

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

**Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio
Anais do V Workshop 2009**

**Odílio Benedito Garrido de Assis
Wilson Tadeu Lopes da Silva
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Editores**

**Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2009**

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) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
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

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Capa: Manoela Campos e Valentim Monzane
Imagem da Capa: Imagem de AFM de nanofibra de celulose - Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Manoela Campos e Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 200

Todos os direitos reservados.

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

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

Anais do V Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao
agronegócio 2009 - São Carlos: Embrapa Instrumentação
Agropecuária, 2009.

Irregular
ISSN: 2175-8395

1. Nanotecnologia - Evento. I. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
II. Silva, Wilson Tadeu Lopes da. III. Mattoso, Luiz Henrique
Capparelli. IV. Embrapa Instrumentação Agropecuária

© Embrapa 2009



USO DE ANÁLISE DE IMAGENS NO ACOMPANHAMENTO DO CARÁTER FUNGISTÁTICO DE REVESTIMENTOS DE QUITOSANA EM MAÇÃS FATIADAS

Odilio B.G. Assis, Douglas de Britto

Embrapa Instrumentação Agropecuária, 13560-970, São Carlos/SP odilio@cnpdia.embrapa.br

Projeto Componente: PC3

Plano de Ação: 01.05.1.01.03.03

Resumo

Neste trabalho fazemos uso de uma metodologia simples, tendo por base 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 sobre frutos fatiados, sendo aqui avaliadas maçãs como exemplo. *Penicillium sp* e *Alternaria sp.* foram usados como contaminantes. A quitosana, um polissacarídeo com ação fungicida, foi empregado na forma de uma película invisível permitindo assim análises comparativas. O método, embora consideravelmente simples, mostrou-se útil sendo indicado para avaliação e prevenção de contaminações de microorganismos em frutos minimamente processados.

Palavras-chave: contaminação fúngica, filmes comestíveis, qualidade de minimamente processados.

Introdução

O segmento de frutos frescos minimamente processados e prontos para o consumo é o que mais cresce em escala mundial. No Brasil, embora ainda incipiente o mercado de minimamente processados dá claros sinais de avanço e tem se consolidado paulatinamente. Frutos processados apresentam uma série de problemas que o levam a degradar mais rapidamente que os produtos intactos. Para estes, o uso de agentes antimicrobianos que não alterem a aparência ou sabor é desejável. Materiais diversos têm sido propostos para uso como revestimentos comestíveis protetores. A quitosana, por exemplo, um polímero linear derivado da quitina, tem sido indicada como um material para este fim. A quitosana é atóxica e forma filme transparente, que além de ação antimicrobiana apresenta atividade clarificadora e reduz a permeação de gases. tendo sido já aplicada com sucesso em vários produtos *in natura*.

Para a validação destes revestimentos, os produtos têm que serem monitorados durante o armazenamento e comercialização e o uso de métodos sensoriais como a inspeção e controle visual têm a vantagem de serem não-invasivos, embora métodos precisos de quantificação por imagens ainda sejam complexos e passíveis de erros de interpretação. Neste trabalho, apresentamos uma metodologia simples para a análise do crescimento de colônias de fungos, sobre superfícies cortadas revestidas, fazendo uso de um scanner comercial convencional e de um programa livre de análise de imagens. Essa metodologia de baixa precisão é, contudo, prática e pode ser facilmente empregada para um monitoramento rápido e qualitativo de produtos com pericarpos claros como por exemplo: pêras, pêssegos, melão, manga, goiabas, etc.

Materiais e métodos

Maçãs da cultivar Gala (*Malus domestica*) foram fatiadas ao meio e separadas em 2 lotes com 20

amostras cada. Os lotes foram acondicionados em câmara climatizada ($25 \pm 0.50^{\circ}\text{C}$) contendo culturas de fungos não classificados, (espécies do gênero *Penicillium sp.* e *Alternaria sp.*) sendo a inoculados por esporulação espontânea. Os fungos foram originalmente isolados de maçãs contaminadas e as culturas preparadas segundo procedimentos descritos por ZHANG & HAN, 2003.

A proteção se deu por imersão total dos frutos em solução de quitosana segundo procedimento corrente do grupo. Imagens das faces cortadas foram obtidas por varredura fazendo uso de scanner comercial (HP ScanJet 4C). Cada amostra foi varrida 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 armazenadas possibilitando o acompanhamento da evolução do escurecimento nas superfícies assumidas como proporcional ao crescimento das colônias de fungos.

No programa de análise, as imagens foram transformadas em arquivos binários (*thresholded*) para a remoção de artefatos e demais tonalidades que não são consideradas nas medidas. O crescimento foi 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>.

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. Para interpretações mais confiáveis 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.

Resultados e discussão

A Figura 1 exemplifica o tratamento binário (*threshold*) realizado que possibilita a seleção de intervalos de tons, separando assim os objetos sobre consideração do fundo geral da imagem, o que permite o isolamento e a proporcional avaliação da área infectada. Os resultados numéricos indicam, como esperado, que as faces não protegidas apresentam proliferação consideravelmente maior com o tempo que as amostras similares revestidas, conforme pode ser constatado pela Figura 2.

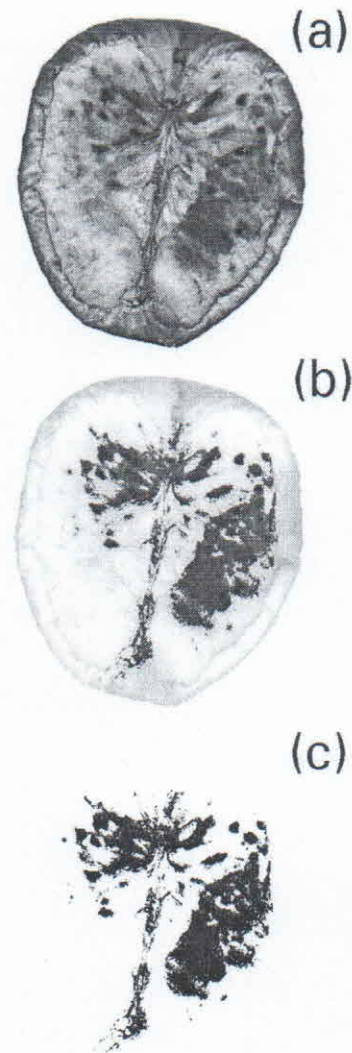


Fig. 1. Exemplo ilustrativo do tratamento de imagem da superfície contaminada de uma maçã fatiada.

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. O programa de análise processa automaticamente a contagem dos pixels correspondente à área selecionada. Por comparação simples é possível estabelecer a tendência de proliferação que diretamente corresponde à cinética de crescimento dos fungos no meio inoculado, neste caso, no pericarpo das maçãs (Fig. 3).

O perfil da curva resultante define 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 (VINIEGRA-GONZALEZ, et al., 1993; OLSSON, 2002).

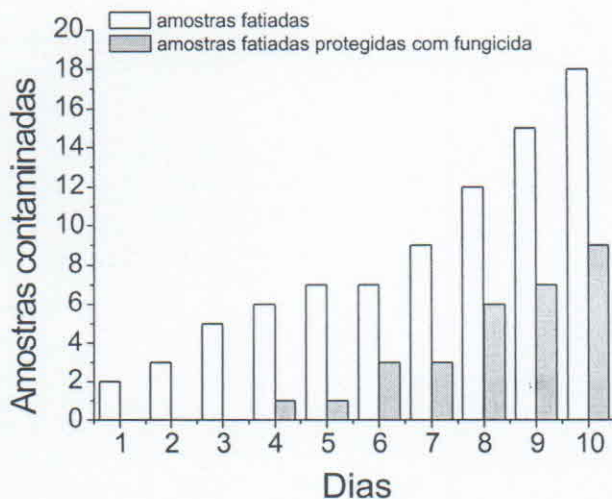


Fig. 2. Evolução do número de amostras infectadas ao longo de 10 dias de armazenamento.

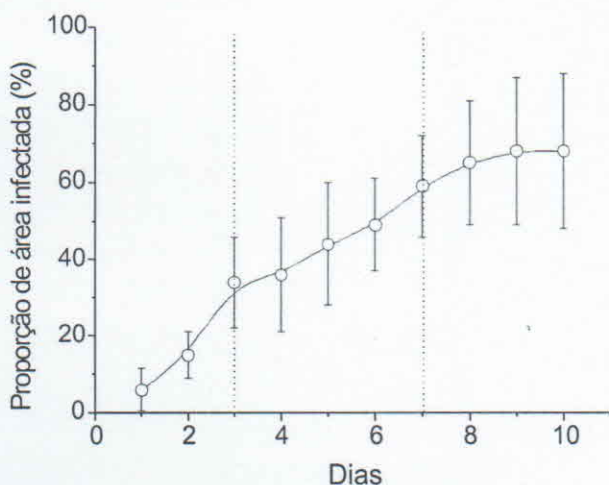


Fig. 3. Proporção de área infectada nas superfícies em função do tempo de exposição, segundo dados obtidos por análise de imagens.

Usualmente, as metodologias para a determinação de intensidade de contaminação fúngica em produtos pós-colheita são conduzidas por determinações quantitativas das micotoxinas, em particular da patulina. A patulina é uma toxina 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.

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 baseada em um número finito de pixels e deve, indubitavelmente, estar sub ou sobre-estimada considerando que pontos diversos escapam do cálculo (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.

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.

Agradecimentos

CNPq, FINEP/MCT, EMBRAPA.

Referências

- IHA, M.H.; SABINO, M. Determination of patulin in applejuice by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 89, n. 1, p. 139-143, 2006.
- 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**. New York: Springer, 2002. v. 3. cap. 6. p. 125-144.
- VLIET, L. J. van; 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, IEEE Press, 2004.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LÓPEZ-ISUNZA, F.; FAVELATORRES, E. Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 42, n. 1, p. 1-10, 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, 2003.