



PAULIANI GONÇALVES VIVAS

**USO DO *BIOSPECKLE* COMO FERRAMENTA
DE DIAGNÓSTICO PRECOCE NA AVALIAÇÃO
DA QUALIDADE DE SEMENTES DE CAFÉ**

LAVRAS - MG

2015

PAULIANI GONÇALVES VIVAS

**USO DO *BIOSPECKLE* COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO
PRECOCE NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES DE
CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Instrumentação, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Roberto Alves Braga Júnior

Coorientador

Dr. Renato Mendes Guimarães

LAVRAS – MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Vivas, Pauliani Gonçalves.

Uso do *biospeckle* como ferramenta de diagnóstico precoce na
avaliação da qualidade de sementes de café / Pauliani Gonçalves

Vivas. – Lavras : UFLA, 2015.

60 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Roberto Alves Braga Júnior.

Bibliografia.

1. *Biospeckle*. 2. Semente de café. 3. Viabilidade. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

PAULIANI GONÇALVES VIVAS

**USO DO *BIOSPECKLE* COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO
PRECOCE NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE SEMENTES DE
CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Instrumentação, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 21 de agosto de 2015.

Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho	UFLA
Dra. Leidiane Aparecida Ferreira Queiroz	Ministério da Agricultura
Dra. Ellen Waleska Nascimento da Fonseca Contado	UFLA

Dr. Roberto Alves Braga Júnior
Orientador

LAVRAS – MG

2015

*Ao Túlio, pelo incentivo, companheirismo e por sempre
acreditar que eu seria capaz! Amo você!*

*Ao meu amado Davi, que com sua ternura e amor
sempre compreendeu minhas ausências.*

*E ao Pedro, que ainda no meu ventre me
enche de amor e força para conquistar esta
vitória.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por reacender em mim a vontade de realizar este sonho adormecido. Não tenho dúvidas da Tua participação nesta obra!

Ao professor Roberto Braga, exemplo de orientação, pela paciência e disponibilidade, todo o meu agradecimento e admiração. Seus ensinamentos foram muito além de conhecimentos acadêmicos. Você é, sem dúvida, um ser humano formidável!

Ao professor Renato, que me presenteou com a ideia deste projeto, pela coorientação e disponibilidade.

À querida Laís, que com sua dedicação e compromisso se mostrou uma excelente companheira. Obrigada, sem a sua participação este trabalho não seria concluído.

Ao Petter, pela colaboração e disponibilidade em dividir seus conhecimentos.

À querida amiga Ellen, pela paciência, auxílio e por sempre ter uma palavra incentivadora nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do CEDIA, Diego, Bianca, Renan, David, Dimitri e Roberto, pelos momentos compartilhados e pela inestimável ajuda.

Ao Sr. Antônio e à Dona Josélia, pelo carinho e dedicação com o qual sempre me trataram.

Ao professor Giovani, por se mostrar sempre à disposição, e pela tão agradável convivência.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, e por sempre acreditarem que eu seria capaz, muito obrigada!

Aos meus queridos irmãos, Paulinelli e Renato, pela amizade, presença e participação constantes em minha vida. Amo vocês!

Ao meu querido irmão e colega de profissão, Marcelo, pelos palpites, auxílio, e participação durante esta fase. Foi muito bom partilhar com você esta conquista. Te amo!!!

À Maria Lúcia e ao Nelson, muito mais do que sogra e sogro, pelas tantas vezes que me ajudaram com o Davi, para que fosse possível a conclusão deste trabalho, a minha eterna gratidão!

*“Se pude enxergar mais longe, foi por me
erguer sobre os ombros de gigantes.” (Isaac Newton)
(1642- 1727)*

RESUMO

Um grande problema na produção de sementes de café é que sua germinação ocorre de forma lenta e desuniforme, o que dificulta a avaliação da qualidade de lotes em tempo hábil, para formação de mudas por meio de métodos tradicionais como o da germinação. Testes que possam reduzir o tempo de avaliação do potencial fisiológico das sementes de café, poderiam permitir a tomada de decisões antecipadas durante as operações de colheita, recepção, beneficiamento, comercialização e formação de mudas, diminuindo riscos e prejuízos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a potencialidade do biospeckle, técnica baseada no fenômeno óptico de interferência, como ferramenta para avaliação de viabilidade de sementes de café, comparando os resultados com o teste de germinação e teste de tetrazólio. Para comparação dos resultados do biospeckle com o teste de germinação, foram utilizados 5 lotes com diferentes qualidades fisiológicas de sementes de café *Coffea arabica* cultivar Mundo Novo. Foram realizadas 3 repetições com 50 sementes de cada lote. As sementes embebidas foram colocadas no germinador a 30° C. Ao 6° dia de embebição foi realizada a iluminação e leitura do biospeckle. Em seguida, estas sementes voltaram ao germinador para conclusão do teste de germinação, ao final do 30° dia. Já para comparação com o teste tetrazólio foram utilizados 3 lotes de sementes com 4 repetições de 25 sementes de cada lote. Ao comparar os resultados do biospeckle com os do teste de germinação, bem como com os do teste de tetrazólio, a atividade registrada pelo biospeckle laser se mostrou um bom parâmetro para detecção não invasiva e antecipada da qualidade de sementes de café.

Palavras-chave: Biospeckle. Atividade. Semente de café.

ABSTRACT

The slow and uneven germination of coffee beans is a major issue in its production, making it difficult to assess quality in time for seed production by means of traditional methods, such as germination. Tests that could reduce the time expended in evaluating the physiological potential of coffee seeds would allow early decision-making during harvesting operations, reception, processing, marketing and seedling production, reducing risks and losses. Thus, the aim of this study was to evaluate the potential of the biospeckle technique, based on the optical phenomenon of interference, as a tool for evaluating coffee seed viability, comparing the results obtained with the germination and tetrazolium tests. To compare the biospeckle results with the germination test, we used five lots with different physiological qualities of *Coffea arabica* cultivar Mundo Novo coffee seeds. The experiment was conducted in three replicates, with 50 seeds per lot. The soaked seeds were placed in germination chamber at 30°C. At the 6th day of soaking, we conducted lighting and biospeckle readings. The seeds were placed back into the germinator to complete the germination test until the 30th day. To compare the results with the tetrazolium assay, we used three seed lots with 4 replicates of 25 seeds per lot. When comparing the results of the biospeckle with the germination and tetrazolium tests, the activity recorded by the biospeckle laser proved to be a good parameter for non-invasive detection of coffee seed quality.

Keywords: Biospeckle. Activity. Coffee seed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	História temporal e matriz de coocorrência. (A) Material com alta atividade e (B) material com baixa atividade	30
Figura 2	Disposição dos equipamentos experimentais durante a captura das imagens e iluminação pelo laser	38
Figura 3	Imagem DG e histograma da região do embrião.....	40
Figura 4	Imagem DG e histograma da região do endosperma.....	40
Figura 5	(a) Imagem DG da semente iluminada com a luz laser de maior intensidade. (b) Imagem DG da mesma semente A, iluminada com a luz laser menos intensa.....	44
Figura 6	(a) Imagem DG da semente posicionada com o embrião voltado para o laser. (b) Imagem DG da semente A girada de 90o no sentido horário. (c) Imagem DG da semente A girada de 180o no sentido horário	45
Figura 7	Mapas DG's para sementes que foram iluminadas com 3, 4, 5 e 6 dias de embebição, totalizando 40 sementes iluminadas	46
Figura 8	Mapas de atividades DG de sementes classificadas como viáveis, ou seja, com registro de atividade diferenciável no embrião e valor de R superior a 1,19.....	47
Figura 9	Mapas de atividades DG de sementes classificadas como viáveis, ou seja, com registro de atividade diferenciável no embrião e valor de R superior a 1,19.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das imagens do <i>biospeckle</i> laser de acordo com os valores da razão (R) entre a intensidade média dos pixels na região do embrião e do endosperma da imagem DG.....	46
Tabela 2	Resultados da classificação de acordo com os critérios do <i>biospeckle</i> laser e do teste de germinação de 744 sementes dos 5 diferentes lotes utilizados	49
Tabela 3	Comparação do resultado de sementes classificadas como viáveis de acordo com o <i>biospeckle</i> laser com o resultado de sementes classificadas como normais para o teste de germinação para todas as 744 sementes dos 5 diferentes lotes avaliados	49
Tabela 4	Comparação entre a porcentagem de sementes viáveis de acordo com o <i>biospeckle</i> e a porcentagem de sementes normais de acordo com o teste de germinação para cada lote de sementes analisado	50
Tabela 5	Valores das médias para o <i>biospeckle</i> laser e teste de germinação de acordo com o teste F	51
Tabela 6	Comparação entre a porcentagem de sementes viáveis de acordo com o <i>biospeckle</i> e a porcentagem de embriões viáveis de acordo com o teste de tetrazólio para cada lote de sementes analisado	52
Tabela 7	Valores das médias para o <i>biospeckle</i> laser e teste de tetrazólio de acordo com o teste F	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Sementes de Café	16
2.1.1	Germinação e viabilidade de sementes de café	17
2.2	Análise de imagem	21
2.2.1	Análise de imagens de sementes	21
2.3	<i>Speckle</i> laser - contexto histórico	23
2.3.1	<i>Speckle</i> Laser Dinâmico	25
2.3.2	Técnicas gráficas de análise do <i>biospeckle</i> laser	26
2.3.2.1	Métodos de Fujii e Diferenças Generalizadas	26
2.3.3	Análises numéricas do <i>biospeckle</i> laser	28
2.3.3.1	História temporal do padrão de <i>speckle</i>	28
2.3.3.2	Matriz de coocorrência	28
2.3.3.3	Diferença dos valores absolutos	31
2.4	Aplicações do <i>biospeckle</i> laser	31
2.4.1	Aplicação do <i>biospeckle</i> na avaliação de sementes	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	Geral	35
3.2	Específicos	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Configuração experimental e teste de protocolo	36
4.1.1	Preparação das sementes	36
4.2	Experimentos para comparação do <i>biospeckle</i> laser com o teste de germinação e tetrazólio	38
4.2.1	Teste de germinação e <i>biospeckle</i>	38
4.2.2	Teste de tetrazólio e <i>biospeckle</i>	41
4.2.3	Procedimentos estatísticos	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Configuração experimental e desenvolvimento de protocolo	43
5.1.1	Experimentos para ajuste da configuração experimental	43
5.1.2	Experimentos para definição do momento da iluminação	45
5.2	<i>Biospeckle</i> laser e teste de germinação	46
5.3	<i>Biospeckle</i> laser e teste de tetrazólio	51
6	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, tem-se acompanhado uma crescente busca por métodos de análise de imagem computacional em várias áreas do conhecimento científico. Em se tratando de análise de sementes, este cenário não é diferente. Dentre outros, alguns métodos utilizam técnicas de medição de ressonância magnética nuclear, raios X e análise de resposta ao *biospeckle* laser para avaliar a viabilidade de sementes. O estudo do fenômeno *speckle* laser dinâmico, o qual se caracteriza por ser um fenômeno de interferência óptica, que ocorre quando um material é iluminado por uma luz coerente que se dispersa sobre uma superfície com rugosidade igual ou superior ao seu comprimento de onda, revela sua viabilidade de monitoramento em diversas áreas do conhecimento. Quando o laser atinge superfícies dinâmicas, observa-se uma contínua formação de novos e diferentes padrões de interferência óptica, e a esse padrão aleatório e dinâmico de interferência denomina-se *speckle* laser dinâmico ou *biospeckle* laser, se a superfície em questão for de origem biológica. Estudos realizados com materiais biológicos, incluindo algumas espécies de sementes, apresentam metodologias bem definidas para quantificação e medição do fenômeno a nível laboratorial. As principais características dos testes propostos com base neste fenômeno estão associadas ao fato de envolverem metodologias de análises rápidas, não destrutivas, e passíveis de automação.

A atividade biológica expressa no contexto do *speckle* laser dinâmico, pode ser entendida como a combinação de movimentos moleculares e estruturais ocorridos no material em análise, variações do índice de refração na área iluminada, movimento browniano nos líquidos presentes nas amostras, efeito Doppler observado nas câmeras, dentre outros.

A observação direta dos padrões de interferência óptica não permite sua quantificação e, por ser um fenômeno dinâmico, o *biospeckle* laser deve ser

analisado com técnicas de processamento de imagem e tratamento estatístico, oferecendo saídas gráficas ou numéricas.

Os métodos gráficos são processamentos das imagens digitais do *speckle*, que geram mapas indicando a variabilidade espacial da atividade biológica, enquanto que as interpretações numéricas conferem valores para a atividade biológica.

Os estudos para aplicação do *biospeckle* em sementes estão relacionados com a avaliação do teor de água, diferenciação dos níveis de atividade metabólica do tecido vegetal e detecção de patógenos. Tais estudos, analisados em conjunto, trazem informações de interação do fenômeno, contribuindo para o domínio da técnica do *biospeckle* como meio de análise da qualidade de sementes. Nesse contexto, vários autores aplicaram o *biospeckle* para estudar diferentes espécies de sementes.

Em sementes de café, um problema importante na sua produção ainda é a propagação de plantas, isso, porque ela é feita por mudas originadas a partir de sementes. O grande empecilho desse método é que as sementes de café têm germinação lenta e desuniforme, além de baixo potencial de armazenamento, o que dificulta a obtenção de mudas com desejável padrão de qualidade no momento do plantio, além de dificultar a avaliação da viabilidade e do vigor das sementes, em virtude do excessivo período gasto para obtenção dos resultados por meio de testes, como o da germinação.

O tempo utilizado para o teste em sementes de café requer 30 dias, o que é considerado longo, pois quando os resultados são informados já houve variação significativa na qualidade das sementes. A redução do tempo do teste traria inúmeras vantagens do ponto de vista tecnológico, operacional e científico, diminuindo a necessidade de pessoas, equipamentos, instalações e infraestrutura de laboratórios.

Diante do exposto, e considerando a potencialidade do *biospeckle* na avaliação de atividade em materiais biológicos, em particular de sementes, este trabalho propõe avaliar a aplicação deste fenômeno como ferramenta de avaliação de viabilidade de sementes de café, comparando os resultados com os do teste de germinação e tetrazólio, em particular, buscando reduzir o tempo de análise.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sementes de Café

As sementes são estruturas biológicas que “guardam” em seu interior milhares de anos de seleção sob condições adversas. As sementes geralmente são constituídas por tecido de reserva endospermático ou cotiledonar e eixo embrionário, ambos protegidos por uma cobertura que tem o importante papel de regulador da germinação (KIGEL; GALILI, 1995).

A semente de café é constituída por embrião, endosperma e um envoltório representado por uma película prateada ou espermoderma. Tem formato plano convexo, elíptica ou oval, sulcada longitudinalmente na face plana. O endosperma é composto por células poliédricas de paredes muito espessas, onde as hemiceluloses apresentam uma função de reserva (DEDECA, 1957; RENA; MAESTRI, 1985). Segundo Shimizu e Mazafera (1999), o endosperma é o tecido de reserva da semente de café e representa 95% da massa seca da semente, contendo cerca de 10 a 14% de proteínas e 0,5 a 2% de aminoácidos. Segundo Pimenta (2003), o café arábica contém teores entre 55 a 65,5% de carboidratos; 8 a 11% de ácidos, sendo encontrados os ácidos cítrico, málico, clorogênico, acético, butírico e valérico; 1 a 3% de lignina; 15 a 18% de lipídeos; 11 a 15% de compostos nitrogenados; 8,5 a 12% de proteína; 0,8 a 1,4% de cafeína; 3 a 5,4% de minerais. Essa composição é influenciada por diversos fatores, tais como a genética da planta, o clima, a região, os métodos de colheita e o armazenamento das sementes (GODINHO et al., 2000; PIMENTA; COSTA; CHAGAS, 2000).

A parte lipídica do café é, em sua maioria, composta de triacilgliceróis, esteróis e tocoferóis, componentes encontrados em todo óleo vegetal comestível

comum. O chamado óleo de café contém diterpenos da família dos kaurenos, em até 20 % dos lipídeos totais (SPEER; KOLLING-SPEER, 2006).

A maioria dos açúcares presentes nas sementes de café arábica são os açúcares não-redutores, em especial a sacarose, sendo os açúcares redutores encontrados em pequenas quantidades (CARVALHO; CHALFOUN; CHAGAS, 1989). Em relação aos açúcares livres predominantes estão a glicose, frutose e sacarose, com maior quantidade de sacarose (ROGERS et al., 1999).

As reservas de polissacarídeos podem estar presentes nas paredes das células dos cotilédones e dos endospermas, denominadas paredes de reserva (BUCKERIDGE; PANEGASSI; DIETRICH, 2000). Assim como em outras espécies, a fração de hemicelulose das paredes celulares do endosperma são constituídas principalmente de mananas e de galactomananas, que são polissacarídeos depositados como fonte de reserva das sementes.

Segundo Buckeridge, Panegassi e Dietrich (2000), os polissacarídeos de reserva presentes em paredes celulares são classificados em três grupos distintos: os mananos, os xiloglucanos e os galactanos, sendo os mananos subdivididos em mananos puros, glucomananos e galactomananos. As substâncias de reserva presentes no tecido servem como fontes nutritivas, utilizadas para o desenvolvimento da plântula, sendo degradado durante a germinação (BEWLEY; BLACK, 1994).

2.1.1 Germinação e viabilidade de sementes de café

A germinação de sementes em um teste de laboratório, é a emergência ou desenvolvimento da plântula até um estágio em que os aspectos de suas estruturas essenciais indiquem a maior ou menor possibilidade de se transformarem em uma planta produtiva sob condições favoráveis no solo (INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING - ISTA, 2007).

Sementes de café germinam de forma lenta e desuniforme, e vários fatores podem estar relacionados a esse comportamento. Dentre eles, podem ser citados a desuniformidade de maturação dos frutos, os mecanismos que regem processos de maturação e os processos de pós-colheita, como secagem e armazenamento (BEWLEY; BLACK, 1994), a presença do endocarpo ou “pergaminho” (GUIMARÃES, 1995), a presença do espermoderma, também conhecido como “película prateada” devido a presença de inibidores naturais como a cafeína (PEREIRA et al., 2002).

Na realização do teste de germinação, o período entre a semeadura e a formação de plântulas normais demanda cerca de 30 dias, sob condições ideais no laboratório, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Este tempo é considerado longo, atrasando a comercialização das sementes, e posteriormente, o processo de semeadura e de formação de mudas.

Alguns estudos têm buscado alternativas para antecipar a obtenção de sementes e, conseqüentemente, que acelerem o processo de formação de mudas ou mesmo da realização de testes para avaliação do potencial fisiológico dos lotes. Uma alternativa estudada foi a da antecipação da colheita de sementes em estádios iniciais de maturação (CARVALHO; ALVARENGA, 1979; VEIGA, 2005), porém, sem sucesso, comprovando que as sementes apresentam melhor qualidade fisiológica quando oriundas de frutos no estágio cereja, inviabilizando a colheita antecipada dos frutos.

A remoção do endocarpo, também conhecido como pergaminho, é uma alternativa apresentada para acelerar o processo de análise de sementes de café, visto que a presença desta estrutura é um dos principais fatores que atrasa a germinação, constituindo numa barreira física, a entrada de oxigênio e água no interior da semente, e secundariamente dificultando a expansão do volume.

Assim, a remoção do pergaminho é de fundamental importância para acelerar a germinação das sementes de café (GUIMARÃES, 1995). Além da

barreira à entrada de água e gases, o pergaminho também dificulta o crescimento do embrião, através de mecanismo inerente à sua rigidez (VÁLIO, 1976).

O pergaminho da semente de café é um componente fibroso que representa de 28,7 a 38,8% da casca (TEIXEIRA, 1999) e é composto basicamente por 37% de celulose, 25 % de hemicelulose e de 9,3 a 13,5% de lignina em base seca (BARCELOS et al., 2002; RIBEIRO FILHO, 1998), e tais componentes conferem ao pergaminho textura rígida e impermeabilidade ao tecido.

Araújo et al. (2004) relatam que a remoção do pergaminho deve ser realizada de forma criteriosa, para não causar danos ao embrião que está localizado em uma camada superficial do endosperma da semente, sendo a mais indicada, a remoção manual do pergaminho.

Além do teste de germinação, o teste de tetrazólio vem se consagrando como um método eficaz para verificação da viabilidade dos lotes, como opção de testes rápidos e seguros para avaliação da qualidade de sementes de café. A viabilidade é definida como a estimativa do potencial de germinação e o teste de tetrazólio pode ser utilizado para determinar a viabilidade das sementes, principalmente, quando estas apresentam germinação lenta (ISTA, 2007).

O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases, que reduzem o sal 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio nos tecidos vivos da semente, pela reação de íons de hidrogênio que são transferidos para o referido sal (DELOUCHE et al., 1976). A redução do sal ocorre apenas nas células vivas, resultando na formação do trifenilformazam, composto vermelho e indifusível, que confere cor vermelha ao tecido vivo.

Para a utilização do teste de tetrazólio na avaliação de viabilidade de sementes é necessário o treinamento do analista, além de metodologia específica para cada espécie (MARCOS FILHO; CICERO; SILVA, 1987). A maior dificuldade na aplicação do teste de tetrazólio, em sementes de café, consiste na

metodologia a ser adotada para a sua condução, uma vez que o embrião que precisa entrar em contato direto com a solução, encontra-se envolvido por tecidos do endosperma.

A metodologia do teste de tetrazólio é descrita nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 1992), como alternativa para a verificação do potencial de germinação de lotes de sementes de café. Pelas RAS, deve-se retirar o pergaminho manualmente, embeber as sementes em água por 18 horas, em seguida fazer um corte longitudinal, iniciado pela concavidade, e remover o pericarpo na região onde se encontra o embrião, deixando-o mais exposto; ou cortar a semente na sua extremidade distal em torno de $\frac{1}{4}$ do seu tamanho. Estas porções devem ser embebidas em solução de tetrazólio a 1% por 24 a 28 horas a 30°C. Após a coloração, o embrião deve ser separado do endosperma para posterior avaliação.

De acordo com Clemente (2009), o uso do hipoclorito de sódio na concentração de 5% por 6 horas de embebição, não é eficiente para a retirada do pergaminho, e afeta negativamente os resultados do teste de tetrazólio em semente de café com umidade abaixo de 25%. Já o período de embebição de sementes de café por 48 horas na fase de preparo para a realização do teste de tetrazólio, facilita a extração dos embriões, não afetando os resultados do teste.

Assim, Clemente (2009) recomenda que o teste de tetrazólio em sementes de café com diferentes níveis de umidade e deterioração, deva ser realizado com a retirada manual do pergaminho.

2.2 Análise de imagem

A ciência da computação e a eletrônica tornaram possível a substituição da avaliação visual humana por meios automatizados, e com isso, tem provocado uma abundância de pesquisas nessa área. Ao longo destes anos houve um aumento expressivo e um aperfeiçoamento com relação às pesquisas em análise visual e de imagem (VENORA et al., 2009).

2.2.1 Análise de imagens de sementes

A identificação de sementes por meio da análise visual é um processo moroso e oferece resultados subjetivos, tornando mais difícil a análise de sementes, tanto para fins comerciais, como tecnológicos. Métodos automatizados podem ser embasados em imagens de sementes, por meio dos quais a categorização das características agregadas ao tamanho da semente, cor, forma e textura, são adquiridos de maneira fácil. Dessa forma, o campo de visão da máquina, juntamente com técnicas de classificação, fornece um panorama adequado para a identificação automática de sementes (GRANITTO; VERDES; CECCATO, 2005).

A análise de imagens é um método rápido, objetivo, pouco oneroso, e compacto, e hoje está se espalhando em variados meios da indústria. Também é considerado um método não destrutivo, e suas aplicações em diversos campos da indústria de alimentos e na agricultura têm sido relatadas. Técnicas de análise de imagens podem facilitar o trabalho de identificação de cultivares, determinação de sementes de diferentes cores, danos mecânicos e de classificação de diferentes tamanhos de sementes.

Vários autores estudaram a análise de imagens por meio da técnica de raios x para avaliar a qualidade em sementes de soja, dentre esses, Pinto et al.

(2012) avaliaram danos mecânicos em sementes de soja por meio de raio x, e observaram que a análise de imagens foi muito útil, permitindo assim, a análise detalhada dos efeitos da pressão de impacto e do teor de água nas sementes. Carvalho, Alves e Oliveira (2010) também utilizaram a técnica de raio x para avaliar a qualidade de sementes de mamona, e observaram que essa análise não destrutiva possibilita prever o desempenho de plântulas e selecionar sementes de alta qualidade. Forti, Cícero e Pinto (2010) avaliaram danos por umidade pelo uso do raio x em sementes de soja e concluíram que por meio da análise de imagens foi possível avaliar a evolução dos danos por umidade durante o armazenamento. Venora et al. (2007) também concluíram que o uso da análise de imagens é um método rápido, gastando menos de um minuto para digitalização e medição. É também uma técnica muito fácil de reproduzir, confiável e não destrutiva.

Ainda nesse contexto, existe o equipamento SAS® – Sistema de Análise de Sementes, que foi desenvolvido pela empresa Tbit, em 2011, e tem como objetivo fazer a captura de imagens de sementes e processá-las por meio de imagens, histogramas, gráficos, dentre outros, que facilitam a análise de imagens das sementes e plântulas.

Andrade (2014) verificou que é possível a utilização do equipamento SAS® para diferenciação de grupos de cultivares de soja, principalmente quando se avalia a cor do hilo.

Com a crescente demanda por produtos de alta qualidade, padrão e segurança, vem ocorrendo o avanço de técnicas que atendam a esses requisitos, como exemplo, a visão computacional, que pode ser empregada em diversos ramos na indústria alimentar, devido a sua capacidade de fiscalização e classificação de frutas e legumes. A análise computacional foi bem aceita para análise de carne e peixe, pizza, queijo e pão, bem como para a qualidade de grãos e suas características (BROSNAN; SUN, 2004).

A análise de imagens também vem sendo aplicada em campos como o de produtos agrícolas. Características morfológicas, ópticas e texturais, de diversificados tipos de cereais e leguminosas, como em lentilhas, estão sendo estudadas (VENORA et al., 2007).

Nesse contexto, o *biospeckle* laser, técnica ótica de análise de imagem, vem sendo aplicada para identificar a presença de parasitos expostas a diferentes tipos de drogas (POMARICO et al., 2004); detectar fungos em sementes de feijão (BRAGA JUNIOR et al., 2005); analisar a qualidade de laranjas (RABELO et al., 2005); para medir alongamentos minuciosos de raízes de pinho (RATHNAYAKE et al., 2008), ou mesmo a atividade biológica de raízes em cultura de tecidos (BRAGA et al., 2009); na avaliação dos parâmetros de motilidade de sêmen congelado bovino (CARVALHO et al., 2009) e em vários outros trabalhos.

2.3 *Speckle* laser - contexto histórico

Quando um feixe de luz é espalhado ou transmitido por uma superfície com rugosidades da ordem do comprimento de onda da fonte, ocorre a formação de uma estrutura granular no espaço livre, o qual é dado o nome de *speckle*. Trata-se de um fenômeno de interferência tipicamente ondulatorio, observado não apenas no visível, mas também em outras partes do espectro eletromagnético e na acústica. Objetos iluminados com laser geralmente apresentam-se cobertos pela estrutura granular do *speckle*. Essa característica é devido ao fato de, na escala microscópica, grande parte das superfícies serem rugosas em relação ao comprimento de onda do laser.

O interesse no granulado óptico não é recente. Newton, no célebre tratado *Opticks*, já o descreveu de forma qualitativa (NEWTON, 1991), e outros grandes pesquisadores depois dele, relataram sua observação. Os primeiros

estudos sistemáticos dos quais se têm notícias são atribuídos a Exner (1877) que descreveu a estrutura fibrosa vista quando a luz de uma lâmpada de mercúrio atravessava uma placa de vidro, onde condensara vapor de sua respiração. Mais tarde, por volta dos anos 1900, De Haas atribuiu a estrutura fibrosa, a não monocromaticidade da radiação incidente. O formalismo matemático, dentro de um corpo teórico mais consistente, foi introduzido por Von Laue e lord Rayleigh, na primeira década do século XX, quando mostraram que a densidade de probabilidade da distribuição espacial do granulado obedece a uma função exponencial negativa. Ainda no século XX, outros trabalhos sobre o tema foram realizados por Raman, Buchwald e Ramachandran.

A invenção do laser em 1960, e as inúmeras aplicações daí decorrentes, deram novo impulso às pesquisas no campo, pois, se por um lado, a coerência permitia o registro e a reconstrução das frentes de onda nos processos holográficos, por outro, provocava de maneira inevitável o surgimento do speckle. A primeira vista, o granulado foi interpretado como mero ruído óptico indesejável, todavia, pesquisas dirigidas no sentido de minimizá-lo, logo demonstraram que ele era portador de informações sobre a superfície. Nas palavras do próprio Gabor, durante a cerimônia de entrega do prêmio Nobel (GABOR, 1971): “It is not really noise; it is information which we do not want, information on the microscopic unevenness of the paper in which we are not interested. What can we do against it?”.

Em fins da década de 1960, já era apresentada por Groh, a primeira aplicação dos padrões *speckle* à metrologia, e desde então, surgiram inúmeras outras envolvendo, principalmente, medidas de micro deslocamento (BURCH; TOKARSKI, 1968), determinação da coerência de fontes, e rugosidade superficial. A descrição formal do granulado óptico só pode ser realizada no contexto da teoria estatística e, paralelamente ao desenvolvimento das aplicações citadas, foram realizados estudos com objetivo de fornecer as bases teóricas

necessárias. Dentre esses trabalhos destacam-se os de Daint (1984) e Goodman (1984), responsáveis por desenvolvimentos nas estatísticas espaço-temporais de primeira e segunda ordem do granulado óptico.

2.3.1 *Speckle* Laser Dinâmico

O *speckle* laser é um fenômeno de interferência óptica que ocorre quando um material é iluminado por uma luz coerente, que se dispersa sobre uma superfície qualquer (RABAL; BRAGA, 2008). Quando aplicado a superfícies dinâmicas, observa-se uma contínua formação de novos e diferentes padrões de interferência óptica, e esse padrão aleatório e dinâmico de interferência denomina-se *speckle* laser dinâmico ou *biospeckle* laser, se a superfície em questão for de origem biológica (RABAL; BRAGA, 2008; ZDUNEK et al., 2013).

A análise desses padrões de interferência no tempo vem sendo validada como instrumento de quantificação e monitoramento da atividade biológica na agropecuária e trabalhos, como os apresentados por Carvalho et al. (2009), na avaliação dos parâmetros de motilidade de sêmem congelado bovino; por Kurenda et al. (2012), na análise do efeito de diferentes níveis de temperatura na atividade biológica de maçãs, e por Zdunek e Herppich (2012), no estudo da relação entre pigmentos de clorofila presentes em maçãs e sua respectiva atividade biológica, são alguns exemplos recentes de aplicação do *biospeckle* laser.

A atividade biológica expressa no contexto do *speckle* laser dinâmico pode ser entendida como a combinação de movimentos moleculares e estruturais ocorridos no material em análise, variações do índice de refração na área iluminada, movimento browniano nos líquidos presentes nas amostras e efeito Doppler observado nas câmeras, dentre outros (ZDUNEK et al., 2013).

A observação direta dos padrões de interferência óptica não permite sua quantificação e, por ser um fenômeno dinâmico, o *biospeckle* laser deve ser analisado com técnicas de processamento de imagem e tratamento estatístico (RABAL; BRAGA, 2008), o que pode ser realizado por meio de técnicas gráficas ou numéricas.

Os métodos gráficos são processamentos das imagens digitais *speckle* que geram mapas indicando a variabilidade espacial da atividade biológica, à medida que as interpretações numéricas conferem valores para a atividade biológica.

2.3.2 Técnicas gráficas de análise do *biospeckle* laser

Há disponíveis na literatura, diversos métodos gráficos para a análise dos dados do *biospeckle* laser, e as técnicas de Fujii e de Diferenças Generalizadas (DG) vêm sendo as mais utilizadas nos trabalhos científicos atuais, merecendo destaque.

2.3.2.1 Métodos de Fujii e Diferenças Generalizadas

O método de Fujii (FUJII et al., 1987) baseia-se no cálculo da visibilidade entre os pixels de imagens gravadas ao longo do tempo. Matematicamente, o procedimento para a construção do mapa de Fujii é descrito por:

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

Onde N corresponde ao total de imagens gravadas e $I_k(x, y)$, ao valor de intensidade na posição (x, y) na imagem k .

O resultado do método é uma nova imagem em que os pixels de regiões onde não houve alterações de intensidade ao longo do tempo, assumem valor nulo ou próximo de zero no mapa final, enquanto zonas em que os pixels sofreram grandes alterações assumem valores mais altos ou claros. Dessa maneira, a imagem resultante apresenta pontos claros nas zonas de grande atividade e pontos escuros naquelas de baixa atividade. A amplificação dos movimentos em áreas mais escuras é uma característica do método de Fujii, resultando em imagens mais claras de forma geral, quando comparadas com as do método de Diferenças Generalizadas (DG) (BRAGA et al., 2009).

O método das Diferenças Generalizadas (DG) (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999) é uma versão mais simplificada do método de Fujii. Nessa técnica, um mapa de atividade é construído a partir das diferenças entre os pixels das imagens gravadas durante o monitoramento. A equação que descreve o método DG é dada por:

$$I(x, y) = \sum_k \sum_l |I_{k+l}(x, y) - I_k(x, y)| \quad (2)$$

Da mesma maneira descrita na metodologia anterior, com as Diferenças Generalizadas, as zonas de menor atividade aparecem mais escuras em relação àquelas em que as variações de intensidade foram maiores ao longo do tempo. No entanto, uma distinção significativa entre esse método e o de Fujii reside na sua maior sensibilidade a flutuações na intensidade da fonte. Por exemplo, se entre uma imagem e outra, o laser se tornar mais intenso, uma região inativa será exibida com um tom mais claro no mapa final. No método de Fujii, devido ao denominador da expressão (1), essas eventuais flutuações são compensadas.

2.3.3 Análises numéricas do *biospeckle* laser

As análises numéricas vieram para suprir as interpretações subjetivas dos métodos gráficos. A medição dos níveis de atividade abre espaço para a utilização do *speckle* laser dinâmico como ferramenta de metrologia, e complementa as informações visuais advindas das técnicas gráficas, melhorando a qualidade das análises.

2.3.3.1 História temporal do padrão de *speckle*

A história temporal do padrão de *speckle* (*time history speckle pattern*, THSP) foi proposta por Oulomara, Tribillon e Duvernoy (1989) e avaliada por Xu, Joenathan e Khorana (1995), e consiste de uma imagem que oferece informações sobre a evolução temporal dos padrões de *speckle*.

A técnica consiste em coletar uma mesma linha na imagem *speckle* em instantes sucessivos e organizá-los, lado a lado, em uma imagem bidimensional intermediária. As imagens THSP são matrizes $m \times n$ com pixels em níveis de cinza, em que o eixo das abscissas apresenta informações sobre a evolução temporal dos pixels selecionados e, no eixo das ordenadas, há o registro da distribuição espacial dos padrões de interferência.

2.3.3.2 Matriz de coocorrência

A matriz de coocorrência (MCO) na análise numérica do *biospeckle* laser é utilizada como passo intermediário no cálculo dos valores finais e que expressa o número de transições de cada pixel da imagem THSP com respeito ao seu vizinho imediato (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999).

A MCO é uma técnica muito utilizada em processamento de imagens para caracterizar a textura de imagens digitais (PARTIO; CRAMARIUC; GABBOUJ, 2007), e é descrita matematicamente pela Equação 3.

$$MCO = [N_{ij}] \quad (3)$$

em que MCO consiste na matriz de coocorrência; i e j são as intensidades sucessivas e N_{ij} corresponde ao número de ocorrências de um valor de intensidade i , seguido por um valor de intensidade j , ao se deslocar pelas linhas ou colunas da história temporal.

Se um material apresentar baixa atividade, o THSP praticamente não apresenta variações de intensidade ao longo do tempo, e sua matriz de coocorrência é caracterizada por pixels que apresentam tons de cinza com pouca variação, ou seja, a mudança de intensidade do pixel i para o pixel j será pequena, e as ocorrências se situam próximas A diagonal principal.

Entretanto, se o material a ser analisado apresentar alta atividade, será possível observar THSP com grande atividade e a matriz de coocorrência apresenta as ocorrências mais distantes a diagonal principal. Na Figura 1, apresenta-se graficamente, a THSP e suas respectivas matrizes de coocorrência para materiais com alta e baixa atividade biológica.

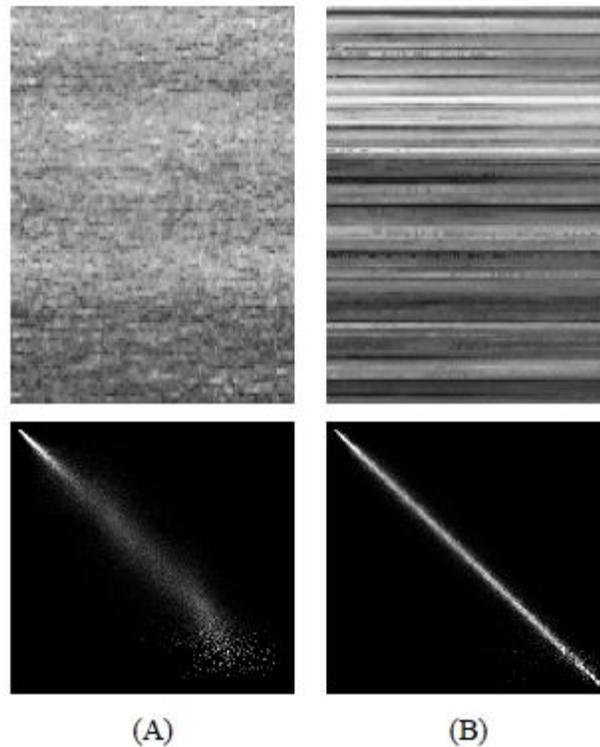


Figura 1 História temporal e matriz de coocorrência. (A) Material com alta atividade e (B) material com baixa atividade

Fonte: (SILVA et al., 2011)

A matriz de coocorrências é normalizada para a quantificação das variações de intensidades do *speckle*. A modificação é realizada dividindo-se os números de transições de cada linha da MCO pelo somatório dos valores de ocorrência de cada linha (RABAL; BRAGA, 2008), conforme Equação 4.

$$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum N_{ij}} \quad (5)$$

Dessa forma, o somatório das componentes em cada linha da matriz de coocorrência modificada é igual a 1.

2.3.3.3 Diferença dos valores absolutos

A partir da matriz de coocorrência modificada, Braga et al. (2011) propuseram um método para quantificar a atividade biológica, denominado diferença dos valores absolutos (AVD), que indica com que frequência ocorreram mudanças bruscas de intensidade na matriz THSP. A Equação 5 descreve matematicamente a diferença dos valores absolutos.

$$AVD = \sum_{ij} M_{ij} |i - j| \quad (5)$$

Esta técnica exibe altos valores quando a amostra apresenta alta atividade, e baixos valores em situação contrária. Este cálculo é uma ferramenta importante para estimar a atividade global em diversas aplicações biológicas e não biológicas.

2.4 Aplicações do *biospeckle* laser

Atividade biológica expressa na dinâmica do padrão do *speckle* não apresenta uma definição clara de qual fenômeno a está criando, porém, pode ser entendida como uma série de processos ocorridos no tecido em análise, como o desenvolvimento e processos de divisão celular, movimentação de organelas, fluxos de citoplasmas ou reações bioquímicas, ou seja, a atividade biológica é o resultado de movimentos moleculares e de estruturais (BRAGA et al., 2009).

Na agropecuária, o *biospeckle* tem sido aplicado como técnica para identificar a presença de parasitos expostos a diferentes tipos de drogas (POMARICO et al., 2004); detectar fungos em sementes de feijão (BRAGA JUNIOR et al., 2005); analisar a qualidade de laranjas (RABELO et al., 2005); para medir alongamentos minuciosos de raízes de pinho (RATHNAYAKE et al.,

2008) ou mesmo a atividade biológica de raízes em cultura de tecidos (BRAGA et al., 2009); na avaliação dos parâmetros de motilidade de sêmen congelado bovino (CARVALHO et al., 2009).

2.4.1 Aplicação do *biospeckle* na avaliação de sementes

Os estudos para aplicação do *biospeckle* em sementes estão relacionados com a determinação do efeito da umidade da atividade biológica (RODRIGUES et al., 2005), avaliação da viabilidade (BRAGA et al., 2001, 2003; FRACAROLLI et al., 2010), caracterização da transmissão do laser (MOREIRA et al., 2002), e detecção de patógenos (BRAGA JUNIOR et al., 2005). Tais estudos, analisados em conjunto, trazem informações de interação do fenômeno, contribuindo para o domínio da técnica do *biospeckle* como meio de análise da qualidade de sementes. Nesse contexto, vários autores aplicaram o *biospeckle* para estudar diferentes espécies de sementes (BRAGA et al., 2001, 2003; BRAGA JUNIOR et al., 2005; FRACAROLLI et al., 2010; MOREIRA et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2007).

Em uma semente, a quantidade de água está relacionada com a intensidade do processo metabólico, sendo que este, por sua vez, tem influência na variação temporal dos pontos de interferência do *biospeckle*, conforme observado por Rodrigues et al. (2005), em estudos realizados com sementes. Dessa forma, pode-se relacionar a umidade do material biológico com as medidas de Momento de Inércia (**MI**), a exemplo do trabalho realizado por Enes (2005).

Braga Júnior (2000), trabalhando com sementes de feijão (*Phaseolus Vulgaris* L.) em diferentes níveis de umidade, comprovou a influência do teor de água e da evaporação nos resultados do *biospeckle*. O autor também utilizou o laser para diferenciar tecidos vivos de tecidos mortos em sementes.

Moreira et al. (2002) realizaram um estudo de caracterização da transmissão do laser em sementes de feijão, avaliando três diferentes espessuras (1mm, 2mm e 4mm) e dois níveis de umidade (9,5 e 23,5 %). Os resultados mostraram que quanto maior o teor de água, maior é a penetração do laser no tecido da semente, pois, o aumento da quantidade de água na semente, aumenta o volume da célula, facilitando a passagem da luz neste tecido.

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

Braga Júnior et al. (2005) aplicaram a técnica do *biospeckle* para identificar 4 fungos diferentes em tecidos de sementes de feijão que haviam sido submetidas ao congelamento em água, constituindo 4 tratamentos, a saber: tratamento 1, semente testemunha; 2, fungo *Sclerotinia fungi*; 3, *Aspergillus fungi* e 4, *Colletotrium fungi*. Os autores encontraram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos ao nível de 1%, evidenciando a capacidade da técnica em identificar fungos em sementes. Os resultados desenvolvidos demonstraram que foi possível diferenciar um lote de sementes sem a presença de fungos, com lotes inoculados com os 3 tipos, não sendo possível identificar o fungo *Sclerotinia fungi*. É possível que para esse fungo não detectado, o método do **MI** utilizando os equipamentos e técnicas da época, não tenha sido suficientemente rápido para capturar sua atividade.

Enes et al. (2004) avaliaram a sensibilidade do método do *biospeckle* trabalhando com sementes de feijão, com diferentes níveis de atividade. Observou-se no trabalho, ser possível diferenciar níveis extremos e alguns níveis intermediários de atividade. As sementes com diferentes níveis de atividade

foram obtidas através da técnica conhecida como envelhecimento acelerado e na quantificação do *biospeckle* foi utilizado o **MI**.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a potencialidade do *biospeckle* laser por meio de técnicas de processamento de imagens e de análise estatística, para identificação de fenômenos de baixa e alta atividade em sementes de café, correlacionando-as com a sua viabilidade.

3.2 Específicos

- a) Investigar a aplicação da técnica na diferenciação da atividade do embrião e endosperma;
- b) Investigar a aplicação da técnica na redução do tempo para avaliação do potencial germinativo em semente de café;
- c) Investigar a potencialidade da técnica em prever a viabilidade de um lote de semente de café, comparando os resultados com o teste de germinação e com o tetrazólio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório Central de Sementes (LCSEM/UFLA), no Setor de Cafeicultura e no Centro de Desenvolvimento e Instrumentação Aplicada à Agropecuária (CEDIA), da Universidade Federal de Lavras (MG), utilizando-se sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*) cultivar Mundo Novo, na safra 2012/2013 e 2013/2014.

A metodologia deste trabalho foi dividida em três etapas, a saber:

- a) Configuração experimental e desenvolvimento de protocolo;
- b) Comparação do *biospeckle* laser com o teste de germinação em semente de café;
- c) Comparação do *biospeckle* laser com o teste de tetrazólio em sementes de café.

4.1 Configuração experimental e teste de protocolo

Foram realizados experimentos preliminares para o ajuste da configuração da iluminação e verificação de qual metodologia seria mais aplicável para interpretação dos resultados do *biospeckle* laser. Também foi verificado a partir de qual dia da embebição das sementes já era possível registrar atividade na semente com o *biospeckle*.

4.1.1 Preparação das sementes

As sementes foram colhidas manualmente e preparadas via úmida, sendo submetidas ao processo de descascamento e despulpamento manual. Em seguida, as sementes passaram pelo processo de secagem lenta à sombra, sobre

peneiras, e o contato com o chão foi evitado, para se obter uma melhor circulação do ar. O processo foi finalizado assim que as sementes atingiram 13% de umidade. O grau de umidade foi controlado pelo método de controle de peso.

Foram utilizadas 40 sementes para realização dos primeiros testes. Para embebição das sementes foi necessário a remoção manual do pergaminho, tendo como substrato rolos de papel de germinação tipo germitest, umedecidos em água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Antes da embebição, foi utilizado tratamento com hipoclorito 1% durante um minuto, a fim de remover a película prateada e facilitar o processo de leitura com o biospeckle. Os rolos foram envoltos com um plástico preto, a fim de reduzir a incidência de luz, e assim, acelerar o processo de germinação (SILVA et al., 2004), e posteriormente, levados ao germinador a 30 °C.

A iluminação das sementes e aquisição das imagens do *biospeckle* ocorreram no 3º, 4º, 5º e 6º dias de embebição. Para leitura foram utilizados uma câmera CCD (Dispositivo de Carga Acoplada), um microcomputador para captura dos dados, e outro para o processamento das imagens com processador Core i3 e 4 GB de memória RAM, um laser HeNe vermelho (632 nm) de 10 mW de potência e mesa óptica com sistema anti-vibração dispostos, como apresentado na Figura 2.

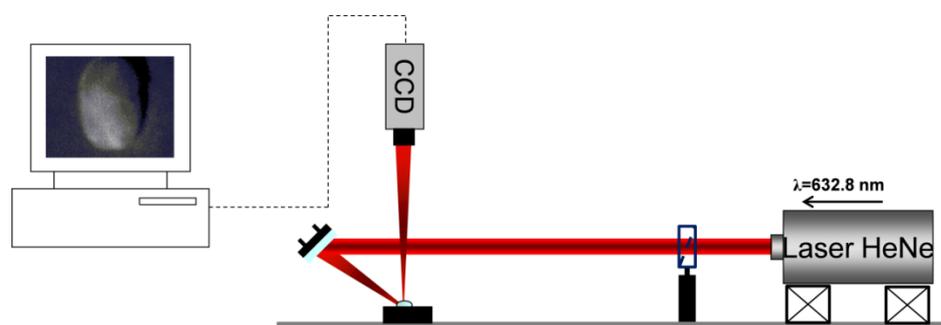


Figura 2 Disposição dos equipamentos experimentais durante a captura das imagens e iluminação pelo laser

Várias configurações foram testadas para iluminação das sementes, posicionando as mesmas de diversas formas em relação ao laser e a câmera.

4.2 Experimentos para comparação do *biospeckle* laser com o teste de germinação e tetrazólio

A fim de verificar se o *biospeckle* laser pode ser usado como ferramenta para avaliação da viabilidade de sementes de café foram realizados experimentos para comparação dos resultados com o teste de germinação e tetrazólio.

4.2.1 Teste de germinação e biospeckle

Para realização destes experimentos foram utilizadas sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*) cultivar Mundo Novo, preparadas da mesma forma descrita no item 4.1.1, porém, as sementes utilizadas foram da safra 2013/2014.

Com a finalidade de se obter lotes de sementes com diferentes qualidades fisiológicas, as mesmas foram submetidas a um processo de envelhecimento acelerado. Para o processo de envelhecimento, as sementes com endocarpo (pergaminho) foram distribuídas em camada única, sobre tela de aço

inoxidável, fixada no interior de caixas plástico tipo *gerbox*, contendo no fundo 40 ml de água destilada. Os *gerbox* foram acondicionados em câmara do tipo BOD regulada à temperatura constante de 42 °C, por períodos de 20, 30, 40 e 50 horas. Em seguida, esses lotes passaram pelo mesmo processo de secagem descrito anteriormente até atingirem 13% de umidade.

Os lotes foram então classificados de acordo com o tempo de envelhecimento da seguinte forma:

Lote 1= tempo zero

Lote 2 = tempo 20h

Lote 3= tempo 30h

Lote 4 = tempo 40h

Lote 5 = tempo 50h.

Foram utilizadas 3 repetições com 50 sementes de cada um dos 5 lotes, totalizando 750 sementes. A embebição das sementes foi realizada de acordo com o protocolo descrito no item 4.1.1. Para comparação dos resultados individualmente, as sementes foram numeradas no papel germitest.

Findada a etapa de embebição inicial, bem como a aquisição das imagens do biospeckle, cada rolo voltou para o germinador, permanecendo no mesmo por um período de mais 24 dias para realização do teste de germinação. As leituras para realização do teste de germinação foram realizadas com 15 e 30 dias, e os resultados foram expressos em porcentagem de germinação, ou seja, porcentagem de plântulas normais por lote, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

No processamento das imagens do *biospeckle* foi utilizada a metodologia DG, para geração dos mapas de atividades de cada semente.

Para análise quantitativa das imagens foi utilizado o software ImageJ, que é um programa Java de domínio público, para processamento de imagens. Com a função histograma do Image J foi possível registrar a intensidade média dos pixels na região do embrião e do endosperma da imagem DG para cada semente, conforme apresentado nas Figuras 3 e 4 e descrito matematicamente na Equação 6.

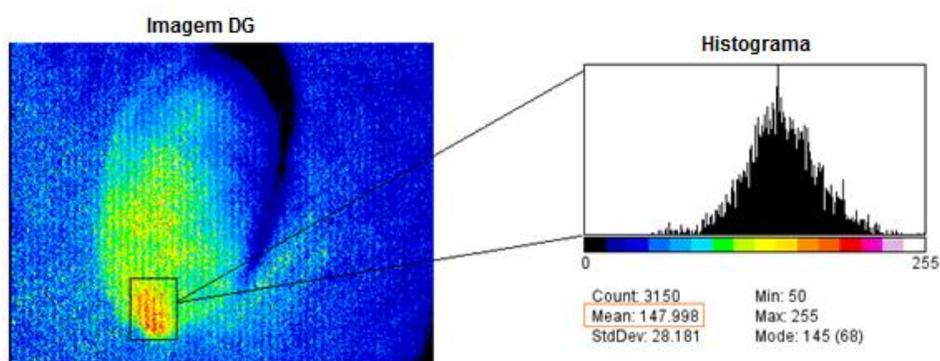


Figura 3 Imagem DG e histograma da região do embrião

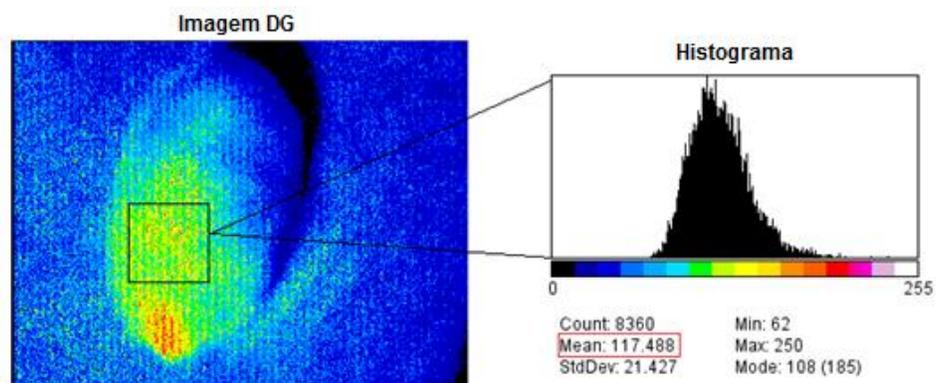


Figura 4 Imagem DG e histograma da região do endosperma

$$RAZÃO = \frac{\text{intensidade média dos pixels região do embrião (147,998)}}{\text{intensidade média dos pixels região do endosperma (117,488)}} = 1,26 \quad (6)$$

De acordo com o resultado da Equação 6 foi possível quantificar a atividade das sementes e assim classificá-las em viável ou inviável.

4.2.2 Teste de tetrazólio e biospeckle

Para comparação do teste de tetrazólio com o *biospeckle* foram utilizadas sementes provenientes de três lotes de café (*Coffea arabica* L.), com diferentes qualidades fisiológicas, da cultivar Mundo Novo 379-19 da safra 2013/2014.

Na aquisição das imagens do *biospeckle* as sementes foram preparadas seguindo a mesma metodologia descrita no item 4.1.1. Foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes de cada um dos três lotes, totalizando 300 sementes. Ao sexto dia de embebição foi realizada a iluminação e aquisição das imagens do biospeckle. Findada esta etapa, estas sementes foram descartadas.

No processamento das imagens do *biospeckle* também foi utilizada a metodologia DG para geração dos mapas de atividades de cada semente. A classificação das sementes foi feita por meio da função histograma do Image J, da mesma forma descrita no item 4.2.1.

Para a realização do teste de tetrazólio, que ocorreu na mesma semana da aquisição das imagens pelo *biospeckle* laser, foram utilizadas outras 4 repetições de 25 sementes de cada um dos três lotes. As sementes tiveram os seus pergaminhos removidos manualmente, e foram embebidas por 36 horas em água destilada à 30° C. Os embriões foram extraídos por meio de um bisturi e mantidos em solução de antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) até serem colocados na solução de tetrazólio. Em seguida, foram lavados em água corrente com o auxílio de uma peneira e embebidos em solução de tetrazólio a 0,5% em

frascos escuros à 30° C durante o período de 3 horas (CLEMENTE, 2009). Após a coloração, os embriões foram retirados e lavados para a interrupção da ação do sal de tetrazólio. A avaliação foi feita com o auxílio de uma lupa estereoscópica, e os embriões classificados em viáveis e inviáveis para posteriores comparações com os resultados do *biospeckle* laser.

4.2.3 Procedimentos estatísticos

A interpretação estatística dos resultados foi realizada a partir da análise de variância, com o objetivo de comparar os resultados do *biospeckle* laser com o teste de germinação e, posteriormente, com o teste de tetrazólio. Para tal, o modelo utilizado foi o de blocos casualizados.

A primeira análise de variância foi realizada para os cinco lotes de sementes, a fim de se comparar os resultados do *biospeckle* laser com o teste de germinação. A normalidade, a homocedasticidade e a independência dos resultados foram avaliadas pelos testes Shapiro-Wilk, Bartlett e Durbin Watson. A comparação das médias foi realizada com o teste F.

A segunda análise de variância foi realizada com outros três lotes de sementes, a fim de se comparar os resultados do *biospeckle* laser com o teste de tetrazólio. A normalidade, a homocedasticidade, a independência dos resultados e a comparação das médias também foram avaliadas através dos mesmos testes. Todo o procedimento foi desenvolvido no software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Configuração experimental e desenvolvimento de protocolo

Nesta seção serão apresentados os resultados dos experimentos preliminares que se fizeram necessários para ajuste de setup, verificação da metodologia utilizada para análise das imagens do *biospeckle* laser, e definição do melhor momento para iluminação das sementes.

5.1.1 Experimentos para ajuste da configuração experimental

Alguns experimentos foram realizados para verificação da melhor posição da semente na configuração experimental, bem como o ajuste da intensidade do laser. Na Figura 6 estão apresentados alguns resultados do processamento DG de uma mesma semente, que foi iluminada duas vezes com o laser, em intensidades diferentes. A intensidade do laser foi controlada com um filtro. Na semente da Figura 5a, o filtro foi posicionado de forma a permitir que o laser atingisse a semente com maior intensidade do que na mesma semente da Figura 5b.

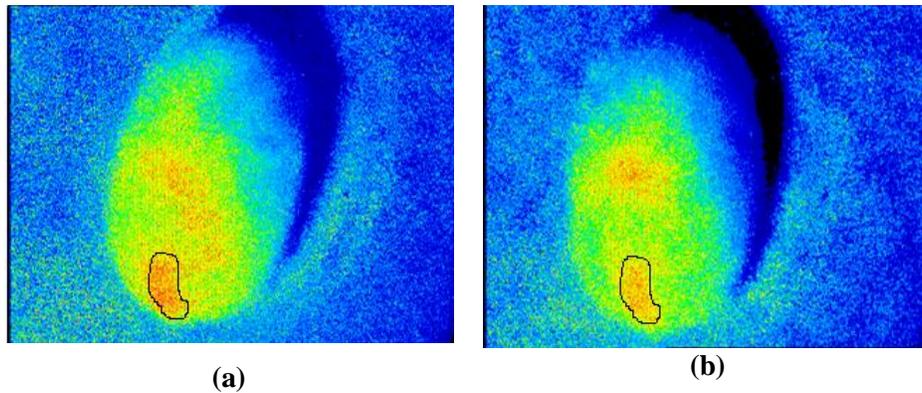


Figura 5 (a) Imagem DG da semente iluminada com a luz laser de maior intensidade. (b) Imagem DG da mesma semente A, iluminada com a luz laser menos intensa

Os mapas de atividades DG foram coloridos de tal forma que a cor vermelha representa uma atividade mais intensa. A região delimitada manualmente, que apresenta atividade mais intensa do que no restante da semente, representa o embrião.

Como pode ser observado na Figura 5, a intensidade do laser influencia no registro da atividade do embrião pelo biospeckle. Na Figura 5a, a semente iluminada com um laser mais intenso, aparece com uma atividade mais pronunciada do que na Figura 6b. Desta forma, a partir destes resultados, foi necessário a fixação da posição do filtro para garantir que todas as sementes fossem iluminadas com laser de mesma intensidade e não interferisse na comparação dos resultados.

Na Figura 6 estão apresentados os resultados do processamento DG de uma mesma semente que foi posicionada no setup em três diferentes posições.

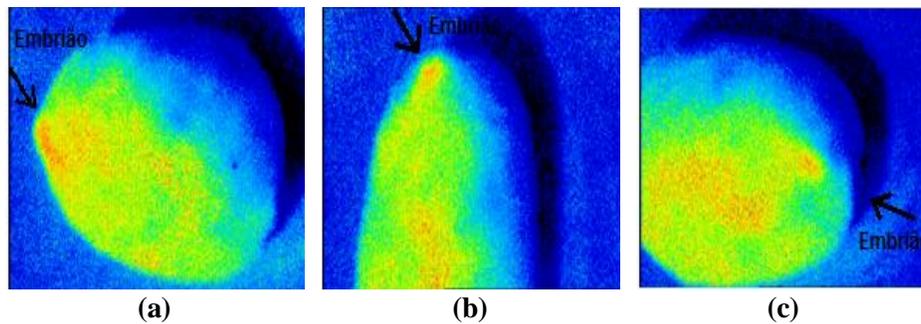


Figura 6 (a) Imagem DG da semente posicionada com o embrião voltado para o laser. (b) Imagem DG da semente A girada de 90o no sentido horário. (c) Imagem DG da semente A girada de 180o no sentido horário

A Figura 6a representa a semente posicionada com o embrião voltado diretamente para o laser. A Figura 6b representa a mesma semente da Figura 6a girada de 90° no sentido horário, e a Figura 6c representa a mesma semente da Figura 6a girada de 180° no sentido horário. Todas as imagens da Figura 6 referem-se ao processamento DG.

Pode-se observar que o *biospeckle* laser é capaz de registrar melhor a atividade no embrião quando o mesmo está voltado para o laser, como apresentado da Figura 6a.

5.1.2 Experimentos para definição do momento da iluminação

As imagens do *biospeckle* laser foram produzidas com sementes embebidas por 3, 4, 5 e 6 dias. Foi observado um aumento geral da atividade do *biospeckle* com o tempo de embebição, que variou entre as sementes, como pode ser observado na Figura 7.

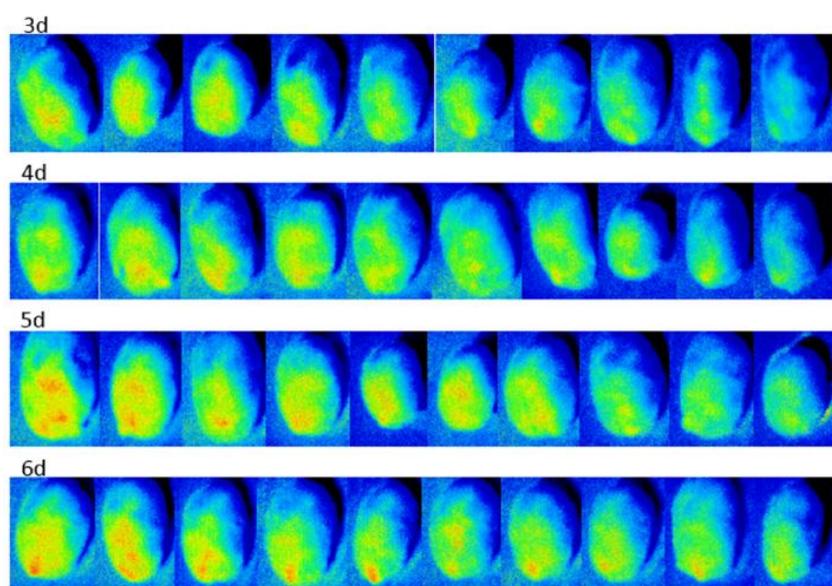


Figura 7 Mapas DG's para sementes que foram iluminadas com 3, 4, 5 e 6 dias de embebição, totalizando 40 sementes iluminadas

5.2 *Biospeckle* laser e teste de germinação

Para classificação das imagens do ponto de vista do fenômeno do biospeckle, também foi usado a Equação 7, que calcula a razão (R) entre a intensidade média dos pixels na região do embrião e do endosperma da imagem DG, para cada semente. A partir destes resultados, as sementes foram então classificadas em viáveis ou inviáveis, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 Classificação das imagens do *biospeckle* laser de acordo com os valores da razão (R) entre a intensidade média dos pixels na região do embrião e do endosperma da imagem DG

Classificação BSL	Intervalo do valor da razão (R)
Inviáveis	0,980 a 1,189
Viáveis	1,190 a 1,590

Nos mapas de atividade DG, a região vermelha representa a região da semente que sofreu maior variação de intensidade dos pixels, representando, portanto, região de maior atividade.

Portanto, aquelas sementes que apresentaram o embrião destacado pela alta atividade, como nos exemplos apresentados na Figura 8, tiveram os valores de R maiores que 1,19, e por isso foram classificadas como viáveis.

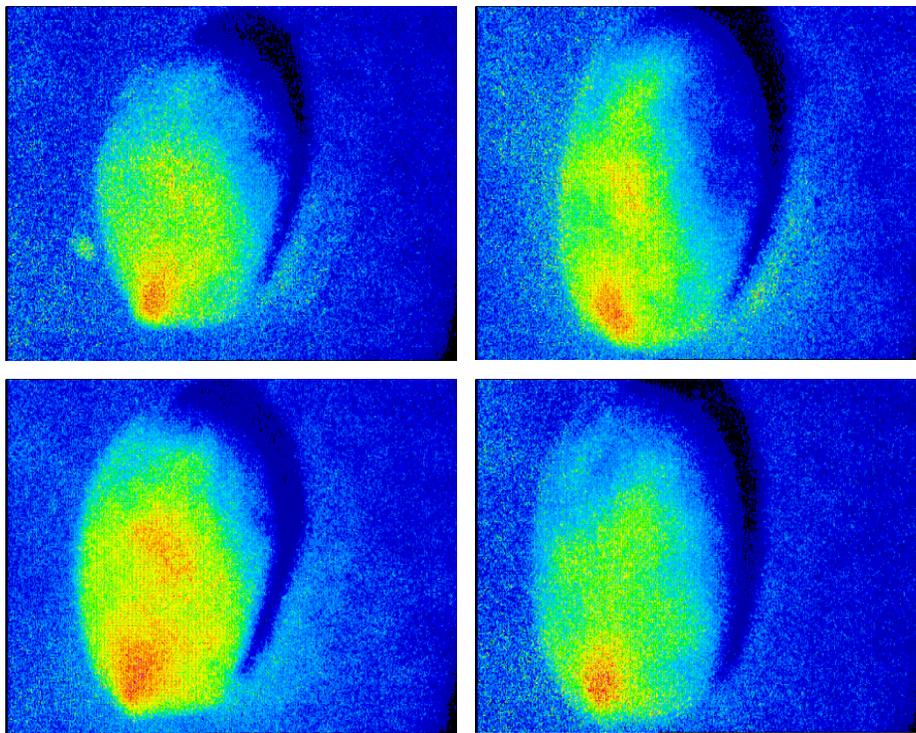


Figura 8 Mapas de atividades DG de sementes classificadas como viáveis, ou seja, com registro de atividade diferenciável no embrião e valor de R superior a 1,19

Na Figura 9 estão apresentadas algumas imagens de sementes em que não é possível observar uma atividade mais pronunciada e intensa na região do embrião. Desta forma, imagens com este padrão tiveram o valor de R menores

que 1,19, e por isso, foram classificadas como inviáveis de acordo com o *biospeckle* laser.

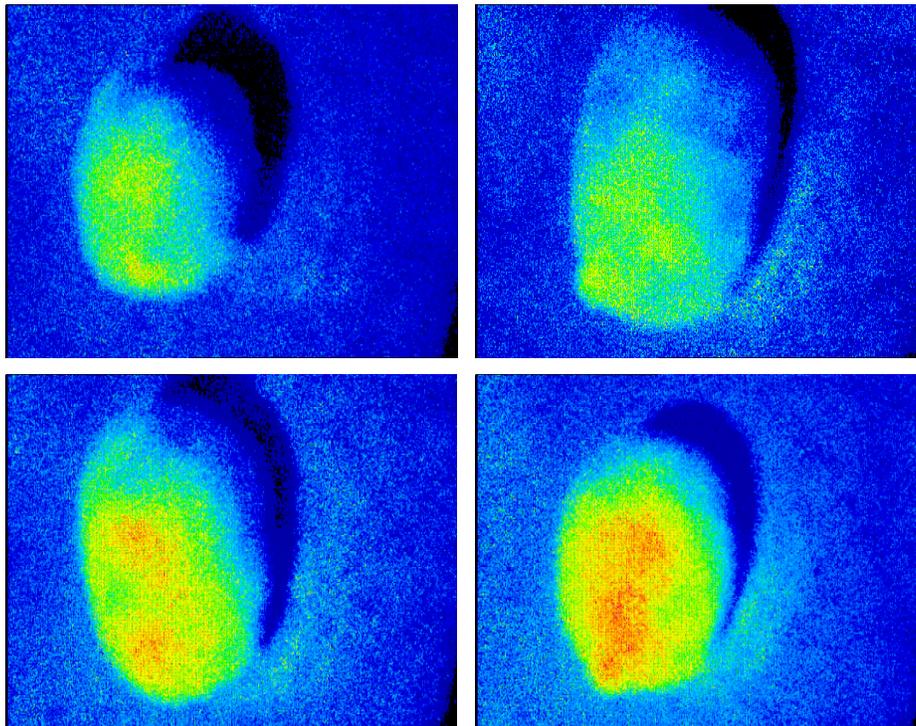


Figura 9 Mapas de atividades DG de sementes classificadas como viáveis, ou seja, com registro de atividade diferenciável no embrião e valor de R superior a 1,19

A partir desta classificação, primeiramente, os resultados do biopeckle laser foram comparados com os resultados do teste de germinação, semente a semente, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados da classificação de acordo com os critérios do *biospeckle* laser e do teste de germinação de 744 sementes dos 5 diferentes lotes utilizados

CLASSIFICAÇÃO BSL RAZÃO (R)	CLASSIFICAÇÃO TESTE GERMINAÇÃO		
	MORTA	ANORMAL	NORMAL
0,980 a 1,189 (INVIÁVEIS) 237 sementes	15	78	144
1,190 a 1,59 (VIÁVEIS) 507 sementes	8	99	400

Em uma interpretação mais simplificada destes resultados, as sementes classificadas como viáveis de acordo com os critérios do *biospeckle* laser são comparadas com as classificadas como normais, de acordo com os critérios do teste de germinação. A Tabela 3 apresenta este resultado.

Tabela 3 Comparação do resultado de sementes classificadas como viáveis de acordo com o *biospeckle* laser com o resultado de sementes classificadas como normais para o teste de germinação para todas as 744 sementes dos 5 diferentes lotes avaliados

Número de sementes (n)	Viáveis BSL (%)	Normais teste germinação (%)
744	68	73

Assim, considerando o conjunto total de 744 sementes, sem considerar a comparação de semente a semente, o *biospeckle* laser conseguiu prever razoavelmente bem a qualidade deste lote de sementes com 24 dias de antecedência, quando comparado com o teste de germinação.

A Tabela 4 apresenta os mesmos resultados da Tabela 3, agora separados por lotes.

Os resultados do *biospeckle*, apresentados na Tabela 4, representam a porcentagem de sementes classificadas como viáveis, ou seja, aquelas que apresentaram um valor de R maior que 1,19 e, conseqüentemente, uma atividade mais intensa e diferenciável no embrião.

Os resultados da germinação, apresentados na Tabela 4, representam a porcentagem de germinação de sementes que corresponde à proporção do número de sementes que produziu plântulas classificadas como normais, em condições e períodos especificados pela RAS (BRASIL, 2009).

Tabela 4 Comparação entre a porcentagem de sementes viáveis de acordo com o *biospeckle* e a porcentagem de sementes normais de acordo com o teste de germinação para cada lote de sementes analisado

	BIOSPECKLE (% sementes viáveis)	GERMINAÇÃO (% de sementes normais)	Nº OBSERVAÇÕES
LOTE 1	78,5	77,5	150
LOTE 2	78	86	150
LOTE 3	84	80	150
LOTE 4	64	46	150
LOTE 5	70	74	150

Analisando os dados da Tabela 4, pode-se observar que o lote 4 apresentou um resultado bem inferior quando comparado com os demais lotes, tanto para o *biospeckle* quanto para o teste de germinação. Esta redução está provavelmente associada à presença de fungos, que foi registrada em várias sementes deste lote. É interessante ressaltar, que essa redução foi registrada pelo *biospeckle* ao 6º dia de embebição e, posteriormente, registrada pelo teste de germinação ao 30º dia. Conseqüentemente, o *biospeckle* foi capaz de prever com 24 dias de antecedência uma contaminação do lote.

Para análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 4 foi realizado a análise de variância, a fim de se comparar os resultados do *biospeckle* laser com os do teste de germinação.

A partir dos valores de p-value verifica-se que todas as pressuposições de normalidade, homocedasticidade e a independência dos resultados foram atendidas.

A partir dos resultados do teste F apresentados Tabela 5, verifica-se que não há evidências para rejeitar a hipótese da igualdade dos efeitos médios dos métodos ao nível de 5% de probabilidade, ou seja, as médias para o teste de germinação e *biospeckle* laser não podem ser consideradas diferentes.

Tabela 5 Valores das médias para o *biospeckle* laser e teste de germinação de acordo com o teste F

	Médias
<i>Biospeckle</i> (T1)	73,6
Germinação (T2)	72,8

Em outras palavras, a partir desta análise estatística, pode-se afirmar que não há diferença entre os resultados apresentados pelo teste de germinação e pelo *biospeckle* laser na análise dos 5 lotes de sementes de café.

5.3 *Biospeckle* laser e teste de tetrazólio

As imagens do *biopeckle* laser também foram classificadas em viáveis e inviáveis, de acordo com o valor de R, da mesma forma dos experimentos anteriores. Assim, os resultados do *biospeckle* laser foram então comparados com o do teste de tetrazólio para cada lote de sementes, como pode ser observado na Tabela 6 .

Os resultados do *biospeckle* apresentados na Tabela 6 representam a porcentagem de sementes classificadas como viáveis, ou seja, aquelas que apresentaram um valor de R maior que 1,19 e, conseqüentemente, uma atividade mais intensa e diferenciável no embrião. Os resultados do teste de tetrazólio apresentados na Tabela 6 representam a porcentagem de embriões viáveis.

Tabela 6 Comparação entre a porcentagem de sementes viáveis de acordo com o *biospeckle* e a porcentagem de embriões viáveis de acordo com o teste de tetrazólio para cada lote de sementes analisado

	BIOSPECKLE (% sementes viáveis)	TETRAZÓLIO (% de embriões viáveis)	Nº OBSERVAÇÕES
LOTE 620/114	50	44	100
LOTE 331/114	61	61	100
LOTE 137/114	64	67	100

Para análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 6, também foi realizada a análise de variância, a fim de se comparar os resultados do *biospeckle* laser com os do teste de tetrazólio.

A partir dos valores de p-value, verifica-se que todas as pressuposições de normalidade, homocedasticidade e a independência dos resultados foram atendidas.

De acordo com os resultados do teste F, apresentados Tabela 7, verifica-se que não há evidências para rejeitar a hipótese da igualdade dos efeitos médios dos métodos ao nível de 5% de probabilidade, ou seja, as médias para o teste de tetrazólio e *biospeckle* laser não podem ser consideradas diferentes.

Tabela 7 Valores das médias para o *biospeckle* laser e teste de tetrazólio de acordo com o teste F

	Médias
<i>Biospeckle</i> (T1)	59
Tetrazólio (T2)	56,3

Com base na análise estatística, pode-se afirmar que não há diferença entre os resultados apresentados pelo teste de tetrazólio e pelo *biospeckle* laser, na análise dos 3 lotes de sementes de café.

6 CONCLUSÕES

A atividade registrada pelo *biospeckle* laser é um parâmetro para detecção não invasiva de qualidade de sementes de café, e também para diferenciação da atividade do embrião e endosperma.

Quando comparado com o teste de germinação, o *biospeckle* consegue diferenciar o resultado com uma antecedência de 24 dias.

O *biospeckle* laser também se mostrou eficiente quando comparado com os resultados do tetrazólio.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. B. **Sistema de análise de sementes (SAS) na detecção de misturas varietais e de sementes esverdeadas em soja**. 2014. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- ARAÚJO, E. F. et al. Efeito da danificação mecânica e da remoção manual do pergaminho sobre a emergência das plântulas de *Coffea arabica* L. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 8, p. 1-5, jun. 2004. Edição especial.
- ARIZAGA, R.; TRIVI, M. R.; RABAL, H. J. *Speckle* time evolution characterization by co-occurrence matrix analysis. **Optics & Laser Technology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.
- BARCELOS, A. F. et al. Parâmetros bromatológicos da casca e polpa desidratada de café (*coffea arabica* l.) armazenadas em diferentes períodos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 780-790, jul./ago. 2002.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BRAGA, R. A. et al. Assessment of seed viability by laser *speckle* techniques. **Biosystems Engineering**, London, v. 86, n. 3, p. 287-294, 2003.
- BRAGA, R. A. et al. Evaluation of activity through dynamic laser *speckle* using the absolute value of the differences. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 646-650, 2011.
- BRAGA, R. A. et al. Live *biospeckle* laser imaging of root tissue. **European Biophysics Journal**, London, v. 38, n. 5, p. 679-686, 2009.
- BRAGA, R. A. et al. Potencial do *biospeckle* laser para avaliação da viabilidade de sementes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 646-649, maio/jun. 2001.
- BRAGA JÚNIOR, R. A. **“Bio-Speckle”**: uma contribuição para o desenvolvimento de uma tecnologia aplicada à análise de sementes. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BRAGA JÚNIOR, R. A. et al. Detection of fungi in beans by the laser *biospeckle* technique. **Biosystems Engineering**, San Diego, v. 91, n. 4, p. 465-469, Aug. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.

BROSNAN, T.; SUN, D. W. Improving quality inspection of food products by computer vision: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 61, n. 2, p. 3-16, Apr. 2004.

BUCKERIDGE, M. S.; PANEGASSI, V. R.; DIETRICH, S. M. C. Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 171-175, abr./jun. 2000.

BURCH, J. M.; TOKARSKI, J. M. J. Production of multiple beam fringes from photographic scatterers. **Optica Acta**, London, v. 15, p. 101-11, 1968.

CARVALHO, M. L. M.; ALVES, R. A.; OLIVEIRA, L. M. Análise radiográfica em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 170-175, 2010.

CARVALHO, M. M. de; ALVARENGA, G. Determinação do estágio de desenvolvimento mínimo do fruto do cafeeiro (*Coffea arabica* L.), para germinação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 7., 1979, Araxá. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1979. p. 118-119.

CARVALHO, P. H. A. et al. Motility parameters assessment of bovine frozen semen by *biospeckle* laser (BSL) system. **Biosystems Engineering**, London, v. 102, n. 1, p. 31-35, 2009.

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p. 25-26.

CLEMENTE, A. da C. **Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de semente de café no armazenamento.** 2009. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

DAINTY, J. C. Recent developments. In: _____. **Laser speckle and related phenomena.** Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 321-335.

DEDECCA, D. M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *typica* Cramer. **Bragantia**, Campinas, v. 16, p. 315-366, 1957.

DELOUCHE, J. C. et al. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente.** Brasília: AGIPLAN, 1976. 103 p.

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

ENES, A. M. et al. Utilização do Laser aplicado na diferenciação de tecidos vivos de tecidos mortos em sementes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 33., 2004, São Pedro. **Anais...** Campinas: UNICAMP/EMBRAPA, 2004. 1 CD-ROM.

EXNER, K. Sitzungsbericht Kaiserl. **Acad Wiss**, Wien, v. 76, p. 522, 1877.

FORTI, V. A.; CICERO, S. M.; PINTO, T. L. F. Avaliação da evolução de danos por "umidade" e redução do vigor em sementes de soja, cultivar TMG113-RR, durante o armazenamento, utilizando imagens de raios x e testes de potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 123-133, set. 2010.

FRACAROLLI, J. A. et al. Ipe (*Tabebuia impetiginosa*) seed quality evaluation by means of laser biospeckle. **Selskostopanska Tekhnika**, Sofia, v. 47, p. 73-78, 2010.

FUJII, H. et al. Evaluation of blood flow by laser *speckle* image sensing. **Applied Optics**, New York, v. 26, n. 24, p. 5321-5325, 1987.

GABOR, D. **Holography: 1948-1971.** London: Nobel Lecture, 1971. 38 p.

GODINHO, R. P. et al. Variações na cor e na composição química do café (*Coffea arabica* L.) armazenado em coco e beneficiado. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, n. 1, p. 38-43, 2000. Especial café.

GOODMAN, J. W. Statistical properties of laser *speckle* patterns. In: DAINTY, J. C. (Ed.). **Laser speckle and related phenomena**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 9-75.

GRANITTO, P. M.; VERDES, P. F.; CECCATO, H. A. Large-scale investigation of weed seed identification by machine vision. **Computers and Electronics in Agriculture**, New York, v. 47, n. 1, p. 15-24, Apr. 2005.

GUIMARÃES, R. J. **Formação de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.):** efeitos de reguladores de crescimento e remoção do pergaminho na germinação de sementes e do uso de N e K em cobertura, no desenvolvimento de mudas. 1995. 133 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING. **International rules for seed testing**. Zurich, 2007. 180 p.

KIGEL, J.; GALILI, G. E. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: M. Dekker, 1995. 853 p.

KURENDA, A. et al. Temperature effect on apple *biospeckle* activity evaluated with different indices. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 67, p. 118-123, May 2012.

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

MOREIRA, M. F. B. et al. Caracterização da transmissão da luz laser em semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 2, p. 119-125, 2002.

NASCIMENTO, A. L. do et al. Development of a Model for the *Biospeckle* Applied to Analyse Bean Seed (*Phaseolus Vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 456-461, mar./abr. 2007.

NEWTON, I. **Óptica**. São Paulo: EDUSP, 1991. 83 p.

OULOMARA, G.; TRIBILLON, J.; DUVERNOY, J. Biological activity measurements on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. **Journal of Moderns Optics**, London, v. 36, n. 2, p. 136-179, 1989.

PARTIO, M.; CRAMARIUC, B.; GABBOUJ, M. An ordinal co-occurrence matrix framework for texture retrieval. **Journal on Image and Video Processing**, Heidelberg, v. 2007, n. 1, p. 1-5, 2007.

PEREIRA, C. E. et al. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 24, n. 1, p. 306-311, 2002.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Lavras: UFLA, 2003. 304 p.

PIMENTA, C. J.; COSTA, L.; CHAGAS, S. J. R. Peso, acidez, sólidos solúveis, açúcares e compostos fenólicos em café (*Coffea arabica* L.), colhidos em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 1, p. 23-30, 2000. Edição especial.

PINTO, T. L. F. et al. Análise de imagens na avaliação de danos mecânicos em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 3, p. 310-316, jul./set. 2012.

POMARICO, J. A. et al. *Speckle* interferometry applied to phamaco dynamic studies: evaluation of parasite motility. **European Biophysics Journal**, New York, v. 33, n. 8, p. 694-699, Dec. 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

RABAL, H.; BRAGA, R. A. **Dynamic laser speckle and applications**. New York: CRC, 2008. 304 p.

RABELO, G. F. et al. Frequency response of *biospeckle* laser images of bean seeds contaminated by fungi. **Biosystems Engineering**, London, v. 110, n. 3, p. 297-301, Nov. 2011.

RATHNAYAKE, A. P. et al. A novel optical interference technique to measure minute root elongations of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Seibold & Zucc.) seedlings infected with ectomycorrhizal fungi. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 64, n. 3, p. 314-321, 2008.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 26-40, jun. 1985.

RIBEIRO FILHO, E. **Degradabilidade in situ da matéria seca, proteína bruta e da fibra em detergente neutro da casca de café e desempenho de novilhos mestiços em fase de recria**. 1998. 55 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Ruminantes) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

RODRIGUES, S. et al. Efeito da umidade na determinação da atividade biológica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizando imagens de *speckle* dinâmico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 30, p. 135-139, 2005.

ROGERS, W. J. et al. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 37, n. 4, p. 261-272, Apr. 1999.

SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Mudanças na composição de proteínas e aminoácidos durante a germinação de sementes de café. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, p. 150, jun. 1999. Suplemento.

SILVA, E. A. et al. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, 2004.

SILVA, M. M. et al. Optical mouse acting as *biospeckle* sensor. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 284, n. 7, p. 1798-1802, 2011.

SPEER, K.; KOLLING-SPEER, I. A fração lipídica da semente de café. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 201-216, jan./mar. 2006.

TEIXEIRA, M. N. M. **Determinação da degradabilidade “in situ” das diferentes frações da casca de três cultivares de café (*Coffea arabica* L.)**. 1999. 44 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Ruminantes) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

VALIO, I. F. M. Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 27, n. 100, p. 983-991, 1976.

VEIGA, A. D. **Armazenabilidade de sementes de cafeeiro em diferentes estágios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

VENORA, G. et al. Identification of Italian landraces of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an image analysis system. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 121, n. 4, p. 410-418, Aug. 2009.

VENORA, G. et al. Identification of Sicilian landraces and Canadian cultivars of lentil using an image analysis system. **Food Research International**, Barking, v. 40, n. 1, p. 161-166, Jan. 2007.

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

ZDUNEK, A. et al. The *biospeckle* method for the investigation of agricultural crops: a review. **Optics and Lasers in Engineering**, London, v. 52, p. 276-285, Jan. 2013.

ZDUNEK, A.; HERPPICH, W. B. Relation of *biospeckle* activity with chlorophyll content in apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 58-63, 2012.