



JULIANA ALVARENGA ALVES

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO BIOSPECKLE
LASER COM ABORDAGEM ESPECTRAL EM
CENOURA MINIMAMENTE PROCESSADA**

**LAVRAS-MG
2012**

JULIANA ALVARENGA ALVES

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO BIOSPECKLE LASER COM
ABORDAGEM ESPECTRAL EM CENOURA MINIMAMENTE
PROCESSADA**

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

Orientador

Prof. Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas

Coorientador

Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior

**LAVRAS -MG
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Alves, Juliana Alvarenga.

Aplicação da técnica do biospeckle laser com abordagem
espectral em cenoura minimamente processada / Juliana Alvarenga
Alves. – Lavras : UFLA, 2012.

73 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Eduardo Valério de Barros Vilas Boas.

Bibliografia.

1. *Daucus carota* L. 2. Taxa respiratória. 3. Transformada de
wavelets. 4. Atividade de água. 5. Atividade fisiológica. I.

Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.80513

JULIANA ALVARENGA ALVES

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO BIOSPECKLE LASER COM
ABORDAGEM ESPECTRAL EM CENOURA MINIMAMENTE
PROCESSADA**

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

APROVADA em 16 de março de 2012.

Dr. Roberto Alves Braga Júnior	UFLA
Dra. Ana Carla Marques Pinheiro	UFLA
Dr. Jaime Vilela de Resende	UFLA
Dra. Brígida Monteiro Vilas Boas	IFSULDEMINAS Campus Machado

Orientador

Prof. Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas

**LAVRAS -MG
2012**

*"O coração do homem traça o seu caminho,
mas o SENHOR lhe dirige os passos"
Provérbios 16:9*

Ao meu Deus,

Ao meu esposo, Cristiano;

Aos meus pais, Sônia e Zezé;

Aos meus irmãos, André e Fernando;

À minha avó, Dalva;

Ao meu sobrinho, Pedro;

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, exalto e glorifico a Deus, pela concretização deste trabalho. Agradeço ao Senhor por ter colocado em minha vida pessoas que muito contribuíram para esta conquista, e principalmente, por iluminar meus passos e me fortalecer espiritualmente nos momentos difíceis e pela certeza de que, com Ele ao meu lado, nenhum obstáculo é intransponível.

Àqueles a quem dediquei este trabalho, reforço meu carinho e eterno AMOR.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos, à Fapemig e à CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas, pela orientação e confiança em mim depositada e pelos ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e para meu crescimento profissional.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior, pela sua prestimosa ajuda, pelo apoio, atenção e disponibilidade incondicional em todos os momentos em que precisei e por ter me oferecido condições para desenvolver este trabalho no CEDIA (Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada à Agropecuária) da UFLA, meus sinceros agradecimentos.

Ao professor Dr. Jaime Vilela de Resende, e às professoras Dra. Ana Carla Marques Pinheiro e Dra. Brígida Monteiro Vilas Boas por se disporem a participar como membros na banca examinadora.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças, Rita Nassur, Susana Chitarra, Camila Fante, Carol Pires, Ana Clara, Juliana Lima, Heloisa Siqueira, ao Paulo Siriano e Andréa Xisto, pela convivência, momentos de descontração e longas horas de convívio, meus agradecimentos.

Aos estudantes do CEDIA, Isis Amaral, Murilo Risso e ao Anderson Costa, pelo apoio durante a etapa de iluminação das amostras. Ao Henrique Barbosa e ao Rafael Cardoso, meus sinceros agradecimentos pela elaboração dos Programas para processamento das imagens. Ao Sr. Antonio agradeço pela paciência e pela companhia.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho chegasse ao fim.....

Muito Obrigada!!!!!!!!!!!!!!

RESUMO GERAL

A explicação física do fenômeno *biospeckle* é bem conhecida. No entanto, ainda é desconhecido qual tipo de processo biológico é a base deste fenômeno, o que limita a sua aplicação como uma técnica não destrutiva, para avaliação da qualidade de alimentos. Fisicamente, *biospeckle* é o resultado da dispersão de luz coerente sobre partículas em movimento em tecidos vivos. Objetivou-se, neste trabalho, estudar o potencial da técnica do *biospeckle* laser, associada à análise de frequência como uma ferramenta para determinar mudanças fisiológicas em cenouras minimamente processadas armazenadas, em duas diferentes temperaturas, 0 °C e 10 °C. Foram utilizados um laser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm e 10 mW de potência), uma câmera filmadora digital e um computador. Os padrões de interferência foram coletados a partir da configuração experimental baseada no *backscattering* e o registro da história temporal foi realizado por meio do THSP (*Time History Speckle Patterns*). Para a quantificação das variações do padrão do *biospeckle*, utilizou-se o Momento de Inércia. A transformada de *wavelets* foi utilizada para o processamento das imagens obtidas pelo THSP, no domínio da frequência. Conclui-se que, usando o *biospeckle* laser e a abordagem no domínio da frequência, é possível identificar diferentes níveis de atividade e avaliar, de forma não destrutiva, a expressão da atividade de água e da taxa respiratória, separadamente, em cenouras minimamente processadas, armazenadas à 0°C e 10°C

Palavras-chave: *Biospeckle* laser. Transformada de *wavelets*. Atividade de água. Taxa respiratória. Processamento mínimo. Cenoura.

GENERAL ABSTRACT

The physical explanation of the phenomenon biospeckle is well known, however, still unknown type of process is the biological basis for this phenomenon, which limits the possible application of the method as a new non-destructive technique for assessing the quality of foods. Physically, biospeckle is the result of coherent light scattering particles on movement of living tissues. The objective of this study was to investigate the potential of the technique of laser biospeckle associated with the frequency analyze as a tool to determine physiological changes in fresh-cut carrots stored at two different temperatures, 0 °C and 10 °C. We used He-Ne laser ($\lambda = 632.8$ nm and 10 mW), a CCD camera and a computer. The interference patterns were collected from the experimental setup based on backscattering and the record of temporal history was made through the THSP (Time History Speckle Paterns). To quantify the variations of the standard biospeckle was used the inertia moment (IM). The wavelet transform was used for processing of images obtained by THSP in the frequency domain. We conclude that, using the laser biospeckle and the approach in the frequency domain, it is possible to identify different areas of activity and non-destructively assess the expression of water activity and respiration rate separately, in fresh-cut carrots stored at 0°C and 10°C.

Keywords: Biospeckle laser. Wavelet transform. Water activity. Respiration rate. Fresh-cut. Carrots.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO GERAL 10
2	REFERENCIAL TEÓRICO 13
2.1	Frutas e hortaliças 13
2.2	Cenoura 14
2.3	Processamento mínimo 16
2.4	Métodos não destrutivos na análise de alimentos 18
2.5	Interação da luz com o tecido vegetal 19
2.6	O laser – considerações gerais 23
2.7	<i>Biospeckle</i> laser 24
2.7.1	Métodos de análise do biospeckle laser.....28
2.7.1.1	História temporal dos padrões de speckle 28
2.8	Análise no domínio da frequência 33
2.9	Estudos com <i>biospeckle</i> laser 36
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS 39
	REFERÊNCIAS..... 40
	SEGUNDA PARTE- ARTIGO..... 49
	ARTIGO: Identification of different physiological phenomena in fresh-cut carrots using biospeckle laser and frequency approach .. 50

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Frutas e hortaliças minimamente processadas têm se tornado mais populares recentemente, em resposta a um aumento da procura por parte dos consumidores por alimentos de preparo rápido ou prontos para o consumo (KOUKOUNARAS; DIAMANTIDIS; SFAKIOTAKIS, 2008). A Internacional Fresh-Cut Produce Association - IFPA (2012) define produtos minimamente processados como "qualquer fruta ou hortaliça, ou a combinação dessas, que foi fisicamente alterada a partir de sua forma original, mas permanece em um estado fresco".

Vários estudos têm sido realizados para acompanhar a vida de prateleira de frutas e hortaliças minimamente processadas usando métodos químicos, físicos e microbiológicos (CORBO; NOBILE; SINIGAGLIA, 2006) além de modelos matemáticos para estimar a estabilidade microbiana, a qualidade química e sensorial (LAURIDSEN; KNØCHELL, 2003; LAVELLI et al., 2006; MONTERO-CALDERON; ROJAS-GRAÜ; MARTIN-BELLOSO, 2008; RIVA; FRANZETTI; GALLI, 2001; ROCHA; MORAIS, 2003; ZANONI et al., 2007).

Métodos tradicionais são usados com sucesso para estudar a vida de prateleira de frutas e hortaliças minimamente processadas, mas eles são caros, lentos, exigem capacidade analítica considerável e não são adequados para automação. Rápidos, os métodos não destrutivos para investigar a perda do frescor dos produtos alimentares aumentaram recentemente em importância. A espectroscopia no infravermelho (IR), tanto nas regiões do infravermelho próximo (NIR) como no infravermelho médio (MIR), é uma das mais convenientes ferramentas analíticas que têm sido usadas para estudar a vida de prateleira de alimentos (COATES, 2000).

Outro método que está surgindo como ferramenta de medição não destrutiva e não invasiva da qualidade de frutos é o método que se baseia na interpretação de um fenômeno óptico que ocorre ao se incidir luz coerente sobre o vegetal. A luz de um *laser*, ao incidir sobre um material que exibe algum tipo de atividade, dá origem a um fenômeno referido na literatura como *biospeckle* ou *speckle* dinâmico. Esse fenômeno é resultado de alterações na fase da luz incidente, produzidas por movimentos de pontos dispersores e mudanças no índice de refração. Com o uso de modelos matemáticos e estatísticos é possível quantificar-se a variação temporal do *biospeckle*, possibilitando a obtenção de informações capazes de estimar a atividade fisiológica do material sob estudo. Essas variáveis são utilizadas como indicadores de qualidade e senescência de vegetais e são comparadas com outras variáveis tais como: sólidos solúveis, acidez titulável, firmeza e tempo de armazenamento.

A técnica do *biospeckle* laser tem como principais virtudes o fato de não ser destrutiva e não necessitar de contato, além de possuir alta sensibilidade, quando comparada aos processos mecânicos convencionais, permitindo uma visualização da atividade do alimento em tempo real.

A combinação de sistemas de aquisição e processamento digital de imagem modernos constitui uma ferramenta importante para os pesquisadores desenvolverem novas técnicas para avaliação da qualidade de produtos vegetais de forma não destrutiva. A utilização do *biospeckle* na área biológica tem sido uma linha de grande potencial, porém ainda pouco explorada na indústria. A complexidade envolvida na constituição e na atividade fisiológica de materiais biológicos, como por exemplo as frutas e as hortaliças, gera uma situação que impede a correlação de cada fenômeno interno aos tecidos vegetais iluminados com a atividade observada pelo *biospeckle*.

Assim, a técnica do *biospeckle* laser permite a identificação da atividade do material, mas não permite distinguir ainda em muitas aplicações quais

processos fisiológicos são os principais responsáveis pela atividade observada. De acordo com Kurenda, Adamiak e Zdunek (2012) e Zdunek e Herppich (2012), há uma falta de interpretação fisiológica/metabólica, o que limita uma possível aplicação do método como uma nova técnica não destrutiva para avaliação da qualidade dos frutos.

No cenário atual, é importante ter como alternativa alguma ferramenta matemática que possa, de um modo mais criterioso e científico, extrair o maior número de informações de um conjunto de dados ou imagens. É notório, nos diversos segmentos da ciência, o crescimento tecnológico e científico manifestado pela utilização, cada vez mais frequente, de recursos computacionais.

A transformada de *wavelets*, atualmente tem facilitado a compreensão, transmissão e análise de muitas imagens, constituindo-se a base de uma nova e poderosa abordagem ao processamento e análise de sinais (GONZALEZ; WOODS, 2010). Uma das características da transformada de *wavelets* é sua capacidade de abrir o sinal nas diversas frequências que o compõem em relação ao domínio do tempo e permitir a reconstrução desse de forma integral, ou sem as faixas de frequências que se desejam filtrar. Ao abrir o sinal de imagens geradas pela técnica do *biospeckle* laser, em diversas frequências que o compõem, é possível identificar detalhes em cada frequência e avaliar em que medida a atividade observada resulta de processos fisiológicos nos tecidos da fruta, e ainda inferir quais são os principais fenômenos responsáveis pela atividade observada.

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar o potencial do *biospeckle* laser associado a análises no domínio da frequência, para a determinação das alterações fisiológicas em cenouras minimamente processadas, armazenadas à 0°C e 10°C, visando o desenvolvimento dessa metodologia na análise de frutas e hortaliças. De forma específica, o trabalho buscou isolar fenômenos como a

atividade de água e a taxa respiratória e associá-los aos sinais vindos do *biospeckle*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Frutas e hortaliças

No Brasil, embora haja grande disponibilidade de frutas e hortaliças acessíveis a substancial parcela da população, observa-se níveis inaceitáveis de perdas de alimentos devido a técnicas inadequadas adotadas desde a colheita até o armazenamento.

Uma dieta rica em frutas e hortaliças pode ser considerada como uma ferramenta importante para prevenir determinadas doenças degenerativas, ainda que, na atualidade, o consumo desses alimentos seja baixo com respeito às recomendações em que estão baseadas as dietas denominadas saudáveis (CANO et al., 2005). No entanto, mudanças nos padrões de consumo de alimentos têm levado ao maior consumo de frutas e hortaliças em detrimento dos produtos industrializados. Enfatizando-se que os consumidores buscam por alimentos saudáveis, que tenham qualidade adequada e praticidade (ALVES et al., 2010).

Frutas e hortaliças são biologicamente variáveis e apresentam alta perecibilidade (BOBELYN et al., 2010; JOHNSTON; HEWETT; HERTOOG, 2002). Desse modo, existe uma necessidade de avaliar-se a qualidade desses vegetais em diferentes estádios pré- e pós-colheita, a fim de fornecer produtos com a melhor qualidade para o consumo direto ou mesmo para o posterior processamento (KURENDA; ADAMIAK; ZDUNEK, 2012).

2.2 Cenoura

A cenoura (*Daucus carota* L.), planta da família das Apiáceas, produz uma raiz aromática e comestível, caracterizando-se como uma das mais importantes hortaliças, pelo seu grande consumo em todo mundo, pela extensão de área plantada e pelo grande desenvolvimento sócioeconômico dos produtores rurais. É também uma das hortaliças mais cultivadas no Brasil.

A cenoura é uma hortaliça de cultivo anual, cuja parte comestível é uma raiz aromática, tuberosa, lisa, carnuda, reta e sem ramificações, podendo ter formato cônico ou cilíndrico. As principais variedades se distinguem ainda pela coloração externa, coloração da rama e época de plantio (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2003).

Além de possuir um sabor muito apreciado por pessoas de todas as idades devido aos seus componentes voláteis, açúcares, compostos amargos e aminoácidos livres, a cenoura também é uma grande fonte de carotenóides, fibras, vitaminas, minerais e outros componentes bioativos, proporcionando uma série de benefícios para a saúde do consumidor (TEIXEIRA, 2008).

A cenoura é uma das principais fontes de origem vegetal em carotenóides provitamínicos A, especialmente o α e o β -caroteno que podem ser transformados em vitamina A dentro do organismo animal (LIMA et al., 2001).

A composição química da cenoura varia de acordo com a variedade, solo, época de plantio, etc. Em média, a composição química da cenoura, em g por 100g, é: umidade 88,20 a 95,55; proteínas 0,44 a 1,3; lipídios 0,19 a 0,50; cinzas 0,3 a 0,99; carboidratos 3,51 a 9,70, sendo que 1,0 a 3,32 desses carboidratos representam fibra alimentar. Para minerais, encontramos, em média, 0,6 a 0,7 mg/100g de ferro; 26 a 36 mg/100g de fósforo; 26 a 37 mg/100g de cálcio (FRANCO, 1992; TABELA..., 2006; VERZELETTI; FONTANA; SANDRI, 2010).

A cenoura é uma das hortaliças mais consumidas na forma “minimamente processada”, sendo um grande atrativo na composição de pratos prontos para consumo, saladas, tira-gostos e passa a atrair também o público infantil devido ao seu formato (SILVA; LANA; VIEIRA, 2009).

O surgimento deste tipo de produto no Brasil foi influenciado pelo alto valor de importação das *baby carrots* norte-americanas. Com isso a Embrapa desenvolveu a tecnologia necessária para a fabricação desses produtos garantindo menor custo de produção e maior frescor em relação ao importado, já que o tempo entre a produção e o consumo é muito reduzido (SILVA; LANA; VIEIRA, 2009).

As formas mais comuns de cenouras minimamente processadas são em rodelas, raladas, e em cubos. Recentemente, a Embrapa inovou a produção de minimamente processados disponibilizando no mercado tecnologia adequada para produção de dois novos formatos, a Cenourete e o Catetinho. São tipos de minicenouras brasileiras similares às *baby carrots* americanas, sendo que, quando em formato de uma minicenoura é chamada de cenourete e quando em formato esférico é chamada de catetinho (TEIXEIRA et al., 2011).

Além das características intrínsecas do produto, as condições de processamento também devem ser levadas em conta, pois assim como qualquer outro produto alimentício, a adoção de um método de conservação inadequado irá causar modificações nas suas propriedades sensoriais devido à atuação de enzimas, reações químicas e crescimento de microrganismos. Talcott e Howard (1999) concluíram que cenouras submetidas a estresse na pós-colheita apresentam mudanças em seus atributos sensoriais de maneira que os provadores atribuíram um sabor amargo mais pronunciado e um gosto doce menos intenso.

2.3 Processamento mínimo

Frutas e hortaliças minimamente processadas têm se tornado mais populares recentemente, em resposta a um aumento da procura, por parte dos consumidores, por alimentos de preparo rápido ou prontos para o consumo (KOUKOUNARAS; DIAMANTIDIS; SFAKIOTAKIS, 2008).

Segundo a Associação Internacional dos Produtos Minimamente Processados (IFPA), produtos minimamente processados (“fresh-cut”, levemente processados, ou parcialmente processados) são definidos como qualquer fruta ou hortaliça, ou ainda qualquer combinação delas, que foi alterada fisicamente a partir de sua forma original, embora mantenha seu estado fresco. Independentemente do tipo, o vegetal é selecionado, lavado, descascado e cortado, resultando num produto 100% aproveitável que posteriormente é embalado no intuito de oferecer aos consumidores frescor, conveniência, qualidade nutricional e microbiológica. Frutas e hortaliças minimamente processadas compõem uma das categorias que cresce mais rapidamente na indústria de alimentos, pois combinam frescor, conveniência e saúde. No entanto, o maior obstáculo para o marketing comercial é o seu prazo de validade limitado, que é devido, principalmente, à excessiva perda de firmeza e escurecimento da superfície (CHUNG; MOON, 2009; LIN et al., 2008).

Como a integridade do tecido dos produtos minimamente processados é alterada durante o processamento, eles são mais perecíveis que as matérias-primas originais (SHEWFELT; LEE; ZYHUER, 2005). O processamento mínimo causa fermento, aumenta a atividade metabólica, a produção de etileno e a descompartimentação celular colocando em contato enzimas e substratos. Isso pode levar a deteriorações, como escurecimento, amaciamento e desenvolvimento de sabores e odores estranhos e reduzir a vida de prateleira de produtos minimamente processados (VAROQUAUX; WILEY, 1997).

Dois problemas básicos confrontam o prolongamento da vida útil de frutas e hortaliças minimamente processadas. Primeiro, o tecido vegetal está vivo, respirando e muitas reações químicas estão acontecendo. Algumas das reações, se não controladas, podem levar à rápida senescência ou mudanças na qualidade. Segundo, a proliferação de microrganismos deve ser retardada. O crescimento de microrganismos causadores de doenças é uma preocupação com a segurança do alimento (KING JUNIOR; BOLIN, 1989).

A respiração é o principal processo fisiológico que continua ocorrendo após a colheita. O efeito do corte e outras injúrias, provocadas durante as etapas do processamento mínimo, provocam um aumento na respiração. E essa taxa respiratória dos alimentos minimamente processados é aumentada de 3 a 7 vezes, em relação ao tecido intacto (VAROQUAUX; WILEY, 1997). Assim, o controle da respiração passa a ser condição essencial para obtenção de condições adequadas de armazenamento dos produtos perecíveis (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Ainda segundo Chitarra e Chitarra (2005), de um modo geral, a taxa de respiração é indicativa da rapidez com que as mudanças de composição ocorrem. A vida útil de diferentes tipos de frutas e hortaliças, em geral, varia inversamente com a taxa de respiração.

A fim de estender a vida útil de frutas frescas, muita investigação tem incidido sobre a utilização de equipamentos de refrigeração (BAI et al., 2009), agentes antiescurecimento (SON; MOON; LEE, 2001), revestimentos comestíveis (ROJAS-GRAU; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2009), tratamentos químicos de imersão (BICO et al., 2009) e atmosferas controladas (GORNY et al., 2002; OMS-OLIU et al., 2008). Embora alguns desses tratamentos sejam eficazes, as frutas respondem diferentemente aos diversos tratamentos físicos e químicos. Portanto, é imperativo que uma combinação razoável de várias técnicas de prolongamento seja determinada para

o aumento da conservação de frutas e hortaliças minimamente processadas (BICO et al., 2009).

Muitos trabalhos têm sido realizados com a finalidade de estender a vida útil de produtos minimamente processados. Objetiva-se, neste estudo, porém, a avaliação de métodos rápidos e não destrutivos para a análise de frutas e hortaliças minimamente processadas, com utilização de tratamentos estatísticos para melhor interpretação e exploração dos resultados obtidos.

2.4 Métodos não destrutivos na análise de alimentos

Os frutos são classificados manualmente ou automaticamente de acordo com o tamanho, coloração e defeitos de superfície. No entanto, os teores de matéria seca, sólidos solúveis, açúcares, acidez titulável e firmeza são importantes atributos de qualidade internos. A maioria das técnicas instrumentais para medir essas propriedades é destrutiva, e envolvem uma quantidade considerável de trabalho manual.

Apesar da relevância dos atributos de qualidade para a indústria de alimentos, sua quantificação ainda consome tempo e requer muito trabalho: os sólidos solúveis são facilmente determinados por refratometria, mas os sólidos totais são quantificados pela secagem em estufa sob vácuo, um processo que demora cerca de 4 h. A acidez total é normalmente determinada por titulação utilizando fenolftaleína como indicador, mas a determinação exata do ponto final é difícil em alguns casos, devido à cor de alguns alimentos e pela identificação exata do ponto final de viragem do pH com o ponto estequiométrico da reação. Os açúcares, os ácidos orgânicos, dentre outros nutrientes, são individualmente determinados por cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia gasosa, uma técnica que exige uma quantidade considerável de solventes orgânicos. Além disso, a análise requer tempo e

trabalho, pois necessita de uma etapa de purificação da amostra antes da análise (CHÁVES-SERVÍN; CASTELLOTE; LÓPEZ-SABATER, 2004; GOULD, 1992; SALUNKHE; KADAM, 1998).

Para resolver problemas analíticos como os acima referidos, os químicos têm aliado técnicas rápidas e não destrutivas com ênfase à espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos de calibração. Dentre os métodos não destrutivos aplicados à agricultura, a espectroscopia no infravermelho (IR) é provavelmente um dos mais estudados.

Outro método que tem apresentado grande avanço em análises de qualidade em frutas e hortaliças é uma nova tecnologia baseada na interpretação de um fenômeno óptico que ocorre quando o fruto é iluminado por luz coerente, como é o caso do laser, o qual produz um fenômeno de interferência óptica, referido como *biospeckle*. O *biospeckle* tem sido utilizado para caracterizar, monitorar e avaliar parâmetros de qualidade em amostras alimentares. Trabalhos para monitorar a atividade (BRAGA JÚNIOR et al., 2003), e a presença de fungos em sementes (BRAGA JÚNIOR et al., 2005), danos em frutos (PAJUELO et al., 2003), monitoramento da qualidade de laranja (RABELO, 2000) e maturação de laranjas (RABELO; BRAGA JÚNIOR; FABBRO, 2005), amadurecimento de tomates (ROMERO et al., 2009), sólidos solúveis e firmeza em maçã (QUING; BAOPING; ZUDE, 2008) e sólidos solúveis, acidez titulável, firmeza e amido em diferentes cultivares de maçã (ZDUNEK; CYBULSKA, 2011) podem ser exemplos do uso dessa metodologia.

2.5 Interação da luz com o tecido vegetal

Os tecidos biológicos possuem como unidade elementar a célula, a qual, por sua vez, é subdividida em organelas. As células são, em grande parte, constituídas por água e compostos orgânicos.

Toda matéria é constituída de átomos e moléculas que têm relevância nos fenômenos ópticos. De acordo com Hecht (1987), o campo elétrico oscilante da luz que ilumina esse tipo de material força os elétrons ópticos a vibrarem em uma frequência próxima à frequência da luz incidente. Esses elétrons excitados emitem luz ao voltarem para seu estado fundamental. Em outras palavras, pode-se dizer que os elétrons ópticos absorvem a luz que vem em uma determinada direção e a reemitem em direções que não são necessariamente a mesma direção de incidência. Esse fenômeno de absorção seguido pela irradiação é denominado “scattering” (HECHT, 1987). Traduzindo para a língua portuguesa, “scattering” significa espalhamento ou dispersão.

A dispersão ou "scattering" é uma depleção da radiação, envolvendo apenas uma mudança de direção da radiação incidente e, eventualmente, alteração no seu comprimento de onda, devido a reflexões, refrações e difrações em moléculas ou partículas distribuídas no material (JOYCE, 1992).

O espalhamento pode ser classificado em três categorias, de acordo com o tamanho das partículas do meio espalhador. Quando os centros espalhadores apresentam dimensões inferiores ao comprimento de onda da radiação incidente, tem-se o espalhamento *Rayleigh*. Quando as dimensões são da mesma ordem ou pouco maiores que o comprimento de onda incidente tem-se o espalhamento Mie. Nos casos em que as dimensões dos centros espalhadores são grandes, quando comparadas ao comprimento de onda incidente, de modo que a luz penetra no seu interior e sofre refrações e reflexões múltiplas, o espalhamento é dito geométrico (MALACARA; THOMPSON, 2001).

Uma célula, por si só, pode atuar como um forte centro espalhador. Todavia, em geral, esse espalhamento obedece ao regime geométrico, de modo que a luz penetra na membrana e os espalhamentos dominantes ocorrem nas estruturas internas. As dimensões típicas das estruturas citológicas cobrem uma faixa bastante ampla que vai de algumas dezenas de nanômetros até alguns

micrômetros. Levando-se em conta os lasers normalmente utilizados na análise desses sistemas, os quais emitem no espectro visível ou infravermelho próximo, a relação entre o tamanho dos centros espalhadores e o comprimento de onda coloca o espalhamento celular nos regimes Mie ou geométrico. Evidentemente, o regime Rayleigh também está presente, aumentando consideravelmente a complexidade dos fenômenos de espalhamento em tecidos biológicos.

Conforme Rabelo (2000), ao incidir e penetrar em um material biológico, a luz laser sofre espalhamentos múltiplos pelas estruturas microscópicas presentes na superfície e em camadas subsuperficiais do tecido analisado.

O tamanho dos elementos constituintes da célula é de grande importância para avaliar o efeito da interação laser com a matéria biológica. Erickson (1989) mostra que as unidades constituintes das células vegetais apresentam tamanhos diversos, maiores e menores que o comprimento de onda da luz laser (por exemplo, laser HeNe; $\lambda=632,8$ nm). O núcleo tem um diâmetro que varia de 5-20 μm , o cloroplasto 5-10 μm , a mitocôndria 1-5 μm , os ribossomos 25 nm e as enzimas 2-10 nm. A parede celular dos tecidos vegetais é rígida e fina podendo atingir 30 nm de espessura. A membrana citoplasmática separa a célula do meio que a rodeia constituindo-se de uma fina camada de, aproximadamente, 7,5 nm de largura localizada logo abaixo da parede celular.

O tamanho das células dos vacúolos e dos espaços entre as células é um pouco maior do que o comprimento de onda de um laser de He-Ne. De acordo com Bergkvist (1997), devido ao tamanho dessas partes constituintes da célula vegetal, elas participam em Mie "scattering", enquanto que as demais partes, que são menores do que o comprimento de onda do laser de He-Ne participam em Rayleigh "scattering".

Logicamente que haverá também absorção da luz pelo tecido vegetal, principalmente se esse tiver muita clorofila, que absorve luz na faixa do espectro

visível. De acordo com o mesmo autor, em tecidos vegetais, os principais elementos que absorvem a luz são a água e a clorofila, entretanto, a água absorve mais na faixa do infravermelho por volta de 0,6 μm , portanto, longe do comprimento de onda do laser de He-Ne.

Os materiais biológicos apresentam uma característica peculiar em relação aos outros materiais, uma vez que os mesmos, segundo Bergkvist (1997), apresentam-se como meios de grande dispersão da luz. E, dessa forma, esses materiais apresentam uma grande complexidade no que se refere à interação da luz com seus diversos constituintes, amplificada pela complexa movimentação interna. A complexa constituição dos tecidos biológicos acaba sendo a base para um intrincado funcionamento biológico que dificulta a relação causa-efeito. Trabalhos realizados na área de biologia têm mostrado que o movimento ocorrido no interior das células deve-se, essencialmente, ao contínuo movimento de cloroplastos e de movimentos aleatórios de partículas (BRIERS, 1993). Em um material biológico há diversos movimentos internos: trocas gasosas, metabolismo e movimentação de nutrientes nas células. Esses movimentos sofrem influência do movimento browniano cuja intensidade é maior na direção das fibras (SAKAMOTO et al., 2007).

Uma das técnicas usadas para mensurar essa movimentação é a espectroscopia *doppler* e a microscopia, porém, Muramatsu et al. (1997) ressaltam que existem certas dificuldades na aplicação dessas técnicas para mensurar o grau de deterioração de espécimes vivos. O mesmo autor cita ainda que a primeira técnica é muito boa para medir fluxo direcional, como o do sangue, mas apresenta dificuldades de aplicação para movimentos de partículas em direções aleatórias. Já a microscopia eletrônica necessita seccionar o objeto interferindo em seu processo vital, sendo, portanto, um processo destrutivo.

Muramatsu et al. (1997) afirmam que a técnica de correlação de *speckle* tem se mostrado uma excelente alternativa aos métodos anteriores para estudo

da atividade biológica para revelar o movimento aleatório intercelular, além de ser um teste não destrutivo e em tempo real. Essa movimentação, proveniente da atividade metabólica, pode ser maior ou menor, dependendo do estado de maturação, crescimento ou deterioração do material biológico, bem como da quantidade de água, temperatura e iluminação (RODRIGUES, 2003).

2.6 O laser- considerações gerais

A luz laser (*Light Amplification by the Stimulated Emission Radiation*) é um tipo de radiação eletromagnética que apresenta um comprimento de onda bem definido (monocromaticidade), alta potência, coerência espacial e temporal, além de alta direcionalidade (HECHT, 2002). As características especiais da luz laser têm despertado os pesquisadores para a potencialidade de sua aplicação em investigações científicas e na indústria e são descritas abaixo, segundo Bagnato (2008).

O laser é coerente, pois a radiação é espacial e temporalmente coerente (as ondas sucessivas da radiação estão em fase e os trens de onda têm todos a mesma direção e o mesmo comprimento de onda).

A luz de um laser é monocromática, já que a energia do fóton estimulante e a energia do fóton emitido são as mesmas. Portanto, ao se verificar o espectro do laser, vê-se apenas faixa estreita, mostrando que ela é composta de apenas um comprimento de onda, enquanto uma fonte de luz incandescente, por exemplo, é formada por vários comprimentos de onda.

O feixe resultante é bastante estreito e todo feixe propaga-se na mesma direção, havendo um mínimo de dispersão. Essa característica, de alta direcionalidade, é extremamente importante para uma série de aplicações, pois o feixe de luz coerente se concentra-se numa área pequena e bem definida.

Outra característica da luz laser é o fato de que a potência do feixe laser pode ser extremamente grande, ao contrário das fontes de luz convencionais. Sua potência pode atingir ordens de tera Watt (10^{12} W).

Por suas propriedades especiais, o laser hoje é utilizado nas mais diversas aplicações: médicas (cirurgias, tratamento de câncer, bioestimulação, regenerador e analgésico), industriais (cortar metais, medir distâncias, soldagens), pesquisa científica (pinças ópticas, hidráulica, física atômica, óptica quântica), comerciais (comunicação por fibras ópticas, leitores de códigos de barras), e mesmo em nossas casas (aparelhos leitores de CD e DVD) (BAGNATO, 2008).

São vários os tipos de lasers disponíveis, mas, normalmente, as características de interesse que os diferenciam são: a potência, o comprimento de onda bem definido, o diâmetro do raio, a divergência e, principalmente, a coerência. A elevada intensidade e a grande direcionalidade do feixe de um laser o torna interessante para um grande número de aplicações. Todavia, é a coerência que permite a observação e a utilização do fenômeno do *speckle* como base para o monitoramento da dinâmica de processos presentes nos objetos iluminados.

2.7 Biospeckle laser

Quando um objeto é iluminado pelo laser, ocorre a formação de uma figura de interferência devido ao espalhamento provocado pela constituição física da matéria desse objeto. Essa figura é denominada de *speckle* (HECHT, 2002).

O termo, em inglês, *speckle* se refere-se ao “granulado” presente nas imagens que se formam a partir da interferência dos raios que retornam da superfície iluminada por luz coerente. Esse espalhamento é resultado da rápida

absorção e reemissão da energia do campo eletromagnético da luz pelos átomos do material (HECHT, 2002). A Figura 1 apresenta três imagens de diferentes *speckles* formados por uma folha de papel, vidro e semente de milho. Esse padrão resulta do fenômeno físico de interferência entre os raios luminosos refletidos pelos elementos dispersores presentes nas superfícies mostradas. A forma da distribuição desses grãos que aparecem na imagem de *speckle* diz respeito à distribuição dos dispersores presentes na superfície, e/ou próximos a ela. Ou seja, a imagem do *speckle* armazena informações sobre o material iluminado e, com tratamentos adequados, é possível extrair essas informações e aplicá-las em um processo de avaliação.

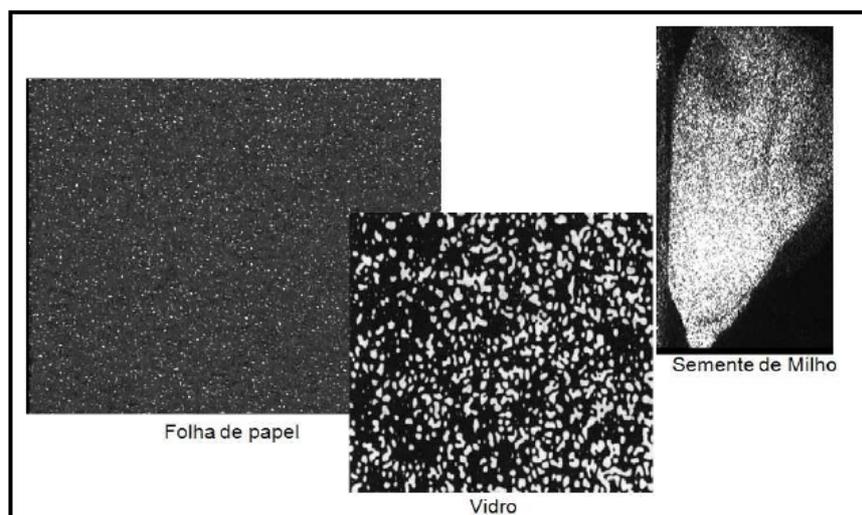


Figura 1 Imagem de speckles
Fonte Cardoso (2011)

Caso os elementos espalhadores/dispersores (estruturas microscópicas do material iluminado) encontrem-se em movimento, o padrão de interferência formado também será dinâmico e suas características estarão correlacionadas

com as propriedades dinâmicas da superfície iluminada. O *speckle* irá variar com o tempo, originando como resultado um ferverilhamento, conhecido por *speckle* dinâmico, ou *biospeckle*, se a superfície em questão for de origem biológica. Nesse caso, é possível avaliar o grau de atividade biológica da superfície através das características dinâmicas do *biospeckle*.

O grau de atividade biológica da superfície iluminada pode ter diversas origens como nível de maturação, deterioração, crescimento, metabolismo, quantidade de água, temperatura, dentre outros (RABAL; BRAGA JÚNIOR, 2008).

Briers (1993) afirma que o padrão de *speckle* observado é resultante da superposição de dois diferentes padrões, sendo esses, os *speckles* grandes, provenientes do espalhamento superficial os quais são fortemente dependentes do ângulo de incidência e são modulados por *speckles* pequenos, produzidos pela luz que vem do interior do material, os quais apresentam uma dependência muito fraca do ângulo de incidência.

Quando o *speckle* é formado por luz espalhada por partículas que se movem, ele é modulado por esse movimento. Isso produz uma variação no padrão temporal do *speckle*. O *speckle* é um fenômeno muito complexo, e de difícil modelagem. Quando a luz penetra em um material, ela é espalhada em todas as direções possíveis antes de retornar à superfície, o que torna impossível reconhecer, estudar e isolar cada elemento que espalha a luz.

O fenômeno em questão, resultado da interferência entre os diversos feixes que iluminam o objeto, era considerado como ruído e empecilho para os estudos ópticos. Os estudos para eliminar tal acontecimento resultaram em seu maior conhecimento e descoberta de novas utilidades para o mesmo (BRAGA JÚNIOR, 2000).

Uma das grandes vantagens do *biospeckle* sobre as técnicas ópticas mais tradicionais reside na relativa simplicidade e baixo custo de sua montagem

experimental. Essencialmente, os equipamentos requeridos consistem em um laser (cuja potência em geral não necessita ser elevada), um dispositivo CCD de média resolução, lentes objetivas e/ou expansoras e, eventualmente, espelhos e polarizadores, e um computador. As Figuras 2A e 2B mostram dois tipos de montagem que pode ser feita para análise por *biospeckle* em amostras vegetais.

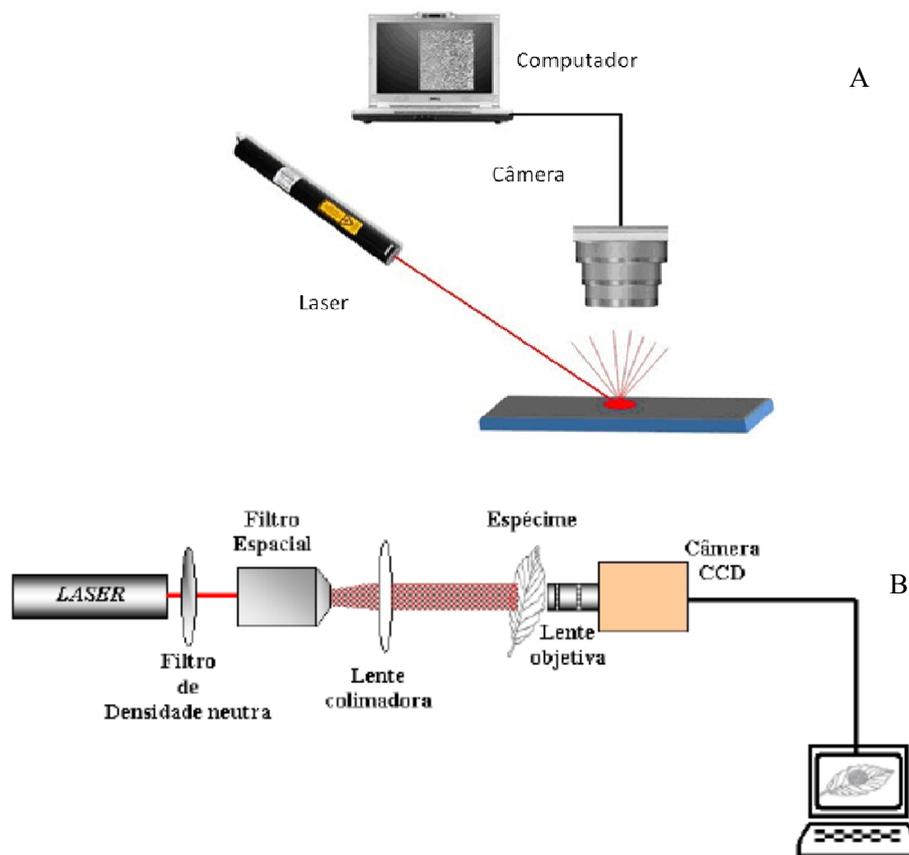


Figura 2 Esquema básico da montagem experimental com propagação em espaço livre e *speckle* obtido por reflexão (A) e arranjo experimental para observações no plano da imagem e *speckle* obtidos por transmissão (B).

A análise visual do fenômeno permite apenas observar um fervilhamento. Para que o *biospeckle* seja quantificado, capturam-se imagens em pequenos intervalos de tempo e aplicam-se tratamentos matemáticos e estatísticos por meio de diversas técnicas de processamento de imagens (RABAL; BRAGA JÚNIOR, 2008).

2.7.1 Métodos de análise do *biospeckle* laser

São vários os métodos de análise do *speckle* dinâmico, que podem ser divididos em dois tipos: numéricos e gráficos. A análise numérica é recomendada para materiais homogêneos, ou seja, materiais que mantêm, em todas as suas regiões, o mesmo nível de atividade, como é o caso nas análises com sêmen animal e vegetais minimamente processados. Entre os métodos de análise numérica se destacam-se o Momento de Inércia, o Método do Contraste, e o da Autocorrelação.

As análises gráficas são recomendadas para amostras de áreas heterogêneas em relação ao nível de atividade presente, quando se deseja mapear áreas de atividade em um tecido. Na análise do *speckle* dinâmico, as principais técnicas utilizadas são Fujii (FUJII et al., 1987), Diferenças Generalizadas (ARIZAGA et al., 2002) e contraste de Briers (também chamado de Lasca) (BRIERS, 1975).

2.7.1.1 História temporal dos padrões de *speckle*

Para obter informações de níveis de atividade em um material iluminado pelo laser, uma ferramenta útil é a matriz da História Temporal dos Padrões do *Speckle* (THSP do inglês “*Time History Speckle Pattern*”) ou também chamada

de *Spatial Temporal Speckle* (STS), representado por uma figura que indica em tons de cinza os níveis de atividade dos pixels, ao longo do tempo.

Oulamara, Tribillon e Duvernoy (1989) propuseram um método para a visualização da evolução temporal de padrões *speckle*, e que parcialmente preserva as informações espaciais da amostra. De acordo com esse método, um registro da história temporal é feito em uma imagem bidimensional denominada THSP. Assim, quando imagens sucessivas do *speckle* são obtidas ao longo do tempo, obtém-se a variação temporal e espacial de cada pixel. A construção do THSP consiste na aquisição de uma linha na mesma posição das imagens capturadas, que pode ser uma linha horizontal ou uma coluna, normalmente na região central das imagens para se evitar efeitos de borda. Cada uma dessas linhas é colocada lado a lado e sequencialmente em uma mesma imagem, formando o THSP (COSTA et al., 2010). Dessa maneira, a primeira linha do THSP corresponde à linha registrada no primeiro instante. A segunda linha corresponde à mesma fila de pixels registrada no segundo instante, e assim sucessivamente até compor uma nova imagem na qual fica registrada a evolução temporal de uma fileira de pixels do padrão. Nesse caso, na direção horizontal fica registrado um conjunto de pixels que correspondem à distribuição espacial do padrão e na vertical, a evolução temporal desses pixels ao longo de instantes sucessivos. A Figura 3 apresenta de forma ilustrativa, o processo de construção do THSP.

Por exemplo, se forem usadas fileiras com 480 pixels, registradas durante 480 instantes sucessivos, os THSP finais possuirão 480x480 pixels.

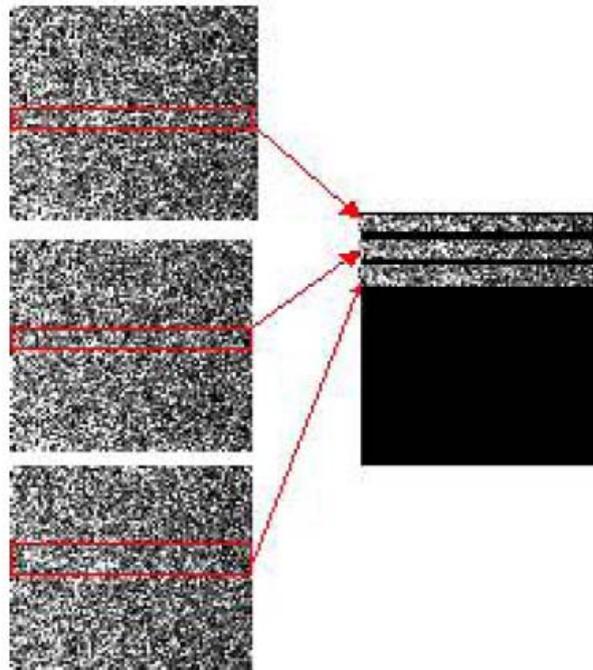


Figura 3 Construção do THSP: A fila central é registrada em instantes sucessivos e colada em uma nova imagem.

Na Figura 4 são apresentados dois THSP construídos com padrões *speckle* espalhados, respectivamente, a partir de uma superfície estática e de uma região recém-pintada. O padrão estático apresenta pequenas variações de intensidade, de modo que o nível de cinza de cada pixel varia muito pouco ao longo do tempo (direção vertical). Por outro lado, no processo de secagem de tinta (SILVA, 2000), percebe-se uma alta atividade no início, com a evaporação do solvente, e rápidas variações nas intensidades dos pixels. À medida que a tinta seca, tais variações tornam-se mais lentas e o THSP tende a apresentar barras verticais paralelas, tais como vistas na situação estática.

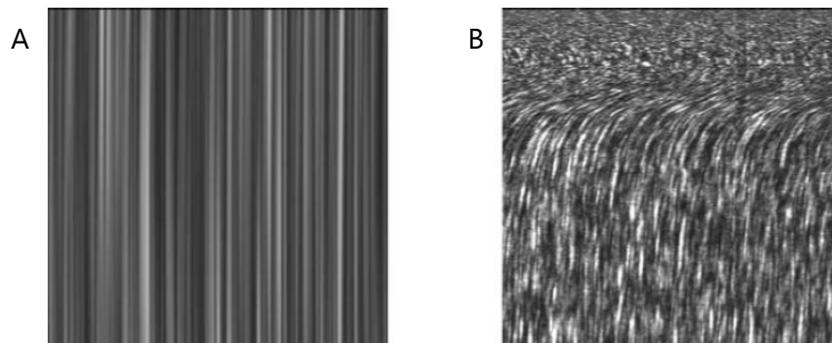


Figura 4 THSP de uma superfície estática (A) e de um processo de secagem de tintas (B)

A imagem de THSP fornece apenas a informação visual da atividade da superfície, sendo possível identificar apenas se a superfície possui ou não atividade, mas não permite quantificá-la. Pensando nisso, foi desenvolvido o procedimento de geração de matriz de ocorrência (MOC) a partir de imagens de THSP (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999). A MOC é uma matriz que propicia trabalhar com as intensidades dos pixels da imagem de THSP para extrair informações contidas neles.

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

A Figura 5A representa o THSP de uma amostra de baixa atividade enquanto a Figura 5B representa a matriz de ocorrências correspondente. Para

uma amostra que apresenta um nível elevado de atividade, pode ser observado na Figura 5C seu THSP e na Figura 5D a matriz de ocorrências correspondente.

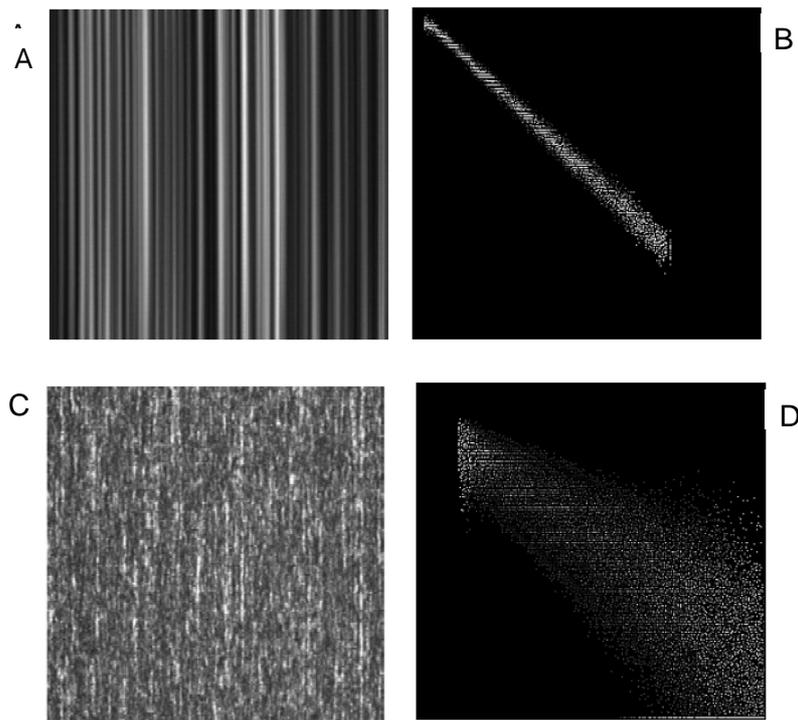


Figura 5 THSP baixa atividade (A), Matriz de ocorrência (MOC) de baixa atividade (B), THSP de alta atividade (C) e MOC de alta atividade (D).

As diferenças de atividade entre as duas amostras podem ser observadas comparando-se as Figuras 5A e 5C e também as Figuras 5B e 5D. Os valores não nulos que se encontram fora da diagonal principal representam mudanças de intensidade, ou seja, quanto mais espalhada é a matriz, mais ativa é a amostra e quanto mais concentrado em torno da diagonal principal, menor é a atividade. Essa diferença é bem evidente ao se fazer uma inspeção visual, portanto, deve-se buscar uma maneira de quantificá-la numericamente.

Uma maneira de quantificar a medida da dispersão dos pontos em torno da diagonal principal é por meio do cálculo do “momento de inércia” da matriz. Esse cálculo é aplicado na matriz de ocorrências constituindo um módulo de dispersão de intensidades (MDI), também referido na literatura como momento de inércia da imagem (MI).

O cálculo do MI depende diretamente dos valores da MOC. Quanto mais os valores da MOC se afastam da diagonal, maior influência no valor final de MI. Os valores que estão na diagonal da MOC não influenciam nos valores do MI, pois se anulam.

Assim, uma imagem com baixa atividade irá apresentar uma concentração de valores na diagonal da MOC que irão gerar um valor de MI muito baixo. Já para o caso da alta atividade, os valores estão mais dispersos na MOC. Isso faz com que os valores de MI aumentem à medida que os valores da MOC ficam mais afastados da diagonal.

2.8 Análise no domínio da frequência

A abordagem dos sinais do biospeckle tem sido realizada também no domínio da frequência como apresentado por Braga Júnior et al. (2007), Passione et al. (2005) e Passione, Rabal e Arizmendi (2004), por que utilizaram a transformada de *wavelets* para isolar fenômenos através da filtragem de faixas de frequências.

A análise de *wavelets*, baseada em escalas, pode ser definida como uma evolução da análise de Fourier, baseada em frequências, pois a verificação de sinais, utilizando variação de escala, demonstrou ser menos sensível a ruídos, bem como capaz de identificar variações das frequências em um mesmo sinal. Segundo Misiti et al. (2005), a análise de *wavelets* permite a utilização de intervalos longos de tempo para encontrar as informações de baixa frequência e

intervalos curtos de tempo nos quais estão localizadas as informações de altas frequências.

Uma maneira eficiente de aplicar esta transformada é através de filtros, técnica desenvolvida por Mallat (1989), em que se tem a decomposição das *wavelets* implementando a análise multirresolução. A análise multirresolução é uma técnica que permite analisar sinais em múltiplas bandas de frequências (SHENG, 1996).

Quando observamos as imagens, geralmente vemos regiões vinculadas por níveis de intensidade similares, que se combinam para formar objetos. Se os objetos forem pequenos ou de baixo contraste, normalmente os analisaremos em altas resoluções; se forem grandes ou de alto contraste, basta uma visão grosseira. Se objetos tanto pequenos quanto grandes – ou objetos de baixo e alto contraste – estiverem presentes simultaneamente, pode ser interessante analisá-los em várias resoluções. Essa, claro, é a motivação fundamental do processamento multirresolução, base da transformada de *wavelet* (GONZALEZ; WOODS, 2010).

Uma das características da transformada de *wavelets* é sua capacidade de abrir o sinal nas diversas frequências que o compõem em relação ao domínio do tempo e permitir a reconstrução desse de forma integral, ou sem as faixas de frequências que se desejam filtrar. Essa característica torna a transformada de *wavelets* uma flexível ferramenta para filtragem.

A transformada de *wavelets* tem sido utilizada para analisar o *speckle* dinâmico no domínio da frequência tanto por análises numéricas e gráficas. Um exemplo da análise no domínio da frequência é o trabalho com sementes apresentado por Cardoso et al. (2011), que utilizaram a técnica para diferenciar as áreas mais ativas e encontrar a frequência com que certos fenômenos atuam no material. A Figura 6 a seguir, exemplifica essa técnica, em que a transformada de *wavelets* foi aplicada pixel a pixel, sendo que cada imagem é

resultado do processamento de Fujii, em um conjunto de 128 imagens que foram reconstruídas em bandas de frequências específicas. À direita está a imagem de referência, a qual não foi processada com *wavelets*.

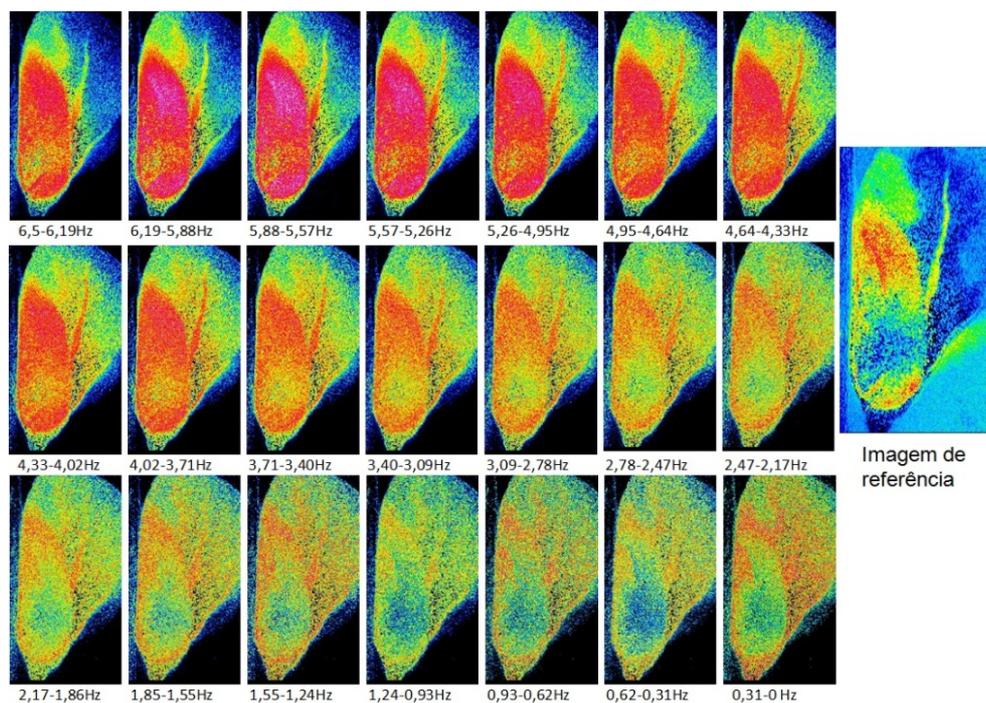


Figura 6 Resultado do processamento usando wavelets para semente de milho
Fonte Cardoso et al. (2011)

Tanto na análise numérica quanto na gráfica, a faixa máxima de frequência que podemos visualizar está relacionada com a taxa de aquisição de imagens pelo teorema da amostragem. No caso da taxa de 0,08 segundos a frequência máxima é 6,25 Hz. O número de bandas de frequência que se pode ter está relacionado com o número de imagens. No caso de 128 e 64 imagens, temos um total de 25 e 21 bandas de frequência respectivamente.

2.9 Estudos com *biospeckle* laser

Duprat et al. (1995) utilizaram um laser de diodo de 1 mW de potência e comprimento de onda de 670 nm para avaliar o grau de maturação de espécimes de uma variedade de maçãs (Golden Delicious). O laser incidia diretamente na superfície do fruto e uma câmera capturava a imagem da área iluminada. Nesse trabalho, os autores mostraram que o tamanho dessa área iluminada na imagem (“spot” luminoso) aumentava à medida que os frutos iam amadurecendo. Também é relatado nesse trabalho que existe uma correlação negativa não linear entre o “spot” e o índice de firmeza medido por um penetrômetro. Em outras palavras, quanto maior era o “spot”, menor era a firmeza, ou seja, maior era o grau de maturação.

Vários estudos têm sido desenvolvidos em alimentos utilizando a técnica do *biospeckle* laser. Em estudos de aplicação do *biospeckle* em sementes, por exemplo, encontram-se na literatura três linhas principais de estudo sendo elas relacionadas com avaliação de teor de água, diferenciação dos níveis de atividade e detecção de patógenos (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999; BRAGA JÚNIOR, 2000; BRAGA JÚNIOR et al., 2005; CARDOSO et al., 2011; ENES, 2005; MOREIRA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005).

O trabalho realizado por Ribeiro et al. (2004) utilizou esta técnica para tratar da mobilidade molecular em biscoitos de polvilho. A técnica foi usada para avaliar a mobilidade molecular em amostras de biscoitos acondicionados em ambientes com diferentes níveis de umidade relativa. Dependendo da taxa de absorção e da umidade do ambiente onde o biscoito é armazenado, este pode sofrer amolecimento, que é refletido numa variação das características dinâmicas do *biospeckle*. Quanto maior a atividade na superfície do objeto iluminado, maior será o “amolecimento” da superfície do biscoito. Segundo os autores, a

técnica do biospeckle conseguiu detectar as mudanças na mobilidade molecular em biscoitos com diferentes formulações e componentes.

Em vegetais, respostas interessantes podem ser obtidas pela técnica do *biospeckle* laser, pois o grau de atividade biológica da superfície iluminada pode ter diversas origens como nível de maturação, deterioração, crescimento, metabolismo, quantidade de água, temperatura, dentre outros (RABAL; BRAGA JÚNIOR, 2008).

Muitos trabalhos na literatura abordam o uso de *biospeckle* no monitoramento do processo de senescência de tecidos vegetais de frutas e hortaliças inteiras (RABELO, 2000; SILVA; MURAMATSO, 2006).

Silva (2007) monitorou três folhas de seringueira, em estágios distintos após a colheita (Figura 7). Os THSPs foram analisados através de matrizes de co-ocorrências e os resultados podem ser vistos na Figura 7.

A primeira folha (verde), recém colhida, apresentou THSP com elevado nível de atividade e com pontos bastante dispersos em torno da diagonal principal. Na segunda folha (amarelada) essa situação se reduziu, indicando diminuição da atividade, com os pontos se condensando ao redor da diagonal, e finalmente na folha seca o padrão temporal constitui-se por barras verticais paralelas com elevado nível de concentração dos pontos em torno da diagonal na matriz de co-ocorrência. Os momentos de inércia, também foram calculados e indicaram a queda progressiva de atividade, apresentando os valores de 380,9; 265,6 e 5,3 para as folhas verde, amarela e seca, respectivamente (SILVA, 2007).

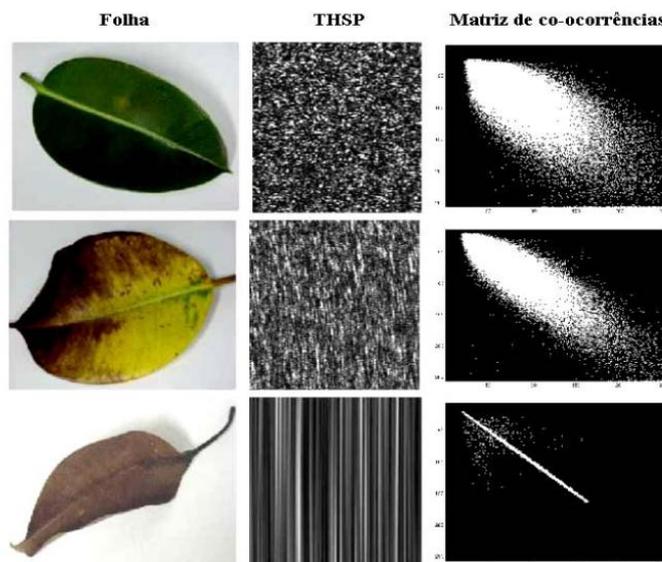


Figura 7 História Temporal dos Padrões de Speckle (THSP) e matriz de co-ocorrência de folhas de seringueira

Fonte Silva (2007)

Outra grande potencialidade do *biospeckle* é seu emprego no monitoramento de lesões fitopatológicas causadas por microrganismos (fungos, bactérias, dentre outros) em vegetais (BRAGA JÚNIOR et al., 2005).

Ao longo das últimas décadas, muitos projetos de pesquisa em todo o mundo começaram a desenvolver técnicas adequadas para a avaliação não-destrutiva das propriedades de frutas. Pajuelo et al. (2003) e Rabelo, Braga Júnior e Fabbro (2005) sugeriram utilizar a técnica do *biosepckle* para analisar o *bruise* em maçãs e o monitoramento da qualidade de laranjas, respectivamente. Entre outros, Qing, Baoping e Zude (2007, 2008) analisaram o teor de sólidos solúveis e firmeza de maçã. Zude, Speinelli e Torricelli (2008) propuseram o uso da luz dispersada em conjunto com espectroscopia de onda contínua para calibrar análises não-destrutivas de pigmentos em alimentos. Romero et al.

(2009) aplicaram o *biospeckle* laser para avaliação do estágio de amadurecimento de tomates. Mais recentemente, Zdunek e Cybulska (2011) estudaram a relação da atividade do *biospeckle* com a firmeza, com o teor de sólidos solúveis, acidez titulável e teor de amido durante o armazenamento de sete cultivares de maçã. Costa (2011) mostrou que a técnica do *biospeckle* laser associada ao momento de inércia é uma ferramenta capaz de prever a ocorrência de *internal bruising* ainda em momentos de não identificação visual do escurecimento em batatas após impactos mecânicos controlados. O momento de inércia foi utilizado para diferenciar batatas saudáveis de batatas que sofreram algum tipo de impacto e, portanto, tenderiam a desenvolver injúrias internas.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais métodos analíticos para a avaliação da qualidade dos alimentos ou determinação de suas propriedades físico-químicas utilizam as técnicas de cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas, espectrofotometria na região ultravioleta e visível, absorção atômica e ainda os métodos clássicos como os métodos volumétricos ou gravimétricos que ainda continuam sendo muito utilizados nos dias de hoje para as determinações das propriedades dos alimentos.

As análises convencionais para avaliação de qualidade de alimentos empregam muitos testes físicos e químicos que dependem muito tempo, consomem muitos reagentes químicos, necessitam de equipamentos e mão-de-obra especializada.

Devido à concorrência do mercado, exige-se cada vez mais o controle das etapas de produção, e portanto, o controle da qualidade por meio de diversos atributos e abordagens com destaque para as não destrutivas. As principais vantagens em uma análise baseada no *biospeckle* laser são o baixo custo dos

equipamentos, a rápida implementação e a análise computacional dos resultados. Erros humanos na etapa de análise, causados por interpretações pessoais e/ou falta de experiência com o método podem ser evitados já que tal etapa é automatizada. Entretanto, mesmo com essas características, métodos que utilizam padrões *speckle* são pouco empregados. As possibilidades de interdisciplinaridade são imensas e as aplicações na agricultura e na análise de alimentos são grandes, fato este que, nos dias atuais, torna-se altamente relevante.

REFERÊNCIAS

ALVES, J. A. et al. Vida útil de produto minimamente processado composto por abóbora, cenoura, chuchu e mandioquinha-salsa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 182-189, jan./fev. 2010.

ARIZAGA, R. et al. Display of the local activity using dynamical speckle patterns. **Optical Engineering**, Redondo Beach, v. 41, n. 2, p. 287-294, Feb. 2002.

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

BAGNATO, V. S. **Laser e suas aplicações em ciência e tecnologia**. São Paulo: Física, 2008. v. 1, 87 p.

BAI, J. et al. Effect of harvest maturity on quality of fresh-cut pear salad. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 250-256, Jan. 2009.

BERGKVIST, A. **Biospeckle-based study of the line profile of light scattered in strawberries**. 1997. 60 p. Dissertation (Master in Technology) - Lund University, Lund, 1997.

BICO, S. L. S. et al. Combined effects of chemical dip and/or carrageenan coating and/or controlled atmosphere on quality of fresh-cut banana. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 5, p. 508-514, May 2009.

BOBELYN, E. et al. Postharvest quality of apple predicted by NIR-spectroscopy: study of the effect of biological variability on spectra and model performance. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 133-143, Feb. 2010.

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. Assessment of seed viability by laser speckle techniques. **Biosystems Engineering**, San Diego, v. 86, n. 3, p. 287-294, June 2003.

_____. Biological feature isolation by wavelets in biospeckle laser images. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 58, n. 1, p. 123-132, 2007.

_____. Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique. **Biosystems Engineering**, San Diego, v. 91, n. 4, p. 465-469, Aug. 2005.

BRIERS, J. D. Speckle fluctuations and biomedical optics: implications and applications. **Optic Engineering**, San Diego, v. 32, n. 2, p. 277-283, Feb. 1993.

_____. Wavelength dependence of intensity fluctuations in laser speckle patterns from biological specimens. **Optics Communications**, Sydney, v. 13, p. 324-325, 1975.

CANO, M. P. et al. Procesado mínimo y valor nutricional. In: GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; GARDEA, A. A.; CUAMEA-NAVARRO, F. (Ed.). **Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados**. Hermosillo: CIAD, 2005. p. 119-152.

CARDOSO, R. R. **Análise do speckle laser dinâmico**: uma releitura. 2011. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CARDOSO, R. R. et al. Frequency signature of water activity by biospeckle laser. **Optics Communications**, Sydney, v. 284, n. 8, p. 2131-2136, Apr. 2011.

CHÁVES-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Analysis of mono and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1043, n. 2, p. 211-215, July 2004.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CHUNG, H. S.; MOON, K. D. Browning characteristics of fresh-cut 'Tsugaru' apples as affected by pre-slicing storage atmospheres. **Food Chemistry**, London, v. 114, n. 4, p. 1433-1437, June 2009.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopaedia of analytical chemistry**. Chichester: J. Wiley, 2000. p. 10815-10837.

CORBO, M. R.; NOBILE, A.; SINIGAGLIA, M. A novel approach for calculating shelf life of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 69-73, Jan. 2006.

COSTA, A. G. **Predição e identificação de danos internos em batata por meio do biospeckle laser**. 2011. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

COSTA, R. M. et al. Técnicas estatísticas aplicadas em imagens do speckle dinâmico. **Revista Brasileira de Biomecânica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 27-39, 2010.

DUPRAT, F. et al. Laser light based machine vision system for nondestructive ripeness sensing of Golden apples. In: WORKSHOP ON CONTROL APPLICATIONS IN POST-HARVEST AND PROCESSING TECHNOLOGY, 1., 1995, Ostende. **Proceedings...** Ostende: FAC/CIGR, 1995. p. 117-123.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Hortaliças minimamente processadas**. Brasília, 2003. 140 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.

ERICKSON, L. C. The general physiology of Citrus. In: _____. **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1989. v. 1, p. 86-126.

FRANCO, G. **Tabela de composição de alimentos**. 8. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992. 230 p.

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.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. C. **Processamento digital de imagens**. 3. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010. 624 p.

GORNY, J. R. et al. Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by controlled atmospheres and chemical preservatives. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 271-278, Apr. 2002.

GOULD, W. A. **Tomato production, processing, technology**. 3rd ed. Baltimore: CTI, 1992. 349 p.

HECHT, E. **Optics**. 2nd ed. New York: A. Wesley, 1987. 676 p.

_____. _____. 4th ed. New York: A. Wesley, 2002. 698 p.

INTERNACIONAL FRESH-CUT PRODUCE ASSOCIATION. Disponível em: <<http://www.fresh-cuts.org>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

JOHNSTON, J. W.; HEWETT, E. W.; HERTOOG, M. L. A. T. M. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review. **New Zealand Journal of Crop Horticulture**, Wellington, v. 30, n. 1, p. 145-160, Feb. 2002.

JOYCE, A. L. M. **Lagos solares: contribuição para o desenvolvimento de uma tecnologia**. 1992. 236 f. Tese (Doutorado em Termomecânica Aplicada) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 1992.

KING JUNIOR, A. D.; BOLIN, H. R. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. In: OVERVIEW OUTSTANDING SYMPOSIA IN FOOD SCIENCE, TECHNOLOGY, 1., 1988, New Orleans. **Proceedings...** Chicago: Institute of Food Technologists, 1989. p. 132-135.

KOUKOUNARAS, A.; DIAMANTIDIS, G.; SFAKIOTAKIS, E. The effect of heat treatment on quality retention of fresh-cut peach. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 30-36, Feb. 2008.

KURENDA, A.; ADAMIAK, A.; ZDUNEK, A. Temperature effect on apple biospeckle activity evaluated with different indices. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 118-123, Feb. 2012.

LAURIDSEN, L.; KNØCHELL, S. Microbiological stability and diversity in raw prepeeled potatoes packed in different atmospheres. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 217, n. 5, p. 421-426, Nov. 2003.

LAVELLI, V. et al. Physicochemical, microbial, and sensory parameters as indices to evaluate the quality of minimally-processed carrots. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 34-40, Feb. 2006.

LIMA, K. S. C. et al. Efeito da irradiação ionizante g na qualidade pós-colheita de cenouras (*Daucus carota L.*) cv. Nantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 202-208, 2001.

LIN, L. et al. Effects of a chitosan-based coating with ascorbic acid on post-harvest quality and core browning of 'Yali' pears (*Pyrus bertschneideri* Rehd.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 5, p. 877-884, Apr. 2008.

MALACARA, D.; THOMPSON, J. **Handbook of optical engineering**. New York: M. Dekker, 2001. 978 p.

MALLAT, S. G. A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, New York, v. 11, p. 674-693, July 1989.

MISITI, M. et al. **Wavelet toolbox for use Matlab: user guide**. Version 3. Natick: The MathWorks, 2005. 625 p.

MONTERO-CALDERON, M.; ROJAS-GRAÜ, M. A.; MARTIN-BELLOSO, O. Effect of packaging conditions on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 50, n. 2/3, p. 182-189, Nov. 2008.

MOREIRA, M. F. B. et al. Caracterização da transmissão da luz laser em semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 119-126, 2002.

MURAMATSU, M. et al. Application of a liquid crystal spatial light modulation to optical roughness measurements by holographic interferometry using two refractive indices. **Optics and Laser Technology**, London, v. 29, n. 5, p. 271-273, July 1997.

OMS-OLIU, G. et al. Antioxidant content of fresh-cut pears stored in high-O₂ active packages compared with conventional low-O₂ active and passive modified atmosphere packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 3, p. 932-940, Jan. 2008.

OULAMARA, 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, Feb. 1989.

PAJUELO, M. et al. Bio-speckle assessment of bruising in fruits. **Optics and Lasers in Engineering**, London, v. 40, n. 1/2, p. 13-24, 2003.

PASSIONE, L. I. et al. Dynamic speckle processing using wavelets base entropy. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 246, n. 1/3, p. 219-228, Feb. 2005.

PASSIONE, L. I.; RABAL, H.; ARIZMENDI, C. M. Characterizing dynamic speckle time series with the Hust coefficient concept. **Fractals**, London, v. 12, n. 3, p. 319-330, 2004.

QING, Z.; BAOPING, J.; ZUDE, M. Non-destructive analyses of apple quality parameters by means of laser-induced light backscattering imaging. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 215-222, May 2008.

_____. Predicting soluble solids content and firmness in apple fruit by means of laser light backscattering image analysis. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 82, n. 1, p. 58-67, Jan. 2007.

RABAL, H. J.; BRAGA JÚNIOR, R. A. **Dinamic laser speckle and applications**. Boca Raton: CRC, 2008. 304 p.

RABELO, G. F. **Avaliação da aplicação do speckle dinâmico no monitoramento da qualidade da laranja**. 2000. 149 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

RABELO, G. F.; BRAGA JÚNIOR, R. A.; FABBRO, I. M. D. Laser speckle techniques in quality evaluation of orange fruits. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 4, p. 570-575, 2005.

RIBEIRO, K. M. et al. Avaliação da mobilidade molecular no biscoito de polvilho azedo utilizando o fenômeno de biospeckle. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 13., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/APG, 2004. p. 71-77.

RIVA, M.; FRANZETTI, L.; GALLI, M. Microbiological quality and shelf-lifemodelling of ready-to-eat cicorino. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 2, p. 228-234, Feb. 2001.

ROCHA, A. M. C. N.; MORAIS, A. M. M. B. Shelf life of minimally processed apple (cv. Jonagored) determined by colour changes. **Food Control**, Guildford, v. 14, n. 1, p. 13-20, Feb. 2003.

RODRIGUES, S. **Análise do Biospeckle laser na diferenciação de tecidos vivos e mortos em sementes**. 2003. 41 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

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, n. 2, p. 135-139, 2005.

ROJAS-GRAÜ, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 20, n. 10, p. 438-447, Oct. 2009.

ROMERO, G. G. et al. Bio-speckle activity applied to the assessment of tomato fruit ripening. **Biosystems Engineering**, London, v. 103, n. 1, p. 116-119, Jan. 2009.

SAKAMOTO, A. C. et al. Correlation between temporal pole MRI abnormalities and surface ictal EEG patterns in patients with unilateral mesial temporal lobe epilepsy. **Seizure**, London, v. 16, n. 1, p. 8-16, 2007.

SALUNKHE, D. K.; KADAM, S. S. (Ed.). **Handbook of vegetable science and technology**. New York: M. Dekker, 1998. 171 p.

SHENG, Y. Wavelet transform. In: POULARIKAS, A. D. (Ed.). **The transforms and applications handbook**. Boca Raton: CRC, 1996. p. 747-827.

SHEWFELT, K.; LEE, H.; ZYHUER, R. Optimization of nitrogen for bioventing of gasoline contaminated soil. **Journal of Environmental Engineering**, New York, v. 4, n. 1, p. 29-42, Jan. 2005.

SILVA, E. R. **Estudo das propriedades do biospeckle e suas aplicações**. 2007. 120 p. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SILVA, E. R.; MURAMATSO, M. Monitoramento da evolução temporal de tecidos através do biospeckle. In: ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, 29., 2006, São Lourenço. **Resumos...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Física, 2006. p. 131.

SILVA, F. C. **Aplicação do speckle dinâmico para o estudo do processo de secagem de pinturas**. 2000. 67 p. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SILVA, J. B. C.; LANA, M. M.; VIEIRA, J. V. Equipamentos para agroindústria de minicenouras cenourete e catetinho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 109-113, jan./fev. 2009.

SON, S. M.; MOON, K. D.; LEE, C. Y. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. **Food Chemistry**, London, v. 73, n. 1, p. 23-30, Mar. 2001.

TABELA brasileira de composição de alimentos. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 2006. 113 p.

TALCOTT, S. T.; HOWARD, L. R. Chemical and sensory quality of strained carrots as influenced by stress induced phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 4, p. 1362-1366, Mar. 1999.

TEIXEIRA, L. J. Q. **Campos elétricos pulsados de alta intensidade no processamento de suco de cenoura**. 2008. 149 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

TEIXEIRA, L. J. Q. et al. Cenoura (*Daucus carota*): processamento e composição química. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-21, 2011.

VAROQUAUX, P.; WILEY, R. C. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. (Ed.). **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. New York: Chapman and Hall, 1997. p. 226-268.

VERZELETTI, A.; FONTANA, R. C.; SANDRI, I. G. Avaliação da vida de prateleira de cenouras minimamente processadas. **Alimentos e Nutrição**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 87-92, 2010.

ZANONI, B. et al. A model to predict shelf-life in air and darkness of cut, ready-to-use, fresh carrots under both isothermal conditions. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 79, n. 2, p. 586-591, Mar. 2007.

ZDUNEK, A.; CYBULSKA, J. Relation of biospeckle activity with quality attributes of apples. **Sensors**, New York, v. 11, n. 1, p. 6317-6327, Feb. 2011.

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, Feb. 2012.

ZUDE, M.; SPEINELLI, L.; TORRICELLI, A. Approach for nondestructive pigment analysis in model liquids and carrots by means of time-of-flight and multi-wavelength remittance readings. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 623, n. 2, p. 204-212, Aug. 2008.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO Identification of different physiological phenomena in fresh-cut carrots using biospeckle laser and frequency approach

**IDENTIFICATION OF DIFFERENT PHYSIOLOGICAL PHENOMENA
IN FRESH-CUT CARROTS USING BIOSPECKLE LASER AND
FREQUENCY APPROACH**

(Preparado de acordo com as normas da revista *Postharvest Biology and
Technology* – artigo enviado para publicação)

Juliana Alvarenga Alves^{1*}, Roberto Alves Braga Júnior²,

Eduardo Valério de Barros Vilas Boas¹

¹ Food Science Department; Federal University of Lavras, Caixa Postal 3037 Lavras MG
Brazil - 37.200-000. ² Engineering Department, Federal University of Lavras, Caixa Postal
3037 Lavras MG Brazil - 37.200-000

**Author to whom correspondence should be addressed. e-mail:*

juliana_alvarenga@yahoo.com.br

ABSTRACT

For consumers, fresh-cut fruits and vegetables are a highly convenient product and a healthy source of fresh food that has nutritional and sensory characteristics similar to those of intact products. In this paper, a non-destructive method for analysis of fresh-cut fruit and vegetables is described. The biospeckle laser technique is based on the optical phenomenon of interference generated by a coherent light interacting with biological materials or dynamical systems. Although many publications on this technique's biological applications have reported that biospeckle activity corresponds to the activity of biological samples, there is some difficulty in determining the correlation between a particular phenomenon and the activity observed. In this study, we evaluated the use of biospeckle data in measuring the physiological properties of fresh-cut carrots stored at two temperatures, 0 °C and 10 °C. In conjunction with this, the moisture content, respiration rate, water activity, and mass loss changes were monitored using traditional analytical methods in order to evaluate the possible correlation of the biospeckle data with any of these phenomena, with or without the use of frequency signatures. The results showed that only by removing the high frequencies could the manifestation of the water in the monitored activity be isolated, thus allowing the activity manifested in the material to be linked to a specific phenomenon such as respiration. We were therefore able to monitor the respiration process in fresh-cut carrots, as well as assign a spectral signature to their water content and respiration.

Keywords: Biospeckle laser, Wavelet transform, Water activity, Respiration rate, Fresh-cut, Carrots.

1 Introduction

Fresh-cut fruit and vegetables have recently become more popular in response to the increasing demand by consumers for fast preparation or ready-to-eat food (Koukounaras et al., 2008), and also in response to the health benefits associated with a diet rich in fruits and vegetables. Several studies have been conducted to investigate the shelf life of fresh fruits and vegetables using chemical, physical, and microbiological methods (Corbo et al., 2006), and even mathematical models, to estimate the stability of these products' microbial, chemical, and sensory qualities (Montero-Calderon et al., 2008). These approaches, however, are expensive, slow, and require considerable analytical skills. Quick, non-destructive methods of assessing the ripening, quality, and senescence of food products have recently become increasingly important, particularly those involving optical techniques.

An optical method that is emerging as a tool for the non-destructive and non-invasive measurement of food quality is based on the interpretation of the optical phenomena that occur when coherent light is focused on a sample. When the light of a laser reaches a material that exhibits some kind of activity, this creates changes in the light scattering, producing an interference phenomenon that is referred to in the literature as biospeckle or dynamic speckle.

The measurement of a given activity based upon biospeckle data can be performed by means of graphical and numerical outputs, depending upon the application and the characteristics of the illuminated material. One numerical approach to the analysis of images via the laser illumination of tissues consists of creating a space time speckle (STS) pattern, as suggested by Oulamara et al. (1989) and Xu et al. (1995), an approach that is also known as a Time History of Speckle Pattern (THSP) (Arizaga et al., 1999). The THSP thus represents the

variation, in time, of the activity in the region of a biospeckle pattern formed by the projection of a laser beam onto the material under analysis. The Inertia Moment (IM) technique, presented by Arizaga et al. (1999), has been used as a reliable technique for numerically quantifying this activity by means of the THSP image, returning a dimensionless number that indicates low or high activity of the materials monitored.

Several studies have been developed with regard to foods and in plants that employ the technique of biospeckle laser, such as its application to seeds, for example, to measure their water content measurement or to detect fungi (Arizaga et al., 1999; Braga Jr., 2000; Moreira et al. 2002; Rodrigues et al., 2005; Braga Jr. et al., 2005). In vegetables, interesting insights can be obtained by the biospeckle laser technique, since the degree of biological activity of the illuminated surface can have various origins, such as the food's level of maturity, decay, growth, metabolism, water content, and temperature, among others (Braga and Rabal Jr., 2008). Works using a biospeckle laser have been developed in order to analyze bruises in apples (Pajuelo et al., 2003), and the soluble solids and firmness of apples (Zude et al., 2006, Qing et al., 2007), to monitor the quality of oranges (Rabelo et al., 2005), assess tomato ripening (Romero et al., 2009), and analyze the pigments in foods (Zude et al., 2008). Other such works have focused on analyzing the process of senescence in plant tissues, fruits and vegetables (Silva and Muramatso, 2006), and even to correlate the biospeckle activity of the chlorophyll content in apples (Zdunek and Herppich, 2012).

The routine methods that have been proposed in order to analyze such activities using biospeckle are based on the summation of many contributions related to a wide range of phenomena. Thus, these traditional approaches lack the ability to separate or isolate a particular feature.

A means of investigating the further separation of signals with the use of spectral ranges has been considered a feasible alternative (Sendra et al. 2005) that can be improved by the use of wavelet transform (Limia et al. 2002; Passoni et al., 2005). The advantage of wavelet transform, as associated with the IM method, is its ability to represent an activity by filtering only the desired signal, which gives the signature of the biological phenomena being studied. Braga Jr. et al. (2007) showed that it was possible to isolate certain features by using the frequency domain, particularly through the wavelet transform.

Braga Jr. et al. (2007) presented the results of an analysis of biospeckle data using wavelet transformations, coefficient filtering, and reconstruction in a novel approach to increasing the information obtained. The data used were from two distinct biological investigations - of crop seeds and of animal sperm - and in the latter case, the results showed that filtering made it possible to identify the effects of dilution of the sperm sample, allowing for the isolation of nuisance covariates. Recently, Cardoso et al. (2011) used wavelet transform to create maps of the frequency of biological materials, of maize and bean seeds in particular, in an effort to isolate water activity. Wavelet transform was then used in conjunction with traditional biospeckle laser methods, Fujii, Generalized Differences, and Time History Speckle Patterns. The data analysis allowed for the access of information at different frequencies, making it possible to map activities that only occur within certain ranges in the seeds, and that are associated with particular areas. These results confirmed that the work made it possible to identify the frequency bands at which water activity may be taking place, thus creating a signature that could be useful in further works.

The current search for scientific and technological resources that have lower cost and broad applicability is intense. Due to the complexity of biological materials, it is necessary to develop research processes that ensure greater efficiency in isolating areas of different activities in the same material using

biospeckle. The possibility of creating frequency markers related to physical or chemical phenomena during biospeckle laser monitoring opens the way for important applications in the analysis of biological materials (Cardoso et al., 2011). The same issue was raised by Kurenda et al. (2012) in a recently published study, in which the authors evaluated the effect of temperature on the activity of biospeckle, and reported that the phenomenon arises mainly due to biochemical metabolic processes. The authors further described the need to determine whether the biological results of biospeckle activity are valid in comparison to actual physiological processes, and not only to the theoretical data, as was the case in their work.

Taking up this issue, this study sought to identify different physiological phenomena in fresh-cut carrots stored at different temperatures, using the laser biospeckle technique in association with spectral approaches, in order to isolate particular phenomena, such as respiration and those related to water.

2 Materials and Methods

2.1 Samples

Carrots (*Daucus carota* L.) were purchased at a local market and were then washed in water with detergent, sanitized in a solution of sodium hypochlorite 100 mg.L⁻¹ for 15 minutes, and dried at 18 °C. The carrots were manually sliced in the transverse direction (5-mm thick) with a sharp stainless steel knife. The sliced carrots were then immersed in a solution of sodium hypochlorite 100 mg.L⁻¹ for 5 minutes. They were then packed in rigid polypropylene (15 x 11.5 x 4.5 cm) with a hard cover made of the same polymer. The packages containing the product were stored at 0 °C ± 1 °C and 85 ± 5% RH and at 10 °C ± 1 °C and 90 ± 5% RH. The fresh-cut carrots were analyzed at two-day intervals over a ten-day period. On each sampling day, three

and six individual samples were used to carry out chemical and *biospeckle* laser analysis, respectively.

During the assay, the temperature effect on the Inertia Moment (IM) was examined by simulating a practical situation. The trays containing the fresh-cut carrots were removed from cold storage and the vegetables waiting for the lighting at room temperature. The experiment aimed to evaluate whether the activity identified by biospeckle might be influenced by environmental conditions prior to the illumination of the vegetables. Therefore, the vegetables were analyzed over time, immediately after being removed from the storage temperature, and 30 min and 60 min after being exposed to ambient conditions (approximately 20 °C).

2.2 Analyses

- *Mass loss* was calculated as the difference between the initial mass of the fresh-cut carrot obtained within the package, and the mass determined at each storage interval, using a semi-analytical balance Mettler Model PC2000.
- *Moisture content* was determined by a gravimetric technique, using an oven at 105 °C, with spot checks to obtain the constant mass, according to AOAC (2005).
- *Water activity (Aw)* was determined using AQUALAB equipment, Decagon 3TE model, (Decagon Devices, Inc.). The samples were placed in plastic containers and readings were performed at a controlled temperature of 25.0 ± 0.3 °C. Measurements were made in triplicate.
- *Respiration rate* was calculated by measuring the amount of CO₂ produced by a known mass of fresh-cut carrots (approximately 80 g) that was conditioned in hermetic glassware of known volume. This was done using the gas analyzer

Check Point O₂ and CO₂, PBI Dansensor. The results were expressed in milliliter of CO₂ per kilogram per hour.

2.3 Inertia Moment (IM)

2.3.1 Experimental Configuration

A schematic of the experimental configuration of the backscattering that was adopted is presented in Fig. 1. The experimental equipment consisted of a low-power HeNe laser (10 mW, 632.8-nm wavelength), a lens assembly that expanded the laser beam so that it covered the entire sample, a digital color charge-coupled device (CCD) camera, and a personal computer with an image processor. The 128 acquired images (resolution: 640×486 pixels; sampling rate: 0.08 s; shutter speed: 1/60 s) were digitized to 8 bits and stored in the memory of the computer. The angle between the laser beam and the CCD camera was adjusted in order to obtain images with a greater contrast of images.

The analysis of the images was performed via the construction of the Temporal History Speckle Pattern (THSP) and the Inertia Moment (IM), as obtained according to Cardoso (2011).

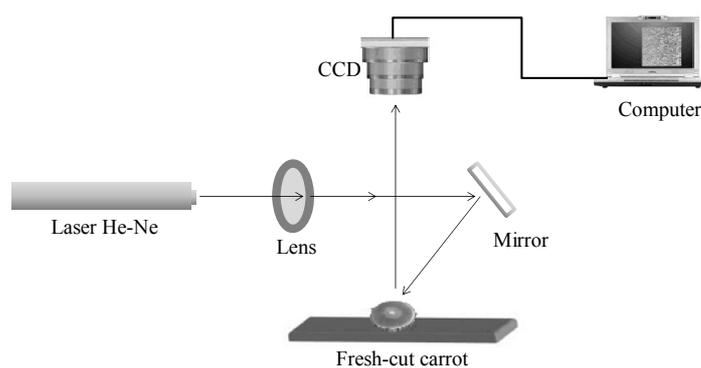


Fig. 1 Configuring the backscattering

2.3.2 Image Processing

Figure 2 shows the steps used for IM calculation (Arizaga et al., 1999) before filtering, and re-analysis using the same method after filtering, using the wavelet transform as reported by Braga et al. (2007). We used 128 images of 486×469 pixels, and it was possible to obtain results in 25 frequency bands between 0 and 6.25 Hz.

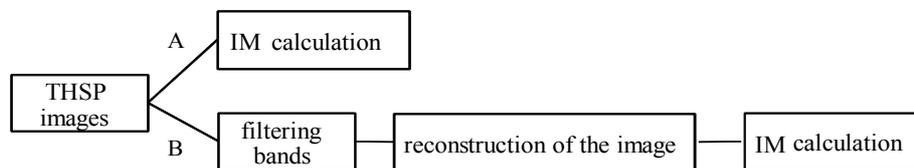


Fig. 2 Steps used for Inertia Moment (IM) calculation without filtering (A), and with filtering (B).

The reconstruction of the images was performed by removing one band at a time for the signal provided by each pixel of the images. For example, band 1 (related to 6.00-6.25 Hz) was removed and the image was reconstructed with the remaining bands (2-25). This image was called Without 6.00-6.25Hz, i.e., a result that did not include band 1. The same procedure was adopted to exclude each band in sequence, until band 25 (Without 0- 0.25 Hz).

An additional filtering step was performed by reconstructing the images without the expression of the first 10 bands or the highest 10 ranges.

2.3.3. Numerical analysis

The Inertia Moment (IM) was determined using the prime method (Arizaga et al., 1999) and a change in the normalization of the data proposed by Cardoso (2011). The prime method of determining the IM was based on the

THSP and the formation of the co-occurrence matrix (Arizaga et al., 1999). The IM was then determined using Eq. 1.

$$IM = \sum_1^M \frac{COM_{i-j}}{NORM} (i-j)^2$$

where COM was the co-occurrence matrix, and the values of i and j were related to the position in the THSP, with j representing the gray value in the pixels that follows the gray value of pixel i in all the elements of the matrix represented by the limits of the summation from 1 to M .

The NORM, in turn, represents the approach used to normalize the COM matrix. The prime normalization makes the summation of the occurrences in each row equal to 1, and the alternative normalization adopted here makes the summation of all the occurrences in the role matrix equal to 1.

2.3.4. Statistical analysis

The results for the response variables evaluated were subjected to variance analysis. The treatment means were compared using the Tukey test at 5% probability. The regression models were evaluated by the coefficient of determination with the aid of the software Sisvar (Ferreira, 2000).

3 Results and Discussion

3.1 Analysis

The mass loss of fresh-cut carrots was separately influenced by the factors of storage time and temperature ($p < 0.05$). This was observed in increases in the mass loss over the storage period (Fig. 3A). The mass loss was

2.13% and 1.74% for the carrots stored at 10 °C and 0 °C, respectively. The lowest mass loss for the carrots stored at 0 °C can probably be attributed to the combined effects of storage temperatures, humidity, and packaging, which minimized the loss of water from the product. According Kader (2002), the main factor responsible for mass loss is transpiration, which is closely related to the respiration of a product. It is known that the lower the storage temperature, the lower the respiration rate, and therefore a lower transpiration rate and consequently a lower mass loss.

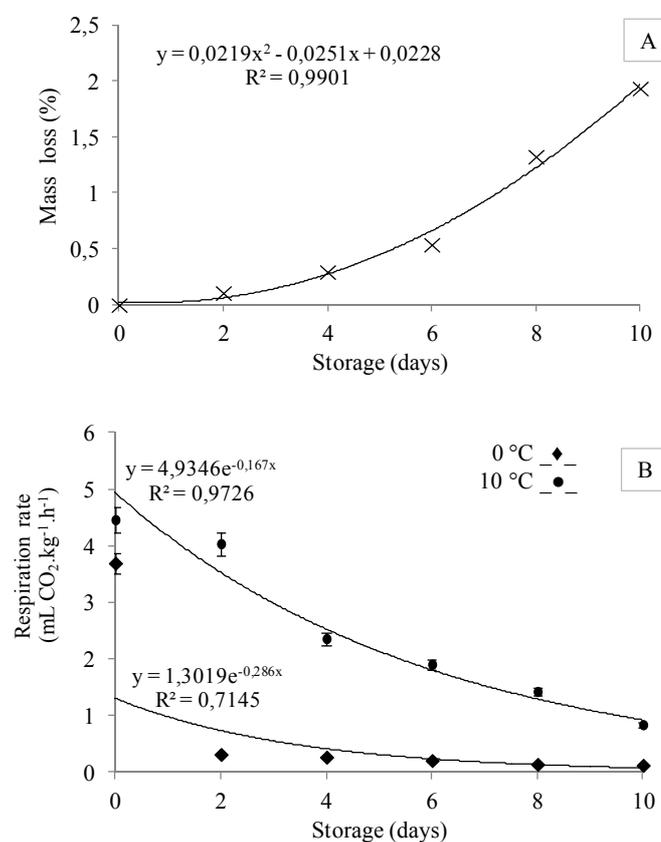


Fig. 3 Mean values, regression equation, and coefficient of determination of mass loss (A), and respiration rate (B) in fresh-cut carrots stored at 0 °C and 10 °C for 10 days.

The moisture variable was then influenced by the temperature factor. The average moisture values were 91.55% and 90.36% for fresh-cut carrot samples stored at 0 °C and at 10 °C, respectively.

The water activity was not influenced by the temperature or storage time in fresh-cut carrots stored at 0 °C and 10 °C, and the mean value during storage was 0.99.

The respiration rate was significantly influenced by the interaction between the temperature and storage time. Fresh-cut carrots stored at 10 °C had higher respiration rates than those kept at 0 °C, on all storage days (Figure 3B).

As shown in Figure 3B, the respiration rate of fresh-cut carrots decreased during storage (4.45 mL CO₂.kg⁻¹.h⁻¹ to 0.83 mL CO₂.kg⁻¹.h⁻¹ in fresh-cut carrots stored at 10 °C, and 3.68 mL CO₂.kg⁻¹.h⁻¹ to 0.116 mL CO₂.kg⁻¹.h⁻¹ in fresh-cut carrots stored at 0 °C). The high temperature storage (10 °C) maintained a higher respiration rate during all days of storage. Also, the high temperature had an influence on the respiration rate of the product. At 10 °C there was a decrease in the slow respiration rate, while at 0 °C the variation of the respiration rate was greater in the first two days, then reached an equilibrium after the second day of storage.

According to Wills et al. (1998), the respiration rate of a product is an excellent indicator of tissue metabolic activity, and is therefore an important factor in determining the potential product life. The deterioration rate, i.e., the perishability of harvested products, is usually proportional to the respiration rate (Kader, 2002).

3.2 Inertia Moment - without filtering

The results of the preliminary experiment that was conducted show no statistically significant difference between the IM calculated immediately after

fresh-cut carrots were removed from the cold, and the IM obtained 30 and 60 min later. Thus, it can be said that fresh-cut carrots can be exposed to an environment of 20 °C for 60 min without alteration of their IM.

The speckle patterns of laser light scattered in fresh-cut carrots were measured through their quantification. From these functions we obtained the Inertia Moment (IM), which was calculated from the normalized occurrence matrix. These values were used as indicators of physiological activity for the fresh-cut carrots, which were compared with other variables such as moisture content, respiration rate, and water activity during the storage period.

In this article, the respiration rate was used as a reference for the physiological activity in fresh-cut carrots, since, according to Kader (2002), the respiration rate is the main post-harvest physiological process that occurs in vegetables. The respiratory activity of fruits and vegetables is directly related to their composition and the chemical changes that occur, in addition to the modification of their cellular organization, the permeability of membranes, and the transport of metabolites to the tissues, since the energy released by respiration is used to continue the synthesis processes necessary for their survival.

The IM was obtained from the illuminated samples just after they were removed from cold storage. The IM was significantly influenced by the interaction between the temperature and storage time. Fig. 4 presents the results for the process without any filtering, in which the IM decreases in fresh-cut carrots stored at 0 °C and 10 °C.

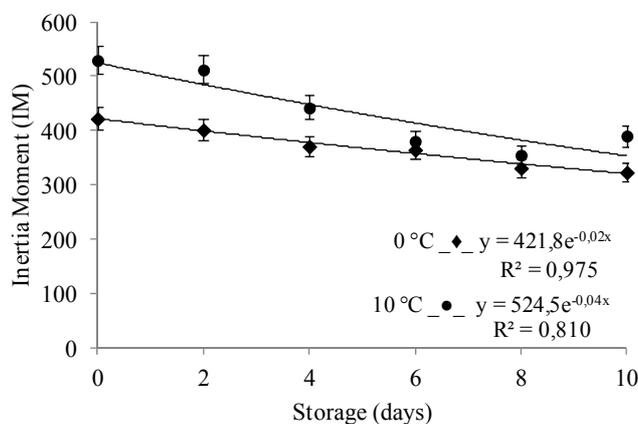


Fig. 4 Mean values, regression equation, and coefficient of determination of Inertia Moment IM in fresh-cut carrots subjected to two temperatures, 0 °C e 10 °C, and stored for 10 days.

In addition, we observed that the IM did not display the same behavior as the physiological activity of the vegetable, based on the respiration rate, but was strongly influenced by the water activity. The observed activity of the fresh-cut carrots can be attributed to the water activity, and can also be explained by the high volume of water (moisture content about 90%) in the tissue, together with its physiological activities. The effect of moisture on IM values has been documented in previous studies that have demonstrated its effect in increasing the values of IM.

Once the activity promoted by the water in tissue masks the observation of that tissue's metabolic activities, it is difficult to identify and compare "fresh" versus "old" tissue, and to detect internal injuries (chilling) and the climacteric period, among other alterations that take place over time. For this reason, the isolation of water activity in the observed data obtained using the biospeckle technique has great significance for improving the results of vegetable analysis.

The results shown in Fig. 4 reveal only that the IM decreases over time, and that the decrease was smaller in fresh-cut carrots stored at 0 °C. They do not, however, allow for any clear interpretation of how they are physiologically related.

The relationship between temperature and biospeckle activity was determined recently by Kurenda et al. (2012), who found it possible to determine only that the value of C^4 (a correlation coefficient used in characterizing biospeckle activity) decreases with an increase in temperature, which indicates that biospeckle activity increases with temperature. According to the authors, to facilitate the practical use of a biospeckle technique, future research will need to include the development of new methods and the improvement of existing methods of determining biospeckle activity. Research will also need to determine whether the biological activity resulting from biospeckle activity is valid in comparison to real biological processes, and not only to theoretical data.

Although biospeckle technology has presented reliable results, e.g., for seeds (Braga Jr. et al., 2003,; Braga Jr. et al., 2005,), animal sperm (Nascimento, 2005), fruits (Rabelo, 2000; Pajuelo et al., 2003,) and soap films (Tebaldi et al., 2004), some information is lost during the procedure of obtaining just one number that summarizes the behavior of the process. This can be a limitation when the object being analyzed presents changes over time, or when the data present a composition of features with distinct frequencies (Jakubauskas et al., 2002; Yang et al., 2005).

In order to improve the existing methods of determining biospeckle activity, we evaluated the use of wavelet transform with filtering frequencies and reconstruction of the THSP images obtained from the biospeckle laser technique, in order to correlate them with the physiological phenomena in fresh-cut carrots.

3.3 Inertia Moment - with filtering

Fig. 5 shows the IM that results from processing of the original THSP images of fresh-cut carrots using wavelet transform, obtained by filtering and reconstructing the images by excluding only one frequency band (beginning with the exclusion of band 1 and continuing, in sequence, until the exclusion of band 25).

In Fig. 5 it can be seen that the behavior with the removal of frequencies was significantly higher for carrots stored at 10 °C. In this case, it is observed that, by removing the higher frequencies, the behavior of the IM is similar to the behavior exhibited by the respiration rate (Fig 3B), which is the main physiological process of fresh-cut carrots during storage at 10 °C. The main hypothesis was then related to the removal of the water expressed by the higher frequencies, which allows the material to express itself more via other phenomena, such as respiration activity. However, when signal reconstruction was performed without the lower frequencies (ranging from 11 onwards), the observed activity can be attributed mainly to the presence of water in the tissue in determining the physiological activity. It is possible to see that the IM values were represented by a linear curve in response to low frequencies, and that the values of the frequencies did not produce a significant change in the IM values during storage, which was not the case in the high frequency range (Nobre et al., 2009).

For fresh-cut carrots stored at 0 °C, it can be seen that the physiological activity and water activity are apparently not separated in frequency. The behavior of IM constant over time can serve as a measure for the integrity of fresh-cut carrots stored at this temperature, and can also serve as an indicator if any change in the IM is perceived during storage.

To confirm this hypothesis, and in seeking to separate water activity from other physiological activities, we performed another frequency filtering step using wavelet transform. This time, however, rather than remove the frequencies one by one, we filtered frequency groups in order to find a statistically significant difference that could serve as a basis for predicting the separation of water activity from other physiological activity. Here, the filtering was based on the exclusion of the higher frequencies during the reconstruction of the signal. After reconstruction of the signal without the ten initial ranges, the signal was analyzed using IM methodology.

A statistical analysis was performed by scrolling through the time within each temperature (data not shown), and the results confirmed that for fresh-cut carrots stored at 0 °C, there was no statistically significant difference in IM over time, even with the use of wavelet transform. Unlike the case for carrots stored at 10 °C, the IM varied over time and was thus statistically significant, even when the image was reconstructed by excluding the first 10 bands together. This result enhances the expression of the water and the behavior of the IM, which was similar to the behavior exhibited by the respiration rate.

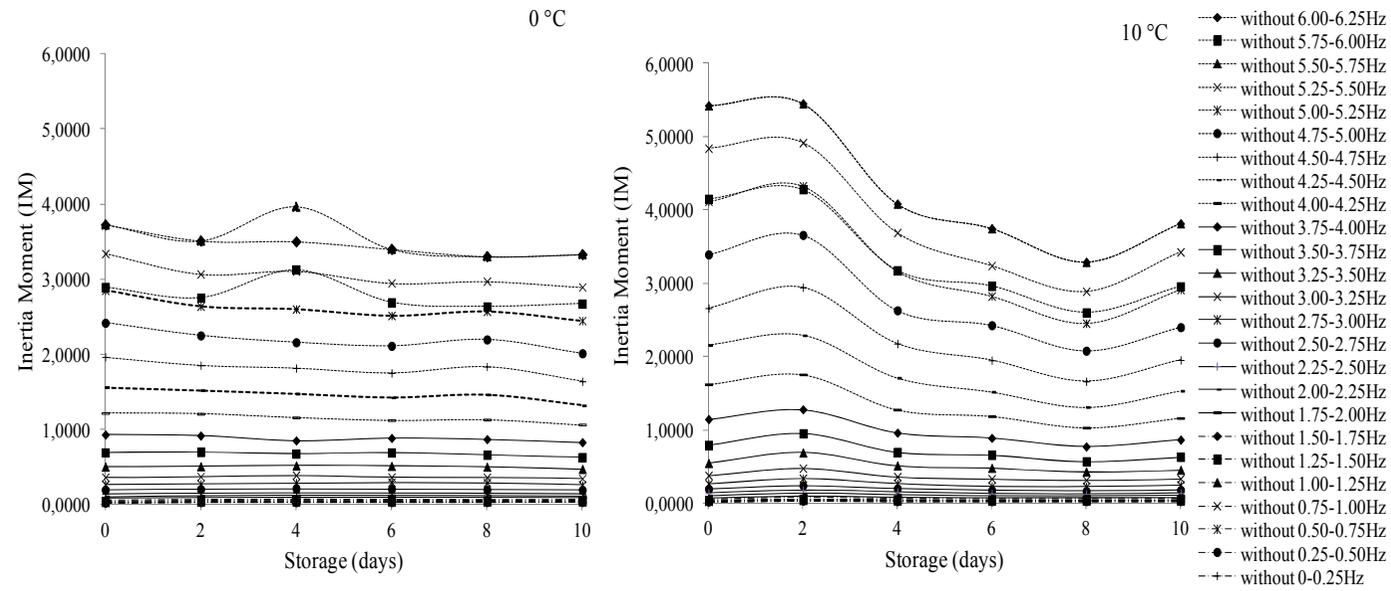


Fig. 5 Inertia Moment (IM) of fresh-cut carrots stored at 0 °C and 10 °C with filtering and reconstruction of the images by excluding only one frequency band, using wavelet transform.

Figure 6 presents the relationship between the respiration rate as measured using the conventional method, and the IM obtained by the biospeckle laser technique through the exclusion of the first 10 bands together. It can be seen in the figure that an increase in the respiratory rate resulted in a linear increase in the Inertia Moment.

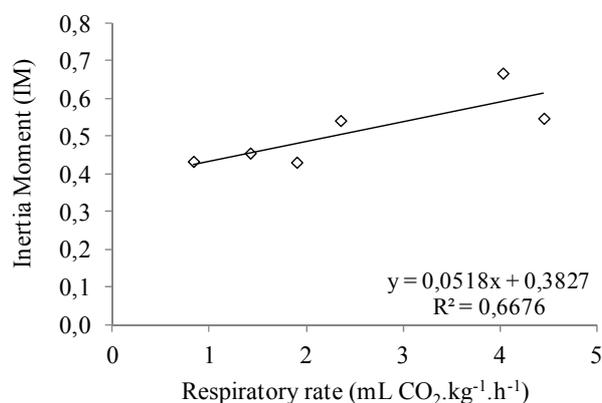


Fig. 6 Relationship of the Inertia Moment (IM) to the respiratory rate of fresh-cut carrots stored at 10 °C for 10 days.

Finally, in Fig. 5 it can be seen that the IM of fresh-cut carrots stored at 10°C is greater than that of carrots stored at 0 °C, but that both cases tend to produce the same values after removal of the first 10 frequency bands. Statistically, the IM of carrots stored at 0 °C (0.67) and 10 °C (0.71) did not show a significant difference with the exclusion of band 11, which leads us to conclude that the physiological activities did not show any relevant changes in the speckle patterns in this spectral band, which is a region that is probably influenced by water activity, since this variable also showed no statistically significant difference for the fresh-cut carrots stored at 0 °C versus 10 °C during ten days of storage.

Cardoso et al. (2011) found a result similar to that of this work. According the authors, the results showed an area in the seed that operates at a

higher rate in the high frequency bands that are related to a portion of the seed that manifests a higher degree of biological activity during germination. It was also noted that there are a number of phenomena that occur in all seeds, from the medium to the lowest frequencies, which are related to the water activity, which is characterized by a signature frequency that is also seen in corn.

These results confirm that it is possible to isolate a variable from biospeckle data using a spectral approach, by improving the results by filtering out non-desirable variables.

The use of certain frequencies for the IM calculations shows that the phenomena that constitute biospeckle are selective; that is, they are restricted to narrow bands of frequency that improve the isolation of phenomena. This property offers the promise of potential applications to many biological materials that require the isolation of areas of activity (Cardoso et al., 2011).

The present work has presented steps that can achieve the actual isolation of biological phenomena by means of spectral approaches that are associated with routine numerical methods. The observation of water activity in different spectral ranges, and the evaluation of routine methods, have produced novel information with regard to the effort to separate and distinguish among the different phenomena responsible for biospeckle patterns.

The application of the biospeckle laser showed results that will encourage new research to obtain a method of analysis of physiological phenomena in vegetables, i.e., water activity and/or respiration rate, as well as to develop other useful applications. Further work remains to be done, however, in order to optimize and implement this technique.

4 Conclusions

We can conclude that by using the biospeckle laser measurement system in association with spectral approaches, by isolating the areas of different

activity through filtering, it was possible to non-destructively assess the water and the respiration rate, separately, in fresh-cut carrots stored at 0 °C and 10 °C.

Acknowledgements

Special thanks to Federal University of Lavras, and to the Brazilian sponsors CNPq, FAPEMIG, and Capes for their financial support.

References

Association Of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 18. ed. Maryland, 2005.

Arizaga, R., Trivi, M., Rabal, H., 1999. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. *Opt. Laser Technol.* 31, 163–169.

Braga Jr. R.A., Horgan G.W., Enes A.M., Miron D., Rabelo G.F., Barreto Filho J.B. 2007. Biological feature isolation by wavelets in biospeckle laser images. *Comp. Elect. Agric.*, 58, 123–132.

Braga Jr., R.A., Rabelo, G.F., Granato, L.R., Santos, E.F., Machado, J.C., Arizaga, R., Rabal, H.J., Trivi, M., 2005. Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique. *Biosyst. Eng.* 91, 465–469.

Braga Jr., R.A., Dal Fabbro, I.M., Borem, F.M., Rabelo, G.F., Arizaga, R., Rabal, H.J., Trivi, M., 2003. Assessment of seed viability by laser speckle techniques. *Biosyst. Eng.* 86, 287–294.

Braga Jr., 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.

Cardoso, R.R., Costa, A.G., Nobre, C.M.B., Braga Jr., R.A. 2011. Frequency signature of water activity by biospeckle laser. *Opt. Comm.*, 284, 2131–2136.

Cardoso, R.R. 2011. Análise do speckle laser dinâmico: uma releitura. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras.

Corbo, M.R., Del Nobile, A., Sinigaglia, M., 2006. A novel approach for calculating shelf life of minimally processed vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 69–73.

Ferreira, D.F. 2008. SISVAR: a program for statistical analysis and teaching. *Symp.* n.6, p.36-41.

Jakubauskas, M.E., Legates, D.R., Kastens, H., 2002. Crop identification using harmonic analysis of time-series AVHRR NDVI data. *Comput. Eletron. Agric.* 37, 127–139.

Kader, A.A. Postharvest biology and technology: an overview. In: KADER, A.A. (Ed.). *Postharvest technology of horticultural crops*. 3rd ed. Berkeley: University of California, 2002. p.39-47.

Koukounaras, A., Diamantidis, G. & Sfakiotakis, E. 2008. The effect of heat treatment on quality retention of fresh-cut peach. *Postharvest Biol.Technol.*, 48, 30–36.

Kurenda, A., Adamiak, A., Zdunek, A. 2012. Temperature effect on apple biospeckle activity evaluated with different indices. *Postharvest Biol. Technol.*, 67, 118–123.

Limia, M.F., Núñez, A.M., Rabal H., Trivi M. 2002. Wavelet transform analysis of dynamic speckle patterns texture. *Appl. Opt.*, 32, 6745-50.

Montero-Calderon, M., Rojas-Grau, M.A. and Martin-Belloso, O. 2008. Effect of packaging conditions on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). *Postharvest Biol.Technol.*, 50, 182-189.

Moreira, M.F.B.; Braga Júnior, R.A.; Borem, F.M.; Rabal, H.J.; Rabelo, G.F.; Dal Fabbro, I.M.; Trivi, M.R.; Arizaga, R. 2002. Caracterização da Transmissão da Luz Laser em semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) .*Rev. Bras. Prod. Agroind.*, 4 (2), p. 119-126.

Nascimento, A.L., 2005. Biospeckle laser: Uma contribuicao para o desenvolvimento da tecnica na avaliacao biologica em meio liquido. In: Universidade Federal de Lavras (Ed.). Academic Press, Lavras.

Nobre, C.M.B., Braga, Jr. R.A., Costa, A.G., Cardoso, R.R., Silva, W.S. da, Sáfadi, T. 2009. Biospeckle laser spectral analysis under Inertia Moment, Entropy and Cross-Spectrum methods. *Opt. Comm.*, 282, 2236–2242.

Oulamara, A., Tribillon, G., Duvernoy, J., 1989. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. *J. Mod. Opt.* 36, 165–179.

Pajuelo, M., Baldwin, G., Rabal, H.J., Cap, N., Arizaga, R., Trivi, M., 2003. Bio-speckle assessment of bruising in fruits. *Opt. Laser Eng.* 40, 13–24.

Passoni, I., Dai Pra, A., Rabal, H., Trivi, M., Arizaga, R., 2005. Dynamic speckle processing using wavelets based entropy. *Opt. Comm.* 246, 219–228.
Qing, Z., Ji, B., Zude, M., 2007. Predicting soluble solid content and firmness in apple fruit by means of laser light backscattering image analysis. *J. Food Eng.* 82, 58–67.

Rabal, H.J.; Braga Jr., R.A. *Dynamic laser speckle and applications*. New York: Taulor and Francis, 2008. 304p

Rabelo, G. F.; Braga Junior, R. A.; Fabbro, I. M. D. 2005. Laser speckle techniques in quality evaluation of orange fruits. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 9, 570–575.

Rabelo, G.F., 2000. Avaliação da aplicação do speckle dinâmico no monitoramento da qualidade da laranja. In: Universidade de Campinas (Ed.). Academic Press, Campinas, 2000.

Rodrigues, S.; Braga Junior, R. A.; Rabelo, G. F.; Enes, A. M.; Batista, C. A. M.; Dal Fabbro, I. M.; Resende, O. 2005. Efeito da umidade na determinação da atividade biológica de sementes de feijão. (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizando imagens de speckle dinâmico. *Rev. Bras. Armazen., Viçosa - MG*, v. 30, n. 2, p. 135-139.

Romero G.G., Martinez C.C., Alanís E.E., Salazar G.A., Broglia V.G., Álvarez L. 2009. Bio-speckle activity applied to the assessment of tomato fruit ripening. *Biosyst Eng.*, 103, p. 116-119.

Sendra, I.L., Arizaga, R., Rabal, H., Trivi, M. 2005. Decomposition of biospeckle images in temporary spectral bands. *Opt. Lett.* 30 (13), 1641–1643.

Silva. E.R.; Muramatso, M. Monitoramento da evolução temporal de tecidos através do biospeckle. In: Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, XXIX, 2006, São Lourenço, Minas Gerais. Anais. Sociedade Brasileira de Física. CD. P. 131-1 (Resumo).

Tebaldi, M., Angel, L., Bolognini, N., Trivi, M., 2004. Speckle interferometric technique to assess soap films. *Opt. Commun.* 229, 29–37.

Xu, Z., Joenathan, C., Khorana, B.M., 1995. Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens. *Opt. Eng.* 34, 1487–1502.

Yang, C.C., Chao, K., Chen, Y.R., Early, H.L., 2005. Systemically diseased chicken identification using multispectral images and region of interest analysis. *Comput. Electron. Agric.* 49, 255–271.

Zdunek, A.; Herppich, W. B. 2012. Relation of biospeckle activity with chlorophyll content in apples. *Postharvest Biol. Technol.*, 64(1), 58-63.

Zude, M., Speinelli, L., Torricelli, A. 2008. Approach for nondestructive pigment analysis in model liquids and carrots by means of time-of-flight and multi-wavelength remittance readings. *Anal. Chim. Acta*, 623, 204–212.

Zude, M., Herold, B., Roger, J. M., Bellon-Maurel, V., Landahl, S. 2006. Nondestructive tests on the prediction of apple fruit flesh firmness and soluble solids content on tree and in shelf life. *J Food Eng.*, 77, 254–260.

Wills, R., McGlasson, B., Graham, D. and Joyce, D. 1998. *Postharvest. An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals.* 4th ed. 262 p. Hyde Park Press, Adelaide, Australia.