



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**ANÁLISE DO BIOSPECKLE LASER NA DIFERENCIAÇÃO DE
TECIDOS VIVOS E MORTOS EM SEMENTES**

SILVESTRE RODRIGUES

2003

SILVESTRE RODRIGUES

**ANÁLISE DO BIOSPECKLE LASER NA DIFERENCIAÇÃO DE
TECIDOS VIVOS E MORTOS EM SEMENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Construções Rurais e Ambiente, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior
Co-Orientador: Prof. Dr. Giovanni Francisco Rabelo

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

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

Rodrigues, Silvestre

Análise do biospeckle laser na diferenciação de tecidos vivos e mortos em sementes / Silvestre Rodrigues. -- Lavras : UFLA, 2003. 43 p. : il.

Orientador: Roberto Alves Braga Júnior.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Semente. 2. Viabilidade. 3. Laser. 4. Biospeckle. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.521

SILVESTRE RODRIGUES

**ANÁLISE DO BIOSPECKLE LASER NA DIFERENCIAÇÃO DE
TECIDOS VIVOS E MORTOS EM SEMENTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Construções Rurais e Ambiente, para obtenção do título de mestre.

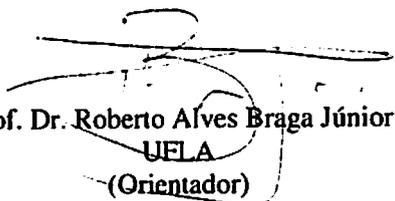
Aprovada em 04 de fevereiro de 2003

Prof. Dr Inácio Maria Dal Fabbro

UNICAMP

Prof. Dr Giovanni Francisco Rabelo

UFLA



Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

OFEREÇO

A DEUS E A MARIA SANTÍSSIMA.

DEDICO

Aos meus pais, Helvécio Rodrigues e Maria Luzia da Silva Rodrigues e a meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Engenharia, pela realização do mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos orientadores, Professores Drs. Roberto Alves Braga Júnior e Giovanni Francisco Rabelo, pela orientação, incentivo, colaboração e, sobretudo pela amizade nesses anos de convivência.

À Professora Maria Laene Moreira de Carvalho, pelo auxílio e ensinamento.

Ao Professor Flávio Meira Borém, pelo apoio.

Ao NeOLaser e seus integrantes: Adilson Machado Enes, Éderson Fonseca Santos, Diego Mello da Silva, Cássia Aparecida Marques Batista, Mara Rúbia Silva, Mônica Fabiana Bento Moreira, e Luis Renato Granato.

Às laboratoristas Ana, Dalva e Elza, do Laboratório de Sementes, pela ajuda.

Ao Laboratorista Cláudio do Laboratório de Patologia de sementes.

À mestranda Alessandra Querino da Silva, pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos Mestrandos Osvaldo Resende e Deise Menezes, pela ajuda no Laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas.

À Daniela, secretária da pós graduação.

Aos amigos.

SUMÁRIO

Página

SUMÁRIO	
LISTAS DE TABELAS	
LISTAS DE FIGURAS	
LISTAS DE EQUAÇÕES	
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
3.1 Teste de germinação.....	4
3.2 Teste de tetrazólio.....	6
3.3 Envelhecimento acelerado.....	8
3.4 Laser em material biológico.....	11
4 MATERIAL E MÉTODO.....	17
4.1 Experimento de umidade determinação da faixa ideal de água da semente para iluminação	17
4.2 Diferenciação de tecidos vivos de tecidos mortos em sementes.....	19
4.3 Definição do “ <i>set-up</i> ” de iluminação, captura e tratamento de imagens.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Determinação da faixa ideal de água na semente para iluminação.....	23
5.1.1 Fase 1- Experimento de umidade.....	23

5.1.2 Fase 2 - Experimento de umidade.....	25
5.2 Diferenciação de tecidos vivos de Tecidos mortos em sementes.....	29
6 CONCLUSÃO.....	32
7 TRABALHOS FUTUROS.....	34
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	37

LISTAS DE TABELAS

Página

- TABELA 1 – Quadro de análise de variância do momento de inércia do experimento de umidade – Fase 1. UFLA, Lavras, MG, 2002.....23
- TABELA 2 – Valores médios de momento de inércia obtidos na fase 1 da análise do “biospeckle” de sementes de feijão. UFLA, Lavras, MG, 2002.....24
- TABELA 3 – Quadro de análise de variância do momento de inércia da média de cada tratamento do experimento de umidade – Fase 2. UFLA, Lavras, MG, 2002.....26
- TABELA 4 – Valores médios de momento de inércia obtidos na fase 2 da análise do “biospeckle” sementes de feijão. UFLA, Lavras, MG, 2002.....27
- TABELA 5 – Quadro de análise de variância experimento de diferenciação de sementes vivas de sementes mortas. UFLA, Lavras, MG, 2002.....29
- TABELA 6 – Valores médios de momento de inércia obtidos na análise do “biospeckle” em tecidos vivos e mortos em sementes de feijão. UFLA, Lavras, MG, 2002.....30
- TABELA 7 – Principais fungos encontrados na avaliação na sanidade de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L), pelo método do *Blotter Test*. UFLA, Lavras – MG, 2002.....31
- TABELA 8 – Valores médios de viabilidade e germinação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L). UFLA, Lavras – MG, 2002.....31
- TABELA 9 – Valores de umidade conseguidos após obter os tratamentos. UFLA, Lavras , MG, 2002.....32

LISTAS DE FIGURAS E GRÁFICOS

Página

FIGURA 1a - Imagem gerada de um PTS alta atividade.....	14
FIGURA 1b - Imagem gerada de um PTS baixa atividade.....	14
FIGURA 2a -Matriz de ocorrência de um material de baixa atividade.....	15
FIGURA 2b - Matriz de ocorrência de um material de alta atividade.....	15
FIGURA 3 - “Set-up” de iluminação e captura de imagens.....	22
GRÁFICO 1 - Tendência das médias dos valores de momento de inércia para cada valor de umidade para fase 1. UFLA, Lavras , MG, 2002.....	25
GRÁFICO 2 - Tendência das médias dos valores de momento de inércia para cada valor de umidade para fase 2. UFLA, Lavras , MG, 2002.....	28

LISTAS DE EQUAÇÕES

Nº	Descrição	Equação	página.
1	Matriz de ocorrências	$MOC = [N_{ij}]$	15
2	Matriz de ocorrência modificada	$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}} [N_{ij}]$	16
3	Momento de inércia de intensidades	$MI = \sum M_{ij} (I - J)^2$	16
4	Porcentagem de quebras	$P(\%) = \frac{100X(U_i - U_f)}{(100 - U_f)}$	18

RESUMO

RODRIGUES, Silvestre. **Análise do “biospeckle” laser na diferenciação de tecidos vivos de tecidos mortos em sementes**: Lavras, UFLA, 2003. 41p. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola).

Este trabalho tem por objetivo separar tecidos vivos de tecidos mortos em sementes, pela análise do “biospeckle”, visando contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia para análise de vigor e viabilidade de sementes. O processo consiste basicamente na análise do “biospeckle”, que é um fenômeno óptico de interação da luz coerente com o material biológico. Para este trabalho, foram utilizadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*). O material biológico iluminado pela luz coerente apresenta transformações superficiais e de constituição interna ao longo do tempo, apresentando-se como uma rede de difração dinâmica. Por meio de tratamento digital de imagens coletadas para retratação do fenômeno é possível diferenciar níveis de atividade biológica em sementes. Isso também poderia servir para mapear áreas com maior ou menor atividade, em uma mesma semente, servindo, assim, como método de análise de vigor e viabilidade. Neste trabalho foi realizado um estudo visando explorar algumas variáveis responsáveis pela interação óptica do material com a luz laser por meio da comparação de um tecido vivo com um tecido morto. A contribuição vai no sentido de estabelecer um modelo dessa interação e isolar as variáveis que interferem nos resultados, mostrando que é possível separar tecido vivo de tecido morto de forma controlada para, então, ser possível separá-los em uma mesma semente. Os resultados demonstraram que, entre 11% e 19% de umidade a influência no método é pequena enquanto que para valores de umidade, maiores é necessário que o nível de umidade das amostras estejam bem próximos para aumentar a confiabilidade do método. Conclui-se também que a técnica do “biospeckle” consegue separar tecidos vivos de tecidos mortos em sementes de feijão.

* Comitê de Orientação: Roberto Alves Braga Júnior – UFLA (Orientador),
Giovanni Francisco Rabelo – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

RODRIGUES, Silvestre. **Biospeckle Analysis of seeds Tissue senescence Differentiation**: Lavras, UFLA, 2003. 41p. (Dissertation – Master Program in Agricultural Engineering)*.

This research work reports tests results and analysis of seed senescence based on a dynamic laser speckle technique. The incidence of laser light on the surface of a vegetative material generates a dynamic speckle phenomena also named as *biospeckle*. Previous research works described the application of the dynamic speckle technique on painting drying determination, as correlated to mechanical properties of vegetative tissue, to blood pathology, to semen viability, etc, seeking, in this work, to contribute to a methodology development for seed viability analysis. The process consists basically in the biospeckle analysis of bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L). The laser illuminated biological material exhibits superficial optical transformations with an internal generation of a dynamic diffraction net along the time. Image treatment exhibit and analysis of the phenomenon allow to identify and to map areas their different levels of biological activity, which might serve as a method of seed viability analysis. The comparison of tissues exhibiting different bioactivity induced considerations on parameters interfering on the dynamic speckle phenomena. The contribution tends toward the establishment of a model capable of isolating the variables which interfere on the results, being possible, this way, to separate alive from dead tissues in a same seed. The methodology was set to compare the bioactivity of viable seeds sample with not viable ones. A sample of seeds has been considered *not viable* after soaking in water for 16 hours and freezing for 24 hours at 18°C negative . The presence of fungi has also been tested to prevent possible interference on the phenomenon under study. The biospeckle technique is showing to be a potential methodology in identifying vegetative tissues of different biological activities.

*Guidance Committee: Roberto Alves Braga Júnior , UFLA (Adviser), Giovanni Francisco Rabelo , UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento do nível de qualidade das sementes é de fundamental importância para que se tenha uma produção de grãos de qualidade. Para assegurar que as sementes que irão ao campo sejam de qualidade, deve-se submeter uma amostra do lote a testes que atestam sua qualidade quanto à viabilidade e ao vigor. Existem vários testes para avaliar a semente quanto a estas importantes características. A viabilidade é medida, principalmente pelo teste de germinação padrão, que determina o percentual de germinação da semente, em condições favoráveis de umidade temperatura e luminosidade.

O vigor representa potencial de atividade e desempenho de uma semente durante a germinação e a emergência da plântula. Os testes atuais para as análises laboratoriais para monitoramento da viabilidade de sementes são subjetivos, lentos e não automáticos e ainda sem padronização, sendo necessário o desenvolvimento de melhorias nos métodos atuais, bem como novas tecnologias para complementar esses métodos.

O “biospeckle” tem sido proposto como mais um método de análise de sementes, servindo como metodologia complementar aos testes atuais. Esta técnica consiste em iluminar o material biológico semente, pela luz laser. A luz laser, ao incidir e penetrar em um material biológico sofre interferência de raios que se interceptam construtiva e destrutivamente, formando uma figura de interferência que se modifica continuamente com uma dinâmica dependente da atividade da amostra. Esse fenômeno é conhecido como “speckle” dinâmico ou “biospeckle”. Desde a descoberta deste fenômeno, muitos esforços têm sido empenhados para sua exploração na análise de materiais biológicos.

Os trabalhos com laser, até o momento, ainda não conseguiram explicar até que ponto algumas variáveis podem interferir no “biospeckle”. Há uma

grande necessidade de pesquisas para dominar e explicar como certas variáveis afetam o fenômeno do “biospeckle”. Uma destas variáveis é a umidade. Outro aspecto importante é o comportamento de um material vivo e de um material morto ao ser iluminado pela luz laser.

Diante disso, este trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de mais uma técnica para análise de sementes utilizando a luz laser. O experimento foi dividido em duas etapas. A primeira teve como objetivo verificar o teor de água mais adequado para se trabalhar com “biospeckle” controlando-se a influência da umidade. A segunda visou separar tecidos mortos de tecidos vivos em sementes utilizando o teor de água da semente dentro do nível encontrado na primeira etapa. A semente utilizada foi a de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), pela homogeneidade encontrada na identificação de sua estrutura.

2 OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver o método de análise do “biospeckle” como ferramenta de estudo de vigor e viabilidade de sementes.

Específicos

Especificamente, foram os objetivos deste trabalho:

- determinar os níveis de teor de água da semente mais adequados para se o método do “biospeckle”;
- separar tecidos vivos de tecidos mortos em sementes, pelo “biospeckle”.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

A qualidade de sementes é definida como a associação de algumas características, tais como a fisiológica, genética, física e sanitária. Estas características afetam a sua capacidade de originar plântulas de alta produtividade (POPINIGIS, 1985). Os componentes físicos e fisiológicos são altamente afetados pelo ambiente em que se formaram as sementes e pelas condições de colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento. Para que se tenha uma ótima produtividade, a qualidade fisiológica está sendo pesquisada nos últimos anos, em razão das sementes estarem sujeitas a uma série de mudanças degenerativas de origem bioquímica, fisiológica e física, após sua maturação, as quais estão associadas com a redução do vigor (ABDUL-BAKI 1980 e ANDERSON, 1973). A garantia do sucesso para todas as culturas depende basicamente da qualidade da semente. Não adianta adotar toda tecnologia sem se dispor de uma semente vigorosa. Para-se ter certeza de se estar usando sementes vigorosas, tem-se que submeter amostras do lote em testes que indiquem a viabilidade e vigor. Para esta indicação existem diversos testes e diversas determinações de campo que podem ser utilizados no controle de qualidade de sementes (MARCOS FILHO *et al.*, 1987).

Sabe-se que o vigor das sementes influi não somente na produção, mas também sobre o ciclo produtivo. Esta influência depende da espécie e, dentro de uma espécie, os lotes apresentam sementes com diferentes vigores. O estágio de deterioração das sementes tem sido avaliado mediante testes de vigor e germinação.

Até o momento não existe uma definição realmente consagrada para definir o conceito de vigor (CARVALHO, 1994.) As duas associações que congregam a tecnologia de sementes, a ISTA ou "International Seed Testing Association", e a AOSA ou "Association of Official Seed Analysts"

apresentam as definições que têm prevalecido. A ISTA define vigor como sendo *“a soma daquelas propriedades que determinam o nível potencial de atividade e desempenho de uma semente ou de um lote de sementes durante a germinação e a emergência da plântula”* (citado por PERRY, 1981). Para a AOSA (1983), a definição de vigor de sementes compreende *“aquelas propriedades que determinam o potencial para uma emergência rápida e uniforme e para o desenvolvimento de plântulas normais sob uma ampla faixa de condições ambientais”*.

Vários testes têm sido empregados para determinar o vigor das sementes de feijão. No entanto, apresentam resultados pouco esclarecedores entre os diversos pesquisadores que estudaram o assunto. Neste sentido, o Comitê de Vigor de Sementes da Associação Brasileira de Sementes (ABRATES) aferiu testes de vigor para sementes de feijão. DIAS e BARROS (1992), ao relatarem os resultados, enfatizaram a necessidade de se padronizar as variáveis e suposições envolvidas em cada teste, além da inclusão de novos testes, visando maiores subsídios para a seleção de testes eficientes na avaliação do vigor de sementes de feijão.

Os testes de germinação, tetrazólio e envelhecimento artificial serão abordados sob a ótica das limitações existentes para sua execução.

3.1 Teste de Germinação

O teste de germinação tem por objetivo a obtenção de informações sobre a qualidade das sementes para fins de semeadura em campo e fornecer dados que possam ser usados, juntamente com outras informações, para comparar diferentes lotes de sementes (BRASIL, 1992). O teste de germinação determina, numa amostra, a porcentagem de sementes que desenvolverão

plântulas normais em condições de germinação favoráveis. Foi desenvolvido e aperfeiçoado para avaliar o valor da semente para fins de semeadura e também para comparar o valor de diferentes lotes (POPINIGIS, 1985). Segundo CARVALHO, (1986) a qualidade fisiológica de um lote de sementes pode ser bem-avaliada usando-se o teste padrão de germinação, desde que o lote apresente alta homogeneidade. Entretanto, se o mesmo apresentar alto grau de heterogeneidade, o teste apresenta baixa sensibilidade e, neste caso, os testes de vigor representam melhor o desempenho das sementes no campo.

O teste de germinação possui algumas limitações (BRASIL, 1992). A realização deste teste em laboratório geralmente não reflete a realidade em campo, devido às variações ambientais que geralmente ocorrem. Devido às condições de laboratório, sementes substancialmente deterioradas conseguem germinar e produzir plântulas que, embora fracas, entram na percentagem de germinação classificadas como plântulas normais (DELOUCHE *et al.*, 1976). O teste de germinação não avalia adequadamente o estágio de deterioração das sementes, a não ser que esteja em estado avançado de deterioração (TOLEDO e MARCOS FILHO, 1977). As transformações degenerativas sofridas pelas sementes, na maioria das vezes, não são detectadas pelo teste de germinação, (ANDRADE *et al.*, 1993).

De acordo com ROBERTS (1972), a classificação das plântulas no teste padrão de germinação, em categorias normais e anormais, está baseada quase completamente no critério morfológico. Por exemplo, a presença, ou ausência, de vários órgãos, de fraturas e outros danos. Não há essencialmente prescrições na classificação e no procedimento de avaliação para diferenças fisiológicas, tais como: velocidade de germinação, taxa de crescimento de plântulas, uniformidade de germinação, etc. As informações obtidas pelo teste de germinação são insuficientes para se determinar o desempenho das sementes sob condições de campo. Desta forma, empresas produtoras de sementes têm

utilizado em conjunto com o teste de germinação, informações obtidas com testes de vigor. Dessa forma, tem sido crescente a busca pelo desenvolvimento de testes que, além de adequados, sejam rápidos, para agilizar as tomadas de decisões e aumentar a eficiência das atividades envolvidas no controle de qualidade, visando a produção e a manutenção de sementes de alto padrão (BITTENCOURT, 1999). Quando se pretende estudar os processos de colheita, conservação, danificações mecânicas, físicas e químicas, tratamento, enfim pesquisas em tecnologia de sementes, devem-se incluir informações sobre o vigor, além da germinação, para se obter conclusões mais seguras (DELOUCHE *et al.*, 1976).

As regras para análise de sementes prescrevem que, nos testes de germinação realizados diretamente sob a luz solar ou artificial, deve-se ter cuidado para que a temperatura não ultrapasse àquela indicada para a espécie, pois esta é considerada máxima (BRASIL, 1992). Assim, para *Phaseolus vulgaris L.*, recomendam-se de 20° a 30°C alternados, ou 20° a 25°C constantes, e a variação não deve ser maior que $\pm 1^{\circ}\text{C}$ em cada período de 24 horas.

3.2 Teste de tetrazólio

A avaliação da viabilidade da semente assume maior importância quando há possibilidade das ocorrências de condições adversas à emergência das plântulas no campo. Conhecendo-se a viabilidade das sementes podem-se adotar procedimentos adequados para a instalação do campo.

O teste de tetrazólio é um teste bastante recomendado, por ser possível sua realização em poucas horas. Para algumas culturas, como ervilha, soja e feijão, a obtenção do resultado não excede 24 horas (GRABE, 1976). Este teste

se baseia na atividade das enzimas desidrogenases, as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias durante a glicólise e o ciclo de krebs. Essas enzimas reduzem o sal de tetrazólio (2, 3, 5 – trifenil cloreto de tetrazólio) nos tecidos vivos das sementes (LAKON, 1949; COPELAND *et al.*, 1959; MOORE, 1985; FRANÇA NETO, 1998).

No processo de redução, as enzimas transferem íons de hidrogênio, liberados pela respiração dos tecidos vivos, para o sal de tetrazólio. Assim, em contato com as sementes, o tetrazólio, que é um sal incolor, é reduzido a um composto não difusível de cor vermelha, conhecido como formazan (BRASIL, 1992). Como essa reação processa no interior das células e o pigmento vermelho não se difunde, há uma delimitação definida entre o tecido que respira (tecido vivo) e o que não respira, tecido morto (MARCOS FILHO *et al.*, 1987). Tecidos deteriorados ou danificados mecanicamente, desenvolvem uma coloração rápida, intensa e profunda, enquanto que os vigorosos apresentam coloração suave e brilhante. Os tecidos mortos não desenvolvem coloração e mostram-se flácidos (DELOUCHE *et al.*, 1976). O padrão de coloração, aliado ao conhecimento das características morfológicas da semente e da plântula, permite avaliar a presença, localização e natureza dos distúrbios dos tecidos embrionários (MOORE, 1972).

A habilidade do analista em reconhecer os sintomas das diversas características provocadas por danos é fundamental para a correta interpretação das causas de perda da viabilidade e vigor das sementes (MOORE, 1985).

Como todo teste, o tetrazólio também apresenta limitações e alguns cuidados devem ser tomados no sentido de se obter resultados mais precisos. A obtenção de bons resultados e reprodutíveis exige, principalmente, o conhecimento específico da estrutura das sementes e das técnicas de interpretação (VIEIRA, 1999). Cada desvio na cor tem uma ou mais causas. É necessário, portanto, o aprimoramento na interpretação dessas causas para a

classificação de qualidade dos lotes de sementes (VIEIRA E VON PINHO, 1999)

Para DELOUCHE (1976), a falta de padronização dos testes de viabilidade não é a principal restrição ao uso em programas internos de controle de qualidade. Mas, o treinamento, as estruturas e o pessoal inadequado, bem como o uso impróprio das informações obtidas, são problemas muito mais sérios. Portanto, o grande desafio é obter precisão e reprodutividade de resultados, para estender o uso destes testes não só em programas internos de controle de qualidade, como também em testes de rotina em laboratórios de análise de sementes. (Para que um teste de viabilidade seja considerado satisfatório e apresente uma padronização de metodologia e de interpretação deve possuir algumas características, tais como alta repetibilidade nos resultados, interpretação e correlação com a emergência sob certas condições, rapidez, objetividade, simplicidade e viabilidade econômica (DELOUCHE, 1976; AOSA, 1983).)

3.3 Envelhecimento artificial

Em sementes armazenadas úmidas, com teores de água acima de níveis considerados ideais para o seu armazenamento, a respiração se torna intensa (CICERO, 1998). Para manter o processo respiratório elevado, a semente gasta energia, que é produzida pela oxidação das substâncias de reservas, o que provoca a deterioração (PUZZI, 1986). Esta situação agrava-se com a liberação de calor proveniente do próprio processo de respiração, que condiciona aumento na temperatura da massa de sementes, acelerando a atividade respiratória (CARVALHO & NAKAGAWA, 1988).

Uma síntese da seqüência do processo de deterioração em sementes foi proposta por DELOUCHE (1976), no trabalho intitulado “Técnicas de envelhecimento acelerado para estimar o potencial de armazenamento de lotes de sementes”. Segundo este autor, a semente em deterioração passa pelas seguintes fases: degradação das membranas celulares, redução das atividades respiratórias e biossintéticas; processo lento de germinação; menor taxa de crescimento e desenvolvimentos de plântulas em campo; aberrações morfológicas; perda do poder germinativo e, finalmente, a morte.

Um método artificial para provocar a deterioração das sementes é o teste de envelhecimento acelerado. Esse teste é bastante utilizado. Consiste, basicamente, na exposição das sementes, em períodos de tempo relativamente curtos, às duas condições ambientais que causam a deterioração rápida das sementes: alta temperatura, entre 41° a 45°C e umidade relativa próxima a 95% (TEKRONY, *et al.*, 1996). Os efeitos do envelhecimento acelerado nas sementes são avaliados pelo teste de germinação (AOSA, 1983; HAMPTON e TEKRONIK, *et al.*, 1996). O teste se baseia no princípio de que as sementes vigorosas são mais tolerantes às condições adversas de temperatura e umidade elevadas e apresentam valores mais altos de germinação que as sementes de menor vigor, cuja viabilidade é reduzida quando expostas às mesmas condições (DELOUCHE e BASKIN, 1973).

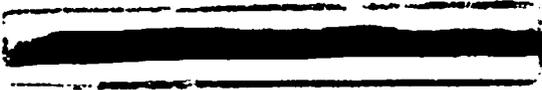
De acordo com KRZYSANOWSKI e FRANÇA NETO (1984), no início da década de 1980, pesquisa realizada em laboratórios de análise de sementes brasileiro, públicos e privados, indicou que o envelhecimento acelerado era o principal teste de vigor para avaliar o vigor de sementes de soja. O teste de envelhecimento acelerado possui alguns fatores que podem influenciar nos resultados. A metodologia tradicional do teste de envelhecimento acelerado preconiza o acondicionamento das sementes em pequenos recipientes de arame, de plástico perfurado ou de filó, que são

pendurados em cavaletes ou dispostos sobre as prateleiras das câmaras de envelhecimento. Este procedimento causa desuniformidade na exposição das sementes às condições adversas de temperatura e umidade relativa do ar; com conseqüente variação acentuada no teor de água atingindo pelas sementes em função da sua posição no interior do recipiente onde estão acondicionadas, produzindo resultados variados e de difícil padronização KRZYSANOWSKI & FRANÇA NETO, 1991; MARCOS FILHO *et al.*, 1987; MARCOS FILHO 1999).

SCAPPA NETO *et al.*, (2001) constataram que diferenças de dois pontos percentuais de teor de água no início do teste de envelhecimento acelerado em amostras de feijão podem comprometer os resultados.

No Brasil, segundo KRZYSANOWSKI e MIRANDA (1990) e VIEIRA (1999), a principal fonte de variação devido à falta de precisão é a temperatura das câmaras, que é muito acima da recomendada pela AOSA (1993). Outros fatores que têm causado variação nos resultados do teste de envelhecimento acelerado são o regime de temperatura e o período de envelhecimento adotado pelos laboratórios (KRZYSANOWSKI e FRANÇA NETO, 1991). Não existe consenso ainda, entre pesquisadores, sobre as condições mais adequadas para o envelhecimento acelerado de diversas espécies de sementes (MARCOS FILHO, 1999). Para classificação dos lotes de sementes quanto ao nível de vigor, deve-se comparar os resultados de testes de envelhecimento acelerado realizado no mesmo tipo de câmara (SCAPPA NETO *et al.*, 2001).

O tratamento com antifúngicos também pode afetar os resultados do teste de envelhecimento acelerado. DELOUCHE e BASKIM (1973) verificaram que sementes tratadas apresentavam porcentagens maiores de germinação que sementes envelhecidas sem tratamento com fungicida e recomendaram para o teste, sementes não tratadas. Entretanto, TEKRONY



(1996) destacou a necessidade de se considerar que sementes de milho são comercializadas tratadas com fungicidas, de tal forma que o efeito potencial do tratamento das sementes sobre o vigor avaliado pelo teste de envelhecimento acelerado deve ser considerado nos resultados.

Um outro modo de provocar a deterioração das sementes é o congelamento. O procedimento consistiu em deixar a semente embeber em água durante 16, horas em caixas gerbox, para favorecer a absorção de água e a retomada dos processos fisiológicos, e submetê-las, após esse período, ao congelamento a 18°C negativos por 24 horas (LIMONARD, 1968). O congelamento favorece a formação de cristais de gelo, que rompem as estruturas celulares e matam o embrião da semente (LUCA FILHO, 1987).

3.4 Laser em material biológico

Na busca de técnicas que permitam a análise de sementes, segundo BRAGA JÚNIOR *et al.*, (2001), o laser apresenta grande potencialidade. Desta forma, tem sido pesquisada sua aplicação para identificar danos em sementes com fins de avaliar a viabilidade e o vigor.

Algumas características especiais da luz laser, associadas a fenômenos ópticos, permitem uma série de aplicações na área biológica, sendo que, na área de sementes, apresenta-se como uma ferramenta para analisar a qualidade delas. O uso do laser nessa área baseia-se no fenômeno conhecido por “biospeckle”, descrito por RABAL *et al.*, (1998) e ARIZAGA *et al.*, (1998). Este fenômeno é bem conhecido em estudos de óptica e ocorre quando o laser se dispersa sobre uma superfície incidente, a qual exhibe algum tipo de atividade (DAINTY, 1975). O speckle pode ser notado quando se ilumina, com luz laser, material biológico, como, por exemplo, sementes, frutos, folhas ou em

fenômenos não biológicos como a secagem de pintura, corrosão, dentre outros. Se o objeto difusor se modifica, os grãos individuais do padrão de “speckle” também alteram a sua forma. Isso permite supor que os padrões de “speckle” dinâmico contenham informações sobre o movimento do objeto. Esse fenômeno é muitas vezes, denominado de “boiling speckle”, devido ao fato de sua aparência visual ser similar a um líquido em ebulição, podendo também ser descrito como um fervilhamento luminoso. Por ser dinâmico, o “biospeckle” deve ser analisado com técnicas de processamento de imagens e tratamento estatístico, uma vez que a observação visual permite apenas a identificação da existência do fenômeno, mas não permite quantificá-lo (RABAL *et al.*, 1998).

A atividade do “biospeckle” tem sido extensamente estudada e têm sido propostas algumas formas para se medir a atividade de espécimes biológicos, como por exemplo, fluxo sanguíneo (DAINTY, 1970, ASAKURA *et al.*, 1981, OULAMARA *et al.*, 1989, RUTH, 1988).

XU *et al.*, (1985) demonstraram que os “speckles” resultantes de espalhamento interno apresentam tamanho médio menor do que aqueles produzidos por espalhamento superficial. Isso se explica pelo fato do feixe de laser se expandir ao penetrar no material.

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 a umidade está relacionada com a transmissão da luz pelo material biológico, especificamente a semente.

RODRIGUES *et al.*, (2002), estudando diferentes sementes, verificaram que as sementes apresentavam atividades diferenciadas para um mesmo grau em porcentagem de umidade, sendo necessário o estudo individual

de cada espécie. Segundo BRAGA JÚNIOR (2000), o grande desafio é estabelecer a faixa de água adequada para realização de experimentos com “biospeckle” na análise de viabilidade e vigor de sementes. O autor destaca que a identificação, dentro de uma mesma semente, de áreas com níveis de atividades diferentes, é importante e, para tanto, de tecidos vivos e mortos separadamente.

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

O padrão temporal do speckle (PTS) 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 estará ao lado da linha da imagem seguinte. O resultado desse conjunto de linhas é chamado de PTS, uma vez que ele representa como se comportou uma linha da área iluminada nas imagens conseguidas durante o tempo de exposição. Nesse caso, se ocorre algum movimento na superfície do material, essa mudança será transmitida para a figura do “speckle” formado e, assim, a linha observada será diferente da anterior. Esta é uma forma de se avaliar o nível de atividade do espécime, 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. As Figuras 1a e 1b, apresentam um PTS de uma semente de feijão com alto vigor e baixo vigor, respectivamente.



FIGURA 1a: Imagem gerada de um
PTS alta atividade

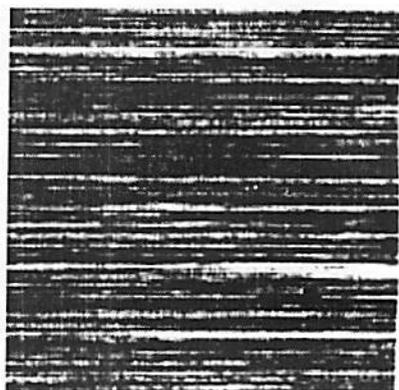


FIGURA 1b: Imagem gerada de um
PTS baixa atividade

Observando-se as Figuras 1a e 1b, nota-se a diferença. Porém, a transformação da imagem em um índice numérico é importante para a quantificação. Um método denominado cálculo de momento de inércia da imagem do PTS foi utilizado por ARIZAGA *et al.*, (1999), RABELO (2000) e BRAGA JR (2000). Esse método permite apresentar uma interpretação quantitativa para o PTS, baseado nas ocorrências de valores de intensidade sucessivos dos “pixels” que compõem o PTS. RABELO, (2000) denominou essa técnica como Módulo de Dispersão de Intensidade (MDI), porém, como o mesmo tem sido predominantemente tratado pela literatura como momento de inércia, este será o termo utilizado para se referir a essa técnica, embora nada tenha a ver com o termo momento de inércia da mecânica. Este método forma uma matriz com as ocorrências de intensidade sucessivas e que é denominado matriz de ocorrências (MOC), definida assim pela Equação 1:

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

Em que:

MOC - matriz de ocorrência

N_{ij} - número de ocorrências de intensidades

i, j - intensidades sucessivas

Nesta equação, N_{ij} representa uma lógica que identifica quantas vezes ocorreu a intensidade i , seguida da intensidade j e, em uma matriz de 256×256 (em que de 0 a 256 tem-se a faixa de intensidades codificadas em 8 bits), faz-se o cômputo de todas as ocorrências. As Figuras 2a e 2b representam a MOC. Uma vez montada a MOC, observa-se que a diagonal principal está relacionada com intensidades que não variam no tempo, enquanto fora da mesma aparecem as ocorrências que caracterizam uma mudança no tempo. Desta forma, quanto mais afastada da diagonal estiver a ocorrência, maior a mudança na intensidade do pixel i para o pixel j . Assim, por meio da matriz de ocorrência é possível analisar o nível de alteração do speckle observado no tempo.

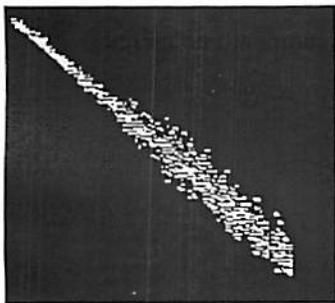


FIGURA 2a: Matriz de ocorrência de um material de alta atividade.

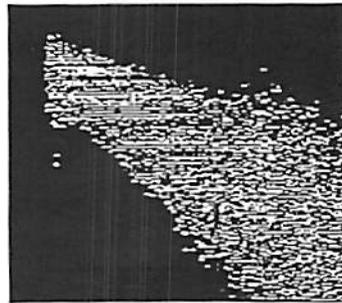


FIGURA 2b: Matriz de ocorrência de um material de baixa atividade

Para normalizar a matriz de ocorrências, cada valor é dividido pelo número total de ocorrências de cada linha detectada na imagem, como representado na equação 2. Dessa forma, o somatório de todas as ocorrências em cada linha torna-se igual à unidade, resultando em uma matriz de ocorrência modificada (MOM). Após este processo, atribuem-se valores de intensidade para cada valor de ocorrência normalizada, de forma que o maior valor seja equivalente ao branco ou 256 e o menor seja equivalente ao negro ou 0.

$$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}} [N_{ij}] \quad (2)$$

Em que:

N_{ij} – número de ocorrências de intensidades sucessivas

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, (MOM ou matriz de ocorrência modificada) é utilizada para plotar o gráfico que representa o grau de dispersão em torno da diagonal. Dessa forma, o momento de inércia pode ser também calculado baseando-se na mesma. A equação 3 apresenta a operação para a obtenção do momento de inércia.

$$MI = \sum M_{ij} (I - J)^2 \quad (3)$$

Em que:

MI - momento de inércia.

I - intensidade (linha).

J - intensidade (coluna).

M_{ij} - número de ocorrência, valor da matriz na posição (linha i, coluna j).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Laser e Óptica e no de Processamento de Produtos Agrícolas, do Departamento de Engenharia, e no Laboratório de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

A pesquisa foi dividida em duas fases, a saber:

- determinação da faixa ideal de água da semente para iluminação;
- utilização do laser na diferenciação de tecidos vivos de tecidos mortos em sementes.

4.1 Experimento de umidade - determinação da faixa ideal de água da semente para iluminação

Foram realizados dois experimentos em datas distintas. O primeiro foi realizado nos meses de janeiro e fevereiro de 2002 (Fase 1) e o segundo em outubro e novembro de 2002 (Fase 2), ambos com delineamento em blocos casualizados, sendo três dias de experimento, conseqüentemente, três repetições ou blocos. Cada bloco continha um grupo homogêneo de sementes em 10 graus de umidades predeterminadas, ou seja, dez tratamentos. Para iluminação, foram retiradas de cada tratamento sete sementes aleatoriamente, somando um total de 70 sementes iluminadas em cada dia.

Em ambos os experimentos, foram utilizados, cerca de 2kg de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), colhidas com um mês antes de se iniciar o

preparo dos espécimes. Foi determinado o teor de água inicial, conforme metodologia proposta por BRASIL (1992). Para se obter os teores de água, partiu-se da umidade inicial, e os demais teores foram acrescidos de aproximadamente de 2% de água, até totalizar 10 amostras de sementes.

Para se elevar o teor de água das sementes, foram separadas, então, em 9 amostras contendo 50g de sementes cada uma das amostras. As sementes foram colocadas em uma caixa *higrostat* com circulação de ar forçado, contendo, ao fundo, cloreto de sódio para fase 1 e nitrato de potássio PA para a fase 2, até que as sementes deixassem de absorver água. Ao conhecer o teor de água inicial das amostras, encontraram-se os outros níveis aproximados de água por pesagem. À medida que as sementes foram chegando ao peso preestabelecido, isto é, partindo do peso inicial acrescido de 2%, foram retiradas da caixa *higrostat* e colocadas em sacos plásticos e, em seguida, foram colocadas em uma lata de alumínio e colocadas dentro de uma câmara fria de 10°C. Como na caixa *higrostat* não é possível obter os teores mais altos de água na semente, colocaram-se, depois de dez dias de permanência na caixa *higrostat*, no germinador.

Para a fase 1, conseguiu-se elevar o teor de água nas amostras até 19,8% b.u. Os outros tratamentos foram conseguidos no germinador. Já para a fase 2, conseguiu-se elevar o teor de água na semente até 24,6% b.u. O cálculo para se estimar o peso das amostras após o ganho de água, foi baseado na equação 4.

$$P(\%) = \frac{100X(U_i - U_f)}{(100 - U_f)} \quad (4)$$

Em que:

U_i - Umidade inicial da amostra.

Uf - Umidade final que se deseja alcançar.

P(%) – Peso.

Pela equação 4, obtêm-se valores em porcentagem, o que, multiplicado pelo peso da amostra, chega-se à quantidade de água que deve ser adicionada (neste caso) ao lote, a fim de se obter a umidade final desejada.

Dos 50g iniciais de sementes de cada amostra, retiraram-se sete sementes para iluminação com laser e o restante foi utilizado para se determinar o verdadeiro teor de água em cada amostra, seguindo a metodologia proposta por BRASIL (1992).

A iluminação foi realizada em três dias, à temperatura ambiente, no Laboratório de Laser e Óptica da Universidade Federal de Lavras. As sementes foram retiradas da câmara fria com antecedência de 12 horas da iluminação.

4.2 Utilização do laser na diferenciação de tecidos vivos de tecidos de mortos em sementes

Neste experimento, foi utilizada uma amostra de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). O delineamento experimental foi planejado em DIC (delineamento inteiramente casualizado). Foram utilizados dois tratamentos: sementes com alto vigor e sementes mortas À baixa temperatura. Foram iluminadas 110 sementes de cada tratamento. A ordem da iluminação foi sorteada entre os dois tratamentos, a cada iluminação.

O primeiro passo para preparar as sementes para iluminação com luz laser foi determinar o teor de água da amostra pelo método da estufa a $105 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, com duas subamostras tendo 25g de sementes em cada subamostra. As amostras foram divididas em duas subamostras, sendo uma

subamostra de alto vigor e viabilidade, enquanto que outra foi submetido à baixa temperatura. O procedimento consistiu em deixar a semente embeber em água durante 16 horas, em caixas gerbox, para favorecer a absorção de água e a retomada dos processos fisiológicos e submetê-las, após esse período, ao congelamento a 18°C negativos por 24 horas. O congelamento favoreceu a formação de cristais de gelo, que rompem as estruturas celulares e matam o embrião da semente.

Para se reduzir os efeitos do teor de água na iluminação, as duas subamostras, foram pesadas para padronização. Determinou-se o peso das sementes quando as duas subamostras atingissem 18% b.u. Em seguida, foram colocadas em uma caixa hidrostática com circulação de ar forçado, contendo ao fundo nitrato de potássio PA, até que as sementes atingissem o peso predeterminado, o que ocorreu em 24 horas.

Para se verificar a viabilidade e vigor dos lotes, foram conduzidos o teste de germinação e o teste de tetrazólio, seguindo a metodologia proposta por BRASIL (1992). O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes por subamostra, em rolo de papel toalha, em germinador, regulado a 25°C, embebido em água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do substrato seco, visando adequado umedecimento, com as contagens feitas no 5º e 9º dias após a sementeira. O teste de tetrazólio foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes por subamostras; as sementes foram embaladas em papel toalha umedecido e mantidas nesta condição por um período de 16 horas, à temperatura de 25°C, sendo as embalagens colocadas no germinador (câmara úmida). Após o pré-condicionamento, as sementes foram colocadas em frascos béquer, sendo totalmente submersas na solução de tetrazólio (0,1%). As sementes permaneceram, assim, à temperatura de 35°C por 4 horas. Alcançada a coloração, as sementes foram lavadas com água e mantidas submersas até o momento da avaliação.

Antes da iluminação, as sementes foram submetidas ao teste de sanidade para verificar a presença de fungos. A metodologia utilizada foi a de incubar as sementes em papel de filtro com restrição hídrica. As sementes foram distribuídas em Placas de Petri de 15 cm de diâmetro, sendo quatro repetições (25 sementes por Placa de Petri) contendo três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com soluções osmóticas, previamente esterilizadas, de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e manitol. Foram utilizadas soluções osmóticas com potencial de -1 Mpa para umedecer o papel de filtro usado para incubar as sementes. As sementes foram incubadas em câmara com temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz negra, durante sete dias para a primeira contagem e por mais sete para verificar a presença de *Colletotrichum lindemunthianum*.

4.3 Definição do “set-up” de iluminação, captura e tratamentos de imagens

Nesta etapa foram utilizados: um laser de He-Ne de 632.8 nm, lente de dispersão do feixe e um sistema de aquisição digital de imagem composto de uma câmara CCD (charge coupled detector); microcomputador, processador de imagens, (Placa “Imagination - Vision System Specialists”) fabricado pela “Imagenatin Corporation” e aplicativo computacional em C++ para tratamento de imagens. A Figura 3 apresenta o “set up” básico de iluminação de uma semente com todo o aparato necessário para a obtenção das imagens.

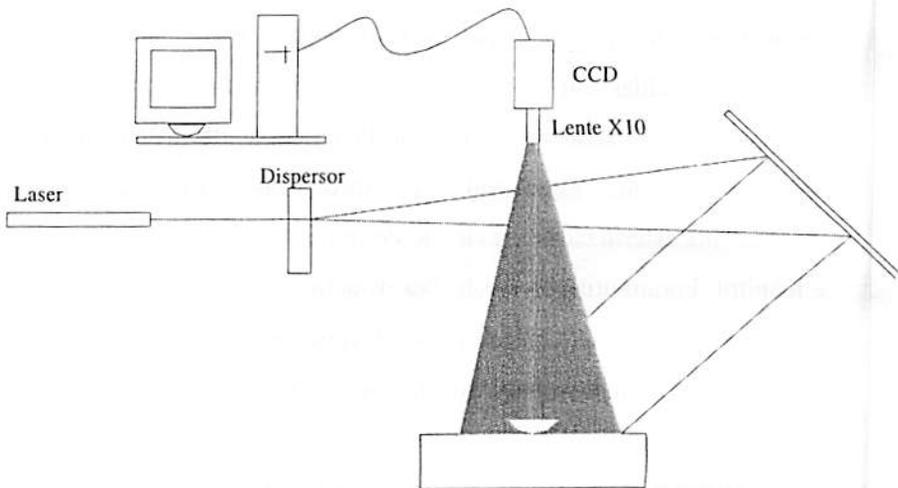


FIGURA 3 : “Set up” de iluminação e captura de imagens.

As imagens dos padrões de “speckle” foram capturadas a uma taxa de 0,08 segundos, totalizando 512 imagens por semente e, em seguida gerado o padrão PTS para cada uma, por meio do programa captura, desenvolvido pelo Núcleo de Estudos de Óptica e Laser na Agropecuária - NeOLaser. Os padrões PTS foram então analisados pelo método de Momento de Inércia.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da faixa ideal de água na semente para iluminação

5.1.1 Fase 1 Experimento de umidade

Nesta fase, as sementes foram umedecidas em uma caixa higrostat contendo solução salina de cloreto de sódio ao fundo. Esta solução aumenta a umidade relativa do ambiente. Com o aumento da umidade relativa, a semente tende ao equilíbrio higroscópico, aumentando seu teor de água na semente até o limite desejável de cada tratamento.

As sementes submetidas ao laser apresentaram germinação de 87%. Após testar a normalidade dados, foi feita análise de variância, sem a necessidade de fazer a transformação dos dados, pelo programa estatístico SISVAR 4.3. A Tabela 1 apresenta a análise de variância, onde se observa que ocorreram diferenças significativa no momento de inércia para os tratamentos e entre os dias em que se realizou as iluminações.

TABELA 1. Quadro de análise de variância do momento de inércia obtidos da média de cada tratamento. UFLA, Lavras, MG, 2002.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	9	210879,504	23431,056	17,403	0,0000
Bloco	2	25094,694	12547,347	9,320	0,0001
erro	198	266577,347	1346,350		
T. Corrigido	209	502551.544813			

CV%=98.52; Média geral: 37.2419726; Número de observações: 210

Analisando-se o Gráfico 1 nota-se que o momento de inércia não apresenta uma relação linear com o nível de umidade.

Entretanto, para níveis de umidade entre 14% e 19,8% b.u., observa-se uma linearidade. Esta instabilidade pode ter ocorrido devido a evaporação de água, ou mesmo a semente ter iniciado, após este nível de umidade, o processo de germinação. A Tabela 2 apresenta o teste de comparação de médias de Tukey, onde se observa, na região de baixa umidade, abaixo de 22% b.u., valores que não apresentam diferenças significativas entre si.

TABELA 2. Valores médios de momento de inércia obtidos na fase 1 da análise do “biospeckle” de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L) com diferentes níveis de umidade. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Tratamentos	Umidade	Médias
1	13,8	14,223997 a
2	16,6	15,175864 a
3	17,9	15,762162 a
4	19,8	16,668738 a
5	21,3	29,179422 a
6	22,2	16,134933 a
7	23,5	68,221444 b
8	26,5	23,568357 a
9	28,4	58,611392 b
10	29,7	114,87341 c

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade

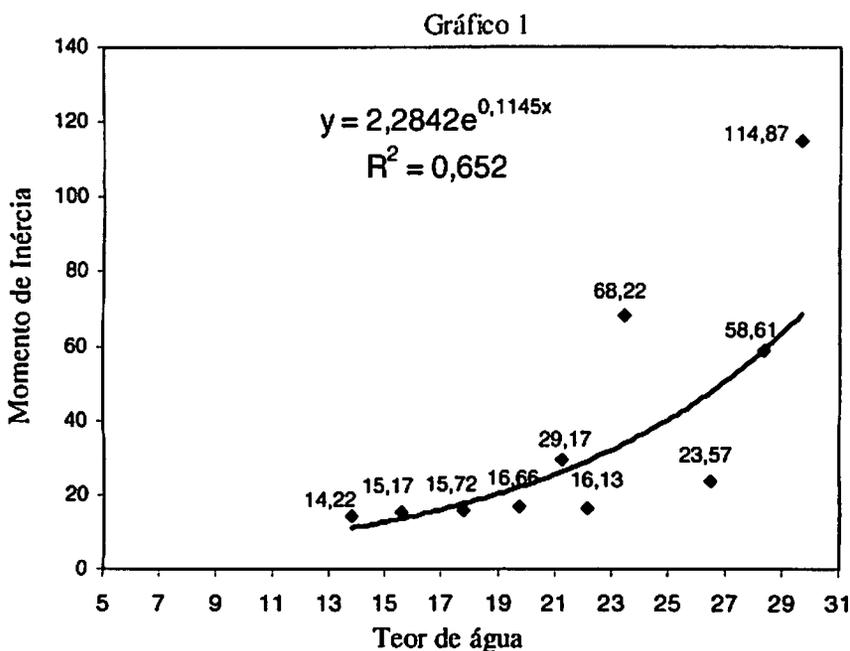


GRÁFICO 1. Tendência das médias dos valores de momento de inércia para cada valor de umidade para fase 1. UFLA, Lavras, MG, 2002

5.1.2 Fase 2 - Experimento de umidade

Nesta fase, as sementes foram umedecidas em uma caixa higrostat contendo solução salina de nitrato de potássio.

Verificada a normalidade dos dados, procedeu-se a análise de variância. A Tabela 3 apresenta a análise de variância onde se observa que ocorreu diferenças significativa no momento de inércia para os tratamentos e entre os

dias em que se realizaram as iluminações. Este resultado mostra que a umidade influencia no “speckle” dinâmico. As médias dos tratamentos são apresentadas na Tabela 4, onde também é apresentado o teste de comparação de médias de Tukey. Na Tabela 4 também se observa que, para os tratamentos de 1 a 6, a umidade interfere pouco nos valores de momento de inércia, entretanto a partir de 24,62% b.u., a influência da umidade interfere no momento de inércia para sementes com o mesmo nível de atividade.

TABELA 3. Quadro de análise de variância do momento de inércia obtidos da média de cada tratamento na fase 2. UFLA, Lavras, MG, 2002.

FV	GL	SO	OM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	9	284545,290851	31616,143428	56,402	0.0000
Blocos	2	41903,378130	20951,689065	7,377	0.0000
Erro	185	103701,399092	560,548103		
T.cor.	196	430150.068073			

CV% = 53,37;

Média geral: 44.3614721;

Número de observações: 197

Pode se observar na tabela 4, que até o nível de umidade de 18,93% b.u., não existe uma diferença significativa a nível de 1% de probabilidade. Após a umidade de 18,93% b.u., o Momento de Inércia começou a possuir uma diferença significativa a nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Na tabela 4, são apresentados os valores médios dos tratamentos encontrada para cada um dos níveis de umidade, nos 3 blocos. Percebe-se que há uma influência da umidade nos valores de Momento de Inércia. Contudo, após o teor de água de 18,93 b.u., o Momento de Inércia passou a aumentar muito em relação aos níveis de umidade mais baixos.

TABELA 4. Valores médios de Momento de Inércia obtidos na fase 2 da análise do “biospeckle” de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L) com diferentes níveis de umidade. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Tratamentos	Umidade % (b.u.)	Médias
1	11,00	7,57 a
2	15,20	15,52 ab
3	16,80	18,91 ab
4	17,24	19,07 ab
5	18,93	21,23 ab
6	20,89	35,97 bc
7	24,62	54,73 c
8	23,44	58,76 c
9	26,60	104,77 d
10	29,7	135,22 e

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a de 1% de probabilidade.

O Gráfico 2 apresenta a variação do momento de inércia com a umidade das sementes, onde se observa que o momento de inércia cresce exponencialmente com a umidade, evidenciado por um alto coeficiente de determinação $R^2 = 0,9822$.

Percebe-se que as duas fases, até o nível de umidade de 19% b.u, foram semelhantes. Os dois experimentos foram feitos seguindo-se a mesma metodologia, com exceção do sal utilizado. No primeiro, foi utilizado o cloreto de sódio hidrofóbico e no segundo, utilizado o nitrato de potássio PA. Na Fase 1, os resultados mostram que o MI apresentou uma certa estrutura somente nos níveis de umidade mais baixo e em níveis mais altos de umidade ocorreu uma grande instabilidade dos valores, isto é, tornaram mais caóticos. Esta instabilidade não ocorreu no segundo experimento. Isto pode ter ocorrido pelo fato de que usando a caixa *higrostat* com cloreto de sódio, não se consegue

aumentar o teor de água da semente mais que 18 % b.u. Após este valor, as sementes foram colocadas em um germinador.

Gráfico 2

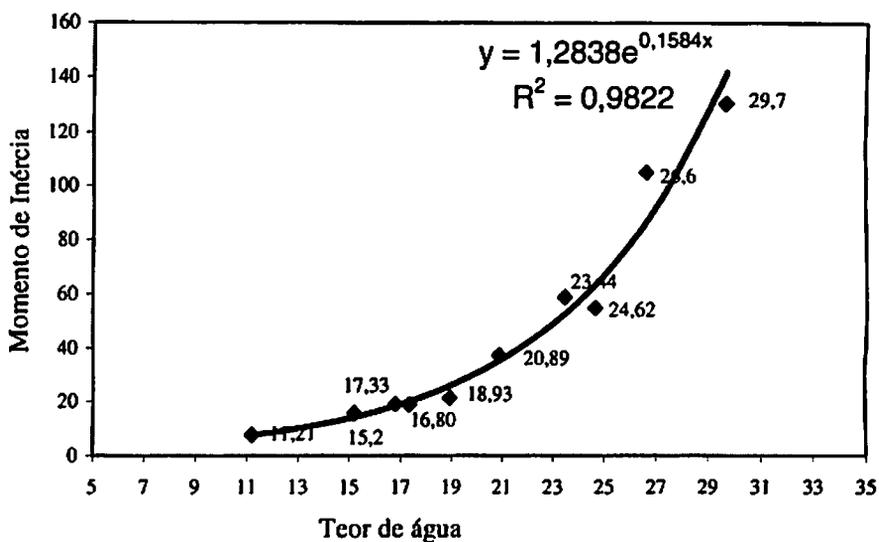


GRÁFICO 2. Tendência das médias dos valores de Momento de Inércia para cada valor de umidade para fase 2. UFLA, Lavras – MG, 2002.

O germinador faz com que a semente absorva água numa velocidade muito grande além disso, existe uma precipitação no teto que, inevitavelmente, umedece as telinhas com as sementes, tornando a umidade não uniforme.

No caso do experimento em que utilizou-se nitrato de potássio PA na caixa *higrostat*, conseguiu-se valores de teor de água na faixa de

25% de b.u., conseqüentemente menor tempo de permanência das sementes no germinador e menor influência do mesmo.

5.2 Diferenciação de tecidos vivos e mortos em sementes

Os tecidos mortos das sementes foram submetidos ao laser, e os momentos de inércia obtidos foram analisados pela análise de variância. A Tabela 5 apresenta a análise de variância, onde se observa que ocorreu diferenças significativas no momento de inércia para os tratamentos. Os valores não apresentaram uma normalidade, sendo necessário proceder a transformação log. n para a análise.

TABELA 5. Quadro de Análise de Variância dos valores *ln* Momento de Inércia obtidos da média de cada tratamento. UFLA, Lavras, MG, 2002.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sementes	1	16,770908	16,770908	23,391	0,0000
Erro	196	140,530148	0,716991		
T corrigido	197	157,3010			

CV% = 18,87;

Média geral: 4,51;

Número de observações: 198

O teste de Tukey foi usado, assumindo variâncias homogêneas, para identificar quais tratamentos diferem entre si. Os resultados obtidos são

apresentados na Tabela 6, onde se observa que o momento de inércia consegue separar sementes de tecidos vivos de sementes de tecidos mortos.

TABELA 6. Valores médios de Momento de Inércia obtidos na análise do “biospeckle” em tecidos vivos e mortos em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L). UFLA, Lavras. MG, 2002.

Tratamento	Médias do MI
Mortas	4,210234a
Vivas	4,792573 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre Si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

Conforme se observou, o método do “biospeckle” consegue diferenciar os tecidos vivos de tecidos mortos em sementes, o que foi evidenciado pelo teste de Tukey. Isto se explica pelo fato de que em uma semente viável há metabolismo, o mesmo não ocorrendo em uma semente inviável. Como as sementes estavam com o teor de água muito próximo umas das outras, a água nas sementes não influenciou na diferenciação dos resultados. Assim, pode-se considerar o momento de inércia como capaz de identificar tecidos vivos de tecidos mortos.

O “blotter test” mostrou que a presença de fungos nas sementes era pequeno a ponto de não interferir nos resultados, como apresenta a Tabela 7, mas, foi observada presença de bactérias saprófitas nas sementes que foram inviabilizadas pelo congelamento. As bactérias saprófitas atacam tecidos mortos. Ainda não é de conhecida a influência de bactérias e fungos nos resultados de “biospeckle”. Como as bactérias possuem atividade, podem ter contribuído para que os valores de momento de inércia das sementes

inviabilizadas pelo congelamento atingissem médias maiores nos valores de momento de inércia.

TABELA 7. Principais fungos encontrados na avaliação da sanidade de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L), pelo método do *Blotter Test*. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Sementes	Fungos	Fungos (%)
Tecido Vivo	<i>Fusarium</i> spp	1,5
	<i>Cladosporium</i> spp	1,5
	<i>Aspergillus</i> spp	1,0
	<i>Alternaria</i> spp.	1,0
	<i>Penicillium</i> spp.	0,5
	<i>Coletotrichum lindemunthianum</i>	0,0
Tecido Morto	<i>Fusarium</i> spp	3,0
	<i>Coletotrichum lindemunthianum</i>	0,0

Pelo teste de germinação e viabilidade constatam-se que as sementes submetidas ao congelamento estavam 100% mortas. Já as sementes vivas estavam com uma ótima viabilidade e germinação pelo Teste de Tukey, a de 5% de probabilidade, como apresentado na Tabela 8.

TABELA 8. Valores médios de viabilidade e germinação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L). UFLA, Lavras – MG, 2002.

Sementes	teste de germinação (%)	teste de tetrazólio (%)
Vivas	92a	96a
Mortas	0b	0b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a de 5% de probabilidade.

Para evitar influência da umidade na comparação dos resultados, buscou-se manter as amostras abaixo de 19% b.u. o que pode observado na Tabela 9, onde se observa a igualdade nas médias pelos Teste de Tukey.

TABELA 9. Valores de umidade conseguidos após obter os tratamentos.
UFLA, Lavras, MG, 2002.

sementes	Umidade % (b.U.)
Vivas	18,25a
Mortas	18,82a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a de 5% de probabilidade.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que existe uma faixa ideal de água na semente, onde ocorre uma pouca influência da umidade. Esta faixa esta compreendida entre 11% e 19% b.u. Para que a água não seja um fator limitante, acima de 19% b.u., deve-se trabalhar as amostras nos mesmos valores de porcentagem de água, para a correta avaliação.

Conclui-se também que a técnica do “biospeckle” consegue separar tecidos vivos de tecidos mortos em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L). Assim, pode-se afirmar que a técnica do “biospeckle” poderá ser usada como um indicador de viabilidade de feijão no futuro.

7- TRABALHOS FUTUROS

O controle do nível de umidade que será utilizado nos experimentos é crucial, uma vez que a umidade influencia nos resultados. Como citado na seção 5.1, há um nível de umidade que é o limite para que a análise de sementes possa ser realizada utilizando a técnica do “biospeckle” sem maiores cuidados com a diferença de umidade entre as amostras (19% b.u). Contudo, torna-se necessário realizar-se novos experimentos que trabalhem dentro do intervalo delimitado superiormente pela umidade limite que foi obtida (21,3% b.u). Isto é necessário para a confirmação deste limite que viabiliza o uso da técnica do “speckle” dinâmico, bem como, confirmar que dentro deste intervalo não será possível distinguir os níveis intermediários entre si.

Um outro trabalho que será de suma importância será verificar a influência de fungos e bactérias no uso da técnica de “biospeckle”.

Será importante também trabalhar com diferentes tempos de envelhecimento de sementes para verificar a sensibilidade do laser ao trabalhar com sementes. Por fim, recomenda-se, iniciar os trabalhos para identificar áreas vivas e mortas dentro de uma mesma semente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-BAKI, A. A., Biochemical aspects of seed vigour. **HortScience**, Alexandria, v, 15, nº 6, p. 756-771, 1980.

ANDERSON, J. D. Metabolic changes associated with senescence. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, nº 2, p. 401-416, 1973.

ANDRADE, R. V., AZEVEDO, J. T. BORBA, C. S., OLIVEIRA, A. C. Teste de vigor em sementes de sorgo para Predizer o Armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília. vol. 15, nº 2- 1993.

ARIZAGA, R., TRIVI, M.R., RABAL, H.J. Speckle time evolution characterization by occurrence matrix analysis. **Optics & Laser Technology**, v.4-5, n.3, p.1-7, 1999.

ARIZAGA, R.; TRIVI, M; RABAL, H. Analysis de diagramas de speckle dinâmicos utilizando la matriz de coocurrencia. **III RIO- Encuentro Ibero-Americano de Óptica**. Cartagena das Indias 1998.

ASAKURA, T., TAKAI, N. Dynamic laser speckles and their application to velocity measurements of the diffuse object. **Journal of Applied Physics**, v. 25, p. 179-194, 1981.

ASSOCIATION OF OFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln: AOSA, 1983. 93p. 9 (Contribution, 32).

BERGKVIST, A. "biospeckle"-based study of the line profile of light scattered in strawberries. Dissertação de Mestrado Faculty of Technology at Lund University, 1997

BITTENCOURT, S.R.M., VIEIRA R.D. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de amendoim. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. P.1-8.

BRAGA JR, R.A. "Bio-Speckle": Desenvolvimento de uma Tecnologia Aplicada a Análise de Sementes. FEAGRI UNICAMP, Tese de doutorado, 2000, 117p.

BRAGA JR, R.A., BORÉM, F.M., RABAL, H.J., TRIVI, M.R., ARIZAGA, R., DAL FABBRO, I.M., SALEH,B.B. Avaliação da influência da umidade de sementes de feijão (Phaseolus vulgaris L.) na análise pela técnica do bio-speckle laser. Engenharia Agrícola, Jaboticabal, v.21, n.1, p.101-106, jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Regras de análise de sementes. Brasília: SND/CLAV, 1992. 365p.

CARVALHO, N.M., NAKAKAWA, J. Sementes: ciência tecnologia e produção. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

CARVALHO, N.M. Vigor de sementes. In: CÍCERO, S.M., MARCOS FILHO, J., SILVA, W.R. (ORG.) Atualização em produção de sementes. Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 207-223.

CARVALHO, N.M. O conceito de vigor em sementes. In: VIEIRA, R.D., CARVALHO N.M. (Ed) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.1-30.

CÍCERO, S.M. umidade na Armazenagem. **Seed News**, Pelotas, n.5, p.10 , 1998.

COPELAND, T.G., BRUCE, C.F., MIDYETTE JR., The unofficial application of tetrazoliun tests as an aid in checking germination claims. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, East Lansing, v.19, p. 134-141, 1959.

DANTY, J.C. **Laser speckler and relat phenomena**. Topics in Applied Physics, v. 9, 1975.

DAINTY, J. C. Some statistical properties of randon speckle patterns in coherent and partially coherent illumination. **Optical Acta**, v. 17, p. 761-772, 1970.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN. C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, 1(2):427-455. 1973.

DELOUCHE, J.C., STILL, T.W., RASPET, M., LIENHARD, M. **O teste de Tetrázólio para Viabilidade de Semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103p.

DIAS, M.C.L., BARROS, A.S.R. Aferição de teste de vigor para sementes de feijão. *Informativo ABRATES*, Londrina, v.3, n.1 p. 7-23, 1992.

FRANÇA NETO, J.B. Teste de tetrazólio. *Seed News*, Pelotas, n.4 p. 12, 1998.

GRABE, D.F. *Manual do teste de tetrazólio em sementes*. Brasília: AGIPLAN, 1976b. 85p.

HAMPTON, J.G., TEKRONY, D.M. *handbook of vigour test methods*. Zürich: ISTA, 1995. 117p.

KRZYZANOWSKI. F.C., FRANÇA NETO, J.B. Relatório do comitê de vigor da ABRATES. *Informativo ABRATES*, Londrina, v.6 n.1, p.8-9, 1984.

KRZYZANOWSKI. F.C., FRANÇA NETO, J.B. Situação atual do uso de testes de vigor como rotina em programas de sementes no Brasil. *Informativo ABRATES*, Londrina, v.1 n.3, p.42-53, 1991.

KRZYZANOWSKI. F.C., MIRANDA, Z.F.S. Relatório do comitê de vigor da ABRATES. *Informativo ABRATES*, Londrina, v.1 n.1, p.7-25, 1990.

LAKON, G. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiology*, Bethesda, v.24, n.3, p. 389-394, 1949.

LIMONARD, T. Ecological aspects of seed health testing. *Proceedings of International Seed Testing Association*. Wagenigen, v. 33, n.3, p.343-513, 1968.

LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. das S (eds) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.

ROBERTS, E. H. **Viability of seeds**. Syracuse University press, 1972. 488p.

MENEZES, N. L.; SILVEIRA, T. L. D.; PASINATTO, P. R. Comparação entre os métodos para avaliação rápida da qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, vol.16, n. 2, p. 121-127, 1994.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.) **Vigor de sementes: Conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.3 (1-24).

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba, FEALQ, 1987. 230P.

MOORE, R.P. **Tetrazolium seed testing**. Zürich, Switzerland: ISTA, 1985. 99p.

MOORE, R.P. Tetrazolium testing of seed peanuts. **Oléagineux**, Montpellier, v.27, n.(8-9), p433-437, 1972.

OULAMARA, A., TRIBILLON G., DUVERNOY J., ARIZAGA, R., TRIVI, M.R., RABAL, H.J. **Speckle time evolution characterization by co-occurrence matrix analysis**. **Optico e Lasr Technology**, v.4-5, n.3, p.1-7, 1999

PERRY, D.A. Handbook of vigour test methods. Zürich: Ista, 1981. 72p

POPINIGIS, F. Fiologia da semente. 2ª ed. Brasília: Agiplan, 1985. 289p.

PUZZI, D. Armazenamento de sementes. In: CÍCERO, S.M. MARCOS FILHO, J., SILVA, W.R. (Org.) Atualização em Produção de Sementes. Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.183-199.

RABAL, H.J. et al Laser na Agricultura Capítulo do Livro: Energia, Automação e Instrumentação. XXVII CONBEA 1998.

RABELO, G.F. Avaliação da aplicação do Speckle Dinâmico no Monitoramento da qualidade da laranja. FEAGRI UNICAMP, Tese de doutorado, 2000, 149p.

RODRIGUES, S; SANTOS, E. F; BRAGA JUNIOR, R. A.; RABELO, G. F; CARVALHO, M. L. M.; BORÉM, F. M; TRIVI, M. R; DAL FABBRO, I. M; SILVA A. Q. Análise do “biospeckle” Laser em Diferentes Sementes Utilizando Métodos de Processamento de Imagem, Anais do XXXI CONGRESSO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, Salvador, BA . 2002.

RUTH, B. Non-CONTACT BLOOD flow determination using a laser speckle method. Optic laser technology, v. 20, p. 309-16, 1988.

SCAPPA NETO, A.; BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D.; VOLPE, C.A. Efeito do teor de água de sementes de feijão e da câmara no teste de envelhecimento acelerado. Scientia Agrícola, v.58, n.4, p.747-751,2001.

TEKRONY, D.M. Accelerated aging test conditions for hybrid corn seed. **Iowa Seed Science**, Ames, v.16 n.2, p.3-4, 1996.

TOLEDO, F.F., MARCOS FILHO, J. **Manual de sementes: Tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica CERES, 1977. 244p.

VIEIRA, R.D. Teste de vigor utilizados para a semente de soja no Brasil na atualidade, In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**, 1, 1999, Londrina. Anais. Londrina: Embrapa Soja, 1999. p227-232.

VIEIRA, M.G.C.G., VON PINHO, E.V. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIERA R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Ed) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. p. 8.1 (1-13).

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