultados do teste de Tukey a 5% para a variável Teor de água, avaliando os três tratamentos.

TABELA 1C – Teste de Tukey para o fator de variação teor de água.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
Testemunha	40.19	a
Aspergillus	41.21	a
Fusarium	42.12	a

DMS: 2,03 NMS: 0,05; Erro padrão: 0,40; Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferenças estatísticas entre si.

### Teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio comprovou a viabilidade das sementes utilizadas nos ensaios, mostrando um potencial de vigor de 78% e um potencial de germinação de 96%, como pode ser visto na tabela 2C.

TABELA 2C – Teste de tetrazólio emitido pelo laboratório de sementes - UFLA

Repetições	Vigor	Porcentagem de germinação
I	72	97
II	83	95
Médias	78	96

Como a porcentagem de germinação indica a viabilidade da semente, e esta, por sua vez, está relacionada com a porcentagem de tecido vivo presente na semente, pode-se concluir com base na tabela 2C, que a semente utilizada no trabalho apresentava, em sua grande maioria, tecidos vivos e que, portanto, poderia ser utilizada como material-base para a realização do experimento.

## Anexo D

### Descrição das principais metodologias adotadas na avaliação do *biospeckle*

#### Módulo de Dispersão de Intensidades

O Padrão temporal do *speckle* (STS) constitui-se de uma manipulação das diversas imagens obtidas da superfície do objeto iluminado pelo laser. De cada imagem conseguida, retira-se uma linha que é colocada ao lado da linha da imagem subsequente, formando uma imagem de 512x512 “pixels” denominada de STS. A ocorrência de algum movimento superficial ou interno do material será transmitida para a figura do *speckle* formado, e, assim, a linha observada será diferente da anterior. Por outro lado, se a figura formada for composta por linhas bem definidas, significa que não está ocorrendo mudança na formação do *speckle* de uma imagem para a outra, repetindo sempre o mesmo padrão de antes (Rabelo, 2000). A figura 1Da apresenta o STS de um material de baixa atividade, enquanto que a figura 1Db, apresenta o STS de um material que exhibe alta atividade.

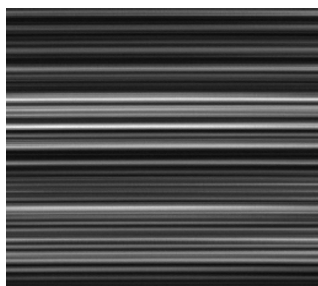


Fig. 1Da

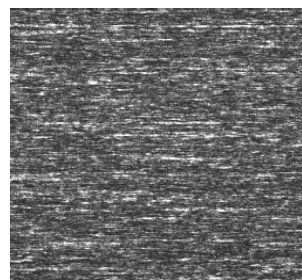


Fig. 1Db

FIGURA 1D – STS de baixa e alta atividade respectivamente. Fonte - Rabelo 2000.

O STS carrega informações da atividade do material sob estudo; sendo assim, cada nível de atividade apresenta um padrão STS diferente. É possível observar visualmente as diferenças existentes entre um STS proveniente de um material de baixa atividade e um STS proveniente de um material de alta atividade. No entanto, o que tem sido proposto é a utilização de métodos matemáticos de diferenciação, tal como o MDI (Módulo de Dispersão de Intensidades). Para se chegar ao MDI é necessário fazer algumas transformações na matriz STS, gerando, assim, uma nova matriz denominada MOC (Matriz de Ocorrências Modificada). Matematicamente, a MOC é definida pela equação 1D.

$$MOC = [N_{ij}] \quad (1D)$$

Em que,

$N_{ij}$  – número de ocorrências de intensidades

$i, j$  – intensidades sucessivas

As entradas são o número de ocorrências que um certo valor de intensidade (**i**) é seguido por um valor de intensidade (**j**), o que de acordo com Arizaga et al (1999) caracteriza um caso particular da também chamada "spatial gray level dependence matrix", usualmente utilizada para caracterizar a textura de imagens.

A figura 1D pode ser transformada em uma matriz de intensidades, onde são considerados os valores das intensidades de cada elemento da imagem, para, em seguida, obter-se a matriz de ocorrências modificada (MOM). A figura 2D-a representa a matriz de ocorrências modificada do STS de baixa atividade da figura 1D-a, enquanto que a figura 2D-b, refere-se à matriz de ocorrências modificada com respeito ao STS de alta atividade da figura 1D-b. Observa-se que em 2D-b, a dispersão dos pontos é maior do que em 2D-a, na qual os pontos



se concentram em torno da diagonal principal da matriz de intensidades. Para se extrair um número que represente ou quantifique essa dispersão, Arizaga et al (1999), citado por Rabelo (2000), propôs calcular o momento de inércia da matriz de ocorrências modificada (MOM), analogamente ao sistema mecânico, como se a dispersão da matriz fosse uma massa. O método foi estudado por Rabelo (2000), o qual, comprovando sua eficiência, passou a tratá-lo como Módulo de Dispersão de Intensidade (MDI). Esse parâmetro consiste no somatório dos produtos dos valores de intensidade da matriz pelo quadrado da distância entre cada elemento da matriz e a diagonal principal. A equação 2D representa a operação do módulo de dispersão de intensidades.

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

Para efeito de exemplo, ao se calcular o MDI para as matrizes das figuras 2D-a e 2D-b, obtêm-se respectivamente os valores 120 e 2450, valores esses que são utilizados como parâmetros de medição de atividade da imagem, para correlação futura com a atividade metabólica.

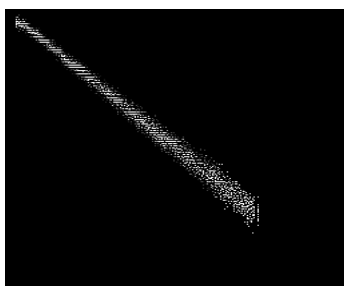


Fig. 2D-a MOC baixa atividade

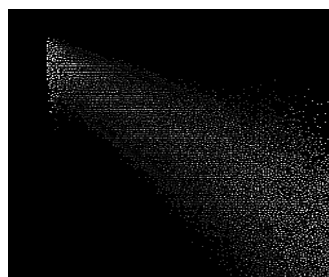


Fig 2D-b MOC alta atividade

FIGURA 2D – MOC de baixa e alta atividade respectivamente. Fonte – Rabelo (2000).

### Diferenças Generalizadas

O método de Diferenças Generalizadas permite indicar áreas que apresentam diferentes níveis de atividades relacionadas à mudança do padrão do *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 do pixel na imagem. O que se faz, então, é realizar uma soma de diferenças de intensidade entre uma imagem e a sua subsequente. O resultado será uma nova imagem e um clareamento dos pixels que apresentarem mudanças de intensidade, representado pela Equação 3D.

$$I(x,y) = \sum_K \sum_I |I_k(x,y) - I_k + I(x,y)| \quad (3D)$$

Em que: **K**- número de imagens

**I** – intensidade

**x,y** –pixels subsequentes.

Esta é a técnica que está sendo proposta, em conjunto com métodos de filtragem, para a identificação de fungos em sementes, identificando áreas com níveis de atividade diferentes, realizando, assim, um mapa que permitirá inferir sobre as áreas contaminadas da semente. Rabelo(2000) apresenta uma descrição detalhada do funcionamento do método de Diferenças Generalizadas.

## **Método de Fujji**

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. A equação 4D apresenta essa ponderação.

$$I(x,y) = \sum \left[ \frac{I_K(x,y) - I_{K+L}(x,y)}{I_K(x,y) + I_{K+L}(x,y)} \right] \quad (4D)$$

Porém, para pequenas intensidades, o efeito das diferenças fica maior do que para intensidades maiores.

## **Referência bibliográfica**

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