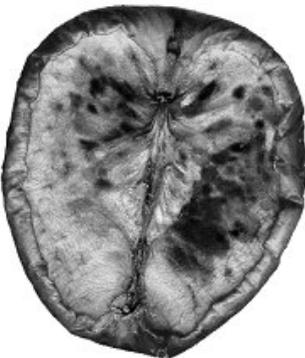
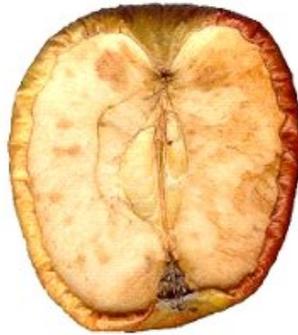


Uso de Metodologia Simples por Análise de Imagens para Acompanhamento da Proliferação de Fungos em Frutos Fatiados



ISSN 1678-0434

Dezembro, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 17

Uso de Metodologia Simples por Análise de Imagens para Acompanhamento da Proliferação de Fungos em Frutos Fatiados

Odilio B. Garrido Assis
Sandra Protter Gouvêa
Douglas de Britto

Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452

Caixa Postal 741

CEP 13560-970 - São Carlos-SP

Fone: (16) 3374 2477

Fax: (16) 3372 5958

www.cnpdia.embrapa.br

E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz

Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,

Dr. João de Mendonça Naime,

Dr. Washington Luiz de Barros Melo

Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Revisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto

Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso

Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane

Foto da capa: Odílio B. Garrido Assis

Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2006): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Instrumentação Agropecuária

A848u Assis, Odílio Benedito Garrido de

 Uso de Metodologia Simples por Análise de Imagens para Acompanhamento da Proliferação de Fungos em Frutos Fatiados. / Odílio Benedito Garrido de Assis, Sandra Protter Gouvêa, Douglas de Brito. - São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2006.

 25 p. - (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1678-0434; 17)

 1. Alimentos Avaliação sensorial. 2. Pós-colheita. 3. Análise de imagens. 4. Qualidade de alimentos minimamente processados. 5. Crescimento de fungos. 6. Quitosana. I. Gouvêa, Sandra Protter. II. Brito, Douglas de. III. Título. IV. Série.

CDD 21 ED 664.8072

© Embrapa 2006

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	11
Conceitos básicos de análise de imagens	12
Contaminação de maçãs por fungos	12
Escurecimento por oxidação ou por ação enzimática	13
Quitosana antifúngica	13
Materiais e métodos	14
Resultados e Discussão	17
Conclusões	22
Referências	12

Uso de Metodologia Simples por Análise de Imagens para Acompanhamento da Proliferação de Fungos em Frutos Fatiados

Odilio B. Garrido Assis¹

Sandra Protter Gouvêa²

Douglas de Britto³

Resumo

Neste trabalho apresentamos uma metodologia bastante simples, fazendo uso de um sistema comercial de captura de imagens, composto de um scanner de mesa que combinado a um programa livre (freeware) de análise de imagens, permite estabelecer qualitativa e quantitativamente a evolução da infestação por fungos (*Penicillium* sp) sobre frutos fatiados, sendo aqui avaliadas maçãs como exemplo. As imagens foram geradas duas vezes ao dia e transformadas em arquivo binário para quantificação. A quitosana, um polissacarídeo com ação fungicida, foi empregado na forma de uma película invisível permitindo assim análises comparativas. O método, embora extremamente simples, mostrou-se útil sendo indicado para avaliação e prevenção de contaminação de microorganismos em frutos minimamente processados.

Termos para indexação: Pós-colheita; análise de imagens; qualidade de minimamente processados, crescimento de fungos; quitosana

¹Físico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C. P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, e-mail: odilio@cnpdia.embrapa.br

²Bióloga, Dra., bolsista de pós-doutorado (FAPESP) junto ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar, São Carlos, SP. e-mail: spgms@hotmail.com

³Químico, Dr., bolsista de pós-doutorado (FAPESP) junto a Embrapa Instrumentação Agropecuária, e-mail: dougbritto@ig.com.br

A Simple Image Analysis Technique for Fungi Growth Assessment on Cut Fruits

Odilio B. Garrido Assis
Sandra Protter Gouvêa
Douglas de Britto

Abstract

In this work a simple image capture system comprising a commercial desktop scanner combined with free image analysis software was used to evaluate the evolution of fruit decay by fungi (*Penicillium* sp) infestation cut apple surfaces. The images were acquired twice a day and transformed in binary archive for quantitative analysis. The natural antifungal polysaccharide chitosan was used as a protective coating aiming at reducing the microorganism proliferation and allowing comparison between results for a set of samples. The main objective of this work was, however, to set a simple methodology based on non-expensive apparatus, useful for qualitative and preventive surveying of microorganism contamination on lightly processed fruits.

Index terms: Post-harvest ; image analysis; minimally processed fruits quality; fungi growth; chitosan.

Introdução

Segundo Barbosa-Cánovas et al. (2003), frutos e vegetais minimamente processados tem experimentado um crescimento significativo nos últimos anos. Embora o maior mercado em expansão seja o da China; a Índia e a América Latina apresentam igualmente demandas expressivas. Em particular o segmento de frutos frescos fatiados é o que mais cresce. Nos EUA este mercado já bem estabelecido e cresce a taxas de 15% ao ano (GORNY, 2005), com uma oferta de itens que chegam a 549 variedades de frutos e legumes processados ou de suas combinações (GLASER e THOMPSON, 2001). Na realidade a tendência de compra de produtos higienizados e prontos para o consumo é mundial, com potenciais gerais de crescimento da ordem de 30% ao ano (CARDWELL, 2005).

Os produtos minimamente processados, contudo, apresentam uma série de problemas. Durante descascamento, cortes ou mesmo transportes, injúrias são introduzidas nos tecidos e estes passam a se degradar mais rapidamente que os tecidos intactos. Assim, a qualidade das frutas armazenadas nessas condições requer um monitoramento constante, sendo este conduzido ou por métodos sensoriais ou diretamente (e evidentemente mais precisos) por análises químicas. O uso de métodos sensoriais como a inspeção visual tem a vantagem de ser não-invasiva, embora métodos precisos de quantificação por imagens ainda sejam complexos e passíveis de erros de interpretação.

Para frutos *in natura*, não processados, na literatura encontra-se uma série de processos de classificação baseados em análise de imagens, com precisões de variam de 60% (KLEYNEN et al., 2005) a 95% (UNAY e GOSSELIN, 2002). Em produtos cortados e processados, contudo, poucos estudos são apresentados. Nestes o escurecimento natural do pericarpo, seja por desidratação ou por reações enzimáticas, associado a contaminação por bactérias e fungos são as principais características de deterioração. Algumas metodologias, tendo por base a geometria fractal, têm sido propostas (COX et al., 1998; McINTYRE et al., 2001), mas estas são complexas e têm se mostrado eficientes principalmente com respeito a uma descrição das informações vinculadas à morfologia e fisiologia, muitas vezes não provendo uma informação rápida e útil ao controle de qualidade.

Neste trabalho, apresentamos uma metodologia simples para a análise do crescimento de colônia de fungos fazendo uso de um scanner comercial convencional e de um programa livre (freeware) de análise de imagens. Essa metodologia de baixa precisão, pode ser facilmente empregada para análise rápida e qualitativa em produtos com pericarpos claros, como por exemplo: pêras, pêssegos, melão, manga, goiabas, etc. Para validar o método empregamos aqui maçãs cortadas que foram intencionalmente contaminadas com *Penicillium* sp.

Conceitos Básicos de Análise de Imagens

Os princípios básicos de geração e análises de imagens têm sido extensivamente cobertos pela literatura, sendo uma boa revisão o trabalho apresentado por Brown, (1992). Em termos genéricos uma cor é definida por seu hue (H), saturação (S) e intensidade (I), algumas vezes sendo esta designada como "value". A hue está associada ao comprimento de onda dominante da luz capturada. A saturação é assumida como inversamente proporcional à quantidade de luz branca associada à hue, e a intensidade pode ser depreendida como a radiância média de uma área relativamente pequena dentro do cenário capturado. No processo de digitalização, tons analógicos contínuos são divididos em valores individuais de brilhos. Assim uma imagem assume uma representação numérica matricial de intensidade, que é a menor unidade gráfica e que só pode assumir uma única cor por vez, comumente referida como elemento de imagens ou pixel. Após a obtenção das imagens em uma distribuição bi-dimensional, níveis de brilhos em posições específicas de uma imagem analógica são registradas e subseqüentemente convertidas. A imagem resultante é assim um arranjo retangular de pixels.

A resolução espacial de uma imagem digitalizada é resultante da sensibilidade do dispositivo de captura (grabber). Os grabbers normalmente geram imagens com 586 linhas de 756 pixels. Para o padrão monocromático, a intensidade de padrão de captura é a transformação de 8-bits, o que corresponde a 256 tons de cinza, ou de brilhos, que vão do preto absoluto (0) ao branco (255). Normalmente a imagem após o processo de digitalização sofre um tratamento (threshold) reduzindo diferenças de tons, limitando o total de informação contida na imagem, o que possibilita um foco em características chaves. O resultado é uma imagem binária contendo apenas a silhueta dos objetos de interesse (para estes o valor do pixel é assumido como 1 e o fundo colocado como 0). A análise de imagens binarizadas tem sido uma ferramenta útil na identificação de diversos meios em ciências.

Contaminação de Maçãs por Fungos

De acordo com Pepeljnjak et al. (2002), a principal ocorrência de infestação por fungos em maçãs se dá pelo microorganismo *Penicillium expansum*. O *Penicillium expansum* não apenas causa uma degradação sistemática do fruto, mas igualmente produz a micotoxina patulina, que mesmo em pequenos níveis gera alterações no sabor. Os fungos do gênero *Penicillium* são considerados necrófagos e parasitários, ou seja, a infestação ocorre facilmente e se propaga através de lesões e ferimentos nos tecidos biológicos (CAPPELLINI et al., 1987). Poucas diferenças são encontradas entre as diversas espécies de *Penicillium* (AMIRI e BOMPEIX, 2005). De uma forma geral, após um curto período de incubação, os fungos tornam-se visíveis principalmente através dos ferimentos,

sépalas e caule. Embora a temperatura ótima para o crescimento do *Penicillium* sp. Seja em torno de 25°C, esporos podem infectar maçãs mesmo em baixas temperaturas e germinar durante armazenagem em temperaturas baixas como a 0°C (PEPELJNJAK et al., 2002).

Uma das principais características dos fungos é a produção de filamentos tubulares longos, chamadas de hifas, que crescem em um processo apical. As colônias terão assim uma estrutura de rede (micélio), em padrões facilmente identificáveis opticamente (COX et al., 1998).

Escurecimento por Oxidação ou por Ação Enzimática

A cor é um fator primordial na determinação da qualidade de frutos, seja *in natura* e principalmente dos processados. Diversos fatores ocorrem isolados ou simultaneamente causando alterações de cor nos tecidos biológicos. Estas alterações podem se dar através de reações de origem enzimáticas ou não-enzimáticas. Normalmente, o escurecimento de frutos ocorre em resposta a injúrias físicas e fisiológicas (impactos, abrasões, chilling, fatiamento, excesso de CO₂, etc.) e devido à oxidação de fenólicos (substâncias que apresentam um anel aromático com no mínimo um grupo hidroxílico). As ações enzimáticas se dão principalmente pela atividade da peroxidase (POX) e da polifenoloxidase (PFO) que atuam sobre uma variedade de substratos, que além dos fenólicos, tem ação sobre as aminas aromáticas, os naftóis e os metoxibenzenos, promovendo um colapso celular, que na presença do oxigênio gera o surgimento de substâncias coloridas em sua maioria em tons escuros (VILAS BOAS, 2000; CARNEIRO et al., 2003). Em condições adequadas, a velocidade de reação medida é proporcional à quantidade de enzima presente no extrato (MARSHALL et al., 2004). O escurecimento por oxidação por sua vez é um fenômeno decorrente da polimerização oxidativa das quinonas (BINDSCHEDLER et al., 2002).

Em ambos os casos, além de perdas na qualidade visual, as reações podem levar a uma perda de valor nutricional e afetar o sabor e o aroma, principalmente as decorrentes de ações enzimáticas (MARSHALL et al., 2004).

Quitosana Antifúngica

O polissacarídeo quitosana e seus derivados têm sido amplamente estudados e propostos como um material de grande potencial para aplicações como revestimentos protetores em alimentos (SHAHIDI et al., 1999). A quitosana é um polímero natural obtido a partir da desacetilação da quitina, fartamente encontrada na natureza. Sua estrutura básica são unidades repetitivas de beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) similar à estrutura da celulose.

A quitosana tem sido caracterizada como um excelente agente antimicrobiano, principalmente contra bactérias e fungos além de estimulador de formação de recuperação de tecidos injuriados (NO et al., 2002). As propriedades fungistáticas da quitosana são igualmente relacionadas com sua habilidade de induzir alterações morfológicas nas paredes celulares dos microorganismos (DEVLIEGHERE et al., 2004).

Como a quitosana forma um filme extremamente fino e transparente, este material foi empregado para o estabelecimento de dois conjuntos de amostras: uma de frutos cortadas e supostamente protegidos pelo revestimento por quitosana e outro conjunto com amostras não revestidas e naturalmente expostas à proliferação fúngica. Em ambos os lotes, a técnica de análise de imagens foi empregada avaliando a área infectada, com o objetivo de validar a técnica proposta.

Materiais e Métodos

Revestimento com quitosana

A quitosana empregada é de origem comercial, extraída de carcaça de camarões e fabricada pela Polymar, CE. O material em sua forma original é flocoso, ligeiramente amarelado e de média massa molar, com aproximadamente 60% ou mais de unidades desacetiladas. Inicialmente foi preparado um gel precursor pela dissolução em 100 mL de água destilada sob agitação magnética na temperatura ambiente. Ácido acético (0,5 M) foi continuamente adicionado para ajuste do pH a aproximadamente 5,0. A solução final, com 2% em peso de quitosana foi agitada brandamente até completa homogeneização (em torno de 2 horas).

Maçãs da cultivar Gala (*Malus domestica*) foram adquiridas em supermercados, fatiadas ao meio e separadas em 2 lotes com 20 amostras cada. O primeiro lote foi revestido com quitosana pela direta imersão dos frutos e secos ao ar após o escoamento do excesso de gel. O segundo lote não foi submetido a nenhum procedimento de proteção. A Fig. 1 ilustra a seqüência de deposição.

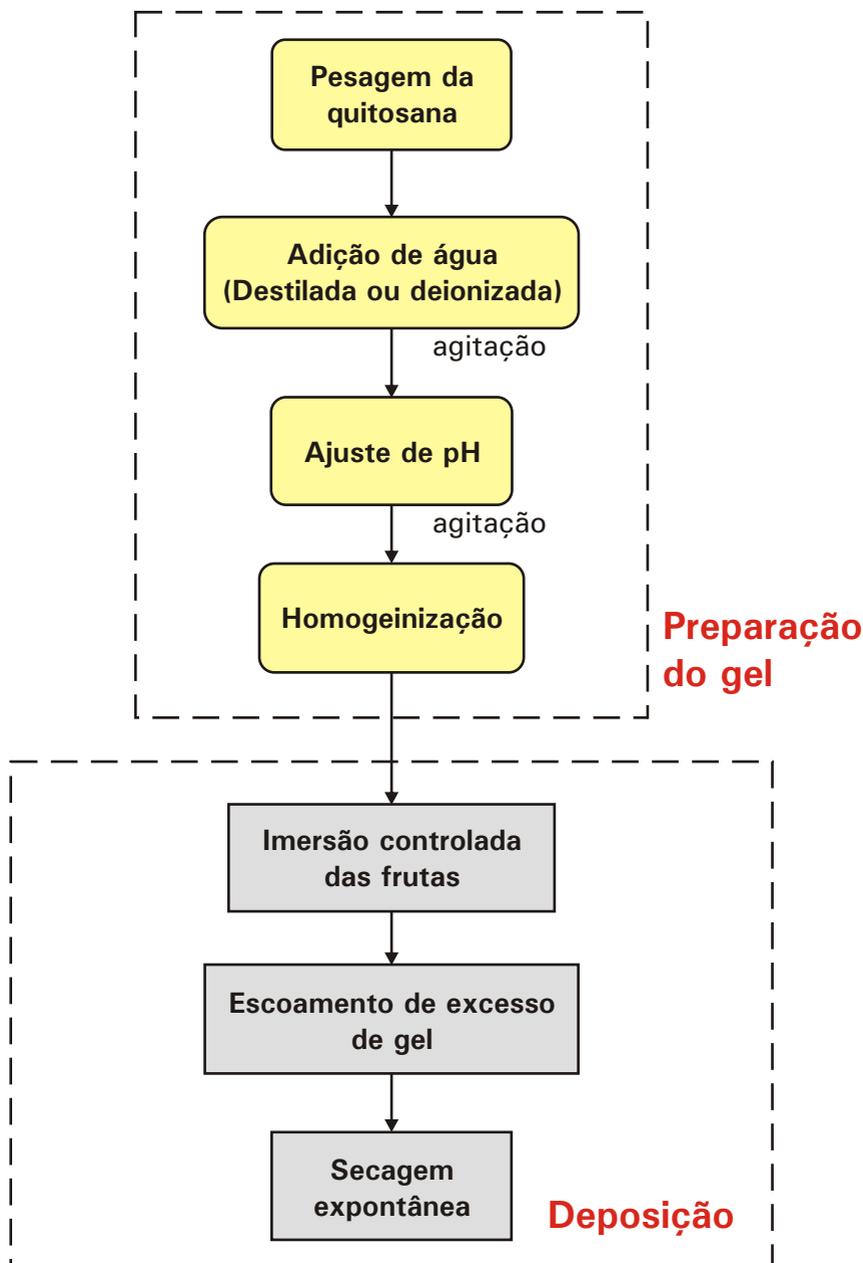


Fig. 1 Seqüência de preparação da solução antifúngica de quitosana e procedimento de revestimento dos frutos.

Preparação do inóculo

As amostras, revestidas e não revestidas, foram acondicionadas dentro de uma câmara climatizada (25 ± 0.5°C), na qual placas de petri (9 cm de diâmetro) contendo culturas de *Penicillium* sp. foram dispostas em posições equidistantes das frutas, com o objetivo de favorecer a inoculação espontânea através da contaminação ambiente. Os fungos foram originalmente isolados de maçãs contaminadas e as culturas preparadas em Agar dextrose (PDA) em pH 5,5 segundo procedimentos descritos por Zhang e Han (2003).

Captura das Imagens

Imagens das faces cortadas foram obtidas por varredura fazendo uso de scanner comercial (HP ScanJet 4C). Cada amostra foi escaneada duas vezes ao dia ao longo de 10 dias. Na captura das imagens, o tamanho original foi ampliado em 250%, para uma resolução de 512 por 512 pixels, em tons de cinza de 0 a 255. As imagens foram seqüencialmente armazenadas possibilitando o acompanhamento visual e quantitativo através da amostragem da evolução do escurecimento nas superfícies escaneadas, assumidas como proporcional ao crescimento das colônias de fungos.

Para tal avaliação, as imagens foram diretamente transportadas para o programa de análise de imagem e transformadas em arquivos binários (thresholded) para a remoção de artefatos e demais tonalidades que não são consideradas nas medidas. O crescimento foi assim considerado como bi-dimensional. O programa empregado foi o software livre Image Tool v.3 desenvolvido pela Universidade do Texas Health Science Center, UTHSCSA e disponível para download em <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>. A Fig. 2 apresenta aspecto da interface do programa Image Tool v. 03.

O escurecimento natural que ocorre nas superfícies de maçãs fatiadas, claramente assume padrões e tons distintos, sendo facilmente identificáveis e não considerados pelo menos nos primeiros 5-6 dias de observação. As colônias de fungos, por sua vez, se dispõem em uma estrutura de arranjos cilíndricos e claramente organizadas em redes freqüentemente em padrões simétricos. Para interpretações mais confiáveis, contudo, o thresholding foi calibrado manualmente, sendo adotado neste trabalho o nível de cinza em 130 para todas as imagens capturadas. A área infectada é então isolada e automaticamente estimada pela contagem de pixels e numericamente comparada com os valores precedentes. Ao longo do tempo de guarda e análise, o escurecimento natural (enzimático e oxidativo) torna-se mais intenso dificultando, a cada dia, uma perfeita distinção entre este escurecimento e a área infectada por fungos.

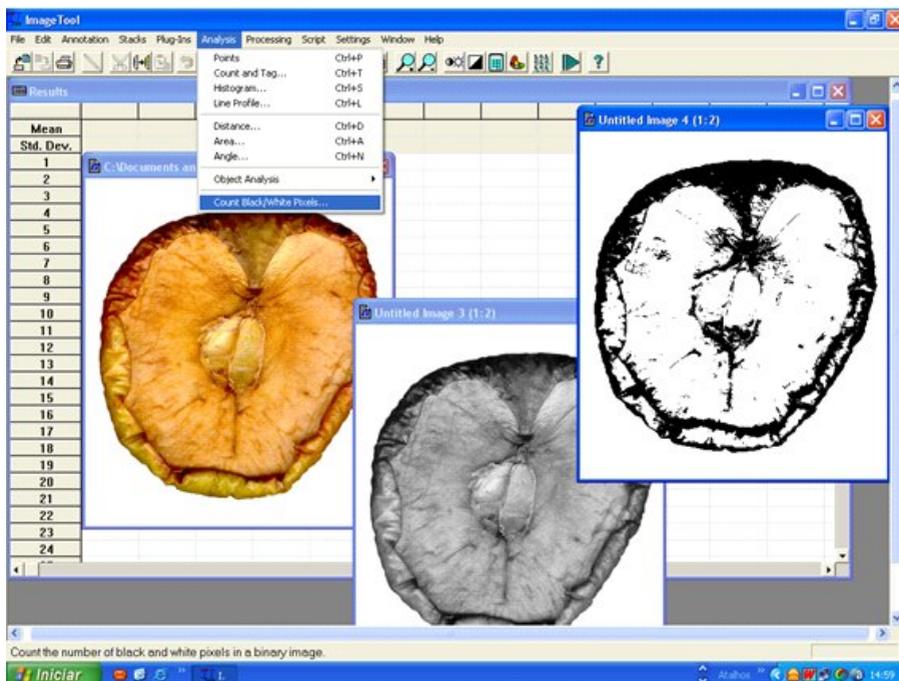


Fig. 2 Interface do programa de análise de imagens empregado (Image Tool v. 03) exemplificando a captura e tratamento de imagem.

Resultados e Discussão

Evolução da Contaminação por Fungos

A Fig. 3 exemplifica o procedimento de captura e tratamento de imagem em uma amostra contaminada e não revestida após 6 dias de exposição. O tratamento binário (threshold) possibilita a seleção de intervalos de tons, separando assim os objetos sobre consideração do fundo geral da imagem, o que permite a proporcional avaliação da área infectada.

Como comentado anteriormente, os fungos são microorganismos filamentosos que crescem em estruturas celulares tubulares, que se estendem por uma vesícula em um processo de crescimento do tipo apical. As colônias já estabelecidas são caracterizadas por agrupamentos de hifas altamente entrelaçadas e com densas massas. De acordo com Cox et al. (1998), a estrutura geral desses filamentos é constituída por um corpo vegetativo denso chamado talo ou soma, tornando-se menos denso e composto de finos filamentos unicelulares nas regiões mais externas. As hifas geralmente formam uma rede microscópica junto ao substrato (fonte de alimento), chamada micélio,

por onde o alimento é absorvido. De um modo geral este padrão permite uma fácil inspeção visual o que possibilita um acompanhamento localizado de sua evolução.

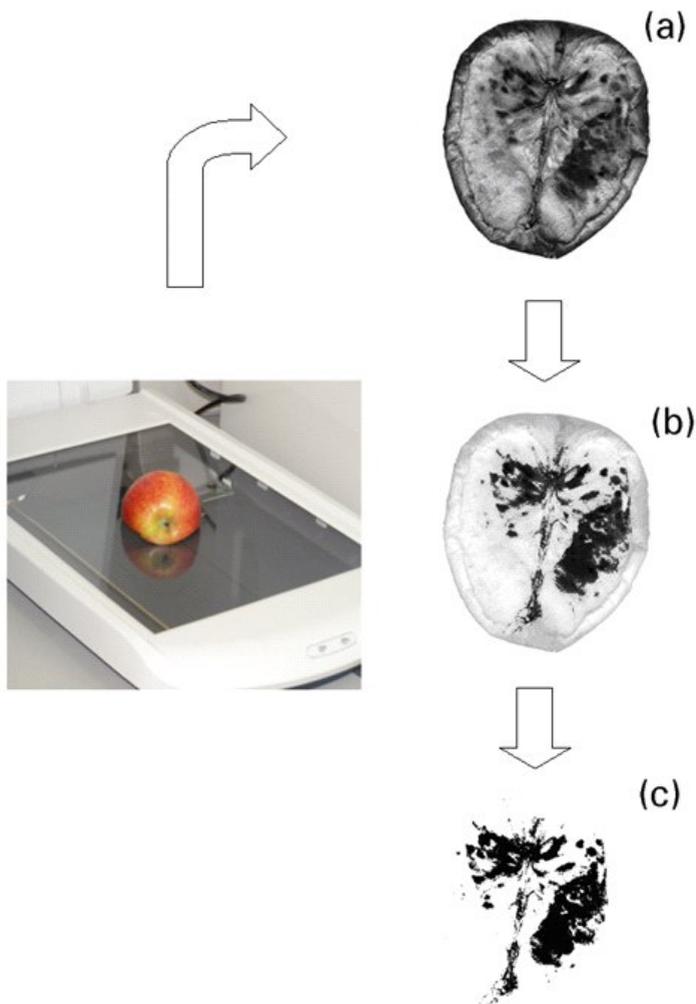


Fig. 3. Exemplo ilustrativo da captura e tratamento de imagem da superfície fatiada de uma maçã contaminada. Após a superfície de interesse ser escaneada, a imagem é gravada digitalmente e acessada diretamente pelo programa de análise (a). Os padrões característicos da infestação fúngica são reconhecidos e isolados (b), e a área proporcional, após binarização (threshold) é removida e automaticamente calculada (c). Neste exemplo a área infectada corresponde a 27,25 % da área total da superfície fatiada da maçã.

Neste sentido, os resultados indicam, como esperado, que as faces não protegidas por quitosana (fungicida natural), apresentam um crescimento e proliferação consideravelmente maior com o tempo que as amostras similares revestidas, conforme pode ser constatado pela Fig. 4. Para esta análise, foram consideradas contaminadas as superfícies que apresentavam uma área igual ou superior a 10% da total, com os padrões de fungos. Após 10 dias de registro de imagens é possível afirmar que 90% das amostras não revestidas estavam contaminadas comparadas a 40% das cobertas com filme de quitosana.

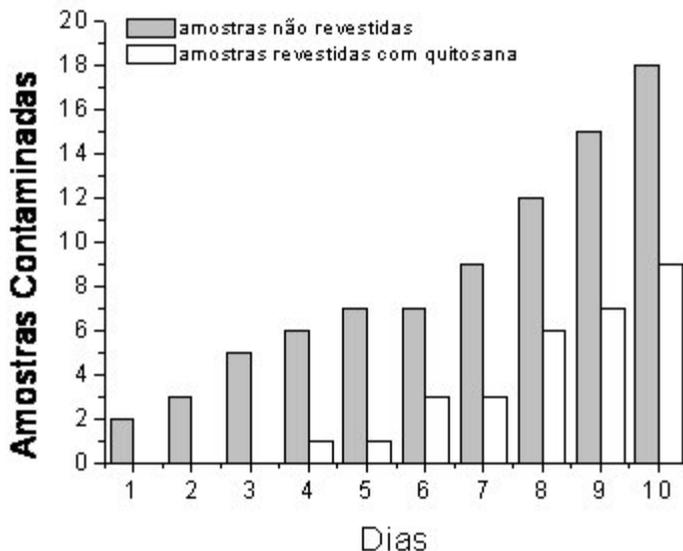


Fig. 4. Evolução do número de amostras infectadas ao longo de 10 dias de armazenamento em condições não controladas, de um total de 20 amostras em cada condição (revestidas e não revestidas com quitosana). Valores obtidos a partir das análises de imagens segundo procedimento descrito.

Considerações sobre a metodologia proposta

No procedimento experimental adotado, o programa de análise processa automaticamente a contagem dos pixels correspondente à área selecionada. Por comparação simples ao longo do tempo é possível estabelecer a tendência de proliferação que diretamente corresponde a cinética de crescimento dos fungos no meio inoculado, neste caso, no pericarpo das maçãs.

As áreas contaminadas medidas estão apresentadas na Fig. 5. Assim como no número de amostras, as superfícies recobertas por quitosana apresentaram uma menor área infectada, indicando uma redução da proliferação do *Penicillium* sp, principalmente ao longo dos 1-4 dias de exposição.

Os perfis dessas curvas definem claramente o padrão cinético de crescimentos encontrados para microorganismos, ou seja, constituintes de uma região lag, um região de crescimento exponencial e uma fase estacionária, em plena concordância com os dados apresentados na literatura (veja como comparação as cinéticas apresentadas por Viniegra-Gonzalez et al. (1993) e Olsson (2002). Esses dados ainda são numericamente próximos daqueles reportados através de análises químicas convencionais como os resultados apresentados por Leibinger et al. (1997), Kozlovsky et al. (2003) e por McKellar e Lu (2003).

Usualmente, as metodologias para a determinação de intensidade de contaminação fúngica em alimentos e produtos pós-colheita são conduzidas por determinações quantitativas das micotoxinas, em particular da patulina. A patulina é uma toxina resultante da atividade do *Penicillium* and *Aspergillus* sendo determinada de maneira essencialmente invasiva: a patulina é extraída através da ação de agentes polares como acetona ou etil acetatos e então acidificada. As toxinas são recuperadas com clorofórmio e as intensidades detectadas por técnica de cromatografia líquida (HPLC) (IHA e SABINO, 2006). Tal procedimento, embora mais preciso, impossibilita seguir o crescimento microbiano em uma única amostra.

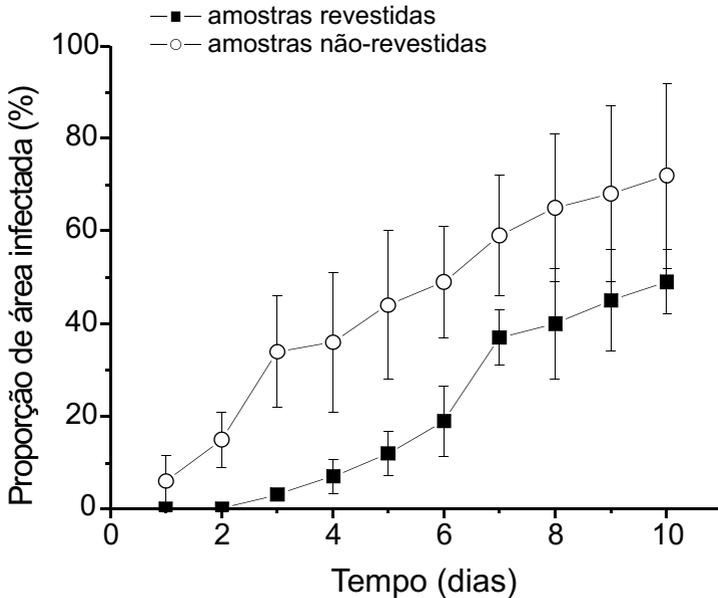


Fig. 5 Proporção de área infectada nas superfícies fatiadas em função do tempo de exposição, segundo dados obtidos por análise de imagens. A barra de erros representa o desvio padrão calculado sobre 20 imagens adquiridas para cada condição.

Deve ser observado que o cálculo de área por contagem de pixels não é um procedimento livre de erros. Considerando a transformação binária da imagem, informações são perdidas neste processo e a presença de bordas e classificação errônea de padrões de pixel podem ocorrer. A contagem de pixel é uma classificação automática e a área resultante é calculada independentemente do formato real do objeto focado, ou seja, a área estimada é baseada em um número finito de pixels e deve, indubitavelmente, estar sub ou sobre-estimada considerando que pontos diversos escapam do cálculo (VAN VLIET et al., 2004).

Com respeito ao escurecimento natural, seja por oxidação ou por ação enzimática, nos primeiros 5-6 dias esta coloração são claramente distinguíveis. Após este período, o escurecimento intensifica-se tornando difícil uma separação visual confiável. De qualquer forma, erros podem ser minimizados na maioria dos casos seja pelo aumento na sensibilidade do sistema e pela adoção de dispositivos e procedimentos idênticos em todas as seqüências de medidas. A prática do operador igualmente pode contribuir para a obtenção de medidas mais acuradas. É importante ser enfatizado que a proposta da presente metodologia não é estabelecer procedimentos para uma análise precisa do grau de infestação por fungos em frutos, mas apresentar uma metodologia simples e com recursos mínimos que possibilitam um acompanhamento temporal do crescimento da infestação.

Atividade antifúngica da quitosana

Considerando que a quitosana foi empregada como um agente antifúngico natural e invisível que permitiu a comparação entre imagens, cabe aqui breves comentários sobre sua atividade antifúngica. Esta atividade tem sido bem documentada na literatura sendo o modelo mais aceito o relacionado à natureza policatiônica do polissacarídeo que interage com sítios aniônicos presentes nas proteínas das paredes celulares dos microorganismos. Tal interação é mediada por forças eletrostáticas entre grupos NH_2 protonados presentes na quitosana e os resíduos negativos nas superfícies celulares. Essa troca iônica interfere diretamente na parede celular dos fungos causando alterações na permeabilidade nas membranas causando instabilidade osmótica (HADWIGER et al., 1981; TSAI e SU, 1999). Como resumidamente apresentado por Jung et al. (1999) os mecanismos atrás da atividade antimicrobiana da quitosana podem ser descritos como: (1) os grupos aminos positivamente carregados da quitosana ligam-se com ácidos siálicos nos fosfolipídios inibindo conseqüentemente o movimento de substâncias microbiais; (2) Oligômeros de quitosana penetram internamente nas paredes dos microorganismos e reduzem o crescimento das células pela inibição da transcrição de DNA em RNA (RABEA et al. 2003). A quitosana igualmente ativa enzimas como quitanases, β -glucanases e lipoxigensases, estimulando a geração de espécies reativas ao oxigênio, que inibem o crescimento de diversos patógenos.

Conclusões

A análise de imagens é uma ferramenta poderosa na avaliação da qualidade em alimentos. Por meio de uma montagem simples, uma avaliação qualitativa e em tempo real do crescimento microbiano pode ser satisfatoriamente conduzida. A metodologia é pode ser aperfeiçoada pelo uso de novos equipamentos ou por programas mais complexos.

Referências

AMIRI, A.; BOMPEIX, G. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. **Plant Pathology**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 74-81, Feb., 2005.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; FERNÁNDEZ-MOLINA, J. J.; ALZAMORA, S. M.; TAPIA, M. S.; LÓPEZ-MALO, A.; CHANES, J. W. **Handling and Preservation of Fruits and Vegetables by Combined Methods for Rural Areas**. Rome: FAO, 2003. 106 p. (Technical Manual FAO Agricultural Services Bulletin, 149). ISBN 9-25-104861-4.

BINDSCHEDLER, L. F.; BLEE, K. A.; BUTT, V. S.; DAVIES, D. R.; GARDNER, S. L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a threecomponent system. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p.1357- 1376, 2002.

BROWN, L. G. A Survey of Image Registration Techniques. **ACM Computing Surveys**, New York, v. 24, nº 4, p. 325-376, Dec. 1992.

CAPPELLINI, R. A.; CEPONIS, M. J.; LIGHTNER, G. W. Disorders in apple and pear shipments to the New York market. **Plant disease**, Saint Paul, v. 7, p. 852-856, 1987.

CARDWELL, M. Fresh-cut sales shoot up like weeds. **Food in Canada**, Toronto, p. 24-30, July/Aug., 2005.

CARNEIRO, C. E. A.; ROLIM H. M. V.; FERNANDES, K. F. Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 189-193, 2003.

COX, P. W.; PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. **Microbiology**, Reading, v. 144, p. 817-827, 1998.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN A.; DEBEVERE J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, London, v. 21, n° 6, p. 703-714, Dec., 2004.

GLASER, L. K.; THOMPSON, G. D. The U.S. lettuce and fresh-cut vegetable industries: Marketing channels, sales arrangements, fees, and services. **Vegetables and Specialties Situation and Outlook**, [S. l.], VGS-283, p. 36-43, Apr. 2001. Economic Reseach Service/USDA.

GORNY, J. R. Leveraging innovative fresh-cut technologies for competitive advantage. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 687, p. 141-148, 2005.

HADWIGER, L. A.; BECKMAN, J. M.; ADAMS, M. J. Localization of fungal components in the pea *Fusarium* interaction detected immunochemically with anti-chitosan and anti-fungal cell wall antisera. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 67, n. 1, p. 170-175, Jan., 1981.

IHA, M. H.; SABINO, M. Determination of Patulin in apple juice by liquid chromatography. **Journal of Aoac International**, Arlington, v. 89, n. 1, p. 139-143, Jan./Feb., 2006.

JUNG, B-O; KIM, C-H.; CHOI, K-S.; LEE, Y. M.; KIM, J-J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 72, n. 13, p. 1713-1719, Apr., 1999.

KLEYNEN, O.; LEEMANS, V.; DESTAIN, M.-F. Development of a multi-spectral vision system for the detection of defects on apples. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 69, n. 1, p. 41-49, Jul. 2005.

KOZLOVSKY, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ADANIN, V. M.; ANTIPOVA, T. V.; OZERSKAYA, S. M.; IVANUSHKINA, N. E.; GRAFE, U. *Penicillium aurantiogriseum Dierckx 1901*: Producer of Diketopiperazine Alkaloids (Roquefortine and 3,12-Dihydroroquefortine), Isolated from Permafrost. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 39, n. 4, p. 393-397, July, 2003.

LEIBINGER, W.; BREUKER, B.; HAHN, M.; MENDGEN, K. Control of Postharvest Pathogens and Colonization of the Apple Surface by Antagonistic Microorganisms in the Field. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 11, p. 1103-1110, 1997.

MARSHALL, M. R.; KIM, J.; WEI, C. I. **Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods.**, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 06 fev. 2007.

McKELLAR, R. C.; LU, X. (Ed.). **Modeling microbial Response in Foods**. Oxford: CRC Press, 2003. 360 p. ISBN 0-84-931237-X.

McINTYRE, M.; EADE, J. K.; COX, P. W.; THOMAS, C. R.; WHITE, S.; BERRY, D. R.; McNEIL, B. Quantification of autolysis in *Penicillium chrysogenum* by semiautomated image analysis. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 4, p. 315-321, Apr., 2001.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. I. P. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 1-2, p. 65-72, Mar., 2002.

OLSSON, S. Colonial Growth of Fungi. In: HOWARD, R. J.; GOW, N. A. R. (Ed.). **The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research**. 1st ed. New York: Springer; 2002. v. 3. chap. 6. p. 125-144. ISBN 3-540-60186-4.

PEPELJNJAK, S.; ŠEGVIĆ, M.; OŽEGOVIĆ, L. Citrininotoxigenicity of *penicillinum* ssp. Isolated from decaying apples. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 134-137, Apr./June, 2002.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E-T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, Nov./Dec., 2003.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y-J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 37-51, Feb., 1999.

TSAI, G-J.; SU, W-H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 3, p. 239-243, Mar., 1999.

UNAY, D.; GOSSELIN, B. Apple Defect Detection and Quality Classification with MLP-Neural Networks, In: **Annual Workshop on Circuits, Systems and Signal Processing**. [S. l.: s. n., 2002]. p. 501-506. Proceedings of PRORISC'2002, 13th., 28th-29th Nov., 2002, Veldhoven, Netherlands.. ISBN 9-07-346133-2.

VAN VLIET, L. J.; VERBEEK, P. W.; YOUNG, I. T. Quantitative Imaging: How to Measure Size Features in Digitized Images. In: **IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro**. Piscataway: IEEE Press, 2004. p. 1227-1230 Proceedings of The ISBI'04, 15th-18th April, 2004, Arlington, USA.

VILAS BOAS, E. V. B. **Aspectos Fisiológicos do Desenvolvimento de Frutos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 75 p. (Textos Acadêmicos).

VINIEGRA-GONZALEZ, G.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LÓPEZ-ISUNZA, F.; FAVELA-TORRES, E. Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 42, n. 1, p. 1-10, June, 1993.

ZHANG, M.; HAN, T. Insecticidal and Fungicidal Activities of Chitosan and Oligo-chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [Virginia], v. 18, n. 5, p. 391-401, Sep., 2003.