

EDERSON FONSECA SANTOS

**MÉTODOS COMPUTACIONAIS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE
BIOLÓGICA ATRAVÉS DO *BIOSPECKLE LASER***

Monografia apresentada ao Departamento de
Ciência da Computação da Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do Curso
de Ciência da Computação, para obtenção do
título de Bacharel

Orientador

Prof. Roberto Alves Braga Júnior

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

EDERSON FONSECA SANTOS

**MÉTODOS COMPUTACIONAIS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE
BIOLÓGICA ATRAVÉS DO *BIOSPECKLE LASER***

Monografia apresentada ao Departamento de
Ciência da Computação da Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do Curso
de Ciência da Computação, para obtenção do
título de Bacharel

APROVADA em 17 de junho de 2003.

Prof. Luciano Mendes dos Santos

Prof. Roberto Alves Braga Júnior
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICATÓRIA

Ao meu grande pai, meu orgulho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser minha razão de viver e minha fonte renovadora de esperança para encarar os diversos problemas do dia-a-dia;

A minha mãe, que de algum modo, sinto seu orgulho por esta vitória;

Agradeço a todos os meus amigos e amigas com os quais convivi durante todo o período de aprendizado;

Agradeço a todos os meus professores e em especial ao meu orientador, Roberto Alves Braga Júnior;

Agradeço aos meus grandes amigos de Itaúna, Sérgio, Flávio, Luzia, Rônel, Mário, Dudu, Samuel;

Aos meus queridos sobrinhos, que nunca deixaram de me trazer tantas alegrias durante os nossos encontros;

Ao meu grande pai e a todos os meus familiares, que sempre acreditaram em meus esforços e nunca deixaram de me apoiar;

Aos professores do DCC, responsáveis por esta conquista;

Aos grandes amigos do 104, Gabriel, Alexandre, Fernando, Márcio, Luiz, Ricardo, Douglas, Marcos e Robert.

RESUMO

O fenômeno do *speckle* dinâmico produzido pela iluminação de material biológico pelo *laser*, também denominado *biospeckle*, apresenta-se como uma potencial metodologia para a quantificação e determinação de áreas com diferentes atividades biológicas em materiais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a iluminação *laser* em diferentes sementes para análise de atividade biológica, através da implementação e utilização de métodos computacionais de captura e processamento de imagens. Os resultados obtidos foram satisfatórios e mostraram o potencial dessa técnica.

PALAVRAS-CHAVE: *biospeckle*; processamento de imagens; sementes

ABSTRACT

The dynamic speckle phenomena produced by the laser illumination of biological material, also called biospeckle, presents as a potential methodology to quantify and determine different biological activity areas in materials. The purpose of this work is to appraise the laser illumination on different seeds for the biological activity analysis, through the implementation and use of computational methods for images capturing and processing. The obtained results were satisfactory and showed the potential use of this technique.

KEYWORDS: biospeckle; imaging processing; seeds

SUMÁRIO

<u>DEDICATÓRIA</u>	i
<u>AGRADECIMENTOS</u>	i
<u>RESUMO</u>	v
<u>ABSTRACT</u>	v
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
<u>2. REFERENCIAL TEÓRICO</u>	3
<u>2.1. Considerações Iniciais</u>	3
<u>2.2. Objeto Difusor</u>	4
<u>2.3. O Laser e os Fenômenos Ópticos</u>	4
2.3.1. Coerência	6
2.3.2. Interferência	8
2.3.3. Speckle	8
2.3.4. Speckle Dinâmico	9
<u>2.4. Métodos de Análise do Speckle Dinâmico</u>	10
2.4.1. Método de Diferenças Generalizadas (DG)	11
2.4.2. Método de Fujii	14
2.4.3. Momento de Inércia	16
<u>3. METODOLOGIA</u>	24
<u>3.1. Implementação dos Métodos Computacionais para Captura e Processamento de Imagens</u>	24
3.1.1. O Aplicativo captura.c	24
3.1.2. O Aplicativo captura3.c	25
3.1.3. O Aplicativo estrutura.c	25
3.1.4. O Aplicativo difgen.c	25
3.1.5. O Aplicativo fuji.c	26
<u>3.2. Equipamentos Utilizados</u>	26
<u>3.3. Montagem Experimental</u>	27
<u>3.4. Utilização dos Aplicativos Computacionais</u>	28
<u>3.5. Os Experimentos Realizados</u>	28
3.5.1. Primeiro Experimento: iluminação laser em diferentes sementes	29
3.5.2. Segundo Experimento: identificação de fungos em sementes	29

<u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	31
<u>4.1. Resultados para o primeiro experimento</u>	31
4.1.1. <u>Determinação do Nível de Atividade - Momento de Inércia</u>	31
4.1.2. <u>Análise dos Valores Obtidos dos Momentos de Inércia</u>	32
4.1.3. <u>Análise Qualitativa – Processamento de Imagens</u>	36
<u>4.2. Segundo Experimento</u>	39
4.2.1. <u>Determinação do Nível de Atividade - Momento de Inércia</u>	39
4.2.2. <u>Repetição da iluminação de sementes inoculadas com o fungo</u> <u>Sclerotinia sclerotiorum</u>	40
4.2.3. <u>Análise dos valores obtidos dos Momentos de Inércia</u>	43
4.2.4. <u>Análise Qualitativa – Processamento de Imagens</u>	46
<u>5. CONCLUSÕES</u>	51
<u>5.1. Métodos Computacionais</u>	51
<u>5.2. Efeito laser em diferentes sementes</u>	51
<u>5.3. Identificação de fungos em sementes</u>	52
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>	53

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E MATRIZES

<u>Figura 2.1 – Padrão de <i>Speckle</i> formado por iluminação <i>laser</i> de HeNe em um vidro.....</u>	8
<u>Figura 2.2 – Imagens consecutivas de uma iluminação fictícia.....</u>	12
<u>Figura 2.3 – Resultado do Método de Diferenças Generalizadas.....</u>	12
<u>Figura 2.4 – Resultado do Método de Fujii.....</u>	16
<u>Figura 2.5 – Resultados STS para (a) semente com baixa atividade; (b) semente com intensa atividade.....</u>	18
<u>Figura 2.6 – Simulação STS de alta atividade.....</u>	20
<u>Matriz 1 - Matriz de intensidades referente à figura 2.6.....</u>	20
<u>Matriz 2 – Matriz de Ocorrências da figura 2.6.....</u>	21
<u>Figura 2.7 - Representação da matriz de ocorrências da figura 2.6.....</u>	21
<u>Figura 2.8 – Matriz de ocorrência de (a) uma caixa de papel (baixa atividade) e (b) de uma laranja (alta atividade).....</u>	22
<u>Figura 3.1 - Esquema da montagem dos equipamentos utilizado no experimento.....</u>	27
<u>Gráfico 1 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de café (12 repetições).....</u>	33
<u>Gráfico 2 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de algodão (12 repetições).....</u>	33
<u>Gráfico 3 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de soja (12 repetições).....</u>	34
<u>Gráfico 4 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de feijão (12 repetições).....</u>	34
<u>Gráfico 5 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de milho (12 repetições).....</u>	35

<u>Figura 4 – Resultado de DG de (a) feijão; (b) soja; (c) milho; (d) algodão; (e) café, e suas respectivas imagens sem tratamento através de algum método.</u>	37
<u>Figura 5 – Resultado de Fujii de (a) feijão; (b) soja; (c) milho; (d) algodão; (e) café.</u>	38
<u>Gráfico 4.1 – Valores dos momentos de inércia para a parte interior das sementes inoculadas</u>	44
<u>Gráfico 4.2 - Valores dos momentos de inércia para a parte exterior das sementes inoculadas</u>	44
<u>Gráfico 4.3 - Valores dos momentos de inércia para a parte interior das sementes-testemunhas</u>	45
<u>Gráfico 4.4 - Valores dos momentos de inércia para a parte exterior das sementes-testemunhas</u>	45
<u>Figura 4.1 – Resultados DG de semente inoculada com <i>Aspergillus spp.</i></u>	46
<u>Figura 4.2 - Resultados DG de semente inoculada com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></u>	47
<u>Figura 4.3 - Resultados DG de semente inoculada com <i>Colletotrichum tindemuthianum</i></u>	47
<u>Figura 4.4 - Resultados DG de semente-testemunha</u>	47
<u>Figura 4.5 – Resultados Fujii de semente inoculada com <i>Aspergillus spp.</i></u>	48
<u>Figura 4.6 – Resultados Fujii de semente inoculada com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></u>	48
<u>Figura 4.7 – Resultados Fujii de semente inoculada com <i>Colletotrichum tindemuthianum</i></u>	48
<u>Figura 4.8 – Resultados Fujii de semente-testemunha</u>	49
<u>Figura 4.9 – Resultados (a) DG e (b) Fujii da parte externa de uma semente</u>	49
<u>Figura 4.10 – Resultados (a) DG e (b) Fujii da parte interna de uma semente</u> ...	50
<u>Figura 4.11 – STS para uma semente de feijão inoculada</u>	50

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1 - Teste Scott-Knott para médias do momento de inércia de sementes de soja, milho, feijão, algodão e café</u>	31
<u>Tabela 2 - Teste Tukey para médias do momento de inércia para sementes inoculadas com fungos</u>	40
<u>Tabela 3 - Teste Scott-Knott para médias do momento de inércia (linha do meio capturada)</u>	41
<u>Tabela 4 - Teste Scott-Knott para médias do momento de inércia (linha superior capturada)</u>	42
<u>Tabela 5 - Teste Scott-Knott para médias do momento de inércia (linha inferior capturada)</u>	42

1. INTRODUÇÃO

O *laser* tem se apresentado como uma ferramenta aplicável ao monitoramento de atividade biológica, devido às características especiais da luz emitida por ele, associadas a fenômenos ópticos que permitem uma série de aplicações. A luz *laser*, ao incidir e penetrar em um material biológico sofre interferências 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, [1]. Esse fenômeno é conhecido como *speckle* dinâmico, *speckle* temporal ou *biospeckle*. Tal fenômeno apresenta-se como uma potencial metodologia para a quantificação e determinação de áreas com diferentes atividades biológicas. As propriedades estatísticas do *biospeckle* e um modelo matemático de sua descrição ainda não foram bem estabelecidos, devido à complexidade envolvida na constituição, e na atividade biológica de uma forma geral. Mas isso não impede realizar uma quantificação da variação temporal do *biospeckle*, possibilitando a obtenção de informações capazes de estimar a atividade biológica do material sob estudo.

Para realizar as análises de atividade biológica devem ser utilizados métodos computacionais de captura e processamento de imagens, como o Método de Diferenças Generalizadas e Método de Fujii, e outras técnicas conhecidas, como o Momento de Inércia.

Para verificar a validade do uso do *biospeckle laser* na análise de atividade biológica através de métodos computacionais, escolheu-se trabalhar com sementes. Essa escolha foi feita por duas razões: a identificação de aplicação da técnica de forma mais imediata, e o conhecimento de que existe uma busca para melhoria dos métodos de análise de sementes atualmente utilizados, [2]. A utilização do *biospeckle* apresenta-se também como alternativa

às análises subjetivas, lentas e não automáticas de monitoramento de viabilidade de sementes atualmente utilizadas.

O uso do *laser* em sementes apresenta-se como uma técnica bastante promissora, principalmente no que se refere ao monitoramento da atividade biológica em seu interior. Esta técnica ainda necessita de pesquisas em diversas linhas para confirmar suas potencialidades, desenvolver as técnicas até o momento propostas, que ainda são limitadas, e trabalhada para que possa converter-se em metodologias e equipamentos comerciais. É necessário melhorias nas metodologias ao aplicar a técnica em diferentes sementes, uma vez que estas apresentam várias características diferentes, [2].

As aplicações em diferentes sementes ainda são muito restritas, o que tem demandado um trabalho que avalie os resultados da iluminação em uma gama maior de sementes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a iluminação *laser* em diferentes sementes, como milho, feijão, soja, café e algodão, a fim de identificar o nível de atividade biológica de diversas sementes, bem como a possibilidade de identificar a presença de fungos nas mesmas, através da implementação e utilização dos métodos computacionais acima mencionados.

Os experimentos realizados foram divididos em dois: um para analisar o efeito do *laser* em diferentes sementes, o que permitiu um maior domínio da técnica, e um segundo para identificar a presença de fungos em sementes. O segundo experimento utilizou-se de apenas sementes de feijão. Assim, este trabalho buscou oferecer uma contribuição para o desenvolvimento da tecnologia que aplica o *laser* e o fenômeno do *biospeckle* na análise de sementes através de métodos computacionais de forma específica, mas permitindo a sua adoção em materiais biológicos em geral, como análise de madeira, de parasitos e de fluxo sanguíneo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Considerações Iniciais

As várias áreas de conhecimento sempre buscam ferramentas e técnicas que permitam um melhor conhecimento dos processos e elementos envolvidos. O mesmo vale para as ciências agrárias, visando a melhoria da qualidade e a redução dos custos de produção. Ao conhecer as aplicações do *laser* em diversas áreas, verificou-se que no meio agrícola essas aplicações poderiam trazer inúmeros benefícios, como o monitoramento de qualidade de sementes, [2].

Os atuais testes para análise de vigor e viabilidade de sementes têm um desafio de, em apenas um teste indicar o desempenho da semente baseando-se nas distintas características avaliadas pelos mesmos, [3].

O **Speckle Dinâmico** procura identificar áreas de dano na semente e avaliar sua gravidade em função do tipo de dano e do local onde ele se encontra. Alguns trabalhos buscaram correlacionar a emissão de luz em sementes (*delayed light emission*) com aspectos de qualidade, e têm sido propostos objetivando a realização de um teste não destrutivo, [4].

A técnica do *Speckle Dinâmico*, também conhecida como **Biospeckle**, baseia-se na utilização do *laser* a partir da física óptica e de tratamento de imagens, buscando identificar as características da semente em análise pela mudança da figura de interferência formada pela bio-atividade do material. Dessa forma, a visão que se tem da semente passa a ser outra, uma vez que serão visualizadas áreas de diferentes atividades após tratamento de imagem. Existem vários experimentos que utilizam o fenômeno do *biospeckle*, por exemplo, um experimento em que se obteve resultados de iluminação de sementes e de secagem de pinturas, [5]. A técnica do *biospeckle* foi apresentada como uma

metodologia potencial para a análise de sementes, porém indicando a necessidade de maior domínio dos diferentes fatores que podem estar interferindo no fenômeno, [6]. As imagens podem ser analisadas usando o **Momento de Inércia**, que está relacionado à atividade presente no material iluminado, [7]. Foi verificado que o Momento de Inércia em frutos variava com a umidade superficial e com o tempo de exposição, [1].

Se um objeto inanimado se move como um todo, o padrão do *speckle* translada na direção do movimento do objeto sem uma grande variação em sua estrutura básica, ao contrário de uma espécie botânica (sementes), [8]. A técnica do *Biospeckle* também permite maior velocidade aos testes.

2.2. Objeto Difusor

Cada ponto do objeto iluminado age como um centro espalhador e um particular ponto do espaço pode aparecer claro ou escuro, dependendo se naquele ponto a luz interfere construtiva ou destrutivamente, [9]. A distribuição espacial do padrão é função da característica da iluminação, da rugosidade da superfície e da geometria de observação, enquanto que a evolução temporal é função direta das variações que ocorrem na superfície e/ou no seu interior. Trabalhos preliminares na área da Biologia têm mostrado que o movimento que ocorre no interior das células deve-se essencialmente ao movimento contínuo de cloroplastos e do movimento aleatório de partículas de minérios.

2.3. O Laser e os Fenômenos Ópticos

As aplicações do *laser* inicialmente eram restritas a pesquisas realizadas por físicos. Porém, o *laser* foi se adaptando aos desenvolvimentos tecnológicos e passou a ser largamente utilizado nas mais diversas áreas, como na medicina, na

indústria, nas telecomunicações, na área militar, e comercialmente desenvolvido para aplicações simples e complexas.

O *laser* apresenta algumas características que proporcionam condições que viabilizam inúmeras aplicações, mas a sua manipulação exige certos cuidados para que os resultados esperados não sejam comprometidos. As principais características que estimularam o uso do *laser* são as seguintes, [2]:

- Fonte de luz que não apresenta risco à saúde (não é insalubre);
- Alta direcionalidade do feixe;
- Alta intensidade do feixe;
- Capacidade de controle da cor e intensidade;
- Coerência e monocromaticidade;
- O seu tamanho pode ser reduzido;
- A potência pode ser de mW até alguns MW.

A palavra *laser* é uma sigla que representa : *Light Amplification by the Stimulated Emission Radiation*, e em português, Amplificação da Luz pela Emissão Estimulada de Radiação, sendo portanto, um tipo de luz que permite um certo controle. A cor da luz do *laser* está relacionada a um comprimento de onda que é selecionado e amplificado pela óptica interna e pela natureza do material estimulado, que são partes constituintes do equipamento. A óptica é uma importante ferramenta para a manipulação do *laser*, pois se trata de um fenômeno eletromagnético de natureza ondulatória e visível (luz).

A primeira tentativa experimental de amplificar a luz foi registrada por Fabrikant (1940), porém sem sucesso. Em 1954, foi conseguida a amplificação de radiação pelo processo de emissão estimulada por C.H. Townes (CIOP, 1997). Em 1960 foi anunciado o primeiro *laser* em operação (*laser de rubi*), e em 1961 foi anunciada a operação de um *laser* de HeNe (hélio-neônio), [1]. A

partir daí, o que se viu foi um grande e contínuo desenvolvimento do *laser*, na busca de novos tipos, tamanhos e potências, com o objetivo de se adaptar melhor às diversas aplicações.

A classificação mais adotada para o *laser* refere-se ao estado do material ativo, que pode ser sólido, líquido ou gasoso. O *laser* de HeNe é um *laser* de estado gasoso, assim como os *lasers* de Excímero, Argônio e CO₂. O *laser* de HeNe é de grande popularidade, principalmente no comprimento de onda de 632,8 nm, fornecendo alguns mW de potência contínua. Trata-se de um dispositivo de baixo custo, emissor de luz coerente e de alta qualidade.

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

2.3.1. Coerência

A coerência é uma importante característica da luz emitida por um *laser* e que permite muitas aplicações. O estudo sobre a coerência é antigo e vem desde 1860, com Emile Verdet, sendo que ainda hoje é motivo de pesquisa, [10]. Alguns autores costumam denominar uma fonte como coerente ou não coerente, porém a coerência é resultado de uma conjugação de fatores que tornam uma fonte mais ou menos coerente, dependendo do ponto de vista. Por exemplo, num experimento de Verdet, pode se constatar que uma luz considerada como incoerente, que é o sol, apresenta resultados próprios de coerência. Nesse caso, Verdet iluminou um anteparo com dois furos bem próximos (< 0.05 mm) e observou que do outro lado se formava uma figura de interferência com franjas bem definidas, que é características básica de uma luz coerente. Por isso, é que existe o conceito de coerência parcial. A coerência é dividida em forma

acadêmica em duas: coerência temporal e coerência espacial. A primeira está relacionada com a limitada faixa de frequência da fonte e a segunda com a limitada extensão espacial.

De outra forma, pode-se dizer que a coerência temporal é um intervalo sobre o qual pode-se prever a fase de uma onda luminosa em um dado ponto do espaço. Verifica-se que as emissões luminosas são realizadas em trens de onda e que, portanto, apresentam duração limitada, implicando em um espectro de frequência com muitos componentes. Se a fonte emite um trem de onda que se apresenta com grande duração, ou que, no limite, tende ao infinito, essa emissão terá apenas um componente de frequência, sendo assim, monocromático. Dessa forma, o grau de monocromaticidade de uma fonte está relacionado com a sua coerência temporal ou, em outras palavras, com sua coerência na direção de propagação.

Um trem de onda com grande duração permite verificar que, em um dado ponto do espaço, é possível saber o estado da onda (fase) em diferentes instantes. Quanto maior esse intervalo, maior será a coerência da onda. Medindo esse tempo através de um dispositivo, o grau de coerência temporal será medido em função das franjas de interferência. Quando a distância a ser percorrida aumentar, ao ponto de começarem a desaparecer as franjas, se tem a chamada longitude de coerência. Para as ondas quasi-monocromáticas¹, a longitude de coerência é grande, o que é uma característica básica dos *lasers*.

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

¹ O feixe emitido é dito quasi-monocromático por ser formado por uma faixa de frequência muito estreita.

2.3.2. Interferência

A interferência é um fenômeno que depende da coerência, uma vez que ela mostra a superposição de suas ondas formando raias, franjas, claras e escuras, [2]. Caso as ondas em questão não sejam coerentes, a interferência das ondas não podem ser observadas na forma de franjas e sim por uma parcela iluminada do espaço sem qualquer definição de áreas claras e escuras. A interferência é o fenômeno básico para a formação do *speckle*.

2.3.3. *Speckle*

O *speckle*, que pode ser entendido como granulado, é um fenômeno que inicialmente era considerado como um ruído que atrapalhava os trabalhos de óptica. Esse fenômeno ocorre somente pelo fato de a luz ser coerente, e que quando ilumina um objeto, observa-se algo diferente, Figura 2.1.

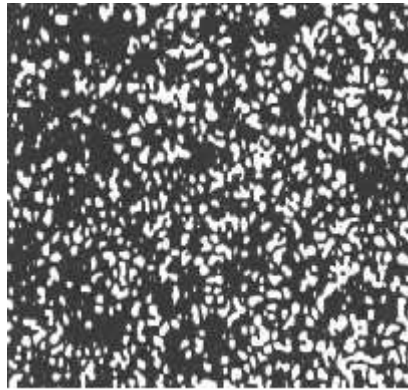


Figura 2.1 – Padrão de *Speckle* formado por iluminação *laser* de HeNe em um vidro, [2]

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

As pesquisas para eliminar o *speckle* dos resultados dos experimentos ópticos acabaram por conhecer melhor esse fenômeno, e assim o mesmo passou a ser visto não mais como um fenômeno indesejado. Muitas aplicações foram descobertas, entre elas na área de metrologia e nos novos desenvolvimentos referentes ao *biospeckle*, que fazem parte desse trabalho, com aplicações em diversas sementes, [2].

2.3.4. *Speckle* Dinâmico

A utilização do *speckle* na área biológica tem sido uma nova linha de grande potencial, sendo que ainda nem todas as aplicações foram desenvolvidas completamente, bem como ainda não se conseguiu mapear todas as reais viabilidades, [6]. O *speckle* dinâmico, quando proveniente de material biológico, é também conhecido como *biospeckle*, que é um termo que explica bem o que se deseja denominar. Por outro lado, apesar de existir uma tradução tanto para *speckle* (granulado), como para *speckle* dinâmico (fervilhamento), os termos originais são notórios e, portanto, adotados também neste projeto. O termo *biospeckle* é definido como sendo a figura de interferência formada ao se incidir a luz *laser* em um processo dinâmico e observar o chamado fenômeno do fervilhamento. Esse processo dinâmico pode ser uma pintura sendo seca, a transmissão de calor em uma chapa ou a atividade de um organismo vivo (sementes).

A bio-atividade faz com que a luz retorne do material biológico, ocorrendo contribuição do exterior e interior do mesmo, e o padrão de

interferência varie de acordo com a movimentação de todas as moléculas presentes nesse material. Essa modificação pode ser frenética ou mais lenta, representando a atividade do material biológico, [8].

As imagens devem então ser obtidas com a maior taxa de aquisição possível para acompanhar a mudança de direção das dispersões, sendo necessário em alguns casos, um equipamento de aquisição de imagens mais rápido, [2]. Como várias imagens são obtidas para o acompanhamento do movimento, é necessário uma maior capacidade de memória. Um outro limite que deve ser considerado é o limite gerado pelo ruído dos equipamentos e pelo objeto iluminado.

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 ferverilhamento, mas não permite quantificá-lo. Mas o que é de interesse é a quantificação da atividade biológica, assim, existem várias técnicas para tratar as imagens que, compostas, expressam o ferverilhamento (*biospeckle*), permitindo sua quantificação, [2].

2.4. Métodos de Análise do *Speckle* Dinâmico

A combinação de sistemas de aquisição e processamento digital de imagens modernos constitui uma ferramenta importante para os pesquisadores desenvolverem novas técnicas para avaliação da qualidade de produtos vegetais de forma não destrutiva, [1]. Técnicas recentes, que utilizam uma fonte de luz *laser* e um sistema de aquisição e processamento de imagens, têm sido referidas na literatura como visão artificial ou *machine vision* e ainda como *laser vision*. Um sistema de visão artificial *laser* consiste de uma fonte de luz *laser*, uma câmera, um monitor, um processador digital de imagens e um microcomputador.

O *speckle* dinâmico pode ser utilizado de formas distintas como fonte de informação. Quando se deseja obter informações de níveis de atividades diferentes em um corpo iluminado pelo *laser*, o que se utiliza são procedimentos de processamento de imagens que geram um mapa indicando em tons de cinza os níveis de atividade. Os métodos utilizados neste trabalho são o de Diferenças Generalizadas e o Método de Fujii. Por outro lado, quando a informação requerida é uma quantificação da mudança do padrão de *speckle* formado durante uma informação, é utilizado o método de Momento de Inércia e o Momento de Inércia Multilinhas (versão modificada do Momento de Inércia).

2.4.1. Método de Diferenças Generalizadas (DG)

O Método de Diferenças Generalizadas permite indicar áreas que apresentam diferentes níveis de atividades relacionadas à mudança de 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 da imagem. O que se faz então, é realizar uma soma das diferenças de intensidade entre uma imagem e a sua subsequente, [5]. O resultado será uma nova imagem e um clareamento dos *pixels* que apresentarem mudanças de intensidade, representado pela seguinte equação:

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

Equação 2.1

sendo k e l as imagens.

A técnica de Diferenças Generalizadas é uma das técnicas de tratamento de imagem utilizada para análise de vigor e viabilidade de sementes, [2].

Um exemplo do funcionamento do Método de Diferenças Generalizadas é mostrado a seguir, em que o mesmo é aplicado nas três imagens consecutivas abaixo.

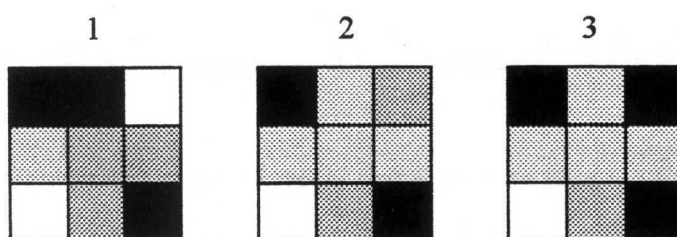


Figura 2.2 – Imagens consecutivas de uma iluminação fictícia, [2]

O resultado do processamento do método pode ser visto na figura 2.3, pela qual se observa que as unidades que mais modificaram sua intensidade de cinza ficaram mais claras de acordo com a amplitude de modificação.

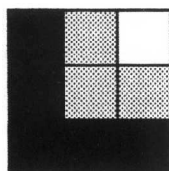


Figura 2.3 – Resultado do Método de Diferenças Generalizadas, [2]

Para simular o Método de Diferenças Generalizadas, valores são atribuídos às intensidades de cinza das imagens anteriores, onde o valor 1 representa o máximo de claridade (branco) e 0,01 representa a referência (negro). Valores maiores que 1 são convertidos automaticamente em 1, uma vez

que ocorre uma saturação da imagem. Os valores atribuídos são mostrados logo abaixo.

Imagem 1

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

Imagem 2

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

Imagem 3

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

Resolvendo por Diferenças Generalizadas, tem-se os seguintes passos, de acordo com a equação 2.1:

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

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

$K = 1$ e $l = 2$

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

$K = 2$ e $l = 1$

0	0	0,49
0	0	0
0	0	0

O resultado do somatório é mostrado a seguir.

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

2.4.2. Método de Fujii

Este método baseia-se na mesma filosofia que é adotada para o Método de Diferenças Generalizadas, porém apenas com uma mudança no tratamento da imagem onde ocorre uma ponderação das diferenças, [11] e [12]. A equação abaixo mostra como funciona esta ponderação.

$$I(x,y) = \Sigma \left| \frac{I_k(x,y) - I_{k+1}(x,y)}{I_k(x,y) + I_{k+1}(x,y)} \right|$$

Equação 2.2

Resolvendo o mesmo exemplo que foi realizado por Diferenças Generalizadas pelo Método de Fujii, têm-se os seguintes passos, de acordo com a equação 2.2.

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

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

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

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

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

0	0	0,96
0	0	0
0	0	0

Somatório

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

Como 1 representa o valor máximo de claridade, ocorre a saturação quando existe um valor maior que este. Após a conversão, tem-se os seguinte valores:

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

A imagem resultante é mostrada na figura 2.4.

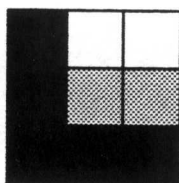


Figura 2.4 – Resultado do Método de Fujii, [2]

A diferença entre os dois métodos está ressaltada, neste caso, no elemento da coluna dois e linha um, em que o valor em Diferenças Generalizadas foi de 0,48, enquanto que no método de Fujii o valor foi de 1, [2]. Esse é um problema do Método de Fujii em que, para pequenas intensidades, o efeito das diferenças fica maior do que para intensidades maiores. Esse efeito é interessante em alguns casos, mas traz informações erradas em outros, como ocorreu no exemplo acima.

2.4.3. Momento de Inércia

Para a análise de nível de atividade de um material biológico, o que se tem proposto com o uso do *laser*, até o momento, é a análise do *Spatial Temporal Speckle*, [13].

O *Spatial Temporal Speckle* (STS) constitui-se de uma manipulação das diversas imagens obtidas da superfície do objeto iluminado pelo *laser*. De cada imagem conseguida, retira-se apenas uma linha que estará ao lado da linha da

imagem seguinte. O resultado desse conjunto de linhas é chamado então de STS, uma vez que ele representa como se comportou uma linha da área iluminada nas imagens conseguidas durante o tempo de exposição.

Para este trabalho, o STS é obtido da seguinte forma: 512 imagens sucessivas são capturadas do material iluminado com a luz *laser* e uma linha é selecionada em cada uma delas, sendo esta a linha central (padrão). Cada linha é composta por 512 *pixels*, e pode ser pensada como uma matriz de *pixels*, composta de uma linha (linha 0) e de y colunas (com y variando de 0 a 511). As linhas são transformadas em colunas, de forma que o *pixel* na posição $(0,y)$ de uma determinada linha se encontrará na posição $(y,0)$ da coluna gerada. Depois, as colunas são colocadas lado a lado verticalmente, obedecendo à ordem temporal de captura. Dessa forma, uma nova imagem composta de 512×512 *pixels* é então gerada, ou seja, o STS.

As colunas dessa nova imagem representam diferentes instantes de iluminação, e suas linhas, o estado de intensidade em todo o instante exemplificado. A atividade da amostra aparece como mudanças de intensidade na direção horizontal. Nesse caso, se ocorreu algum movimento na superfície do material, essa mudança será transmitida para a figura do *speckle* formado e, conseqüentemente, a linha observada será diferente da anterior. Essa é uma forma de se avaliar o nível de atividade do objeto iluminado, pois se o resultado apresentar uma figura completamente distorcida, é sinal de que o movimento está intenso. Por outro lado, se a figura for composta por linhas bem definidas, significa que não está ocorrendo mudança na formação do *speckle* de uma imagem para outra, repetindo sempre o nível de cinza de antes. A Figura 2.5 ilustra essas diferenças.

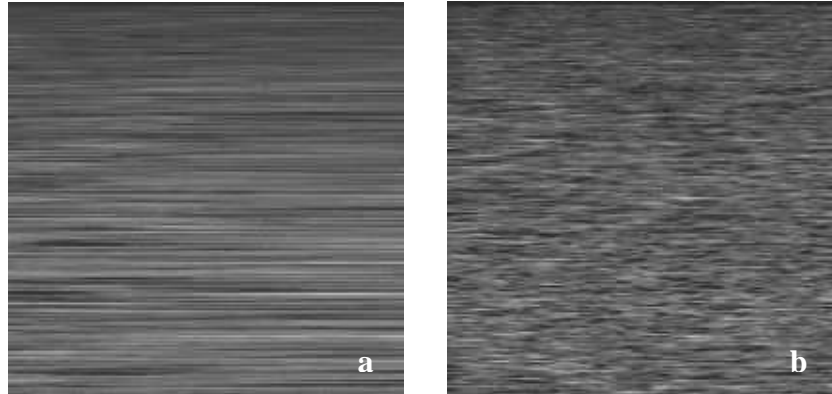


Figura 2.5 – Resultados STS para (a) semente com baixa atividade; (b) semente com intensa atividade

As mudanças do *speckle* no tempo têm duas causas: o movimento da difusão, mudanças nos índices de refração, ou ambas, [6]. Quando um fenômeno diminui sua atividade com o tempo, um tempo menor de variações do *speckle* pode ser esperado.

Considerando que o STS carrega informações da atividade do material sob estudo, cada tipo de material apresenta um STS diferente, [1]. Isto pode ser observado através de inspeção visual, porém valores numéricos são necessários para efeito de comparação. Assim, torna-se necessário transformar o STS em um número ou índice de quantificação, o que permite diferenciar os objetos que apresentam níveis de atividade distintos.

Um resultado da análise do STS é o **Momento de Inércia** que, permitindo apresentar uma interpretação quantitativa para o STS, baseado nas ocorrências de valores de intensidade sucessivos dos *pixels* que compõem o STS, [7] e [2]. Este método forma uma matriz de ocorrências de intensidades sucessivas, denominada matriz de ocorrências (MOC) ou *concurrence matrix* (COM), definida pela seguinte equação:

$$\mathbf{MOC} = [\mathbf{N}_{ij}]$$

Equação 2.3

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 255 tem-se a faixa de intensidades codificadas em segundo 8 bits) faz-se o cômputo de todas as ocorrências. Uma vez montada a MOC, observa-se que a diagonal principal está relacionada com intensidades que não variaram no tempo, enquanto fora da mesma aparecem as ocorrências que caracterizam uma mudança no tempo. Dessa forma, quanto mais afastado da diagonal principal estiver a ocorrência, maior a mudança na intensidade do *pixel* i para o *pixel* j . Assim, com a MOC é possível analisar o nível de alteração do *speckle* observado no tempo.

Para melhor entendimento sobre a técnica, segue-se um exemplo, [1]. Considere a imagem ilustrada na figura 2.6 como sendo uma imagem da evolução temporal de um padrão de *speckle* (STS) composta por 4×4 elementos e no máximo quatro níveis de intensidade, o que corresponde a um sistema de dois bits. A figura 2.6 pode ser transformada numa matriz de intensidades, onde são considerados os valores das intensidades de cada *pixel*, para em seguida, obter-se a matriz de ocorrências modificada (MOCN ou MCOM). A matriz de intensidades da figura 2.6 é representada pela matriz 1.

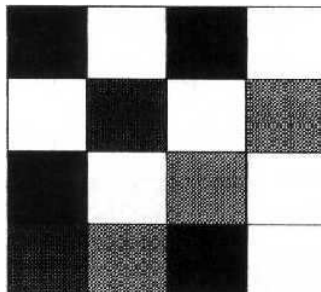


Figura 2.6 – Simulação STS de alta atividade, [1]

$$\begin{pmatrix} 1 & 4 & 1 & 4 \\ 4 & 2 & 1 & 3 \\ 1 & 4 & 3 & 4 \\ 2 & 3 & 1 & 4 \end{pmatrix}$$

Matriz 1 - Matriz de intensidades referente à figura 2.6, [1]

A matriz de ocorrências da figura 2.6 seria equivalente a matriz 2, onde as linhas representam um certo nível de intensidade seguido por outro nível de intensidade representado pela coluna. Por exemplo, a intensidade 1 seguida da intensidade 4 ocorre quatro vezes na matriz 1. Assim, na linha 1, coluna 4 da matriz de ocorrências, coloca-se o valor 4. A ocorrência da intensidade 4, seguida pela intensidade 3, ocorre uma vez, portanto, na linha 4, coluna 3, coloca-se o valor 1, até formar a matriz de ocorrências (matriz 2).

$$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 1 & 4 \\ 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 0 \end{pmatrix}$$

Matriz 2 – Matriz de Ocorrências da figura 2.6, [1]

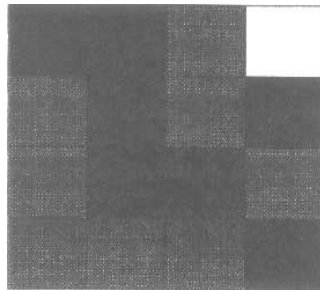


Figura 2.7 - Representação da matriz de ocorrências da figura 2.6, [1]

Para normalizar a matriz de ocorrências, cada valor é dividido pelo número total de ocorrências de cada linha detectado na imagem como representado na equação 2.3. Dessa forma, o somatório de todas as ocorrências em cada linha torna-se igual à unidade (um), resultando a matriz de ocorrências modificada. Após esse processo, atribui-se valores de intensidade para cada valor de ocorrência normalizada, de forma que o maior valor seja equivalente ao branco ou 255, e o menor valor seja equivalente ao negro ou 0.

$$\mathbf{M}_{ij} = \mathbf{N}_{ij} / \sum_j \mathbf{N}_{ij}$$

Equação 2.3

Em que \mathbf{N}_{ij} é o número de ocorrências de intensidades sucessivas.

A matriz modificada (MOCN) é a transformação da Matriz 2 em uma imagem, onde para cada ocorrência é atribuído um nível de intensidade, e passa a ser utilizada para plotar o gráfico que representa o grau de dispersão em torno da diagonal e dessa forma, o Momento de Inércia pode ser também calculado baseando-se na mesma. A diagonal principal da matriz de ocorrências modificada está relacionada às regiões homogêneas da imagem, cujos valores de intensidades são estáveis e não se alteram como o tempo, enquanto que as regiões mais afastadas da diagonal principal com valores não nulos se relacionam a zonas de grande contraste de intensidade, [1].

Para análise de atividade, a variável de interesse é o tempo, de forma que os N valores de ocorrência indicam quantas vezes um valor de intensidade i é seguido no próximo intervalo de tempo por um valor de intensidade j no STS. Caso a intensidade não se altere com o tempo, os únicos valores não nulos da matriz de ocorrências pertencerão à sua diagonal principal, caracterizando um material de baixa atividade. Se um material apresenta muita atividade, as intensidades apresentarão mudanças e começarão aparecer valores de ocorrências não nulos fora da diagonal principal.

A figura 2.8 mostra o comportamento acima descrito.

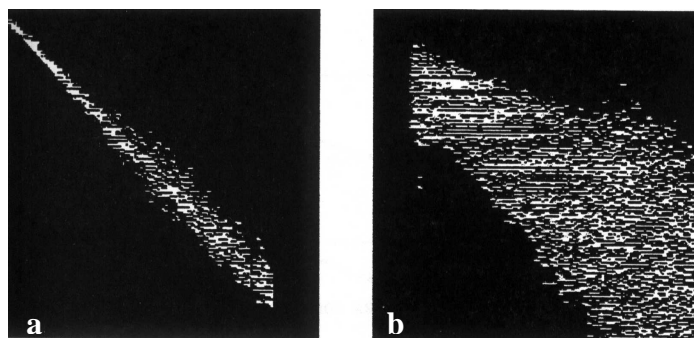


Figura 2.8 – Matriz de ocorrência de (a) uma caixa de papel (baixa atividade) e (b) de uma laranja (alta atividade), [2]

A fim de se obter um valor numérico que permita quantificar as diferenças entre duas imagens distintas, pode ser aplicado o conceito de segunda ordem. Esse cálculo é aplicado na matriz de ocorrências com respeito à sua diagonal principal na direção das linhas, constituindo o Momento de Inércia (MI). O MI consiste no somatório dos produtos dos valores de intensidade da matriz pelo quadrado da distância entre cada elemento da matriz e a diagonal principal. Numericamente, essa matriz pode ser avaliada de acordo com a Equação 2.4, [7]:

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

Equação 2.4

Voltando ao exemplo da Figura 2.6, pode-se determinar o Momento de Inércia a partir de sua matriz de ocorrências modificada. O cálculo é mostrado a seguir.

$$\mathbf{MI} = \left(\begin{array}{cccc} 0 & + 0 & + 1(1-3)^2 & + 4(1-4)^2 & + \\ 1(2-1)^2 & + 0 & + 1(2-3)^2 & + 0 & + \\ 1(3-1)^2 & + 0 & + 0 & + 1(3-4)^2 & + \\ 1(4-1)^2 & + 1(4-2)^2 & + 1(4-3)^2 & + 0 & \end{array} \right) \mathbf{MI} = 61$$

Assim, obtém-se uma forma rápida e objetiva de quantificação da variação temporal de padrões do *speckle*.

3. METODOLOGIA

3.1. Implementação dos Métodos Computacionais para Captura e Processamento de Imagens

Após a placa de aquisição de imagens *PXC200 Color Frame Grabber*, fabricante Imagenation, ter sido instalada num microcomputador Compaq, de 1.7 GHz, processador AMD Duron, com 128 MB de memória RAM e sistema operacional Microsoft Windows Millenium Edition, deu-se o início da implementação dos métodos computacionais de captura e processamento de imagens. Foram implementados os seguintes métodos anteriormente citados: Método das Diferenças Generalizadas (aplicativo *difgen.c*), Método de Fujii (aplicativo *fujii.c*), Momento de Inércia (aplicativos *captura.c* e *estrutura.c*) e Momento de Inércia Multilinhas (aplicativos *captura3.c* e *estrutura.c*). Todos os métodos foram implementados utilizando a linguagem de programação C, incluindo as DLL's e bibliotecas de funções de captura da placa PXC200, [15]. Os aplicativos foram compilados usando o compilador Visual C++, versão 6.0, da Microsoft.

3.1.1. O Aplicativo *captura.c*

O aplicativo *captura.c* é utilizado para capturar imagens e gerar a respectiva imagem STS (*Spatial Temporal Speckle*). O usuário especifica o nome do arquivo que armazenará o STS gerado na captura, o número de imagens a serem capturadas, o canal de vídeo utilizado², o intervalo de captura de imagens (o padrão é 80 ms) e se as imagens capturadas devem ser salvas em arquivo ou não. Vale lembrar que o STS gerado sempre é salvo em arquivo

² O canal de vídeo, NTSC ou Palm, depende da câmera utilizada (colorida ou preto-e-branco).

(nomeSTS) e as imagens capturadas são armazenadas temporariamente em um espaço da memória (*buffer*), e ao final do processamento esse espaço é liberado, ou seja, as imagens são descartadas. Todas as imagens geradas são salvas no formato bitmap (.bmp).

3.1.2. O Aplicativo *captura3.c*

O aplicativo *captura3.c* é uma modificação do aplicativo *captura.c.*, sendo modificado da seguinte maneira: ao invés de capturar apenas a linha central de cada imagem (STS padrão), agora são capturadas três linhas de cada imagem, sendo uma linha superior, uma linha central e uma linha inferior – **Momento de Inércia Multilinhas**. Assim, são obtidos três STS's e gerados três valores para o Momento de Inércia utilizando o aplicativo *estrutura.c*, permitindo uma melhor análise da atividade biológica nas sementes.

3.1.3. O Aplicativo *estrutura.c*

O aplicativo *estrutura.c* é utilizado para realizar o cálculo do Momento de Inércia a partir do STS gerado pelo aplicativo *captura.c*. O usuário deve passar como parâmetro o nome da imagem STS para que seja gerado uma quantificação do nível de atividade biológica.

3.1.4. O Aplicativo *difgen.c*

O aplicativo *difgen.c* é utilizado para realizar o processamento de imagens através do Método das Diferenças Generalizadas (DG). Como no aplicativo *captura.c*, o usuário especifica o nome do arquivo que contém o resultado do método DG gerado na captura, o número de imagens a serem capturadas, o canal de vídeo utilizado, o intervalo de captura de imagens (o

padrão é 80 ms) e se as imagens capturadas devem ser salvas em arquivo ou não. Este método também utiliza o armazenamento temporário de imagens. Vale lembrar que a imagem DG gerada sempre é salva em arquivo (nomeDG).

3.1.5. O Aplicativo *fujii.c*

O funcionamento do aplicativo *fujii.c* é semelhante ao funcionamento do aplicativo *difgen.c*, porém é utilizado o Método de Fujii para gerar o arquivo de saída (nomeFJ).

3.2. Equipamentos Utilizados

O experimento utilizou-se de uma fonte de luz *laser*, lente de dispersão de feixe, lentes de *zoom* e um sistema de aquisição digital de imagens, composto de uma câmara CCD (*charge coupled device*), processador de imagens, microcomputador, monitor e os aplicativos computacionais acima descritos para análise e processamento das imagens.

A fonte de luz utilizada é um *laser* de HeNe (hélio-neônio) vermelho, de 17 mW de potência e comprimento de onda de 632,8 nm, fabricante Coherent.

A câmara de vídeo consiste basicamente em um arranjo de cerca de 780x480 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 μm (infravermelho próximo). Cada detector recebe uma parte da imagem (*pixel*), [14].

Foi utilizado um filtro neutro, a fim de diminuir a intensidade do *laser* que seria incidido na espécie que estava sendo iluminada. Também foi utilizada uma lente dispersora do feixe de *laser* para que se conseguisse incidir o *laser* em

uma maior área da espécie que estava sendo iluminada. A câmera foi colocada a uma altura de aproximadamente 15 cm da espécie que estava sendo iluminada.

O *laser* era ligado uma hora antes de se iniciar a iluminação, a fim de evitar efeitos transitórios e para que o *laser* se estabilizasse. Tal *setup* (montagem experimental) foi conseguido através da realização de diversos pré-testes, conseguindo-se assim melhores imagens para serem processadas.

3.3. Montagem Experimental

O *laser* é direcionado em um espelho altamente polido, onde o feixe é refletido na semente em questão e as imagens são capturadas pela câmera CCD digital, sendo tomadas várias imagens para o início da fase de processamento das imagens.

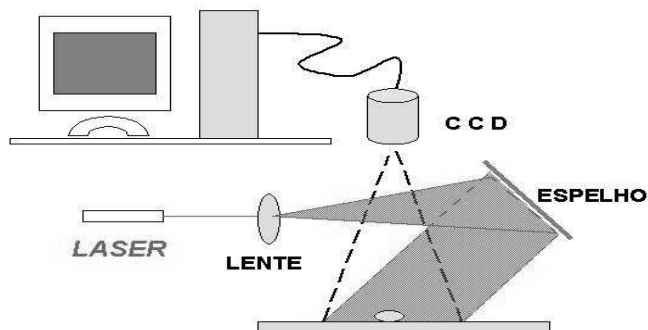


Figura 3.1 - Esquema da montagem dos equipamentos utilizados no experimento

3.4. Utilização dos Aplicativos Computacionais

O cálculo do Momento de Inércia é obtido a partir do STS formado após a aquisição de 512 imagens. O STS é obtido utilizando o aplicativo *captura.c* e sua respectiva quantificação utilizando o aplicativo *estrutura.c* (Momento de Inércia). O aplicativo *captura3.c* foi utilizado somente no segundo experimento, descrito na seção 3.6.

À medida que as sementes eram iluminadas, os aplicativos computacionais para o cálculo do método de Diferenças Generalizadas (aplicativo *difgen.c*) e Fujii (aplicativo *fujii.c*) eram executados e as correspondentes imagens eram obtidas após a captura de cem imagens consecutivas da espécie que estava sendo iluminada.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o aplicativo estatístico Sisvar³. Os gráficos foram feitos utilizando o aplicativo Excel da Microsoft.

3.5. Os Experimentos Realizados

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Laser e Óptica do Departamento de Engenharia, da UFLA, em Lavras, MG, utilizando sementes de feijão, milho, soja, algodão e café para serem iluminadas.

Após a realização de diversos pré-testes, foram realizados dois experimentos principais para verificar a validade do uso do *biospeckle laser* para análise de atividade biológica através dos métodos computacionais implementados. Esses experimentos são descritos nas próximas subseções.

³ Aplicativo desenvolvido por Daniel Furtado Ferreira, Departamento de Ciências Exatas – UFLA.

3.5.1. Primeiro Experimento: iluminação *laser* em diferentes sementes

Após as sementes terem sido devidamente preparadas para a iluminação, estas foram colocadas em sacos plásticos lacrados e posteriormente colocadas em uma câmara fria, a fim de que não houvesse troca de umidade com o ambiente, e levadas para o laboratório de *laser* para serem iluminadas. Maiores detalhes sobre a preparação das sementes são encontradas em [16].

As sementes de milho eram cortadas longitudinalmente e as demais eram cortadas ao meio, a fim de que se conseguisse iluminar os embriões das sementes, pois estes apresentam vida (atividade biológica).

As sementes foram separadas em lotes de dez sementes. Realizando-se 12 repetições, obteve-se 120 iluminações para cada espécie, totalizando seiscentas iluminações. Tal delineamento garantiu representatividade.

3.5.2. Segundo Experimento: identificação de fungos em sementes

Objetivando investigar a viabilidade de uso do *biospeckle* em sementes de feijão, a fim identificar a presença de fungos, lotes de sementes foram inoculados com três espécies de fungos, a saber: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus spp.*, *Colletotrichum tindemuthianum*. Após a obtenção dos resultados da iluminação do lote inoculado, estes foram comparados com os resultados da iluminação das sementes-testemunhas (sementes sem fungos).

Escolheu-se trabalhar com sementes de feijão por estas apresentarem atividade biológica em uma maior área, o que facilita a compreensão dos resultados do processamento das imagens, bem como a facilidade do corte das mesmas.

As sementes foram colocadas em sacos plásticos lacrados, a fim de que não houvesse troca de umidade com o ambiente, e levadas para o Laboratório de Laser e Óptica para serem iluminadas.

As sementes de feijão foram cortadas ao meio, e então iluminadas suas partes internas e externas, a fim de verificar se a presença de fungos ocorre somente na parte externa da semente bem como em seu interior.

As sementes inoculadas pelos fungos foram separadas em quatro lotes, onde foram iluminadas 15 sementes de cada lote, totalizando sessenta iluminações para cada tipo de fungo. O mesmo foi feito para as sementes-testemunhas. Tal delineamento garantiu representatividade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados vários testes estatísticos para análise dos resultados obtidos das iluminações realizadas nos dois experimentos, a fim de comprovar o uso da técnica bem como o funcionamento dos métodos computacionais desenvolvidos. Os testes realizados são descritos nas próximas subseções.

4.1. Resultados para o primeiro experimento

4.1.1. Determinação do Nível de Atividade - Momento de Inércia

Após realizar o teste de *Scott-Knott*⁴ para as médias dos valores dos Momentos de Inércia, verificou-se que as sementes apresentaram atividade diferenciada para uma mesma situação de umidade, exceto para as sementes de soja e milho. O teste é apresentado logo abaixo.

Tabela 1 - Teste Scott-Knott para médias de log(momento de inércia) de espécies ($\alpha=0,05$).

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
soja	1.769200	a
milho	1.768242	a
feijão	1.615125	b
algodão	1.436400	c
café	1.030975	d

Essas diferenças representam uma grande importância para trabalhos futuros, uma vez que, como estas indicam que sementes diferentes possuem uma atividade biológica diferenciada para um mesmo nível de umidade, pode ser que

⁴ As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

uma espécie esteja com um alto nível de atividade e outra espécie diferente esteja com baixo nível de atividade. Também, deve ser investigada a possibilidade da presença de fungos na semente. Caso exista, haverá a influência destes nos resultados, pois os mesmos apresentam atividade biológica, necessitando identificar a sua presença através do *biospeckle*. Isto é verificado no segundo experimento, descrito na seção 3.5.2.

O cálculo para o Momento de Inércia é feito sobre a imagem STS. Como esta é formada retirando-se a linha central da imagem, existe a dificuldade em saber se realmente a informação que está sendo obtida é válida para todas as sementes, uma vez que cada semente apresenta uma localização diferente para o seu embrião. O presente fato precisa ser melhor compreendido através de novos experimentos a fim de se chegar na melhor metodologia. Assim, foi implementada uma nova versão para o Momento de Inércia, o Momento de Inércia Multilinhas, descrito na seção 3.1.2., sendo utilizado somente no experimento para identificação de presença de fungos.

4.1.2. Análise dos Valores Obtidos dos Momentos de Inércia

De posse dos valores dos Momentos de Inércia de cada semente, foi calculada a média dos mesmos para cada repetição. Os gráficos abaixo representam as médias dos Momentos de Inércia para as 12 repetições realizadas para as sementes analisadas.

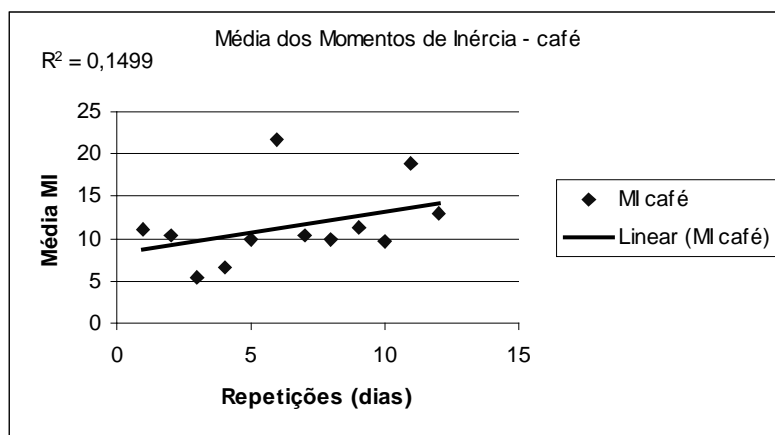


Gráfico 1 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de café (12 repetições)

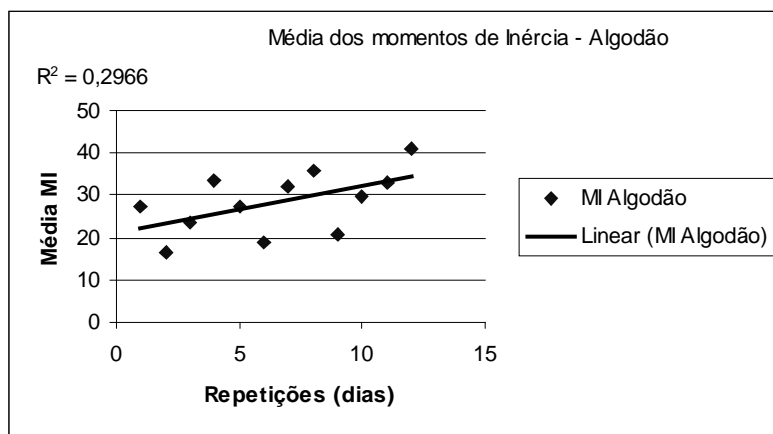


Gráfico 2 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de algodão (12 repetições)

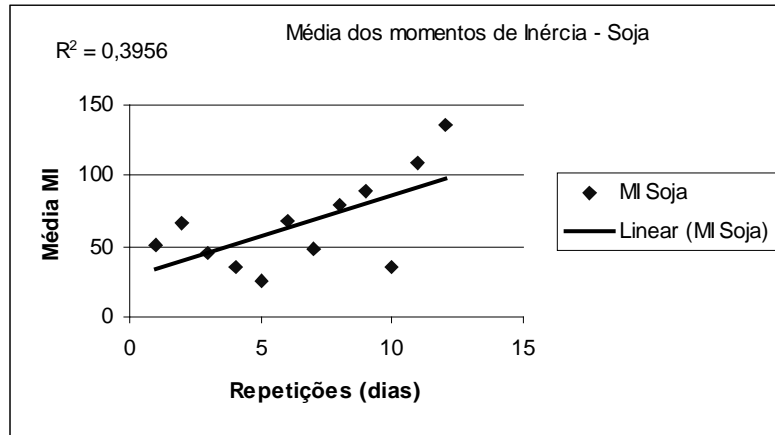


Gráfico 3 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de soja (12 repetições)

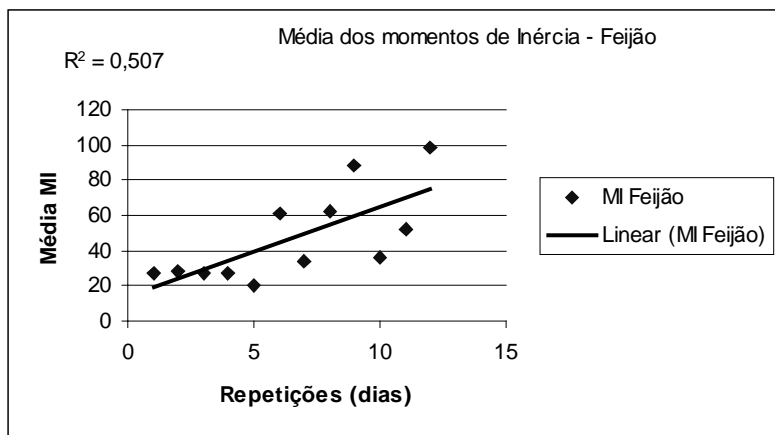


Gráfico 4 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de feijão (12 repetições)

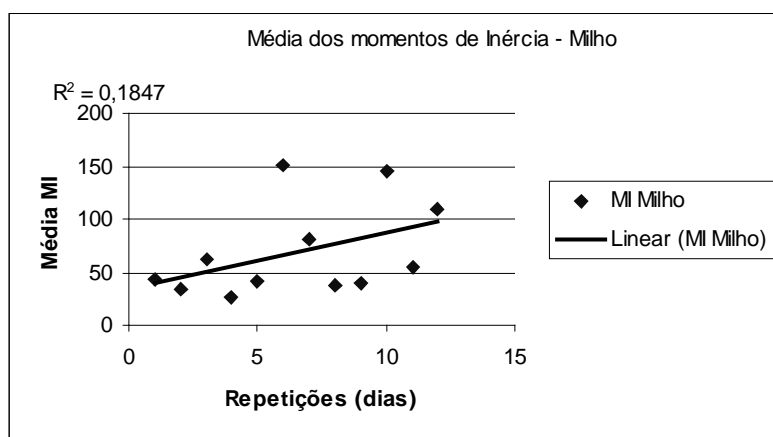


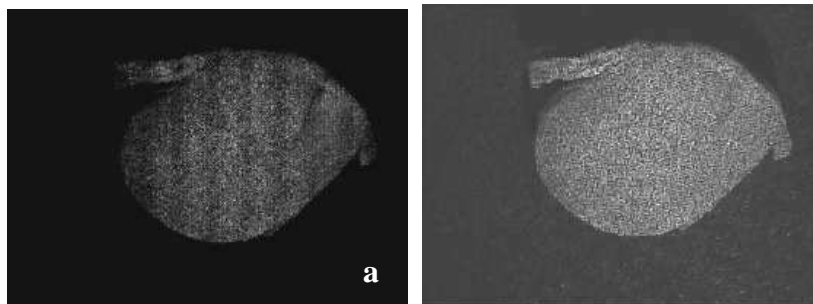
Gráfico 5 –Média dos Momentos de Inércia para as sementes de milho (12 repetições)

Analisando os gráficos acima, nota-se que todas as espécies de sementes analisadas apresentaram grande variação para os valores dos Momentos de Inércia para as 12 repetições realizadas. Algumas variáveis como a temperatura e umidade relativa do laboratório ao longo dos dias de iluminação, vibração mecânica, presença de fungos dentre outras, podem ter sido a causa da grande variação observada, além da dificuldade de iluminar sementes onde a atividade biológica se encontra em áreas limitadas, como é o caso das sementes de milho, café e algodão. As sementes de feijão apresentaram menor variação, uma vez que estas são mais fáceis de cortar, iluminar e apresentam resultados melhores para os Momentos de Inércia, uma vez que as sementes de feijão possuem atividade biológica em uma grande área.

Assim, a metodologia utilizada deve ser adaptada para as diversas sementes, a fim de que se obtenha resultados mais precisos ao se trabalhar com iluminações ao longo de vários dias, além de pesquisas que avaliem o efeito de parâmetros externos nos resultados.

4.1.3. Análise Qualitativa – Processamento de Imagens

Nas imagens obtidas utilizando o Método de Diferenças Generalizadas e Fujii após a iluminação com *laser*, notou-se áreas com intensidades luminosas distintas (tons de cinza) nas sementes analisadas, caracterizando níveis de atividade biológica diferentes. Isto pode ser observado nas Figuras 4 e 5, ao evidenciar o embrião em algumas sementes. Nas sementes de milho é possível notar que a área onde se encontra o embrião está mais clara, ao contrário da área onde se encontra a reserva biológica. Isto foi possível ser verificado porque o embrião encontra-se nitidamente separado de sua reserva biológica. O mesmo não pode ser notado nas sementes de feijão e soja, pois estas apresentam atividade biológica numa grande área. Para as sementes de café, a parte mais clara é o embrião e os demais pontos claros representam outras atividades biológicas que não dizem respeito ao embrião, talvez a presença de fungos. Já as sementes de algodão não apresentam uma área bem definida para o embrião, ficando difícil identificar sua localização através da imagem.



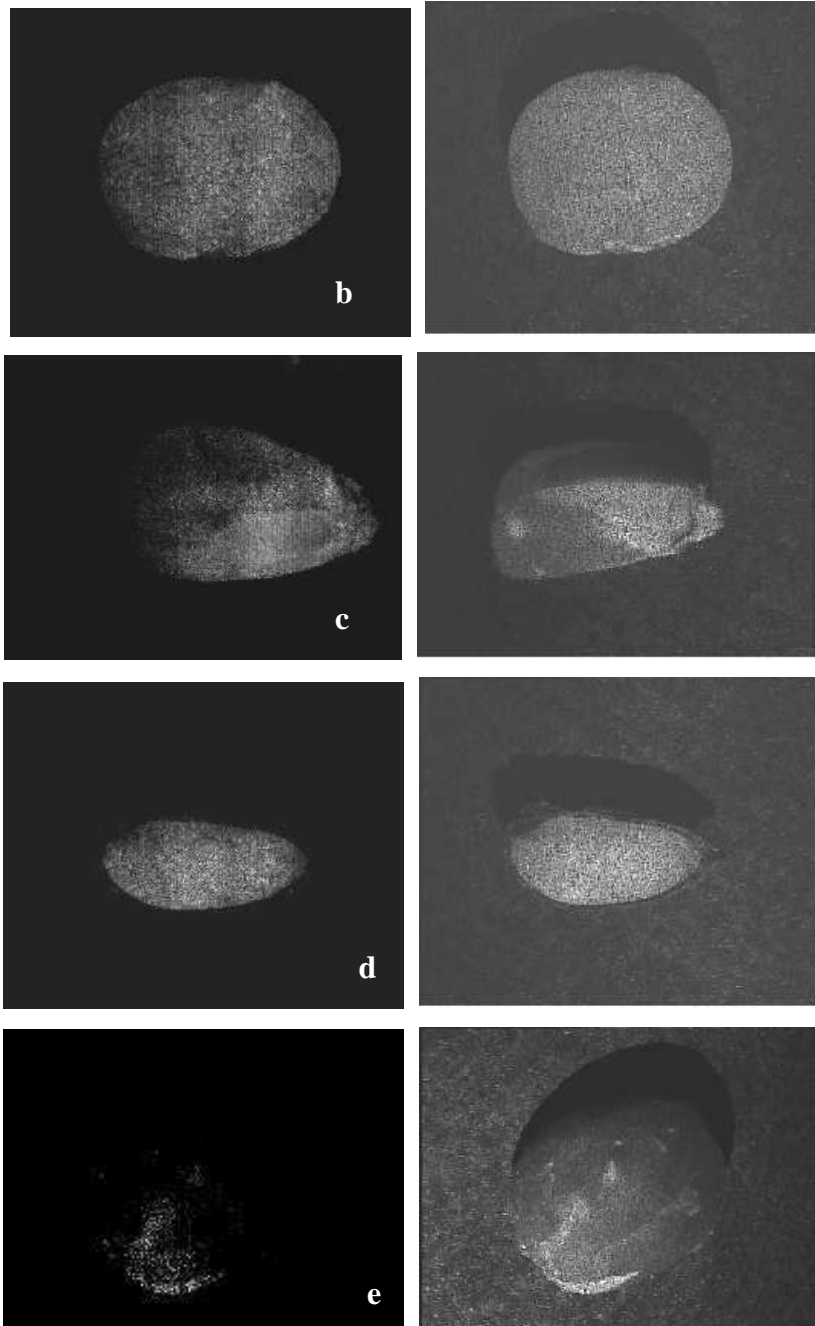


Figura 4 – Resultado de DG de (a) feijão; (b) soja; (c) milho; (d) algodão; (e) café, e suas respectivas imagens sem tratamento através de algum método

Esse é um resultado que evidencia a possibilidade de mapear áreas ou tecidos de diferentes comportamentos metabólicos e que apontam para a possibilidade de correlacionar movimento resultante de diferentes níveis de atividade biológica após processamento de imagens. Observa-se que a superfície sobre a qual está a semente não apresenta nenhum ponto mais claro, pois esta é completamente inerte.

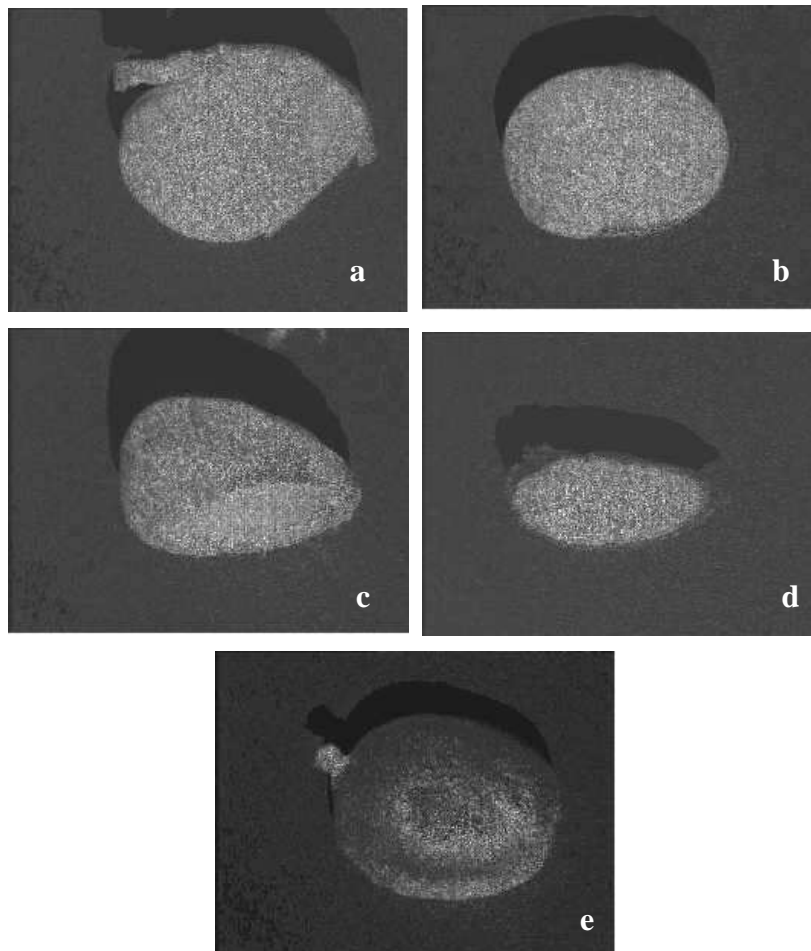


Figura 5 – Resultado de Fujii de (a) feijão; (b) soja; (c) milho; (d) algodão; (e) café

Comparando-se as imagens obtidas pelo método DG e as imagens obtidas pelo método de Fujii, nota-se claramente que o método de Fujii consegue fazer um clareamento dos *pixels* localizados em áreas que não apresentavam atividade biológica, como se houvesse um sombreamento da imagem. Pode-se observar que agora é possível notar pontos mais claros sobre a superfície.

Não é possível diferenciar as imagens STS de cada espécie. Sendo assim, as imagens STS de cada espécie não são mostradas, onde estas são parecidas com a imagem da figura 2.5b.

4.2. Segundo Experimento

4.2.1. Determinação do Nível de Atividade - Momento de Inércia

Este experimento permitiu o conhecimento da influência de fungos nos resultados, e a necessidade do desenvolvimento da técnica para sua identificação em sementes.

Como os fungos apresentam atividade biológica, os mesmos interferem nos resultados, o que permitiu diferenciar sementes contaminadas de não-contaminadas.

Os resultados a seguir mostram esta situação, onde foi possível diferenciar os fungos, exceto para um caso. Os resultados são claros, e apontam para a necessidade de desenvolvimento tecnológico da metodologia.

O teste a seguir mostra as diferenças observadas.

Tabela 2 - Teste Tukey para médias do momento de inércia de espécies (sementes inoculadas e testemunhas)

DMS: 44,7638510122387 NMS: 0,05
 Média harmônica do número de repetições (r): 16
 Erro padrão: 11,9749169396211

Tratamentos do teste	Médias	Resultados
1	45.417231	a1
2	56.169106	a1
3	134.246725	a2
4	184.299187	a3

Onde, tratamento 1: testemunha;
 tratamento 2: *Sclerotinia sclerotiorum*;
 tratamento 3: *Aspergillus spp.*;
 tratamento 4: *Colletotrichum tindemuthianum*.

Como pode ser visto, apenas o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* não ficou diferente da testemunha. Assim, foi realizado uma repetição desse experimento para esse fungo a fim de identificar tal diferença. Esse experimento é descrito na próxima subseção.

4.2.2. Repetição da iluminação de sementes inoculadas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

Este experimento seguiu o mesmo delineamento estatístico descrito anteriormente. Agora, as sementes foram inoculadas somente pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo separadas em quatro lotes e iluminadas 15 sementes de cada lote, totalizando sessenta iluminações. O mesmo foi feito para as sementes-testemunhas. Tal delineamento garantiu representatividade.

Para a análise do momento de inércia foi utilizado o aplicativo computacional *captura3.c* (Momento de Inércia Multilinhas). Assim, são obtidos três valores para o Momento de Inércia utilizando o aplicativo *estrutura.c*.

Para saber se houve diferença entre as sementes inoculadas e as sementes-testemunhas, foram realizados os seguintes testes:

Valores para o momento de inércia padrão (linha do meio capturada):

Tabela 3 - Teste Scott-Knott para médias de log(momento de inércia) de espécies

NMS: 0.05

Média harmônica do número de repetições (r): 58.7467811158798
Erro padrão: 0.646125707912092

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	4.872268	a1
1	5.994909	a1
4	8.341857	a2
2	10.071952	a2

Onde: tratamento 1 – Fungos parte exterior

tratamento 2 – Fungos parte interior

tratamento 3 – Testemunha parte exterior

tratamento 4 – Testemunha parte interior

Valores para o momento de inércia modificado (linha superior capturada):

Tabela 4 - Teste Scott-Knott para médias de log(momento de inércia) de espécies

NMS: 0.05

Média harmônica do número de repetições (r):
 58.7467811158798
 Erro padrão: 0.727661487156087

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	4.966076	a1
1	6.168227	a1
4	8.865899	a2
2	10.832884	a2

Onde: tratamento 1 – Fungos parte exterior

tratamento 2 – Fungos parte interior

tratamento 3 – Testemunha parte exterior

tratamento 4 – Testemunha parte interior

Valores para o momento de inércia modificado (linha inferior capturada):

Tabela 5 - Teste Scott-Knott para médias de log(momento de inércia) de espécies

NMS: 0.05

Média harmônica do número de repetições (r):
 58.7467811158798
 Erro padrão: 0.639448474404409

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	5.006859	a1
1	6.171088	a1
4	7.973211	a2
2	9.635578	a2

Onde: tratamento 1 – Fungos parte exterior
tratamento 2 – Fungos parte interior
tratamento 3 – Testemunha parte exterior
tratamento 4 – Testemunha parte interior

Analisando os resultados apresentados pelos testes acima, observou-se que não existe diferença de atividade biológica entre as sementes-testemunhas e as sementes inoculadas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, quando comparados os resultados entre as partes internas e externas correspondentes, considerando os três valores de momento de inércia. Esse resultado indica que é necessário um melhor conhecimento da natureza do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, como o nível de umidade que é favorável ao seu desenvolvimento, ciclo de vida, dentre outros.

Porém, foi possível observar que existe uma diferença de atividade biológica entre as partes internas e externas das sementes (testemunhas e inoculadas), e também uma diferença entre as partes externas das sementes inoculadas e as partes internas de sementes-testemunhas. Esse resultado foi válido para os três valores de momento de inércia.

4.2.3. Análise dos valores obtidos dos Momentos de Inércia

De posse dos três valores dos momentos de inércia gerados pelo aplicativo *captura3.c* (Momento de Inércia Multilinhas), foram plotados os gráficos para verificar se os três valores apresentavam diferenças entre si. Os gráficos abaixo mostram os valores do momento de inércia para as sementes inoculadas e testemunhas, ambas com sessenta iluminações (partes interna e externa).

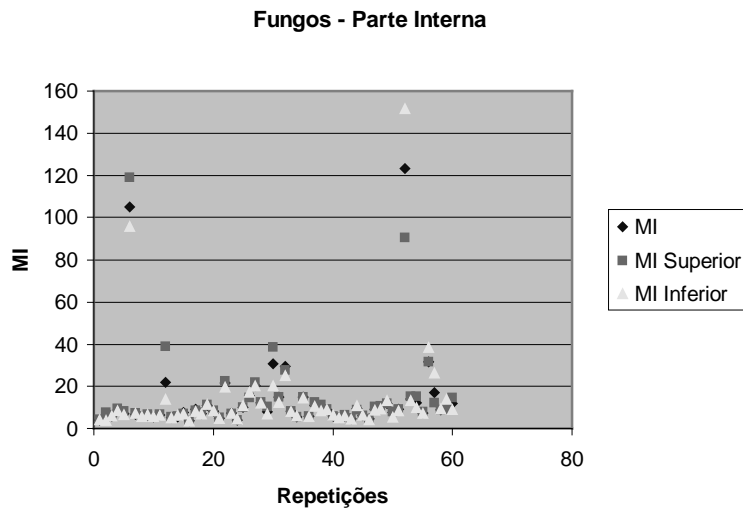


Gráfico 4.1 – Valores dos momentos de inércia para a parte interior das sementes inoculadas

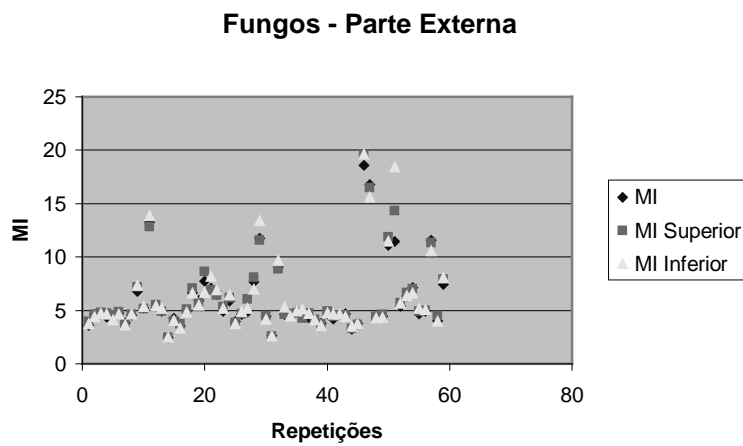


Gráfico 4.2 - Valores dos momentos de inércia para a parte exterior das sementes inoculadas

Testemunhas - Parte Interna

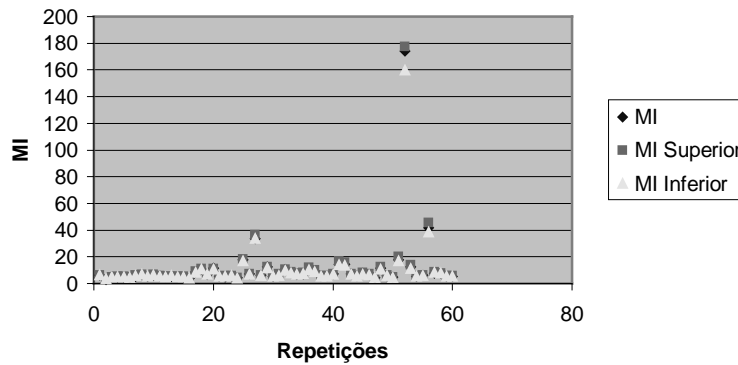


Gráfico 4.3 - Valores dos momentos de inércia para a parte interior das sementes-testemunhas

Testemunhas - Parte Externa

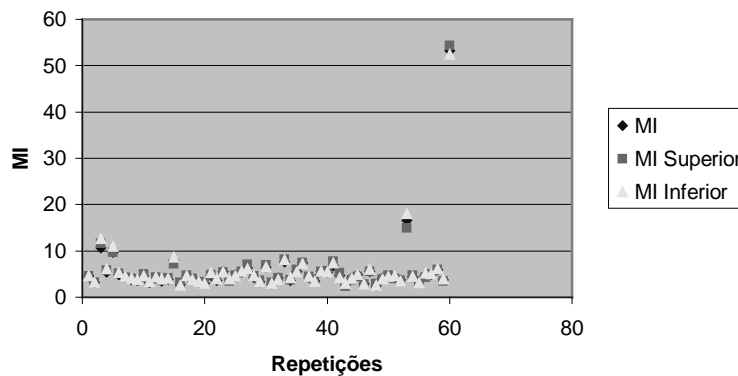


Gráfico 4.4 - Valores dos momentos de inércia para a parte exterior das sementes-testemunhas

Os gráficos acima mostram que os valores dos momentos de inércia, chamados de MI, MI Superior e MI Inferior, não apresentaram grandes diferenças entre si, tanto para as sementes-testemunhas e sementes inoculadas. Assim, não foi possível separar sementes contaminadas de não-contaminadas.

4.2.4. Análise Qualitativa – Processamento de Imagens

Nas imagens obtidas utilizando os métodos de Diferenças Generalizadas e Fujii após a iluminação com *laser*, notou-se áreas com intensidades luminosas distintas nas sementes analisadas, caracterizando níveis de atividade biológica diferentes. Isto pode ser observado nas figuras abaixo, onde é possível notar imagens que apresentam uma grande área branca, ou seja, alto índice de atividade biológica, tanto na parte interna e externa das sementes. Nota-se também que as sementes inoculadas apresentam um branco mais forte quando comparado com as imagens das sementes-testemunhas, evidenciando maior índice de atividade biológica, o que pode ser visto nas figuras 4.3 (sementes inoculadas) e 4.4 (sementes-testemunhas).

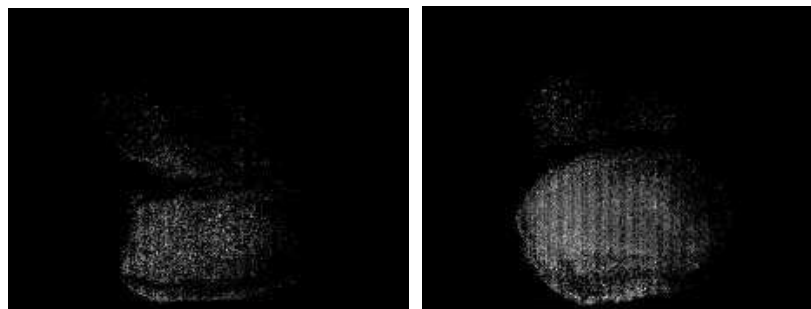


Figura 4.1 – Resultados DG de semente inoculada com *Aspergillus spp.*

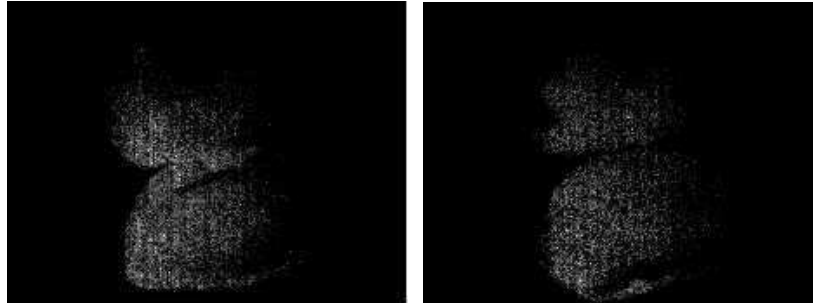


Figura 4.2 - Resultados DG de semente inoculada com *Sclerotinia sclerotiorum*

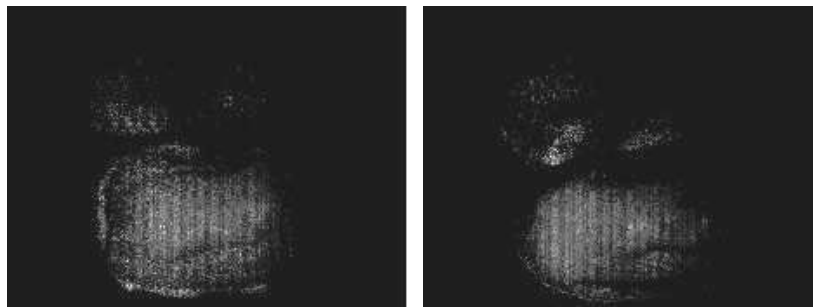


Figura 4.3 - Resultados DG de semente inoculada com *Colletotrichum tindenuthianum*

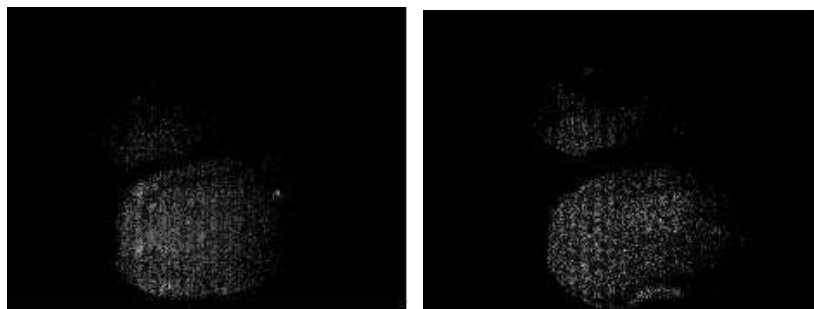


Figura 4.4 - Resultados DG de semente-testemunha

As imagens a seguir apresentam os resultados do Método Fujii.

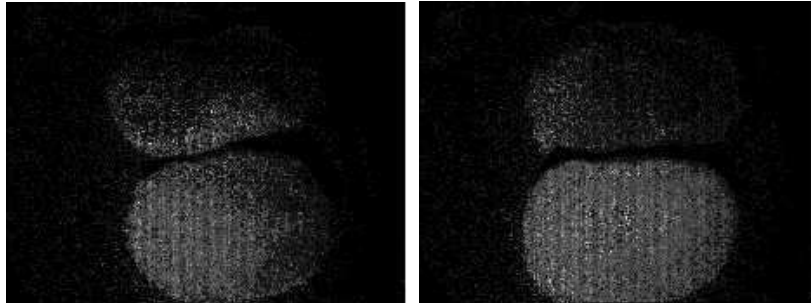


Figura 4.5 – Resultados Fujii de semente inoculada com *Aspergillus spp.*

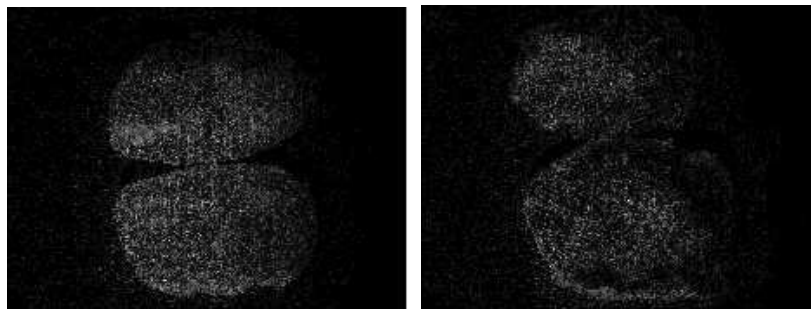


Figura 4.6 – Resultados Fujii de semente inoculada com *Sclerotinia sclerotiorum*

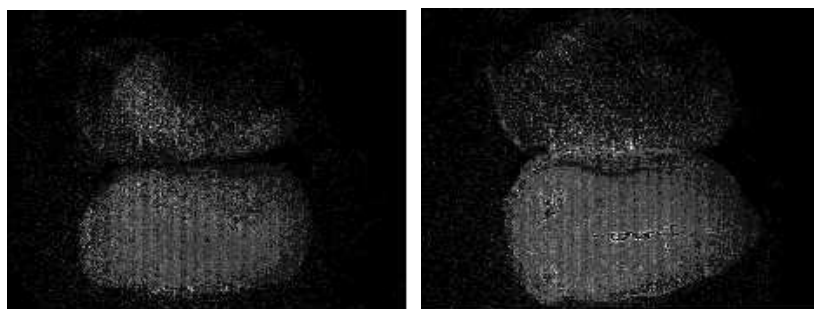


Figura 4.7 – Resultados Fujii de semente inoculada com *Colletotrichum tindenuthianum*

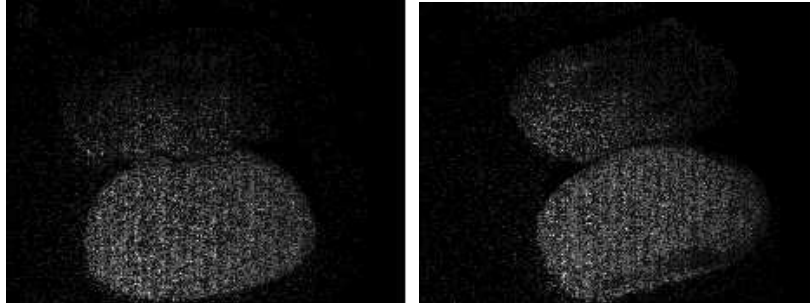


Figura 4.8 – Resultados Fujii de semente-testemunha

Comparando-se as imagens obtidas pelo método DG e as imagens obtidas pelo método de Fujii, não foi possível notar grandes diferenças entre as imagens de sementes-testemunhas e sementes inoculadas processadas pelo método Fujii.

As figuras abaixo mostram algumas imagens obtidas durante a repetição da iluminação com sementes inoculadas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

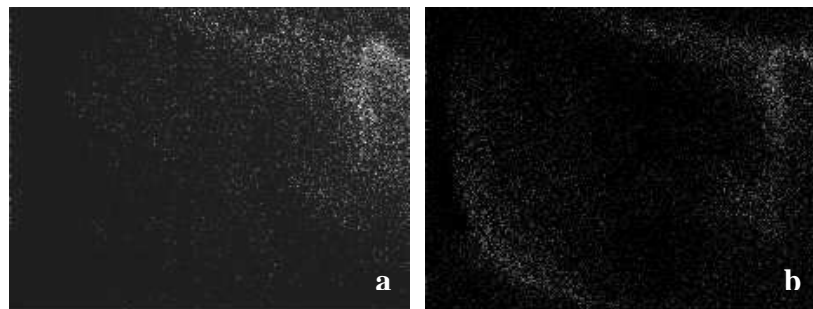


Figura 4.9 – Resultados (a) DG e (b) Fujii da parte externa de uma semente

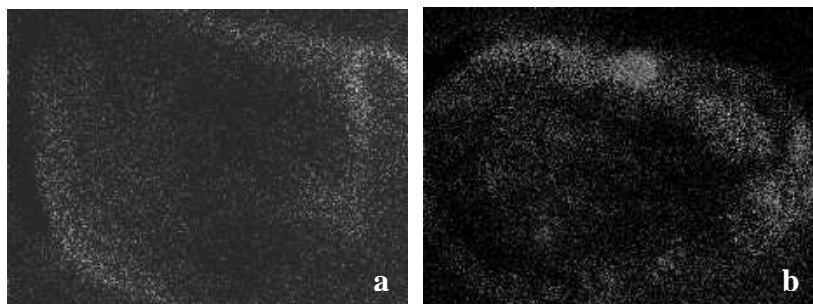


Figura 4.10 – Resultados (a) DG e (b) Fujii da parte interna de uma semente

Comparando as imagens das figuras 4.9a e 4.10a, pode-se observar que a parte interna das sementes inoculadas apresentam um índice de atividade biológica maior, caracterizado por uma maior área branca.

A imagem a seguir mostra o STS obtido após a captura de 512 imagens sucessivas utilizando o aplicativo *captura.c*.

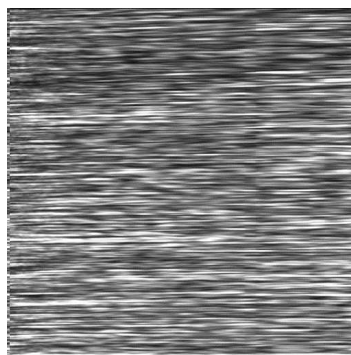


Figura 4.11 – STS para uma semente de feijão inoculada

É apresentada somente uma imagem STS por esta não se diferenciar muito de uma espécie para outra, bem como diferenciar parte externa de interna de sementes.

5. CONCLUSÕES

5.1. Métodos Computacionais

Todos os métodos computacionais implementados atenderam às necessidades do presente trabalho, onde foi possível visualizar áreas de diferentes atividades biológicas das espécies que estavam sendo iluminadas utilizando os métodos de Diferenças Generalizadas e Fujii, bem como quantificar o nível de atividade biológica das mesmas através do Momento de Inércia.

Os métodos implementados apresentaram uma grande eficiência quando comparados com outros métodos de captura e processamento de imagens anteriormente utilizados, onde o tempo de processamento passou de cerca de quatro horas para dois minutos.

5.2. Efeito *laser* em diferentes sementes

Foram observadas diferenças significativas nos valores dos Momentos de Inércia para as várias sementes, exceto entre as sementes de milho e soja. Essas diferenças são importantes para a realização de trabalhos específicos em cada uma destas sementes, mostrando que a técnica precisa ser adaptada a cada tipo de material biológico. As sementes também apresentaram diferenças em várias regiões das imagens obtidas. Assim, é necessário adotar metodologias diferentes ao trabalhar com o *biospeckle* na análise de espécies distintas de sementes.

5.3. Identificação de fungos em sementes

O fenômeno do *biospeckle laser* permite a determinação do nível de atividade biológica. A presença de fungos na semente muda o nível de atividade no seu interior e exterior, permitindo a sua identificação por meio do *biospeckle laser* e metodologia para análise.

Foi possível realizar a separação de sementes sem fungo de sementes com fungo, exceto para uma espécie de fungo. Também foi possível evidenciar que a técnica permite separar os três fungos iluminados com médias de atividade biológica distintas. Assim, é possível realizar o desenvolvimento de técnicas que melhor determinem o grau de viabilidade de sementes e que dizem respeito à identificação de fungos.

Para se conseguir utilizar a técnica é necessário um *laser* estável, que ilumine a semente segundo um padrão de ângulos e intensidade, um sistema de aquisição de imagens da semente iluminada e um sistema de processamento dessas imagens, envolvendo toda uma metodologia de tratamento e filtragem estatística desenvolvida para este fim.

O domínio da técnica pode ser considerado como uma das grandes conquistas deste projeto, permitindo que o Laboratório de Laser e Óptica da UFLA possa realizar pesquisas avançadas na área de metrologia *laser* sem dependência de outras instituições.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] **RABELO, G.F.** *Avaliação da Aplicação do “Speckle” Dinâmico no Monitoramento da Qualidade da laranja.* 2000. 149p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.
- [2] **BRAGA JR, R.A.** *“Bio-speckle” : Desenvolvimento de uma Tecnologia Aplicada a Análise de Sementes.* 2000. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.
- [3] **MARCOS FILHO, J.** *Testes de Vigor: Importância e Utilização.* In: KRZYZANOWSKI.F.C., VIEIRA,R.D., FRANÇA NETO,J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes ABRATES, 1999.**
- [4] **NEURHOR, R. et al.** **Photon Emission – A new method for scanning the quality of food.** Deutsche Lebensmittel – Rundschau, 78-82, mar 1991.
- [5] **ARIZAGA,R.;TRIVI, M; RABAL. H.;** *Analisis de diagramas de speckle dinâmicos utilizando la matriz de coocurrencia.* III RIAO – Encuentro Ibero-Americano de Optica, Cartagena das Indias, 1998.
- [6] **RABAL, H.J. et al.** *Laser na Agricultura.* In: Energia, Automação e Instrumentação, XXVII CONBEA, Poços de Caldas, 1998.
- [7] **ARIZAGA, R.; CAP, N.; RABAL, H.; TRIVI, M..** *Activity image in Dynamical speckle 3rd.* Iberoamerican Optics Meeting, A.GUZMAN Ed. Proceeding SPIE 3572, 310-314, (1999).
- [8] **XU, Z.; C. JOENATHAN; B.M., KHORANA.** *“Temporal and Spatial Properties of the Time Varing Speckles of Botanical Specimens”.* **Optical Engineering, vol 34, no. 5 / 1487, may 1995.**
- [9] **MURAMATSU, M., MIZUKAMI, A, RIBEIRO, J.A.** *Medida da Atividade Biológica Superficial Usando Correlação de Laser-Speckle em Tempo Real,* XIX ENFMC, 1996.
- [10] **HECHT, E.** *Optics.* 2ed. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Co., 1987.

- [11] FUJII, H. et al. *Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing*. **Applied Optics**, v.26, n.24, p.5321-5325.
- [12] AIZU, Y.; ASAKURA, T. *Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow*. **Optics & Laser Technology**, v.23, n.4, 1991.
- [13] OULAMARA, A., TRIBILLON G., DUVERNOY, J. *Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle*. **Journal of Modern Optics**, v.36, n.2, 165-179, 1989.
- [14] YOUNG, MATT. *Fibras e Guia de Ondas Ópticas*. **ÓPTICA E LASERS**. 4. ed., Edusp, p. 237, 1998.
- [15] IMAGENATION CORPORATION. *PXC200: Color Frame Grabber*. 2. ed. Beaverton: Imagenation Corporation, 1997. 176 p. (User's Guide).
- [16] SANTOS, E. F.; BRAGA JR, R. A.; CARVALHO, M. L. M.; TRIVI, M. R. *Efeito Laser em Diferentes Sementes*. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA**, 2002, Lavras/MG.