



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

Alisson Amorim Siqueira

**SISTEMA PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS  
MICROBIOLÓGICOS DE PREDIÇÃO E CONTAGEM DE  
COLÔNIAS POR ANÁLISE COMPUTACIONAL DE  
FOTOGRAFIAS**

JUAZEIRO – BA  
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

Alisson Amorim Siqueira

**SISTEMA PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS  
MICROBIOLÓGICOS DE PREDIÇÃO E CONTAGEM DE  
COLÔNIAS POR ANÁLISE COMPUTACIONAL DE  
FOTOGRAFIAS**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Paulo Gustavo Serafim de Carvalho  
Coorientadora: Marianne Louise Marinho Mendes

JUAZEIRO – BA  
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**MESTRADO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

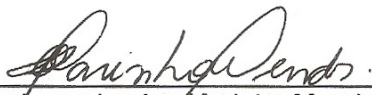
Alisson Amorim Siqueira

**SISTEMA PARA DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE  
PREDIÇÃO MICROBIOLÓGICA E CONTAGEM DE  
COLÔNIAS MICROBIOLÓGICAS POR FOTOGRAFIAS.**

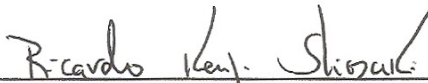
Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação *Strito Sensu* em Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.



Paulo Gustavo Serafim de Carvalho, Prof. D.Sc.  
Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF



Marianne Louise Marinho Mendes, Prof<sup>a</sup>. D.Sc.  
Universidade de Pernambuco – UPE



Ricardo Kenji Shiosaki, Prof. D.Sc.  
Universidade de Pernambuco – UPE



Marlon da Silva Garrido, Prof. D.Sc.  
Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

S618s Siqueira, Alisson A.  
Sistema para desenvolvimento de modelos microbiológicos de  
predição e contagem de colônias por análise computacional de  
fotografias / Alisson Amorim Siqueira. – Juazeiro, 2015.  
VIII; 96f.: il.; 29 cm.

Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em  
Engenharia Agrícola) - Universidade Federal do Vale do São  
Francisco, Campus Juazeiro, Juazeiro-BA, 2015.

Orientador (a): Prof.(a) Dr. Paulo Gustavo Serafim de Carvalho.

1. Modelagem - Computação. 2. Microbiologia. I. Título. II.  
Carvalho, Paulo Gustavo Serafim. III. Universidade Federal do Vale  
do São Francisco.

CDD 003.3

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelo livre arbítrio, pelo discernimento, por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas.

Agradeço imensamente ao meu orientador, o Professor Paulo Gustavo, pelo exemplo ímpar de profissional responsável, dedicado, atencioso e prestativo, pela pessoa incrível, honesta, amiga, inteligente, criativa e alegre. Muito obrigado por sua amizade, por seu incentivo, por acreditar em mim, pelos conhecimentos compartilhados e pelo entusiasmo contagiante com que faz todas as atividades e pela orientação impecável. Obrigado por me ajudar e instruir em cada passo, por transformar as dificuldades em oportunidades, por ter tornado tudo muito mais fácil. O que aprendi e aprendo contigo levarei comigo sempre. Não cabe em palavras e nem nesse curto espaço a quantidade de elogios e agradecimentos que tenho a te fazer. Os mesmos agradecimentos e elogios faço a minha coorientadora, a Professora Marianne Marinho, cujo tempo, contribuições e disponibilidade permitiram a realização desse trabalho.

A minha mãe, Angelita (Ângela), pela dedicação, amor, carinho e atenção constantes desde que me trouxe ao mundo. Muito obrigado por ter investido na minha educação pessoal e profissional, pelos valores ensinados, pelo exemplo de mulher honesta, forte e trabalhadora, por me incentivar em cada passo, por não me deixar baixar a cabeça, por insistir no que é certo e por tornar tudo mais fácil para mim. A minha irmã, Alana, pelo amor, amizade e carinho desde a infância, por cuidar de mim, pela cumplicidade, pelas aventuras e gargalhadas. Por me tirar do sério, por me tirar do trabalho, por ensinar que nunca devemos nos arrepender daquilo que nos faz sorrir.

A minha namorada Laísia, pelo amor, carinho, cuidado e proteção. Obrigado por estar sempre ao meu lado, por me acalmar com teu abraço depois de um dia corrido e complicado, por me mostrar tantas formas de ser feliz, por me convidar a experimentar o novo, por me contagiar com sua paz, com sua alegria, sua bondade, doçura e sabedoria. Sinto que ao seu lado sou muito melhor do que eu jamais poderia ser sozinho.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, em especial à professora Silvia Helena, pela atenção, apoio e incentivos. Aos amigos de Pós-graduação, que me ajudaram de diversas formas e me acompanharam em agradáveis momentos: Wilis, Victor, Nielton, Armando, Marcio, Henrique, Cintia, Sheila, Roberto, Saulo, Danielle, Indira, Fábio, Bruno, Mayara e em especial a Daniel Costa, que me incentivou a fazer a matrícula e a Rubem Franca, que muito me ensinou. Obrigado aos secretários Carolina Torres e Sinivaldo pela atenção e disponibilidade que sempre me receberam. Aos professores Miriam Cleide, José Aliçandro e Vanessa Donzelli pela disponibilidade e apoio a realização desse trabalho. Aos professores Marlon, Brauliro, Vivianni, Mario Miranda e Vanessa pelos importantes ensinados e incontáveis auxílios. Ao professor Kenji, pela paciência e ensinamento sobre a contagem de microrganismos e práticas de laboratório. A todos que não citei aqui, por falha de memória, mas que agradecerei pessoalmente. Muito obrigado a todos. A FAPESB pela concessão da bolsa de estudos e incentivo a esse trabalho.

*“...Meus olhos viram o que nenhum ser humano deveria testemunhar: câmaras de gás construídas por engenheiros ilustres; crianças envenenadas por médicos altamente especializados; recém-nascidos mortos por enfermeiros diplomados; mulheres e bebês assassinados e queimados por pessoas formadas em ginásio, colégios e Universidades.*

*Por isso, caro professor, eu duvido da educação. E eu lhe faço um pedido: Ajude seus estudantes a se tornarem humanos. Seus esforços, professor, nunca devem produzir monstros eruditos e cultos, psicopatas e Eichmans educados.*

*Leitura, escrita e aritmética são importantes somente se servirem a tornar nossas crianças e jovens mais humanos...”*

**Carta de um sobrevivente do holocausto  
endereçada a Janusz Korczak**

SIQUEIRA, A. A. **Sistema para desenvolvimento de modelos microbiológicos de predição e contagem de colônias por análise computacional de fotografias.**

2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, Juazeiro, BA.

## RESUMO

Os modelos de predição microbiológica são uma importante ferramenta para aferição da segurança alimentar e avaliação de riscos nos alimentos, proporcionando um caminho rápido e relativamente econômico para obtenção de estimativas confiáveis sobre o comportamento microbiano, de acordo com as condições de estocagem de um produto. Apesar da importância dos modelos de predição, a dificuldade de utilização e resolução dos mesmos, por consistirem de equações não lineares e sem solução analítica, impedem sua ampla utilização. A baixa disponibilidade de programas eletrônicos para trabalhar com dados microbiológicos, desde a contagem de colônias que irão fomentar os estudos de modelagem, até o ajuste dos dados em uma determinada equação, são outros entraves ao uso dos modelos de predição. Para superar essas dificuldades, esse trabalho teve por objetivo desenvolver ferramentas que facilitasse as atividades de avaliação e criação de modelos, bem como a contagem automática de colônias em experimentos através da análise computacional de fotografias. Para cumprir os objetivos propostos, gerou-se uma lista de funções ausentes e necessárias aos programas comumente empregados nas atividades de ajuste de modelos e contagem de colônias por fotografias. O desenvolvimento dessas funções foi realizada através da implementação de um interpretador computacional de funções matemática, métodos numéricos de Levenberg-Marquardt e Runge-Kutta, e técnicas de processamento, segmentação e identificações de colônias por fotografias. Através dessas técnicas criou-se dois softwares. O primeiro software desenvolvido permite ajustar, criar e comparar de modelos de crescimento microbiológicos, enquanto o segundo provê a contagem automática de bactérias por análise de fotografias. Ambos os programas funcionam sem dependências externas, são distribuídos gratuitamente, possuem interface clara e objetiva, com ferramentas funcionais, robustas e fáceis de utilizar.

**Palavras-chaves:** Modelagem de populações de microrganismos; Contagem de bactérias; segurança alimentar; Software de modelagem e contagem automática;

SIQUEIRA, A. A. **A software to create predictive models and count microbiological colony by computer photographs analysis.** 2015. 96f. Dissertation (Master in Agricultural Engineering), Federal University of São Francisco Valley - UNIVASF. Juazeiro – BA.

## **ABSTRACT**

The microbiological prediction models are an important tool for assessment of food safety and risk assessment in food, providing a quick and relatively economical way to obtain reliable estimates of microbial behavior, according to the storage conditions of a product. Despite the importance of prediction models, the difficulty of use and solve them, because they consist of non-linear equations and no analytical solution, prevent its widespread use. The low availability of electronic programs for working with microbiological data, from colony count for the modeling studies, to the data fitting in a given equation, are other barriers to the use of prediction models. To overcome these difficulties, this study aimed to develop tools that facilitate the activities of model evaluation and creation, as well as automatic colony count in experiments, by computer analysis of photographs. To meet the proposed objectives, it was generated a list of missing and necessary functions to commonly used programs in modeling activities and colony count by photograph analysis. The development of these functions were performed by implementing an computer math functions interpreter, numerical methods of Levenberg-Marquardt and Runge-Kutta, and processing techniques, segmentation and identification of colonies by photographs. Through these techniques was created two softwares. The first developed software is able to adjust, create and compare microbiological growth models, while the second provides automatic counting of bacteria analysis of photographs. Both programs operate with no external dependencies are distributed for free, have a clear and objective interface with functional tools, robust and ease of use.

**Keywords:** Modeling microbial populations; Count of bacteria; food security; Modeling and automatic counting software;



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>10</b> |
| 1.1. A conservação de alimentos e os modelos de predição .....              | 10        |
| 1.2. A contagem bacteriana como base de estudos microbiológicos.....        | 13        |
| 1.3 Contribuições esperadas e justificativas .....                          | 15        |
| 1.4 Objetivos do estudo .....   | 16        |
| 1.5 Organização da dissertação.....   | 17        |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                                       | <b>18</b> |
| 2.1 Modelagem matemática e ambiental .....                                  | 19        |
| 2.1.1 Conceitos básicos.....  | 20        |
| 2.1.2 Tipologia de sistemas.....  | 22        |
| 2.1.3 A modelagem como procedimento metodológico.....                       | 25        |
| 2.1.4 Características e funções dos modelos .....                           | 27        |
| 2.1.5 Procedimento guia para construção de modelos .....                    | 30        |
| 2.1.6 Limitações e Potencialidades da Modelagem (CHRISTOFOLETTI, 1999)..... | 31        |
| 2.1.6 Modelagem matemática de microrganismos.....                           | 32        |
| 2.2.1. Conceitos básicos.....   | 34        |
| 2.2.2. Sobrevivência e multiplicação de microrganismos.....                 | 37        |
| 2.2.3 Modelos matemáticos e curva de crescimento .....                      | 38        |
| 2.3 Visão computacional e processamento de imagens .....                    | 41        |
| 2.3.1. Espaço de cores e representação de imagem.....                       | 43        |
| 2.3.2 Etapas da visão computacional .....                                   | 46        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>48</b> |
| 3.1 Desenvolvimento do MicroFit.....  | 48        |
| 3.2 Desenvolvimento do MicroCount.....                                      | 53        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                      | <b>61</b> |
| 4.1 Desenvolvimento do MicroFit.....  | 61        |
| 4.2 Caso de uso do <i>MicroFit</i> com leite .....                          | 70        |
| 4.3 Desenvolvimento do MicroCount.....                                      | 72        |
| 4.4 Validação do MicroCount.....  | 82        |
| 4.5 Integração do MicroCount e do MicroFit .....                            | 83        |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....   | <b>85</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>86</b> |

## **1. INTRODUÇÃO**

As bactérias são os seres vivos mais adaptados e predominantes do planeta terra, capazes de ocupar desde o alto dos picos nevados até as profundezas dos leitos de vulcões (ROTHSCHILD et al., 2001) e de suportar as mais adversas condições de temperatura, salinidade, acidez, pressão e radioatividade encontradas na natureza terrestre (PIKUTA et al., 2007), conseguindo interferir de forma decisiva não só na vida humana (SALYERS, 2004), mas em toda a ecologia do planeta (PROSSER et al., 2007). Enquanto algumas bactérias são de grande importância para a indústria de alimentos e de fármacos, possibilitando a produção de queijo, iogurte, vinagre, vinho, frios e diversos outros produtos de valor comercial (VIEIRA, 2011), outras são responsáveis pela proliferação de doenças e deterioração das características físico-químicas dos alimentos, como mudanças de odor, sabor e aparência. Esse processo torna os alimentos impróprios para o consumo, sob o risco de infecção alimentar, e gerar prejuízos em toda a cadeia de distribuição (COSTA, 2011), exigindo um uso crescente de técnicas de conservação e estudos que maximizem o tempo de vida útil dos produtos (PINHEIRO et al., 2012), juntamente com pesquisas e desenvolvimento de soluções que colaborem com cada etapa dos estudos sobre segurança alimentar e controle de crescimento de microrganismos em alimentos.

### **1.1. A conservação de alimentos e os modelos de predição**

A importância da alimentação para a sobrevivência humana tornou a conservação de alimentos uma das mais antigas e importantes tecnologias apropriadas pelos homens (MOREIRA, 2010). Conservar um alimento significa reduzir a atividade microbiológica a fim de prolongar as características físicas, químicas e biológicas de um produto, mantendo-o próprio para consumo e ausente de bactérias que possam provocar doenças e infecções alimentares (VALSECHI, 2006).

Apesar do consenso de que os alimentos devem ser conservados e estocados corretamente, as doenças transmitidas por microrganismos são uma gravíssima questão de saúde pública em todo o mundo. Anualmente nos Estados Unidos ocorrem 48 milhões de casos, 128 mil internações e 3 mil óbitos relacionados à doenças alimentares, segundo os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDCs 2011). No Brasil o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) calcula que de 1999 a 2002 ocorreram 25.281 óbitos por doenças transmitidas por alimentos, com uma média de 6.320 óbitos/ano (MIN. DA SAÚDE, 2005).

A conservação de alimentos, bem como a predição das características físicas e químicas desses alimentos no momento de consumo, é uma das áreas de estudo da microbiologia preditiva, ciência que assume a hipótese de que os efeitos das propriedades dos alimentos podem ser previstos por meio de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos microrganismos e das condições de estocagem de um produto (NAKASHIMA et al., 2000). O aumento acentuado da preocupação pública por fornecimento de alimentos microbiologicamente seguros e saudáveis impulsionou o desenvolvimento da microbiologia preditiva, sobretudo o desenvolvimento de modelos de predição microbiológica (TELEKEN et al., 2011).

Os modelos de predição são definidos por Arroyo-López et al. (2014) como uma das mais importantes ferramentas para aferição da segurança alimentar e avaliação de risco nos alimentos, pois através das curvas de crescimento o pesquisador poderá explicar como ocorre a proliferação de um microrganismo em determinado alimento, prever o tempo que esse alimento poderá permanecer na prateleira e maximizar esse tempo pela modificação das condições de estocagem, como a temperatura, e informar ao consumidor até quando é possível utilizar o produto sem riscos.

Além de permitir a investigação e avaliação dos processos de conservação de alimentos e produtos, os modelos preditivos proporcionam um caminho rápido e relativamente econômico para obtenção de dados confiáveis sobre crescimento, inativação e sobrevivência durante o desenvolvimento microbiano (SARMENTO, 2006).

Um modelo preditivo pode ser de *nível primário*, quando mede a resposta de um microrganismo no tempo para um ambiente de condições estáticas, a exemplo de uma câmara com temperatura fixa, de *nível secundário*, quando descreve a

resposta dos parâmetros do modelo primário para as variações das condições ambientais, como em uma câmara simulando uma variação de temperatura em diversos pontos de um deslocamento, ou de *nível terciário*, quando se trata de *softwares* ou soluções eletrônicas para resolver os modelos do nível primário ou secundário (SWINNEN et al., 2004).

Os modelos preditivos primários são em sua maioria equações não lineares, a exemplo do modelo Logístico modificado (Eq. 01), da Equação de Gompertz (Eq. 02) e da Curva de Baranyi-Robert (Eq. 03), enquanto que os modelos preditivos secundários são equações diferenciais (Eq. 04), como descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Exemplo de modelos de predição microbiológica e suas equações.

| <b>Modelo</b>   | <b>Equação</b>  |          |
|---|---|----------|
| <b>Logístico Modificado</b><br>Modelo primário<br>(FUJIKAWA et al., 2004) | $Y(t) = A + \frac{C}{1 + \exp[-B(t - \lambda)]}$  | (Eq. 01) |
| <b>Equação Gompertz</b><br>Modelo primário<br>(ZHOU et al., 2012)         | $Y(t) = A \cdot \exp\{-\exp[-B(t - \mu)]\}$   | (Eq. 02) |
| <b>Baranyi &amp; Roberts</b><br>Modelo Primário<br>(CAYRE et al., 2007)   | $Y(t) = Y_0 + \ln \left[ \frac{-1 + \exp(\mu_{\max} \cdot \lambda) + \exp(\mu_{\max} \cdot t)}{-1 + \exp(\mu_{\max} \cdot t) + \exp(\mu_{\max} \cdot t + y_f - y_0)} \right]$ | (Eq. 03) |
| <b>Van Impe</b><br>Modelo Secundário<br>(Huang, 2003)                     | $\frac{dL}{dt} = \mu(L - A) \cdot \ln \left( \frac{B - A}{L - A} \right),$<br>$\mu = a(T - T_{\min})^2 \{1 - \exp[b(T - T_{\max})]\}$   | (Eq. 04) |

Trabalhar com equações não lineares e diferenciais desse tipo é geralmente trabalhoso e envolve dispêndio de tempo e atenção, pois uma pequena variação em um dos parâmetros provoca uma grande mudança no valor final da função. Além disso, essas equações não possuem solução analítica e para encontrar as constantes que melhor se ajustem a um conjunto de dados coletados, em cada um desses modelos, é necessário recorrer a métodos numéricos e computacionais, por vezes inacessíveis aos pesquisadores fora da área de exatas (SWINNEN et al., 2004). Se o pesquisador desejar encontrar a solução dessas equações, terá que inferir um valor inicial próximo da solução real, conforme exige a maioria dos algoritmos. Se a indicação for distante da solução, o algoritmo não irá convergir e gerar a resposta esperada, forçando o pesquisador a ficar experimentando soluções,

por tentativa e erro. Os entraves apresentadas tornam-se ainda mais graves ao se utilizar modelos de nível secundário, com equações diferenciais.

Diante da dificuldade de utilização dos modelos primários e secundários, torna-se essencial o uso de um modelo de nível terciário, uma motivação mundial para o desenvolvimento de *softwares* que facilitam o ajuste de dados experimentais aos modelos de crescimentos teóricos, sendo de grande utilidade, tanto para pesquisadores como para empresas (GEERAERD, 2005).

Atualmente estão disponíveis alguns programas e ferramentas desenvolvidas com intuito de trabalhar com modelos de predição. As soluções existentes geralmente não possuem executáveis autônomos, rodam apenas dentro de um programa proprietário, a exemplo do GlnaFit e DMFIT, que funcionam como complementos do Microsoft® Excel™ (ARROYO-LÓPEZ et al., 2012), apresentam dependências externas, baixa curva de aprendizado e todas as soluções executam apenas modelos internos, não permitindo criação de modelos ou adição de novos parâmetros (como pH, atividade de água ou concentração de sal) aos modelos existentes. Soluções com executáveis próprios e alternativas comerciais (BROWN, 2009) possuem as mesmas dificuldades.

As ferramentas de propósito geral e pacotes matemáticos, como o Matlab® e o R®, surgem como alternativa às deficiências dos softwares disponíveis (HUANG, 2014), entretanto, para utilizá-las são necessário conhecimentos de programação e cálculo numérico, normalmente distantes das áreas de saúde e ciências biológicas, o que torna trabalhoso novos esforços para desenvolver, testar e validar modelos de crescimentos, sendo necessário e cômodo uma ferramenta funcional que abstraia a complexidade matemática necessária para criar novos modelos de predição.

## **1.2. A contagem bacteriana como base de estudos microbiológicos**

A contagem de bactérias é um passo fundamental para diagnosticar níveis de infecção, estado de contaminação de produtos e prevenir doenças, com inúmeras utilidades para ciências biológicas, saúde e diversas áreas do conhecimento, atuando como base de estudos microbiológicos (SOUZA et al., 2012). Entender como as bactérias se comportam e se desenvolvem dentro de um ambiente, com o

passar do tempo, é essencial para desenvolver modelos de predição e técnicas para controle de doenças e fenômenos de origem bacteriana, bem como realizar qualquer atividade que objetive diminuir os gastos e as perdas de produtos e alimentos por proliferação de microrganismos (NAKASHIMA et al., 2000).

Esse entendimento advém da aferição da quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), uma região visível que se forma durante a contaminação e que tende a aumentar de número quando as condições ambientais favorecem esse desenvolvimento (ABELHO, 2012). Através da aferição da taxa de crescimento dos microrganismos e das variações decorrentes da modificação de variáveis ambientais, como temperatura, acidez, quantidade de água ou qualquer variável de interesse, é possível controlar ou amenizar o desenvolvimento dos microrganismos, interferindo diretamente no tempo em que um alimento levará para se deteriorar ou como uma doença será proliferada, por exemplo.

Para aferir o número de colônias formadas, após um período inicial de inoculação, é necessário recriar as condições na qual a bactéria será exposta no produto final, através do cultivo em meios de culturas, ou ambiente propício à reprodução, e respectiva contagem visual de colônias em diferentes instantes do tempo, cujo formato e quantidade dependerão do tipo de microrganismo (NAKASHIMA et al., 2000). Essa é um das principais técnicas utilizadas na Microbiologia para quantificar e isolar diferentes grupos de microrganismos, e mesmo diante das modernas técnicas de biologia celular e molecular, essa etapa continua sendo obrigatória quando se deseja isolamento e purificação de linhagens bacterianas (ALVES, 2006).

Os métodos de contagem podem ser classificados como diretos e indiretos. Os métodos diretos distinguem e contam individualmente os microrganismos, enquanto os métodos indiretos medem alguma propriedade da população total, como medida de turbidez, atividade metabólica ou microcalorimetria (PESSÔA, 2008).

A técnica de contagem visual de colônias em placas de Petri se destaca entre as rotinas de análise microbiológica, por ser mais antiga e reconhecida como o método de referência, além de mais preciso do que métodos indiretos de contagem. Outra vantagem do método direto é permitir que somente células viáveis sejam contadas e possibilitar o isolamento de colônias para cultivo em culturas puras, que

são mais facilmente estudadas e identificadas (CASSOLI, 2013). Apesar de ser uma técnica amplamente aceita e relativamente confiável, a contagem é um método trabalhoso, fatigante e propício a erros humanos de contagem, sobretudo quando é realizado por mais de uma pessoa (MIRANDA et al., 2004).

A principal dificuldade do método é o aumento do número de colônias visíveis ao longo de um experimento, que além dificulta a contagem e demandar mais tempo, eleva as chances de divergência de resultados, sendo desejável um mecanismo automático de contagem por computador, uma das principais aplicações do processamento digital de imagens, atualmente viável para contagens de células, árvores, frutas, amostras de solo, fungos, pólen, espigas, cromossomos, insetos, madeira, peixes, grãos, esperma, parasitas, plâncton, larvas, elementos geológicos, sedimentos, amianto, automóveis, circuitos impressos vários problemas de interesse prático (BARBEDO, 2012).

Para contar colônias, ou qualquer outro elemento, computacionalmente através de processamento de imagens, é preciso separar o que se deseja identificar de qualquer outra área que possa interferir na contagem, tornando o elemento de interesse distinto do restante da fotografia (FELICIANO et al., 2005). Ao realizar essa segmentação, a contagem possa ser executada por algoritmos que identificam e enumeram cada colônia formada, por meio de técnicas de visão computacional, uma tecnologia de identificação artificial que permite às máquinas obterem informações a partir de imagens, por vezes buscando a automatização de tarefas geralmente associadas à visão humana, de forma fácil e rápida (MONGELO, 2012).

### **1.3 Contribuições esperadas e justificativas**

Além de ser essencial para qualidade e segurança dos alimentos, a Microbiologia preditiva está intrinsecamente relacionada ao desenvolvimento econômico e social da população, através de pesquisas e técnicas que colaboram para diminuição dos gastos com patologias alimentares, um alarmante problema de saúde pública mundial.

Na base das técnicas utilizadas pela microbiologia preditiva, estão os modelos de predição microbiológica e a contagem de unidades formadoras de colônias,

entretanto, há uma visível carência por ferramentas que facilitem essas atividades e contribuam de forma significativa para realização das mesmas, com lacunas ainda não atendidas pelas soluções existentes, conforme apresentado anteriormente.

Esse desafio é principal incentivador desse trabalho, que espera poder contribuir para a Microbiologia Preditiva ao facilitar a análise de dados do comportamento microbiano em alimentos e incentivar o uso de modelos preditivos. Os modelos podem contribuir de forma efetiva para a diminuição dos alarmantes números de óbitos decorrentes de intoxicações alimentares.

É esperado ao final desse trabalho o desenvolvimento de dois *softwares*, ambos gratuitos, autônomos, funcionais e de fácil utilização. O primeiro é voltado para o ajuste, criação e comparação de modelos microbiológicos de crescimento microbiano, sem exigência de conhecimentos avançados de matemática ou estatística; O segundo tem por objetivo contribuir com a contagem automática de bactérias, de forma transparente e controlada pelo usuário. Espera-se que através das ferramentas aqui propostas, profissionais de microbiologia possam aumentar a produtividade, possibilitar novos empreendimentos e tornar a análise dos dados coletados mais rápida, fácil e confiável.

#### **1.4 Objetivos do estudo**

- Objetivos gerais:

- Desenvolver um programa de computador gratuito e autônomo que auxilie e facilite as atividades de criação de modelos de predição e contagem de colônias microbiológicas por análise de fotografias;

- Objetivos específicos:

- Disponibilizar um programa de computador capaz de trabalhar com dados e equações de crescimento de nível primário e secundário comumente encontrados na literatura;
- Desenvolver uma ferramenta que permita criar e comparar modelos de níveis primários e secundários;



- Desenvolver filtros de imagens e técnicas de detecção de objetos que permitam destacar e contar visualmente colônias em placas de Petri;
- Desenvolver uma interface fácil e acessível para os programas e ferramentas desenvolvidas;

### **1.5 Organização da dissertação**

Após as elucidações iniciais contidas nessa seção, esse manuscrito está dividido em 4 partes. Na primeira parte, será realizada uma revisão bibliográfica sobre os principais pontos que tangem a modelagem matemática, a microbiologia e a visão computacional; Na segunda parte, será apresentado os materiais e métodos utilizados para reprodução desse trabalho, com foco nas técnicas chaves; Na terceira parte, estão os principais resultados obtidos com o trabalho, bem como casos de usos e comparações realizadas; Na quarta e última parte, estão as considerações finais desse manuscrito e intenções futuras.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nessa seção serão apresentados os principais pontos necessários para entender o trabalho realizado, a saber, modelagem matemática, microbiologia e visão computacional. Tanto modelos preditivos quanto o processamento digital de imagens são produtos de uma técnica chamada modelagem matemática, que está na base desse estudo. Modelar matematicamente um sistema microbiológico significa representá-lo por meio de uma abstração do processo real, que é complexo e envolve inúmeras variáveis, sem, contudo, perder a precisão ou as características base do processo que se deseja explicar. É impossível descrever, por exemplo, como se dará o desenvolvimento bacteriano dentro de um produto, considerando toda a atividade metabólica, variáveis ambientais como temperatura e pressão, componentes estruturais do produto inoculado, reações moleculares, eventos estocásticos e processos ainda não conhecidos pela humanidade, mas é possível simplificar todo esse ambiente através de equações matemáticas, que descrevem com relativa precisão a quantidade de colônias em um dado instante de tempo após o período inicial de desenvolvimento.

De forma semelhante, para realizar a identificação de qualquer objeto por processamento de fotografias, é necessário simplificar a representação da imagem para aspectos mais primitivos da visão, como imagens monocromáticas contendo somente o objeto de interesse, pois seria impossível para um computador reproduzir com precisão todos os processos que a visão e a mente humana realizam para reconhecer, interpretar e retirar informações de uma cena. Essa simplificação é realizada através de abordagens matemáticas que ressaltam partes de interesse da imagem, desde que se conheçam como a imagem está representada.

Ao utilizar modelagem, além de conhecimentos matemáticos e físicos, é preciso conhecer o que se deseja modelar, com seus aspectos teóricos e práticos, bem como as variáveis que o influencia e como o influenciam. Dessa forma, ao se trabalhar com bactérias, é de grande importância adquirir conhecimento básico sobre microbiologia, tanto para entender o que se busca explicar, quanto para poder explicar os resultados obtidos em termos comuns aos especialistas dessa área.

A teoria e ideia da modelagem estão intrínsecas aos procedimentos metodológicos e científicos, a ponto de diversas vezes passarem despercebido ou não serem citados explicitamente.

## **2.1 Modelagem matemática e ambiental**

Para Christofoletti (1999), a modelagem matemática constitui um procedimento teórico envolvendo um conjunto de técnicas com a finalidade de compor um quadro simplificado do mundo, cuja complexidade total é superior ao que a consciência humana é capaz de suportar e conceber. Modelar algo consiste em compor uma abstração da realidade, em função das concepções de mundo, trabalhando no campo da abordagem teórica, ajustando e/ou orientando experiências empíricas.

A modelagem ambiental, por sua vez, possui a função de representar os fenômenos da natureza e de estabelecer delineamentos para a elaboração de novas hipóteses no contexto das teorias ou leis físicas, favorecendo com que os enunciados sejam formulados de modo adequado para testes, visando à ratificação ou refutação das ideias preestabelecidas (DOURADO NETO et al., 1998; THORNLEY, 1998).

Segundo Barioni et al. (2003), pode-se apontar como aspectos positivos da modelagem: i) fazer previsões de interesse particular, ou cenários futuros, a partir de dados conhecidos, visando nortear tomadas de decisão e otimizar sistemas de produção; ii) descobrir o que se deve buscar para entender um sistema para que os atributos escolhidos representem precisamente o comportamento do modelo; iii) identificar lacunas do conhecimento, se os atributos não forem capazes de descrever as relações e interações do modelo; iii) nortear a pesquisa, através do rastreamento oferecido pela composição do modelo e iv) fornecer subsídio teórico para estudos mais amplos e mais complexos.

Obviamente, por ser uma abstração da realidade, o modelo precisa ser validado com situações reais, com uma boa aproximação do sistema real. O estabelecimento de valores aos parâmetros dos modelos e identificação dos

parâmetros fisicamente mensuráveis do mundo real se constitui outra dificuldade, bem como o conhecimento sobre a faixa de validade do modelo (DETOMINI, 2004).

A escolha de um modelo apropriado como sendo parte de um projeto de pesquisa deve sempre estar estreitamente ligada às necessidades da pesquisa planejada, operacionalizado em escalas temporais e espaciais adequadas. À medida que a pesquisa se desenvolve, deverá ocorrer uma interação entre o experimento e o modelo: os dados experimentais sendo usados para melhorar ou substituir o modelo, que propiciará novas previsões que poderão ser relevantes ao local da pesquisa e ao conjunto de dados (CHRISTOFOLETTI, 1999).

Os conceitos relacionados a sistemas e modelos encontram-se intrínsecos a todos os procedimentos da modelagem de sistemas ambientais. Essas ideias expressam perspectivas ligadas com as maneiras de se conceber a estruturação e o funcionamento dos fenômenos da natureza, auxiliando o modelador nas diferentes etapas da modelagem matemática (CHRISTOFOLETTI, 1999). A teoria básica de sistemas e modelagem engloba conceitos de abordagem holísticas e reducionistas e características e funções dos modelos, que são apresentados a seguir.

### 2.1.1 Conceitos básicos

Os conceitos a seguir, extraídos da obra de Christofolletti (1999), são fundamentais para compreensão de modelos e sistemas, dentre eles:

- a) **Unidade:** Representa a qualidade do que é um, único, só ou sem partes, sendo tudo o que pode ser considerado individualmente. Pode ser formada por agrupamento de seres individuais, que mantém a característica de único dentro do conjunto.
- b) **Totalidade:** Aplica-se às entidades constituídas por um conjunto de partes, cuja interação resulta numa composição diferente e específica, independente do somatório dos elementos componentes. O todo assume estrutura e funcionalidade diferenciada dos seus subcomponentes. Em novo nível hierárquico cada componente do todo possui características específicas, podendo ser considerada unidade, sendo também analisada como totalidade.
- c) **Complexidade:** Inerente à totalidade encontra-se a concepção e a análise da complexidade. Os sistemas complexos apresentam diversidade de elementos,

encadeamentos, interações, fluxo e retroalimentação, compondo uma unidade organizada. Um sistema complexo pode ser definido como sendo composto por uma grande quantidade de componentes interagentes, capazes de intercambiar informações com seu entorno condicionante e capaz, também, de adaptar sua estrutura interna como sendo consequências ligadas a tais interações. Exemplos: Organização social, ecossistema, cérebro.

Outro ponto de definição chave são as definições de Reduccionismo e Holismo.

- a) **Abordagem analítica (Reduccionismo):** Por essa abordagem há a necessidade de focalizar subconjuntos e partes componentes de cada um desses, a fim de melhor conhecer seus aspectos e as relações de interação. Nessa abordagem o procedimento metodológico desenvolve-se focalizando o problema em seu nível inferior na hierarquia da complexidade, sendo mais intuitivo para o pesquisador entender o funcionamento de sistemas complexo de forma pontual. Encontra-se mais desenvolvida nas atividades científicas, necessária à análise e interpretação. É uma síntese ou generalização do sistema.
- b) **Abordagem Holística (Holismo):** Considera que a análise do fenômeno deve ser realizada em seu próprio nível hierárquico, e não em função do conhecimento adquirido nos componentes de nível inferior. Isso significa que essa abordagem procura compreender o conjunto mais do que suas partes e sugere que o todo é maior que a soma das propriedades e relação de suas partes, pois há o surgimento de novas propriedades que não emergem do conhecimento das suas partes constituintes. Por essa abordagem, o todo possui propriedades que não podem ser explicadas em termos de seus constituintes.

Torna-se inadequado entender que haja oposição entre as perspectivas reducionistas e holísticas. Elas se complementam e se tornam necessárias aos procedimentos de análise em todas as disciplinas científicas. Deve-se estar ciente da totalidade do sistema abrangente, da complexidade que o caracteriza e da sua

estruturação hierárquica. Portanto, no desenvolvimento de uma pesquisa, as duas abordagens são utilizadas em complementação mútua.

### **2.1.2 Tipologia de sistemas**

Compreender a tipologia de sistemas utilizados em modelagem é de grande importância para a caracterização e organização dos sistemas ambientais. Sem uma definição clara do tipo de sistema que se está modelando, a compreensão das estruturas e das funcionalidades fica comprometida. Os diversos critérios utilizados para a classificação não devem ser entendidos de forma excludente, mas de forma complementar para o melhor rastreio das características do sistema em foco (CHRISTOFOLETTI,1999).

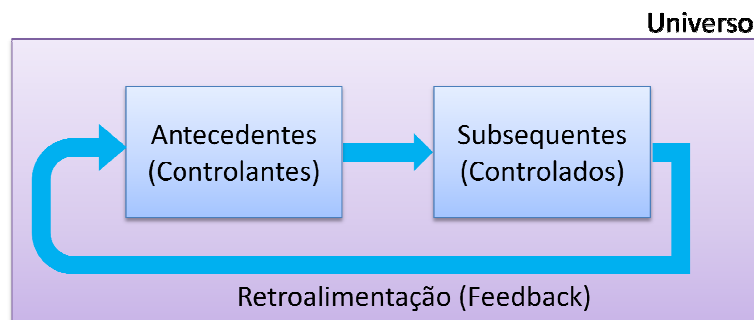
Para Chorley e Kennedy (1971), um sistema é um conjunto estruturado de objetos e/ou atributos que consistem de componentes ou variáveis que exibem relações discerníveis um com os outros e operam conjuntamente com um todo complexo, de acordo com determinado padrão. Haigh (1985) defende que um sistema é uma totalidade criada pela integração de um conjunto estruturado de partes componentes, cujas interações estruturais e funcionais criam uma inteireza que não e encontram implicadas por aquelas partes componentes quando desagregadas.

Christofoletti (1999) simplifica as definições descrevendo que um sistema representa um conjunto organizado de elementos e de interações entre os elementos. Quando se conceitua fenômenos como sistemas, uma das principais atribuições e dificuldade está em identificar os elementos, seus atributos (variáveis) e suas relações, a fim de delinear com clareza a extensão abrangida pelo sistema em foco.

Para a análise e modelagem ambiental deve-se estar ciente de que distinguir um sistema na multiplicidade das características e fenômenos da superfície terrestre é um ato mental, cuja ação procura abstrair o referido sistema da realidade envolvente. O procedimento de abstrair, procurando estabelecer os elementos

componentes e as relações existentes, depende da formação intelectual e da percepção ambiental apresentada pelo pesquisador (CHRISTOFOLETTI,1999).

Os sistemas envolvidos na análise ambiental funcionam dentro de um ambiente, fazendo parte de um conjunto maior, denominado Universo, o qual compreende o conjunto de todos os fenômenos e eventos que, através de suas mudanças e dinamismo, apresentam influências condicionadoras no sistema focalizado. Dentro de um universo, os primeiros sistemas são chamados de antecedentes ou controlantes e os segundos como subsequentes ou controlados, entretanto, os segundos sistemas podem voltar a exercer influência sobre os primeiros através da retroalimentação, como ilustrado na Figura 2.



**Figura 2:** Representação do Universo e da ordem classificatória de sistemas. Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com o critério funcional de Forster et al. (1957) os sistemas podem ser classificados como Isolados ou Não-Isolados:

- a) **Sistemas isolados:** Dadas as condições iniciais, não sofrem nenhuma perda, nem recebem energia ou matéria do ambiente que os circundam. Os sistemas isolados favorecem a abordagem dos fenômenos através do tratamento evolutivo e histórico, pois pode-se prever o começo e a sucessão das etapas até seu final. Um processo de erosão ou uma garrafa térmica podem ser considerados sistemas isolados, entretanto, a rigor não existem sistemas completamente isolados.
- b) **Sistemas não-isolados:** Mantém relações com os demais sistemas do universo com o qual funcionam, trocando massa e/ou energia. São ditos *Fechados* quando há troca de energia, mas não de matéria e *Abertos* quando ocorrem constantes trocas de energia e matéria, tanto recebendo como perdendo. Os sistemas ambientais mais comuns são os abertos. Um exemplo

de sistema fechado é o planeta terra, que recebe energia solar, mas não perde massa significativa para outros planetas. Como sistema aberto cita-se uma bacia hidrográfica, que constantemente troca massa e energia.

Pelo Critério da Composição (CHORLEY; KENNEDY, 1971) os sistemas podem ser classificados em:

- a) **Sistemas morfológico:** São compostos somente pela associação das propriedades físicas dos sistemas e de seus elementos componentes, ligados com os aspectos geométricos e de composição, constituindo os sistemas menos complexos das estruturas naturais. Correspondem às formas sobre as quais se podem escolher diversas variáveis a serem medidas (Massa, comprimento, etc.). A coesão e a direção da conexão entre tais variáveis são reveladas pela análise de correlação. Podem ser isolados, abertos ou fechados.
- b) **Sistemas em sequência ou encadeantes:** São compostos por cadeias de subsistemas, possuindo tanto grandeza como localização espacial, que são dinamicamente relacionados por uma cascata de matéria e energia. Dentro de cada subsistema deve haver um regulador que trabalhe a fim de repartir o input recebido de matéria ou energia em dois caminhos – armazenando ou fazendo atravessar o subsistema, como output.
- c) **Sistemas de processos-resposta:** São formados pelas combinações de sistemas morfológicos e sistemas em sequência. Enquanto os sistemas em sequência indicam o processo, os sistemas morfológicos representam a forma, a resposta à determinado funcionamento. Ao definir os sistemas de processos-resposta, a ênfase maior está focalizada na identificação das relações entre o processo e as formas que dele resultam, caracterizando a globalização do sistema.
- d) **Sistemas controlados:** São Sistemas de processos-respostas controlados pela atuação do homem. Através de certas variáveis-chaves, ou válvulas, o homem pode intervir para produzir modificações na distribuição de matéria e energia dentro dos sistemas de sequência e, conseqüentemente, influenciar na forma como eles estão relacionados.



Por fim, o Critério da Complexidade (WEAVER, 1958 apud CHRISTOFOLETTI, 1999) classifica os sistemas em:

- a) **Sistemas simples:** São compostos por um conjunto de componentes conectados conjuntamente e agindo um sobre outros conforme determinada lei. Exemplo: Movimento dos planetas em torno do Sol, que pode ser explicado em função das leis newtonianas.
- b) **Sistemas complexos, mas desorganizados:** São formados por um conjunto de componentes, mas os objetos são considerados como interagindo de maneira fraca ou acidental. Exemplo: Gás em um jarro. Interações entre as partículas são mais acidentais e muito numerosas para serem estudadas individualmente.
- c) **Sistemas complexos organizados:** Os componentes são vistos como interagindo fortemente uns com os outros para formar um sistema complexo e de natureza organizada. Exemplo: Solos, Rios, sistemas processo-resposta.

### 2.1.3 A modelagem como procedimento metodológico

A modelagem pode ser considerada como instrumentos metodológicos da pesquisa científica. A justificativa reside no fato de que a construção de modelos a respeito dos sistemas ambientais representa a expressão de uma hipótese científica, que necessita ser avaliada como sendo enunciado teórico sobre o sistema ambiental focalizado (teste de hipóteses). Dois procedimentos gerais são adequados à investigação na pesquisa científica (CHRISTOFOLETTI, 1999):

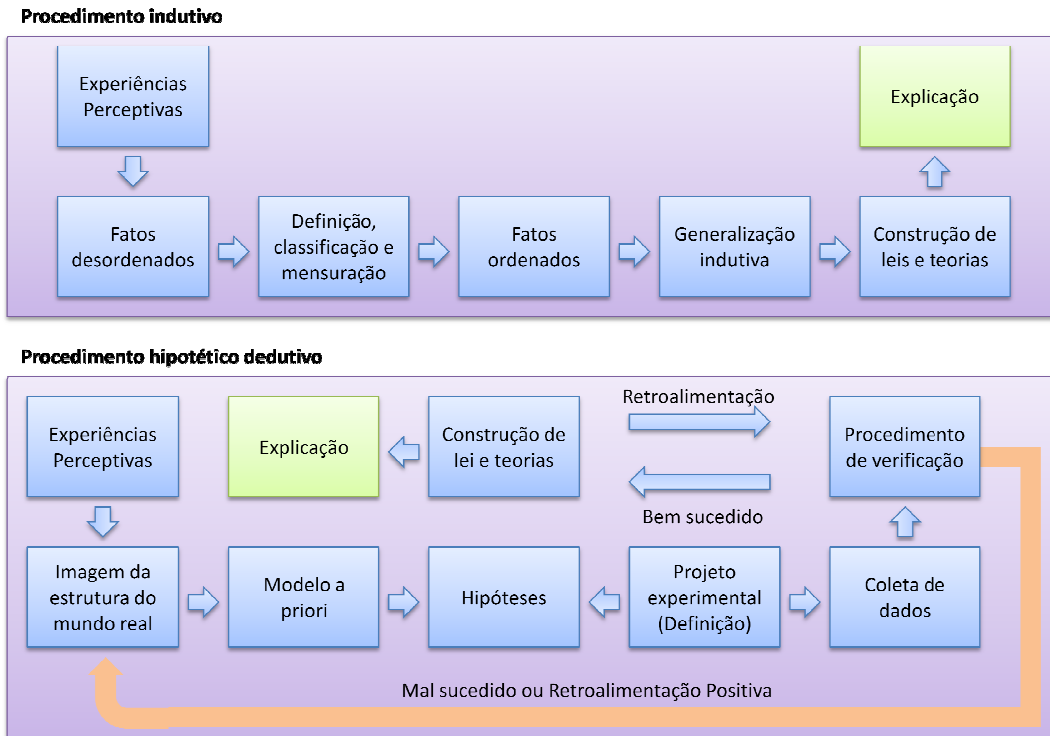
- a) **Concepção indutiva:** A investigação científica foi considerada por muito tempo como o procedimento metodológico geral e clássico das ciências físicas e naturais. As etapas estabelecidas nesse procedimento são as seguintes:
  1. Observações e coleta de todos os fatos e informações;
  2. Definição, análise e classificação dos fatos e informações;
  3. Derivação indutiva e generalizada a partir dos fatos e informações;
  4. Verificação adicional das generalizações, por meio de novas observações e coletas de dados;
  5. Construção de leis e teorias;

b) **Concepção Hipotético-dedutiva:** Surge como algo mais complexo, pois considera o conhecimento científico como sendo espécie de especulação controlada. As etapas são interconectadas e não há nenhuma razão essencial para se começar com a primeira, ou seja, pesquisador não precisa, necessariamente, iniciar seu trabalho por uma hipótese e observação dos fatos, pode começar por uma teoria ou modelo. As etapas são:

1. Concepção teórica de como a realidade encontra-se estruturada, podendo-se construir modelo a priori;
2. Enunciado de hipóteses, que forneça uma interpretação empírica a ser verificada com as observações e coletas de dados;
3. Em função da hipótese, especificar as variáveis relevantes, coletar os dados pertinentes, analisá-los e interpretá-los;
4. Se a hipóteses for validada, passa a categoria de leis, que se integra na teoria. Se for refutada, ela pode promover a reformulação da teoria ou proposição de nova teoria;
5. Desde que a significância de uma relação possa ser estabelecida, ela pode ser testada com dados de qualquer outra área ou sistema. Por meio desses testes as hipóteses ganham maior validade de reaplicação, sendo aceita como generalização teórica.

As etapas do procedimento hipotético-dedutivo expressam um esquema genericamente aceito no qual está inserido a modelagem de sistemas ambientais, com configurações elaboradas em decorrência de hipóteses ou de explicações. A Figura 3 ilustra as etapas dos procedimentos indutivo e hipotético dedutivo.

Na concepção de Popper (1975), o fundamental da pesquisa científica não consiste em realizar pesquisas e experimentos para ratificar os resultados ou hipóteses, mas sim em criar condições possíveis de refutá-las;



**Figura 3:** O procedimento indutivo apresenta um comportamento linear e que leva a uma explicação, enquanto o hipotético dedutivo possui interações mais complexas e retroalimentadas. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 2.1.4 Características e funções dos modelos

Na construção de modelos devem-se considerar aspectos envolvidos com as características e funções, que por vezes se entremeiam. São aspectos que possibilitam identificar e avaliar a qualidade dos modelos oferecidos, criando exigências mais específicas com o cuidado a ser aplicado na modelagem. Conforme as contribuições de Haggett & Chorley (1975), as principais características dos modelos são:

- a) **Seletividade:** A característica fundamental dos modelos é que sua construção implica numa atitude altamente seletiva quanto às informações, na qual os ruídos e sinais menos importantes são eliminados para permitir que se veja algo da essência das coisas. Para essa seletividade, a fim de eliminar os detalhes acidentais, surge como fundamental o contexto da relevância das variáveis discernidas e a ordenação da prioridade em função dos valores concebidos para integrá-las.

- b) **Estruturação:** Salienta que os aspectos selecionados da realidade são explorados em termos de suas conexões. Há um padrão integrativo entre componentes diferenciados, considerando as suas características morfológicas e funcionais.
- c) **Enunciativo:** O delineamento da estrutura mostra a existência de determinado padrão, na qual os fenômenos são considerados em termos de relação sistêmica. Esse quadro reveste do significado enunciativo (sugestivo), pois os modelos bem sucedidos contêm sugestões para sua ampliação e generalização.
- d) **Simplicidade:** Em sua apresentação, o modelo deve ser suficiente simples de manipular e de se compreender pelos seus usuários, mas sem detrimento de ser representativo do espectro total das implicações que possa ter e da complexidade necessária para representar com precisão o sistema em estudo.
- e) **Analógicos:** Os modelos são analogias, porque são diferentes do mundo real, mostrando uma maneira aproximada de se compreendê-lo.
- f) **Reaplicabilidade:** A reaplicabilidade é pré-requisito dos modelos nas ciências empíricas. Isso significa que o modelo não se apresenta apenas como descritivo de um caso, mas possibilita que seja usado para outros casos da mesma categoria.

Em relação às funções dos modelos, pode-se descrever:

- a) **Psicológica:** Possibilita que determinada categoria de fenômeno seja visualizada e compreendida, pois de outra forma não se poderia salientar a sua complexidade e magnitude.
- b) **Comunicativa:** No sentido de que o modelo proporciona estrutura dentro do qual as informações podem ser definidas ordenadas e relacionadas, favorecendo a comunicação e a difusão de ideias entre os cientistas.
- c) **Promissora:** Os modelos não são apenas estruturas organizadas, com respeito aos elementos e dados, mas possuem um sentido gerador e fértil para novos enunciados e percepção das relações, tornando-se instrumentos promissores para se extrair dos dados o máximo de informações;

- d) **Lógica:** Os modelos possuem função lógica, ajudando a explicar como acontece e se encadeia determinado fenômeno;
- e) **Normativa:** Possibilita formular uma representação que permite a comparação de uma categoria de fenômenos com outras;
- f) **Adequação:** Como a construção de modelos insere-se no contexto dos procedimentos metodológicos, permitindo o enunciado e a verificação de hipóteses, levando à validação e refutação de leis e teorias, eles devem apresentar adequabilidade à análise pretendida. Assim, os modelos não podem ser avaliados como sendo verdadeiros ou falsos, mas como sendo apropriados, corretos, ajustados, etc.
- g) **Previsibilidade:** Em muitos casos, os modelos são construídos para fornecer previsões específicas como base para tomada de decisão imediata. No setor de pesquisas, os modelos são usados para propiciar uma previsão, a qual então será comparada com a realização do fenômeno em outro local ou época. Esse procedimento permite a checagem independente do modelo, antes que o mesmo venha a ser adotado.
- h) **Simulação de cenário possíveis em função de mudanças ambientais:** Uma função dos modelos é servir como instrumentos para o planejamento. O planejamento envolve-se em realizar previsões, considerando as implicações de planos alternativos em os custos de esperar ou colocá-los em prática. Se as previsões forem corretas, pode-se tomar decisões e fazer escolhas entre os cenários simulados pela modelagem.
- i) **Relacionar as mensurações dos processos a curto prazo com a evolução de forma a longo prazo:** Geomorfologia e a pedologia propiciam evidências sobre as taxas de processos que podem ser mensurados durante poucos anos e as formas resultantes que levam milhares de anos para se desenvolver.
- j) **Condensação temporo-espacial:** Os modelos têm a função de condensar ou comprimir as escalas temporais e espaciais. Os custos operacionais de modelos concretos e o tamanho dos laboratórios demandam operacionalização em escalas e tempos reduzidos, aumentando também a velocidade dos processos a fim de se obter um resultado em tempo razoável.

- k) **Desenvolver explicações aplicáveis a todas as escalas:** Os modelos necessitam estar fundamentados da melhor maneira possível em princípios considerados como estabelecidos. O modelo assume uma especificação não espacial e ao ganhar aplicabilidade para ser utilizado em sistemas aninhados nas mais diversas escalas de grandeza espacial, pode ser adjetivado como de invariância escalar. O termo explicações refere-se a justificativas plausíveis e aceitáveis, nos campos da lógica, física e matematicamente, sem, no entanto, tornar-se uma verdade absoluta.

### 2.1.5 Procedimento guia para construção de modelos

O procedimento guia para a construção de modelos consiste numa sequência de normas e de passos que podem levar à produção de um modelo, à implementação de algum tipo de linguagem formal, ao estabelecimento de inferência, prevendo as consequências do modelo, e a avaliação dessas inferências em face da adequabilidade e uso para o qual o modelo foi construído. Em geral deve-se compreender o problema, estabelecer um plano para a solução do mesmo, executar o plano e checar a adequação da resposta. Essas etapas podem ser relacionadas como segue (HAEFNER, 1996):

- a) **Objetivos:** O início do procedimento é representado pelo enunciado dos objetivos ou propósitos de modelos a ser construídos. Os enunciados sobre os objetivos devem constituir repostas às seguintes indagações: Qual o sistema a ser modelado? Como o modelo poderá ser aplicado? Qual é a regra para finalizar a atividade da modelagem (Quão bom o modelo deve ser)? Como os produtos do modelo serão analisados, sumarizados e usado?
- b) **Hipóteses:** Consiste em transladar os objetivos e o conhecimento disponível do sistema em enunciados de hipóteses.
- c) **Formulação Matemática:** As hipóteses qualitativas podem ser convertidas em relações matemáticas. Nessa etapa deve-se usar das informações disponíveis para a construção do modelo e avaliar a correção dos enunciados

e das equações que descrevem o comportamento dinâmico dos elementos e processos do sistema.

- d) **Verificação:** A quarta etapa corresponde ao conjunto de atividades necessárias para verificar a precisão dos enunciados e das equações propostas. A verificação corresponde ao processo de analisar se os algoritmos e códigos computacionais estão corretos para as definidas relações matemáticas.
- e) **Calibragem:** A calibragem do modelo consiste em estabelecer parâmetros para as entradas e condições internas do sistema, a fim de se verificar a adequação das repostas. O objetivo da calibragem é definir a escolha mais adequada dos parâmetros ajustados aos modelos, estabelecendo limiares que representam a sua potencialidade de uso.
- f) **Análise e avaliação do modelo:** É a fase de checagem. Depois que o modelo for calibrado, pode-se utilizá-lo para produzir as respostas almejadas nos objetivos que foram especificados.

### **2.1.6 Limitações e Potencialidades da Modelagem (CHRISTOFOLETTI, 1999)**

A modelagem constitui-se em um importante instrumento para analisar as características e investigar mudanças nos sistemas ambientais, propiciando a melhor abordagem para analisar a complexa interação do sistema e reduzir as incertezas da previsão. Embora amplamente usados e mencionados, os modelos estão longe de se constituir na cura para os males do mundo e devem ser usados considerando as suas limitações, procurando-se discernir as maneiras mais adequadas para superá-las.

O primeiro grande problema dos modelos é a avaliação da sua acuidade ou ajustagem das suas previsões. Um segundo problema está relacionado com o estabelecimento de valores aos parâmetros dos modelos e identificá-los com os parâmetros fisicamente mensuráveis do mundo real.

A escolha de um modelo apropriado como sendo parte de um projeto de pesquisa deve sempre estar estreitamente engrenada com as necessidades da pesquisa planejada, operacionalizado em escalas temporais e espaciais adequadas. À medida que a pesquisa se desenvolve, deverá sempre ocorrer um diálogo entre o

experimento e o modelo: os dados experimentais sendo usados para melhorar ou substituir o modelo e o modelo propiciando novas previsões que são relevantes ao local da pesquisa e ao conjunto de dados.

A despeito das suas limitações dos modelos, a aceitação da aplicabilidade rapidamente se amplia e conseqüentemente as dificuldades técnicas em sua implementação vão sendo paulatinamente superadas.

### **2.1.6 Modelagem matemática de microrganismos**

Teleken et al. (2011) obtiveram através de modelagem matemática um excelente índice de previsão sobre a quantidade de populações de bactérias em leite de gado UHT. Utilizando dados de uma base de conhecimento *web* ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)) contendo informações sobre a quantidade de bactérias ao longo de um período, o autor derivou equações que representam a reprodução e a mortalidade de microrganismos e ajustou os dados, relacionando os parâmetros do modelo com as informações coletadas.

Utilizando carne moída como produto, Huang (2003) modelou o comportamento da bactéria *Clostridium perfringens*, tanto em temperaturas constantes quanto em regimes variáveis de temperatura, obtendo um bom ajuste para ambos os casos, através do modelo de Gompertz e suas derivadas. Segundo o autor, a técnica pode ser aplicada para outros microrganismos e auxiliar a indústria de alimento na previsão do tempo de vida de produtos.

Sarmiento (2006) conseguiu aumentar em 20 dias o tempo de vida da linguiça defumada e em 10 dias o tempo da mortadela através de modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas, comuns nesses alimentos, através de curvas logísticas e modelo de Gompertz, com modificações.

Frühling (2013) modelou o desenvolvimento de bactérias em leite cru por regressão polinomial, conseguindo diminuir os níveis de contaminação do leite por mudanças de comportamento e técnicas de ordenha, apoiados pelo modelo.

Dalcanton (2010) modelou matematicamente o crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas, utilizando os modelos de Gompertz, Logístico e Baranyi-Roberts concluindo que o tempo de vida do leite é prejudicado por flutuações de temperatura e temperaturas acima do



recomendado, como observado nos testes realizados com *Lactobacillus viridescens* e *Lactobacillus plantarum* em laboratório.

Em todas as aplicações citadas anteriormente, os autores relatam uma alta taxa de ajuste dos modelos aos dados observados em ambiente real, o que resulta em diminuição de gastos, aumento de produtividade e entendimento do processo de desenvolvimento microbiológico. Também foi possível observar nos problemas analisados que o uso da modelagem surge da necessidade de obtenção de respostas rápidas, de forma barata e eficaz, ou de problemas cujas respostas só seriam obtidas após a consumação de um fato, uma das premissas que incentivam uso de modelos matemáticos, alcançado pelos trabalhos citados.

## **2.2. Microbiologia preditiva**

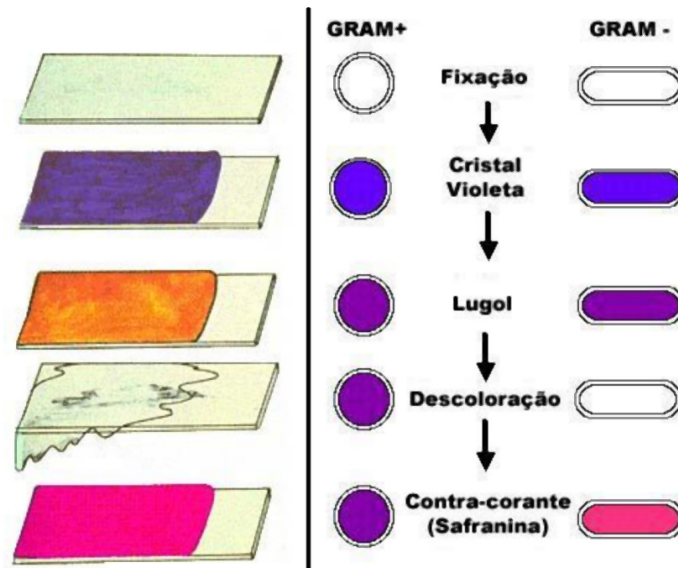
A microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos, ou formas de vida microscópicas, que incluem seres procariotas, como bactérias e arqueas, e seres eucariotas, como fungos, leveduras, microalgas e protozoário (ABELHO, 2012). Presente em todos os ambientes, os microrganismos encontram nos alimentos os nutrientes e condições necessárias para se desenvolverem, provocando transformações no sabor, odor, aspecto, e características dos alimentos, que podem ser notados pela fermentação, rancidez e putrefação que se forma no alimento (SARMENTO, 2006). Com intuito de amenizar os crescentes surtos alimentares e atender as demandas da sociedade por alimentos seguros e saudáveis, em tempo útil, surgiu a microbiologia preditiva, ciência defensora da ideia de que é possível prever, através de modelos matemáticos e estudos quantitativos de microrganismos, o efeito que as condições ambiente provocam na propriedade dos alimentos (NAKASHIMA et al., 2000). A microbiologia preditiva é aceita como uma ferramenta útil para realização de predições, estimativas de vida útil, desenvolvimento de produto, análise de riscos, redução de custos e atividades educacionais, sendo uma das áreas mais importantes e influentes da microbiologia (ARROYO-LÓPEZ et al., 2012).

### 2.2.1. Conceitos básicos

A seguir são apresentados alguns conceitos básicos sobre microrganismos, em especial, bactérias. Serão apresentadas terminologias comuns e as formas de classificação utilizadas para condições de crescimento.

- **Crescimento:** Em Microbiologia, crescimento microbiano refere-se ao aumento do número e não ao tamanho das células, ou seja, microrganismos em crescimento estão aumentando seu número (LIMA & CEZAR, 2013).
- **Unidades formadoras de colônias (UFC):** O crescimento de microrganismos em meio sólido origina formação de colônias, uma área macroscopicamente visível resultante da multiplicação celular. Se as células microbianas estiverem completamente dispersas, cada colônia corresponde a uma bactéria inicial em estado viável e cultivável. Entende-se por célula viável aquelas com capacidade para se multiplicar (ABELHO, 2012).
- **Esterilização:** é a destruição ou remoção de todas as formas vegetativas e de resistência dos microrganismos, patogênicos ou não, de um dado material. Esterilização é diferente de desinfecção, que consiste na remoção ou na inativação de parte ou de todos os microrganismos patogênicos presentes num dado material (CARDOSO JORGE, 2002).
- **Observação de células microbianas:** o índice de refração do plasma bacteriano é muito semelhante ao do meio circundante, como placas de Petri, tornando difícil a observação dos microrganismos em preparações não coradas, sendo desejável um aumento do contraste entre as células e o meio. Esse aumento é possível através da coloração de Gram. Em contato com corantes básicos, bactérias Gram-Negativas podem ser facilmente descoradas com solventes orgânicos, enquanto as Gram-Positivas resistem a esta coloração. Essa diferença é explicada pela estrutura da parede celular e auxilia a identificação de bactérias, como na Figura 4 (ABELHO, 2012). Esse aspecto tem importância fundamental na identificação visual e

computacional das colônias, pois áreas distintas na placa de Petri podem ser facilmente separadas e identificadas.



**Figura 4:** Coloração e descoloração de bactérias (ABELHO, 2012).

- **Forma (Morfologia):** Cocos (esféricos), Bacilos (bastonetes), Espiral, Espiroqueta (espiral mais acentuada) ou Vibrião (forma de vírgula), além arranjos de cocos, como Diplococos, Estreptococos, Tetrades, Sarcinas, Estafilococos (Tortora et al. 2005).

Os microrganismos podem ser classificados quanto aos aspectos que limitam ou favorecem o seu crescimento (LIMA & CEZAR, 2013).

#### Quanto à temperatura:

- **Psicrófilos:** Tem como temperatura ótima 15°C e pode crescer inclusive a 0°C, entretanto é altamente sensível a altas temperaturas. Não causam problemas na preservação de alimentos.
- **Psicrotróficos:** Também são capazes de crescer a 0° e em temperaturas de congeladores domésticos, mas suas temperaturas ótimas ficam entre 20 e 40 °C e seu crescimento não ocorre acima de 40°C. Esses microrganismos são encontrados em alimentos estragados.
- **Mesófilos:** Microrganismos encontrados de 25 a 40°C, tendo como temperatura ótima 37°, muito comum no corpo de animais, com a

temperatura da pele. São responsáveis por degradar alimentos e são patogênicos.

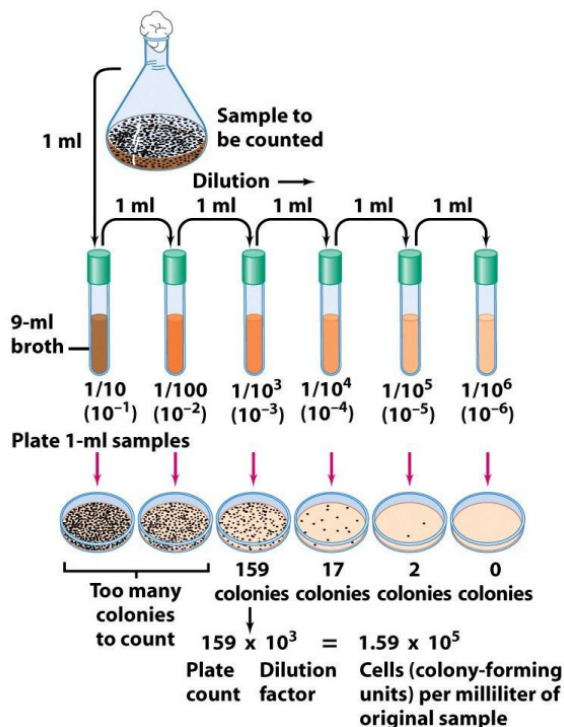
- **Termófilos:** São capazes de crescer em altas temperaturas, com temperatura ótima entre 50 e 60°C, comumente encontrados em ambientes de águas termais e solo aquecido. Não crescem em temperaturas menores que 45 °C.
- **Hipertermófilos:** podem resistir a temperaturas superiores a 100 °C.

#### Quanto à presença de sais:

- **Não Halófilos:** não necessitam de sal e não toleram a presença no meio.
- **Halotolerantes:** não necessitam de sal, mas toleram a presença no meio.
- **Halófilos:** necessitam de sal em uma concentração moderada
- **Halófilos extremos:** necessitam de sal em altas concentrações.

#### Quanto à presença de oxigênio:

- **Aeróbios:** Podem ser subdivididos em *Estritos* (aquele que necessitam de O<sub>2</sub>), *Facultativos* (aqueles que não necessitam de O<sub>2</sub>, mas crescem melhor com O<sub>2</sub>) e *Microaerófilo* (necessitam de O<sub>2</sub>, mas em níveis menores).
- **Anaeróbios:** Podem ser subdivididos em *Aerotolerantes* (não necessitam de O<sub>2</sub>, mas crescem melhor sem O<sub>2</sub>) e *Estritos* (aqueles não toleram O<sub>2</sub>).
- **Tempo de geração:** é o intervalo de tempo necessário para que uma célula se duplique (NAKASHIMA et al., 2000).
- **Diluição seriada:** Como já explicado, a quantidade de organismos presentes em alimentos pode ser determinada utilizando o método da contagem de colônias, um método simples e aplicado universalmente que produz, em geral, bons resultados. Normalmente, em uma amostra, o número de organismos de uma cultura é demasiado para ser contado diretamente, necessitando diluir uma amostra sucessivamente em fatores de 10, como ilustrado na Figura 5 (DAMASCENO, 2011).



**Figura 5:** Efeito da diluição sobre o número de colônias. Quanto mais diluídos, menor o número de colônias, com o contrário igualmente verdadeiro. Fonte: Madigan et al. (2006).

### 2.2.2. Sobrevivência e multiplicação de microrganismos

A capacidade de sobrevivência ou multiplicação dos microrganismos dentro de um alimento é definida por fatores intrínsecos e extrínsecos. São classificados como fatores intrínsecos as próprias características do alimento, como a atividade de água, o pH, o potencial de oxirredução, a composição química, a presença de fatores antimicrobianos naturais e as interações entre os microrganismos presentes nos alimentos. Já os fatores extrínsecos, citam-se a temperatura, pressão, umidade e as variáveis da composição da atmosfera que envolve o alimento (DALCANTON, 2010).

A temperatura é o principal fator extrínseco responsável pelas reações de deterioração dos alimentos, especialmente a microbiana, pois os parâmetros cinéticos de crescimento são altamente dependentes da temperatura. Como debatido por Massaguer (2005), resfriar os alimentos entre 0 e 10°C é uma

importante medida de controle da proliferação de microrganismos, entretanto, a temperatura não os eliminam, apenas torna o processo mais lento, pois alguns microrganismos, como bactérias psicrófilas, são capazes de se multiplicar a baixas temperaturas.

Substâncias químicas e fatores intrínsecos como pH também exercem importante influência no crescimento de microrganismos. O NaCl, por exemplo, é tido como o principal inibidor de crescimento dos microrganismos (NERBRINK et al., 1999), funcionando como conservante químico, enquanto que o pH em torno da neutralidade (6,5 – 7,5 °H) é o mais favorável para a maioria dos microrganismos, alguns, como bactérias irão preferir o meio ácido, por conta da inibição da microbiota de competição (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

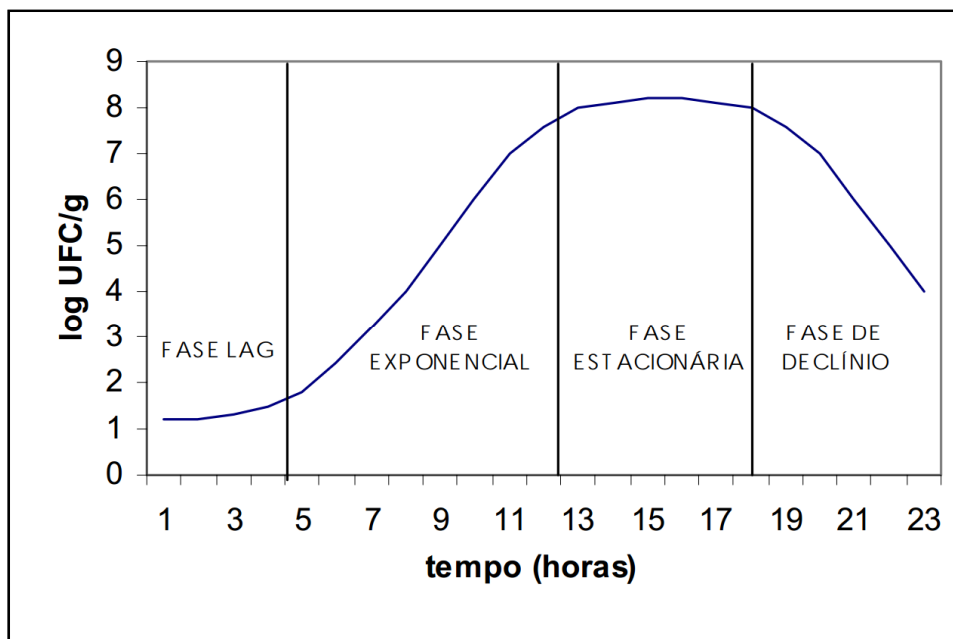
### **2.2.3 Modelos matemáticos e curva de crescimento**

Como explicado por Swinnen et al. (2004), os modelos primários descrevem o comportamento da população microbiana com o tempo, sem variação dos parâmetros ambientais, enquanto os modelos secundários demonstram como os parâmetros obtidos nos modelos primários se comportam com a variação de variáveis ambientais, comumente a temperatura. Os modelos terciários referem-se a *softwares* ou soluções eletrônicas para resolver automaticamente os modelos do nível primário ou secundário.

O crescimento bacteriano apresenta 4 fases distintas, ilustradas pela Figura 6, que podem ser explicadas como segue (Swinnen et al., 2004): Na fase de *Lag* acontece o ajuste da fisiologia e bioquímica das células para que possam ser capazes de explorar o ambiente onde se encontram, sendo uma etapa de baixíssimo crescimento, onde o consumo do alimento tem menor probabilidade de provocar infecções alimentares. Maximizar o tempo que os microrganismos passam nessa fase é um dos principais objetivos do modelo matemático.

Na fase seguinte, exponencial, os microrganismos já estão acostumados com o ambiente e cada componente celular é ajustado para que não exista síntese além do necessário para a produção de novas células, gerando um crescimento de ordem exponencial, consumindo os nutrientes dos alimentos. A

elevada taxa de desenvolvimento de microrganismos libera metabólitos tóxicos no meio de crescimento, que provocam morte e lise celular, provocando fim da fase exponencial e o começo da fase estacionária, onde acúmulo de substâncias tóxicas e a escassez de nutrientes torna a taxa de crescimento aproximadamente igual a de mortalidade. Em determinado ponto, os nutrientes do produto se tornam escassos e os resíduos metabólicos aumenta a mortalidade, levando os microrganismos à fase de declínio (NAKASHIMA et al., 2000).



**Figura 6:** Fases do crescimento bacteriano. Fonte: Nakashima et al. (2000).

Os modelos matemáticos têm por função representar essa curva de crescimento, em uma ou mais fases, utilizando equações, que possuem uma parte determinística, que representa as variáveis e cujo comportamento é esperado, e uma parte estocástica, que pode ou não existir no modelo e cujo comportamento é aleatório e desconhecido (DANNENHAUER, 2010).

O modelo de Gompertz, o modelo Logístico e o modelo de Baranyi e Roberts são comumente citados na literatura como as principais equações para se ajustar o crescimento em nível primário (ARROYO-LÓPEZ et al., 2010).

O modelo de Gompertz (Eq. 05) é uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmóide assimétrica, onde  $Y(t)$  representa o logaritmo decimal da densidade microbiana no tempo  $t$ . A ideia do modelo é representar a limitação de espaço e/ou nutrientes, bem como a produção de metabólitos tóxicos, com

velocidade de crescimento crescendo até um Máximo e não diminuindo depois, se assemelhando as 3 primeiras fases do crescimento microbiológico (ZHOU et al., 2012).

$$Y(t) = A \cdot \exp\{-\exp[-B(t - \mu)]\} \quad \text{Eq. 05}$$

Em que,

A: é a quantidade limite de colônias (assíntota superior);

B: é a velocidade de crescimento relativa no tempo  $\mu$ ;

$\mu$ : é o tempo onde o crescimento tem sua taxa máxima;

t: é um instante de tempo qualquer.

O modelo Logístico (Eq. 06) diferente da curva de Gompertz por ser uma equação sigmóide simétrica. Segundo Dalcanton (2012), aplicação do modelo Logístico é mais limitada quando comparada com o modelo de Gompertz, já que a equação é mais simples, com apenas uma exponencial.

$$Y(t) = \frac{A}{1 + \exp[-B(t - \lambda)]} \quad \text{Eq. 06}$$

Em que,

A: é a quantidade limite de colônias;

B: é a velocidade de crescimento relativa;

$\lambda$ : é a metade do tempo da fase exponencial;

t: é um instante de tempo qualquer.

Para alguns pesquisadores, o uso de modelos matemáticos e ecológicos na descrição de curvas de crescimento de bactérias, sobretudo a função de Gompertz e o modelo logístico padrão, é uma abordagem mecânicas e sem interpretação biológica. Preocupados com esse fato Baranyi e Roberts (1994) propuseram um modelo mais focado nas explicações biológicas, apresentado em Eq. 07, gerando a equação a seguinte, que por ser mais complexa que as outras, costuma ajustar dados com mais precisão.

$$Y(t) = Y_0 + \ln \left[ \frac{-1 + \exp(\mu_{\max} \cdot \lambda) + \exp(\mu_{\max} \cdot t)}{-1 + \exp(\mu_{\max} \cdot t) + \exp(\mu_{\max} \cdot t + y_f - y_0)} \right] \quad \text{Eq. 07}$$

Em que,



$Y_f$ : é a quantidade limite de colônias;  
 $Y_0$ : é a quantidade inicial de colônias;  
 $\mu$ : é a taxa máxima de crescimento do tempo da fase exponencial;  
 $t$ : é um instante de tempo qualquer.

Já para modelos secundários, sobretudo os que se utilizam da temperatura como fator fundamental, o modelo da raiz quadrada, a equação de Arrhenius (Eq. 08) e o modelo proposto por Van Impe são os mais utilizados. A equação da raiz quadrada é dado como segue, onde  $k$  é o parâmetro de interesse do modelo,  $b$  representa o coeficiente de regressão,  $T$  é a temperatura (°C) e  $T_{min}$  é a temperatura mínima para o crescimento ou coeficiente do modelo.

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min}) \quad \text{Eq. 08}$$

A equação de Arrhenius, embora mais famosa, em alguns casos, não descreve bem o efeito da temperatura nas velocidades de crescimento dos microrganismos. Na equação de Arrhenius,  $k$  é a velocidade de crescimento,  $A$  é a constante da equação (fator pré-exponencial),  $T$  é a temperatura (K),  $E_a$  é a energia de ativação para o crescimento microbiano (kJ/mol) e  $R$  representa a constante universal dos gases (8,314 J/K.mol).

$$k = \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad \text{Eq. 09}$$

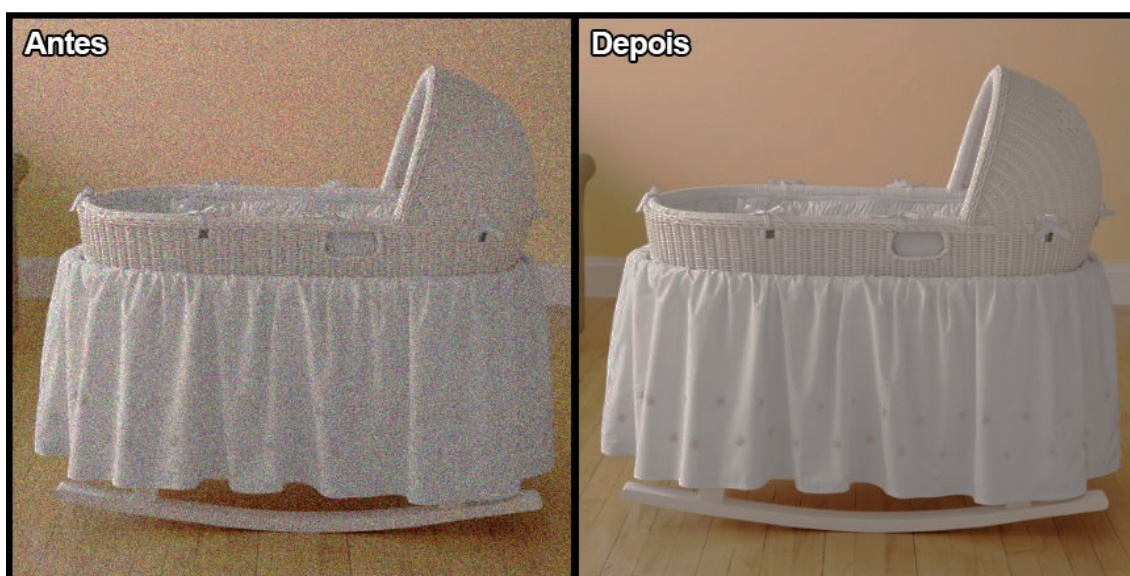
Nota-se que o modelo proposto por Van Impe é a derivada da equação de Gompertz com  $\mu$  representando uma temperatura dinâmica.

$$\frac{dL}{dt} = \mu(L - A) \cdot \ln\left(\frac{B - A}{L - A}\right), \text{ onde } \mu = a(T - T_{min})^2 \{1 - \exp[b(T - T_{max})]\} \quad \text{Eq. 10}$$

### 2.3 Visão computacional e processamento de imagens

Visão computacional é uma tecnologia de identificação artificial que permite às máquinas obterem informações a partir de imagens, por vezes buscando a automatização de tarefas geralmente associadas à visão humana (MONGELO,

2012). A Visão computacional é uma das aplicações do processamento digital de imagens, que pode ser explicada como um conjunto de técnicas de manipulação de pixels (menor unidade que compõe uma imagem digital) capazes de transformar uma imagem em uma representação de interesse, por meio de algoritmos e equações, comumente empregadas na melhoria da informação visual (Figuras 7 e 8), efeitos (Figura 9) e extração de informações de forma automática (Figura 10). Essas técnicas têm recebido cada vez mais atenção e desponta como uma promissora área de conhecimento dentro da computação (GOMES E QUEIROZ, 2011).



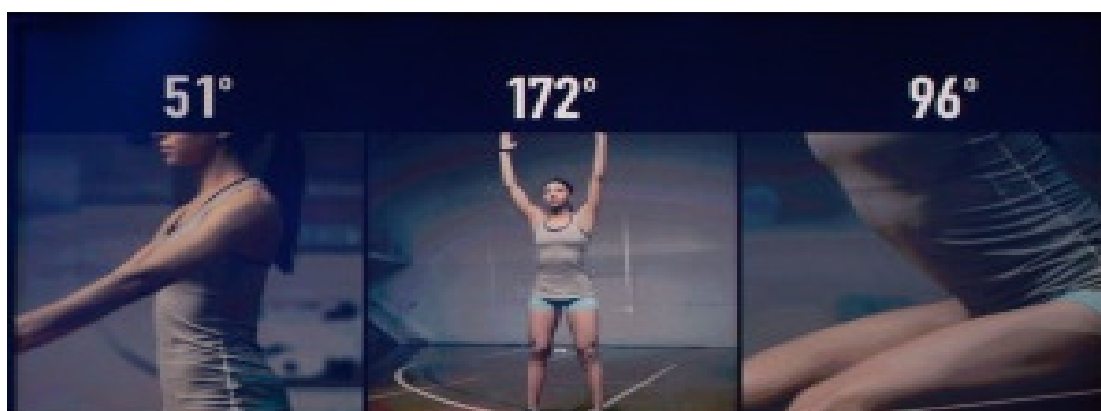
**Figura 7:** Imagem após remoção de ruídos. Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figura 8:** Realce de contraste e iluminação. Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figura 9:** Aplicação de efeito negativo. Fonte: Elaborado pelo autor.



















**Figura 10:** Captura do ângulo de inclinação de uma imagem obtido por Xbox one®. Fonte: HowStuffWorks, 2014.

### 2.3.1. Espaço de cores e representação de imagem

A cor é o resultado da percepção da luz (comprimento de onda de 400–770 nm) que incide na retina, especificamente em células foto-receptoras, denominadas cones. A maioria das cores visíveis pelo olho humano pode ser representada pela combinação de luzes monocromáticas nos comprimentos de onda do azul, vermelho e verde (ACHARYA, 2005).

Através dessa abstração, criou-se o espaço de cores RGB (*Red, Green e Blue*), cuja soma ponderada dos componentes vermelho, verde e azul resulta na sensação de branco à vista humana. O espaço RGB é usado para exibir imagens coloridas na tela do computador, com cada componente variando de 0 a 255, sendo o zero nenhuma porção da componente e 255 representando toda a intensidade de alguma das três componente (GONZALEZ & WOODS, 2002). Segundo essa ideia, as cores podem ser representadas como por 3 números, que variam de 0 a 255, de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1:** Cores, nomes e código em RGB. Fonte: Elaborado pelo autor.

| Cor   | Nome            | (R,G,B)       |
|---|-----------------|---------------|
|    | Preto           | (0,0,0)       |
|    | Branco          | (255,255,255) |
|    | Vermelho        | (255,0,0)     |
|    | Verde           | (0,255,0)     |
|    | Azul            | (0,0,255)     |
|  | Amarelo         | (255,255,0)   |
|  | Azul bebê       | (0,255,255)   |
|  | Rosa            | (255,0,255)   |
|  | Prata           | (192,192,192) |
|  | Cinza 50%       | (128,128,128) |
|  | Vermelho Escuro | (128,0,0)     |
|  | Amarelo         | (128,128,0)   |
|  | Verde escuro    | (0,128,0)     |
|  | Roxo            | (128,0,128)   |
|  | Verde marinho   | (0,128,128)   |
|  | Azul Marinho    | (0,0,128)     |

A menor porção de cor visível no monitor chama-se pixel, que é representado por cada minúsculo ponto que o monitor possui (um monitor de 1200 x 960 possui 1.152.000 de pontos). Embora seja comum para programadores, as relações de cor, saturação e iluminação no sistema RGB não são estabelecidas, tornando outro sistema de cores, o HSL (Hue, Saturation, Lightness), mais adequado para uso artístico e certas etapas de processamento digital, na qual deseja-se alterar um componente e manter os outros (GONZALEZ & WOODS, 2002).

Para representar uma imagem no computador é preciso criar um conjunto de pontos (pixel), com orientação vertical e horizontal em relação ao monitor, e para cada ponto da imagem, fazer brilhar sobre a tela uma representação RGB do pixel, composta por 3 números (HOSHIRO & GOLDSCHMIDT, 2008). Para criar um simples “boneco”, com pixels que representam olhos e boca, é preciso gerar uma matriz de 5x5 e preencher os valores do monitor como apresentados na Figura 11. Os 25 pixels do boneco representam menos de 1,4 milímetro de uma tela (1 mm = 3,779528 px) e são necessários 75 números para representar.

|        |  |  |  |  |           |           |           |           |           |
|--------|--|--|--|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|        |  |  |  |  | 255,255,0 | 255,255,0 | 255,255,0 | 255,255,0 | 255,255,0 |
|        |  |  |  |  | 255,255,0 | 0,0,255   | 255,255,0 | 0,0,255   | 255,255,0 |
|        |  |  |  |  | 255,255,0 | 255,255,0 | 255,255,0 | 255,255,0 | 255,255,0 |
|        |  |  |  |  | 255,255,0 | 0,255,0   | 0,255,0   | 0,255,0   | 255,255,0 |
|        |  |  |  |  | 255,255,0 | 255,255,0 | 255,255,0 | 255,255,0 | 255,255,0 |
| FIGURA |  |  |  |  | MONITOR   |           |           |           |           |

**Figura 11:** Representação de 10 pixels no monitor Fonte: Elaborado pelo autor.

Para extrair alguma característica da figura, pelos dados da Figura 11, é notória a quantidade de números que precisam ser processados à procura de algum padrão. Para simplificar esse trabalho, é comum trabalhar com imagens representadas em cinza (apenas um canal), como apresentado na Figura 11. A representação ficou mais simples, pois de 16.581.375 (255 x 255 x 255) possibilidades por ponto, agora a imagem só possui 255. Com a figura em escala cinza, pode ressaltar alguma característica dela, como na Figura 12:

|        |  |  |  |  |         |     |     |     |     |
|--------|--|--|--|--|---------|-----|-----|-----|-----|
|        |  |  |  |  | 100     | 100 | 100 | 100 | 100 |
|        |  |  |  |  | 100     | 50  | 100 | 50  | 100 |
|        |  |  |  |  | 100     | 100 | 25  | 100 | 100 |
|        |  |  |  |  | 100     | 200 | 200 | 200 | 100 |
|        |  |  |  |  | 100     | 100 | 100 | 100 | 100 |
| FIGURA |  |  |  |  | MONITOR |     |     |     |     |

**Figura 12:** Representação de 10 pixels em um monitor em escala cinza. Fonte: Elaborado pelo autor.

Para contar o número de “olhos do boneco”, pelos dados da Figura 12, seria preciso retirar os pixels diferentes de 50, de forma que fiquem dois conjuntos: Iguais a esse valor e abaixo desse valor. Com apenas dois conjuntos, podemos simplificar a imagem para monocromática, como ilustrado na Figura 13, indicando para o computador onde estão os objetos de interesse e contá-lo.

O exemplo apresentado pode ser expandido para imagens reais e de todos os tamanho, independente do sistema de cores utilizado. Nota-se que para uma imagem de 640 x 480 pixel, relativamente pequena para os tamanhos atuais, seria preciso processar 307.200 cores, cada uma com 3 elementos, elevando o tempo de processamento e a memória utilizada.

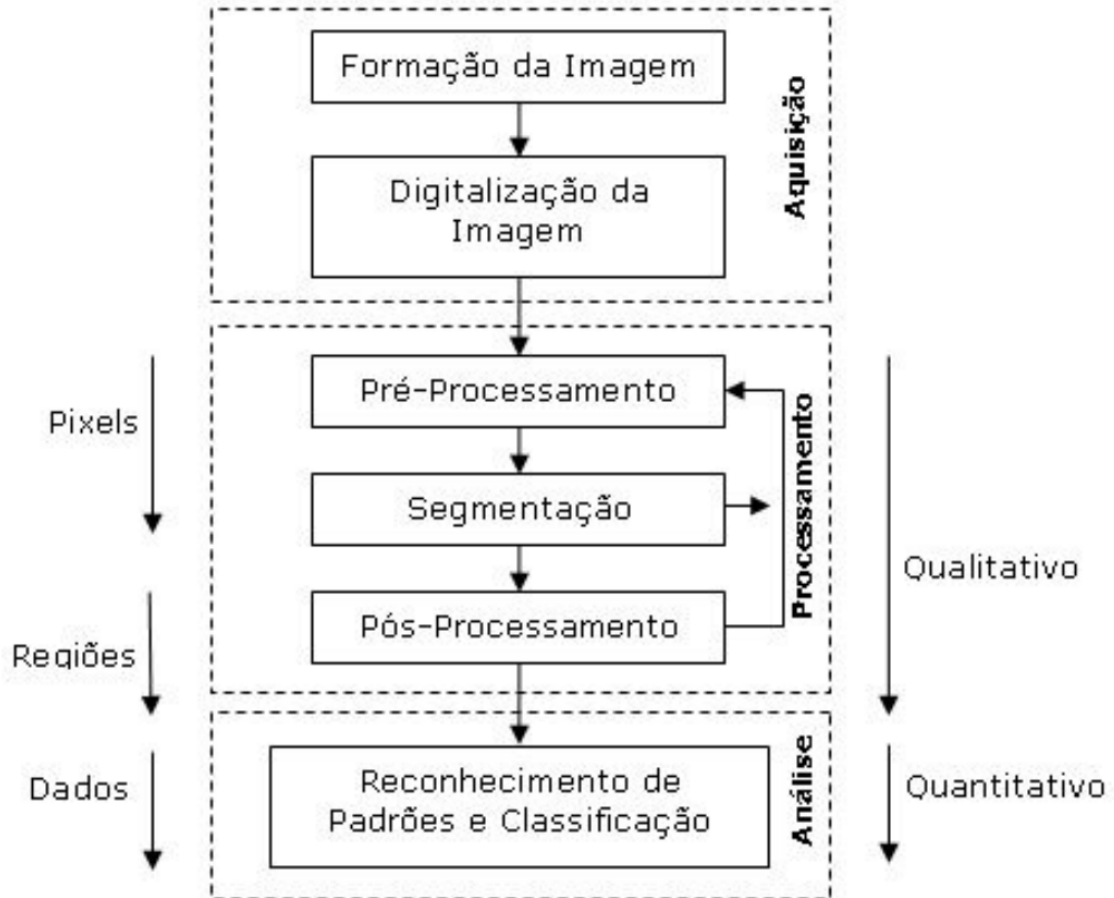
|        |   |  |   |  |         |   |  |   |  |
|--------|---|--|---|--|---------|---|--|---|--|
|        |   |  |   |  |         |   |  |   |  |
|        | ■ |  | ■ |  |         | 0 |  | 0 |  |
|        |   |  |   |  |         |   |  |   |  |
|        |   |  |   |  |         |   |  |   |  |
|        |   |  |   |  |         |   |  |   |  |
| FIGURA |   |  |   |  | MONITOR |   |  |   |  |

**Figura 13:** Representação monocromática da Figura 11. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 2.3.2 Etapas da visão computacional

Após a aquisição da imagem e sua respectiva digitalização, é possível dividir as etapas de processamento da visão computacional em quatro partes (MONGELO, 2012; ALVES, 2006): No *pré-processamento*, efetua-se um realce da imagem, reduzindo os ruídos, corrigindo a iluminação, o contraste e a nitidez da fotografia, com intuito de aumentar a qualidade da parte de interesse; Na *segmentação*, a imagem é dividida (segmentada) de acordo com os objetos a serem identificados, tornando os objetos da frente da imagem (*foreground*) e diferenciados dos objetos do fundo da imagem (*background*); Na *identificação*, procurar-se corrigir problemas de oclusão, onde um objeto pode estar parcialmente escondido atrás de outro objeto e remove-se de falsos objetos, tornando a imagem para o processamento; No

*reconhecimento de padrões* os objetos de interesse são reconhecidos e classificados com intuito de automatizar a identificação computacional. Essas etapas são representadas na Figura 14.



**Figura 14:** Etapas da visão computacional. Fonte: Gonzalez & Wood (1993).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Com intuito de tornar mais claro as etapas desenvolvidas para alcançar os dois objetivos propostos, dividiu-se essa seção em duas partes: O desenvolvimento do *software* para ajuste de modelos microbiológicos, intitulado *MicroFit*, e o desenvolvimento do *software* para contagem de colônias por análise *MicroCount*. O desenvolvimento de ambos os *softwares* tiveram início apenas após a realização de um levantamento bibliográfico na literatura especializada, com intuito de localizar soluções já existentes, técnicas utilizadas, características presentes e ausentes nas soluções encontradas, bem como as contribuições já realizadas e pendentes pelos achados da pesquisa, cujos detalhes são expostos na seção seguinte.

#### 3.1 Desenvolvimento do *MicroFit*

O desenvolvimento do *software MicroFit* teve início após o levantamento técnico das soluções já existentes, citadas na literatura especializada ou em compilações *web* (ARROYO-LÓPEZ et al., 2014; PMM, 2014; UC FOOD SAFETY, 2014). As características úteis, funções ausentes e as falhas de cada *software* foram registradas em um *checklist* de funcionalidades, com soluções para os problemas encontrados. As características foram obtidas com base no uso dos *softwares*, descrições dos desenvolvedores e documentação dos programas identificados. Após a compilação da *checklist*, planejou-se as funcionalidades de um *software* que atendesse aos critérios da lista compilada anteriormente, através de protótipos em folhas de papel, de forma que o usuário final pudesse acessar cada ferramenta adicionada de forma fácil e intuitiva. Dados reais de crescimento bacteriano, para teste e validação do programa, foram obtidos gratuitamente no site do COMBASE ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)). A codificação da aplicação foi realizada na linguagem C++, dentro do ambiente de desenvolvimento integrado C++ *Builder 2007*, no Sistema Operacional *Windows*.

Inicialmente foram programadas as rotinas de leitura e inserção de dados, como importação de arquivos (.txt, .csv e documentos do Microsoft® Excel™) e



digitação de dados pelo usuário. Independente do formato, a leitura dos dados espera receber um arquivo com múltiplas colunas, cada uma representando um parâmetro do modelo a ser utilizada (tempo, pH, atividade de água, concentração de sal, etc.). Optou-se por armazenar os parâmetros lidos do arquivo dentro de um banco de dados autocontido, SQLite 3 (<http://www.sqlite.org/>), um programa gratuito, de código aberto e fácil integração, que permite cadastrar, consultar e atualizar dados de forma rápida e segura. No momento do uso da aplicação, os dados armazenados no SQLite são transferidos para a memória do computador, dentro de estruturas de dados abstratas, que tornam a manipulação mais eficiente pelos módulos e procedimentos do programa.

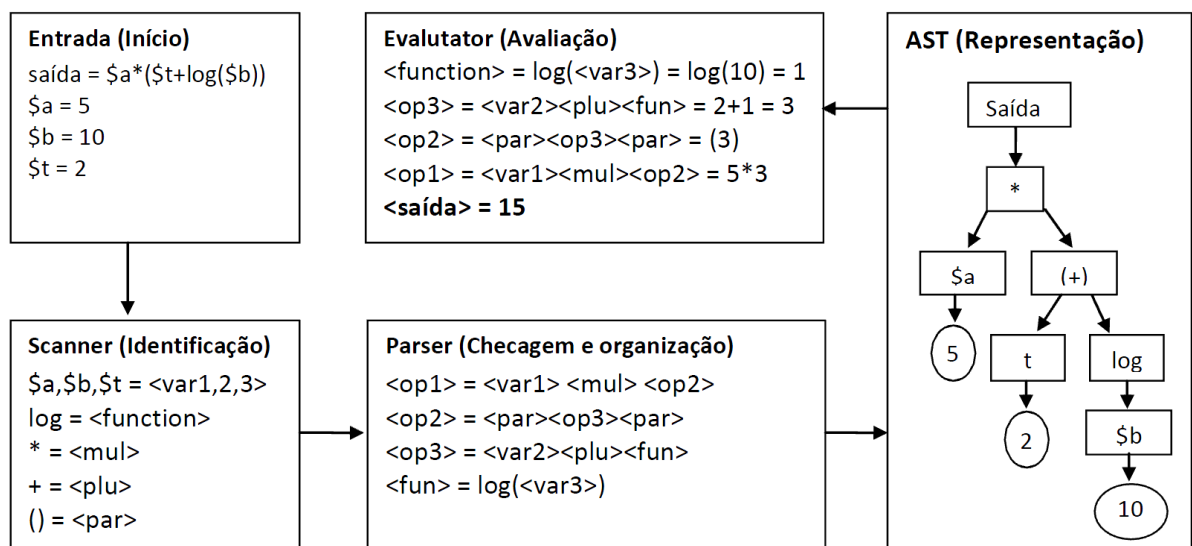
Após a implementação dos procedimentos de leitura de dados, foram codificadas as rotinas para geração de estatísticas de dispersão dos dados armazenados, que compara o valor observado em laboratório e o valor estimado pelos modelos do programa e métodos de comparação dos modelos, que permitem o usuário decidir a melhor equação, embasado em métricas numéricas. Entre as estatísticas programadas estão a média, desvio padrão, coeficiente de correlação de Pearson, erro médio relativo, erro médio estimado e dados residuais e total.

Os principais modelos descritos na literatura (ARROYO-LÓPEZ et al., 2012) foram cadastrados dentro do programa, com intuito de acelerar os cálculos e tornar os usuários mais familiarizados com o que existe de comum no meio acadêmico (Modelos de Gompertz, funções Logístico, curvas de Baranyi-Robert, entre outros).

Para permitir que os usuários pudessem criar novos modelos, sejam eles primários ou secundários, foi desenvolvida uma ferramenta na qual os usuários pudessem criar seus próprios modelos, montando unicamente a equação desejada, por meio de funções matemáticas, como exponenciais, potenciação, logaritmos, funções trigonométricas, variáveis e constantes.

Para avaliar uma equação genérica, fornecida pelo usuário, foi preciso programar um interpretador de expressões matemáticas, composto pelos quatro blocos funcionais de um reconhecedor genérico de linguagens computacionais: o leitor de símbolos (*Scanner*), o organizador e identificador de sintaxe (*Parser*), a árvore de sintaxe abstrata (*Abstract Syntax Tree*) e o avaliador (*Evaluator*), cujo funcionamento é ilustrado na Figura 15.

O interpretador desenvolvido é executado ao receber um conjunto de caracteres representando uma equação. O primeiro bloco funcional, o *Scanner*, divide e identifica os caracteres de entrada, classificando-os como símbolos (*Token*) entendidos pelo programa, permitindo que o *Parser*, na etapa seguinte, faça a organização e ordenação lógica dos termos da equação, checando se a sintaxe foi obedecida e a precedência dos operadores e símbolos de união foi respeitada. Em caso afirmativo, os símbolos identificados são organizados em forma de árvore de sintaxe abstrata (*AST*), uma estrutura facilmente navegável por algoritmos, e levando em consideração a precedência de parêntesis, operadores e regras matemáticas. Após a construção da árvore, o *Evaluator* atribui o valor de cada item, na ordem que surge na árvore, de baixo para cima e da esquerda para a direita, gerando o resultado final da avaliação.



**Figura 15:** Processamento da equação de entrada em cada bloco do interpretador.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a construção do interpretador, foram implementadas as rotinas para ajuste automático dos dados, responsáveis por avaliar os melhores parâmetros para um modelo, como o algoritmo de Levenberg-Marquardt e as rotinas para execução do método numérico de Runge-Kutta (4ª ordem). Ambos os métodos foram testados e validados dentro do Open Office 4.0.1™, através do pacote para resolução de equações não lineares Solve™ (SOLVER, 2014).

O funcionamento do algoritmo de Levenberg-Marquardt pode ser explicado pelas equações apresentadas na Figura 16. Dado uma equação qualquer ( $f$ ), com  $m$  parâmetros, calcula-se a matriz Jacobiana ( $J$ ) da equação, que é a derivada parcial da equação representando o modelo em relação aos  $m$  parâmetros que a descreve e as  $n$  linhas de dados que se busca ajustar. Junto com a matriz Jacobiana ( $J$ ), é necessário gerar um vetor de resíduos ( $R$ ), que é a diferença entre o valor coletado no experimento e o valor estimado por um conjunto de parâmetros em teste. O valor de cada parâmetro ( $\beta^{s+1}$ ) é calculado através da tentativa anterior ( $\beta^s$ ) acrescido de um vetor incremento ( $\Delta$ ), que é a resolução de um sistema não-linear dado pelo vetor de resíduos ( $R$ ) e a matriz Jacobiana ( $J$ ). Após isso calcula-se o valor do vetor de resíduos, que é o valor da função calculada com cada parâmetro menos o valor. Esse processo repetido várias vezes tende a diminuir o valor do vetor de resíduos ao ponto de deixar o valor estimado o mais próximo do valor obtido experimentalmente, pois os valores dos parâmetros ( $\beta$ ) são corrigidos pelo vetor incremento ( $\Delta$ ).

Entrada de Dados

Vetor Resíduos

$$R^{(s)} = \begin{bmatrix} Y_1 - f_1^{(s)} \\ Y_2 - f_2^{(s)} \\ Y_3 - f_3^{(s)} \\ \vdots \\ Y_n - f_n^{(s)} \end{bmatrix}_{n \times 1}$$

Matriz Jacobiana

$$J^{(s)} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial par_1} & \frac{\partial f_1}{\partial par_2} & \dots & \frac{\partial f_1}{\partial par_m} \\ \frac{\partial f_2}{\partial par_1} & \frac{\partial f_2}{\partial par_2} & \dots & \frac{\partial f_2}{\partial par_m} \\ \frac{\partial f_3}{\partial par_1} & \frac{\partial f_3}{\partial par_2} & \dots & \frac{\partial f_3}{\partial par_m} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \frac{\partial f_n}{\partial par_1} & \frac{\partial f_n}{\partial par_2} & \dots & \frac{\partial f_n}{\partial par_m} \end{bmatrix}_{n \times m}$$

$$\left( J_r^T J_r + \lambda \text{diag}(J_r^T J_r) \right) \Delta = -J_r^T R$$

$$\beta^{(s+1)} = \beta^{(s)} + \Delta$$

**Figura 16:** Esquema de interações do algoritmo Levenberg-Marquardt.

O algoritmo de Levenberg-Marquardt tem por objetivo encontrar o melhor ajuste para um conjunto de dados, através da modificação de parâmetros, de tal modo que a soma dos quadrados das distâncias tomadas na vertical entre o modelo (curva ajustada) e cada um dos pontos coletados (dados reais) seja a menor possível (GAVIN, 2013). O método de Runge-Kutta (VALLE, 2012) foi programado para resolver numericamente uma equação diferencial, que surge naturalmente em modelos de nível secundário, com base nos parâmetros iniciais fornecidos pelo usuário. Novamente foram inseridos no código, estaticamente, os principais modelos da literatura, além da possibilidade do usuário inserir sua própria equação diferencial.

O método de Runge-Kutta (4ª ordem) é obtido através da resolução de  $f(y,t)$ , dado por Eq. 11, onde o próximo valor da equação ( $y^{n+1}$ ) é obtido a partir do valor atual ( $y^n$ ) mais a contribuição de 4 termos ( $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  e  $K_4$ ) dependente da variação de  $t$  (Eq. 12), variável responsável por definir a precisão do método. Quando menor a variação de  $t$  (Eq. 13), mais próximo do valor correto será a estimativa.

$$f(y, t) = M(y - n_0) \ln\left(\frac{A}{y - n_0}\right) \quad \text{Eq. 11}$$

$$y^{n+1} = y^n + \frac{\Delta t}{6} (k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \quad \text{Eq. 12}$$

$$t^{n+1} = t^n + \Delta t \quad \text{Eq. 13}$$

O valor de  $f(y,t)$  aqui exposto foi obtido da derivada da equação de Gompertz, que após discretização e aplicação de logaritmo neperiano em ambos os lados da equação (Eq. 14) pode ser rescrita como apresentado acima

$$.y = y^0 + \frac{\{B.A.\exp [B.(M-t)]\}}{\{1+\exp [B.(M-t)]\}^2} \quad \text{Eq. 14}$$

Em que  $A$ ,  $B$  e  $M$  são os parâmetros do modelo de Gompertz, explicados anteriormente, mas agora variantes no tempo  $t$ .

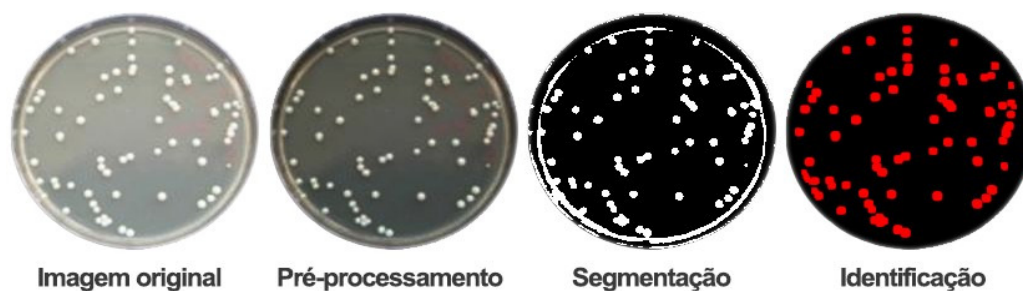
As rotinas desenvolvidas foram validadas através de dados proveniente do Combase, em sua maioria dados de leite e carne, por serem alimentos de alto consumo e com grande diversidade de tipos. Ao fim do desenvolvido, a interface do *software* foi desenhada, com o objetivo de deixar o usuário familiarizado com o programa desde o primeiro uso, além de possibilitar a importação e digitação rápida

de dados, visualizar graficamente os dados importados, criar, avaliar e modificar modelos preditivos, com ajuste automático de dados e parâmetros e exportação dos resultados gerados. A interface foi criada para que o usuário resolva os problemas de ajuste da forma mais rápida e intuitiva possível, evitando configurações desnecessárias ou necessidade de entendimento da complexidade matemática.

### 3.2 Desenvolvimento do MicroCount

Após a realização do levantamento bibliográfico em busca das soluções, contribuições e técnicas já existentes teve início o desenvolvimento do *software* para contagem de colônias bacterianas. O desenvolvimento começou pelos algoritmos de leitura e exibição de imagens nos formatos mais comumente encontrados, como .bmp, .jpg, .png e tif. Após a leitura, cada figura foi convertida para um estrutura de dados interna ao programa, que representa em forma de matriz cada uma das 3 cores contidas em cada pixel de uma imagem, independente do formato lido. Após a leitura, testou-se a visualização, opções de zoom e enquadramento de figuras.

O desenvolvimento dos algoritmos seguiu a ordem das 4 etapas de identificação da visão computacional, comumente citadas na literatura (MONGELO, 2012; ALVES, 2006) e exemplificados na Figura 17. Pré-processamento, segmentação e identificação.



**Figura 17:** Etapas do processamento de uma imagem contendo colônias. Fonte: Elaborado pelo autor.

A principal técnica implementada, que resume os 4 pontos citados pela visão computacional, foi o algoritmo de detecção de bordas Canny (ZHOU et al., 2011). Essa técnica é desenvolvida em 4 passos, exemplificados na Figura 18. Da

esquerda para a direita tem-se: 1) imagem original; 2) a imagem em escala de cinza e suavizada por máscara gaussiana; 3) gradiente das componentes x e y do operador de Sobel; 4) A imagem com bordas refinada (supressão de não máximos); 5) Bordas detectadas por histerese e Threshold.



**Figura 18:** Processamento de bordas em 5 passos para 2 exemplos genéricos.

Fonte: <http://www-scf.usc.edu/~boqinggo/Canny.htm>

Dado a representação de uma imagem genética, de m colunas e n linhas, no qual  $f(x,y)$  representa um pixel (R,G,B) na linha y e coluna x, tem-se:

$$f(x,y) = \begin{bmatrix} f(1,1) & f(1,2) & \dots & f(1,m) \\ f(2,1) & f(2,2) & \dots & f(2,m) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ f(n,1) & f(n,2) & \dots & f(n,m) \end{bmatrix} \quad \text{Eq. 15}$$

Onde  $f(i,j) = [\text{Vermelho} \quad \text{azul} \quad \text{verde}]$

Com 3 componentes de cores a imagem passa a exigir uma complexidade elevada de processamento, que obriga o algoritmo de detecção a realizar as operações pelo menos 3 vezes. Essa carga extra de trabalho pode ser eliminada convertendo a imagem para uma escala cinza, técnica que pode ser efetuada multiplicando os canais [R; G; B], em cada pixel da figura, pelas constantes [0,2989; 0,5870; 0,1140], fazendo com que cada ponto  $f(x,y)$  agora seja representado por uma única cor (em escala cinza).

$$f(x,y) = [0,30*\text{vermelho}(x,y) + 0,59*\text{azul}(x,y) + 0,11*\text{verde}(x,y)] \quad \text{Eq. 16}$$

Após transformar a cada pixel colorido em cinza, a imagem passa a ter apenas um canal, diminuindo consideravelmente a complexidade da representação, entretanto, ele ainda apresenta ruídos, como partes serrilhas e variação de cores muito próximas que não ajudam a recuperação de características. Para diminuir a quantidade de ruídos de uma imagem, efetua-se filtro gaussiano (Eq. 17), que é o gradiente das componentes X e Y (Eq. 18) da convolução da imagem  $h_1$  pela máscara gaussiana  $h_2$ , na horizontal (eq. 19) e vertical (Eq. 20), com largura  $\sigma$  e intensidade  $k$ . Quanto maior o valor de  $\sigma$ , mais desfocado e sem ruído fica a imagem (O passo 2 ilustrado nesse exemplo tem  $\sigma$  como uma matriz de dimensão 5).

$$G(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}\right) \quad \text{Eq. 17}$$

$$\nabla G = \begin{bmatrix} \delta G / \delta x \\ \delta G / \delta y \end{bmatrix} \quad \text{Eq. 18}$$

$$\frac{\delta G}{\delta x} = kx \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right) \exp\left(-\frac{y^2}{2\sigma^2}\right) = h_1(x)h_2(y) \quad \text{Eq. 19}$$

$$\frac{\delta G}{\delta y} = ky \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right) \exp\left(-\frac{y^2}{2\sigma^2}\right) = h_1(y)h_2(x) \quad \text{Eq. 20}$$

Com a imagem contendo somente um canal (cinza), com baixa influência do ruído, é possível exaltar as bordas e as características a serem extraídas, através das derivadas das componentes X (Eq. 21) e Y (Eq. 22) de um operador P qualquer (Sobel, Roberts Cross, Prewitt, entre outros). A magnitude do gradiente  $M$  (Eq. 23), é a raiz do quadrados dos termos e o ângulo do gradiente o arco-tangente das componentes X e Y do operador selecionado (Eq. 24). Sendo  $I(x,y)$  uma imagem qualquer, tem-se que as componente  $P_x$  e  $P_y$  do gradiente são:

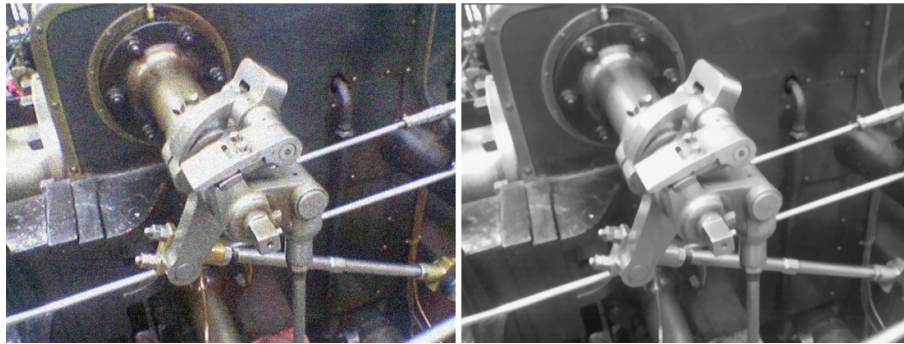
$$P_x(i, j) = [I(i, j + 1) - I(i, j) + I(i + 1, j + 1) - I(i + 1, j)] * 0.5 \quad \text{Eq. 21}$$

$$P_y(i, j) = [I(i, j) - I(i + 1, j) + I(i, j + 1) - I(i + 1, j + 1)] * 0.5 \quad \text{Eq. 22}$$

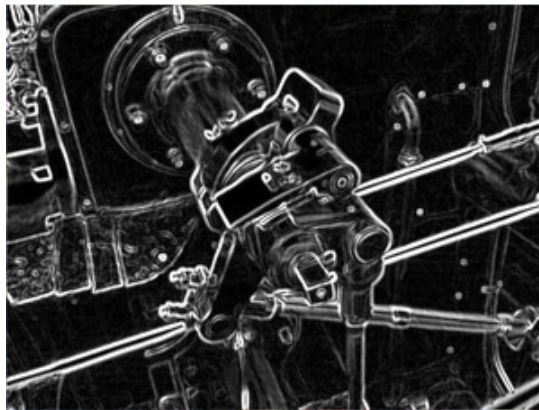
$$M(i, j) = \sqrt{P_x^2(i, j) + P_y^2(i, j)} \quad \text{Eq. 23}$$

$$\theta(i, j) = \arctan\left(\frac{P_x(i, j)}{P_y(i, j)}\right) \quad \text{Eq. 24}$$

Os passos realizados são ilustrados nas aplicações das Figura 19 e 20.



**Figura 19:** Transformação de imagem em escala cinza e remoção de ruídos. Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/Sobel\\_operator](http://en.wikipedia.org/wiki/Sobel_operator)



**Figura 20:** Aplicação do operador de Sobel sobre a imagem cinza. Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/Sobel\\_operator](http://en.wikipedia.org/wiki/Sobel_operator)

Os passos 4 e 5 são responsáveis por diminuir o tamanho das bordas e refinar o traço do contorno, com base no valor do ângulo da etapa anterior e na intensidade da magnitude dos pontos vizinhos da matriz  $M$ . A histerese preenche buracos vazios ao logo das bordas detectadas, utilizando o valor de 8 pixels adjacentes. Ao fim do processo as bordas são detectadas com base nos valores limites de um limiar pré-definido, para mostrar mais ou menos detalhes de uma imagem, podendo inclusive ser utilizado para descartar elemento do background, como ilustrado na Figura 21.

Após a obtenção de bordas da imagem, é possível aplicar a transformada circular de Hough (ACHTERT et al., 2008) para identificar o centro das colônias. O princípio de funcionamento dessa técnica é desenhar um círculo de raio  $R$  em cada ponto que contém um pixel branco e guardar quantas vezes esse círculo passa sobre qualquer ponto da imagem. O ponto que acumular mais círculos ao redor

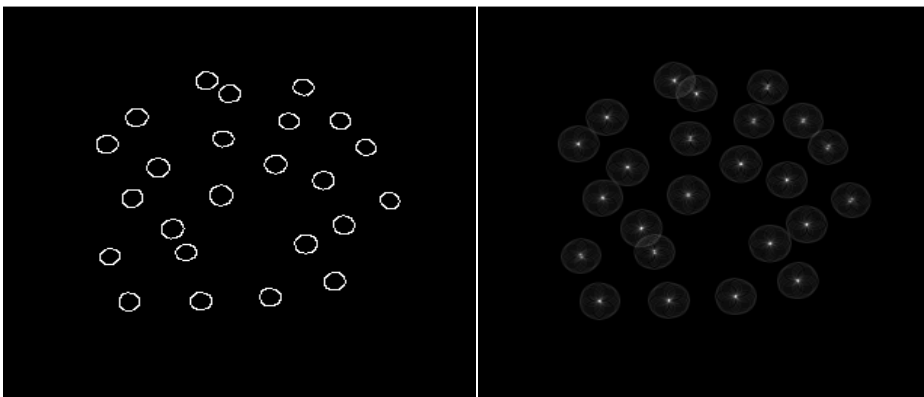


formará um centro de acumulação, que é entendido como o raio de uma esfera existente naquele ponto. Os valores acumulados podem ser desenhados. A Figura 22 exemplifica o uso da transformada de Hough sobre 24 círculos.



**Figura 21:** Detecção de borda com Threshold de 0.85 (superior) e 0.93 (inferior).

Fonte: <http://www-scf.usc.edu/~boqinggo/Canny.htm>



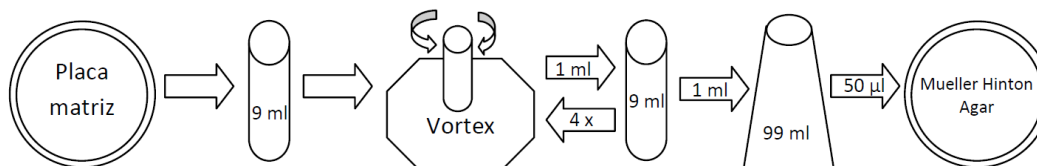
**Figura 22:** Aplicação da transformada de Hough em bordas de colônias bacterianas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para validar o programa desenvolvido utilizaram-se fotografias disponíveis na internet e realizou-se um experimento para aquisição de imagens, cujos passos realizados são explicados a seguir, bem como detalhes das técnicas de pré-processamento, segmentação e identificação de objetos selecionados.

#### - Cultivo das bactérias para aquisição de fotografia

Para cultivo das bactérias utilizou-se uma placa matriz contendo *Pseudomonas aeruginosa* da linhagem UFPEDA 416, proveniente da Coleção de microrganismos do departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), conservada em meio de cultura Ágar Nutriente, datado de 20/02/2013. Através de um perfurador retirou-se quatro discos da placa matriz e adicionou-se a um tubo de ensaio contendo uma solução esterilizada de 9 ml de leite de cabra tipo C, comumente encontrado em mercados, objetivando inocular o produto com a bactéria. A solução passou por um Vortex, com intuito de homogeneizar o inóculo no conteúdo do tubo de ensaio e em seguida retirou-se, com uma micropipeta, 1 ml da solução homogeneizada e adicionou a um outro tubo de ensaio, contendo também 9 ml de leite. O processo de homogeneização e transferência para o tubo foi realizado mais 3 vezes para obter uma diluição de  $10^{-5}$ . Retirou-se 1 ml da solução diluída e a colocou dentro de um Erlenmeyer contendo 99 ml do leite esterilizado. O conteúdo do Erlenmeyer foi também homogeneizado e através de uma pipeta microvolumétrica, com ponteiros descartáveis, retirou-se 50  $\mu$ l da solução e a espalhou, com uma Alça de Drigalski, sobre uma placa de Petri contendo meio de cultura Mueller Hinton. Para cada instante de tempo foram preparadas 5 placas. Todo o experimento foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar com luz UV, contendo um bico de bunsen para flambar os equipamentos utilizados. As etapas realizadas são resumidas na Figura 23.



**Figura 23:** Processo de preparação das placas. Fonte: Elaborado pelo autor.

### **- Aquisição de fotografias**

Para obter as fotografias utilizou-se uma câmera digital Câmera Digital Sony H Series DSC-HX300/B de 20.4 Megapixels, equipada com lentes um filtro polarizador CIR POLARIZING – Citiwide, para evitar o reflexo das Placas de Petri. As imagens não passaram por qualquer processamento em programas de manipulação de imagens e nenhum corante foi adicionado ao experimento. As imagens foram salvas em formato .jpg, padrão da máquina.

### **- Ambiente de desenvolvimento**

A codificação da aplicação foi realizada na linguagem C++, dentro do ambiente de desenvolvimento integrado C++ Builder 2007, no Sistema Operacional Windows 7. Não foram utilizadas bibliotecas externas, além das que estão incluídas no compilador, para processar as imagens. Após o planejamento dos casos de uso do programa e dos requisitos funcionais e não funcionais do programa, teve início a codificação do programa. Inicialmente foram programadas as rotinas para leitura de imagens. Optou-se por transformar todos os formatos de imagens lidos (.jpg, .gif, .png, .tif e .bmp) em estruturas de dados armazenadas em memória, com 3 bytes por cada pixel da imagem lida (um byte para o cada canal: vermelho, verde e azul, com transparência ignorada). Todos os métodos de processamento são orientados a essa estrutura, que durante os teste se mostraram mais rápidos do que a manipulação padrão oferecida pelo sistema operacional, através da manipulação de pixels. Adicionou-se ao programa a possibilidade de replicar para um conjunto de imagens todos os métodos aplicados para processar uma imagem anterior. Funções para exportação de dados foram adicionadas ao programa, que coloca em células o resultado de cada identificação. A interface do programa foi planejada para ser intuitiva e fácil de utilizar, com um tutorial inicial explicando a importância das etapas de processamento.

### **- Pré-processamento**

As fotografias do mundo real comumente apresentam milhões de cores, diversas texturas, background, problemas de cor, contraste, iluminação, ruído e diversos aspectos que tornam a mesma quase impossível de ser processada com toda a riqueza de detalhes. O pré-processamento tem por objetivo diminuir essa riqueza e

torna a imagem mais fácil de ser segmentada. Para realização dessa etapa foram implementados algoritmos para correção de luminosidade e contraste da imagem, filtro mediano, que atribui a cor média de uma região para cada pixel dentro de um raio específico, mudança para escala cinza, modificação do espaço de cores (RGB e HSL), misturador de canais, removedor de ruído, filtro passa baixa, passa alta, máximo, mínimo, ressaltador de bordas e ofuscador. Todos os códigos implementados têm por objetivo destacar o objeto de interesse do restante da imagem. Enquanto algumas imagens utilizarão poucos filtros, outras, de difícil visualização, utilizarão vários filtros para conseguir destacar uma área.

### **- Segmentação**

A segmentação das imagens é dependente do pré-processamento. Embora a imagem possa ser processada em outro software, como o Adobe Photoshop™ ou o Gimp™, é necessário diminuir a riqueza de detalhes das imagens para permitir que o computador interprete de forma fácil a parte de interesse e consiga separá-la nessa etapa. Para segmentar a imagem foram implementados, além da técnica de detecção de bordas, algoritmos de binarização, para tornar todos os pixels que estão abaixo de um valor definido e em preto todos que são maiores que esse valor, seleção por histograma de cores e seleção por verossimilhança de pixel. A segmentação torna-se fácil ou difícil de acordo com o nível de pré-processamento realizado.

### **- Identificação de objetos**

Para identificar os objetos destacados durante a segmentação utilizou-se as técnicas da Transformada de Hough (ACHTERT et al., 2008), que realiza a detecção de formas geométricas em imagens digitais, e o Template Matching (BRUNELLI, 2009; YUHAI et al. , 2005), técnica que procura por pequenos padrões dentro da imagem alvo e tenta “casar” com um padrão preestabelecido e técnica de identificação de bordas. As técnicas podem ser customizadas, para identificar colônias com diferentes raios ou considerar agrupamentos de colônias e são capazes de reconhecer colônias que se formam na borda da placa de Petri, algumas vezes sem formato específico. Após destacado o objeto de interesse, o mesmo é transformado em dados que são exibidos para o usuário e enumerados. É possível utilizar

imagens processadas completamente em outros programas e utilizar o software desenvolvido apenas para contar os objetos destacados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Assim como explicitado em Materiais e Métodos, essa seção será dividida em duas etapas: A primeira parte serão apresentados os resultados referentes ao desenvolvimento do *software MicroFit*, uma ferramenta capaz de indicar os parâmetros de uma equação que melhor se ajustam à um conjunto de dados e com base nessa característica criar modelos de crescimento microbiológico, enquanto que a segunda parte trata do desenvolvimento do *software MicroCount*, uma ferramenta que processa fotografias de experimento com colônias bacterianas e conta automaticamente o total de colônias identificadas. Após a descrição dos resultados obtidos, serão expostos testes de execução do programa.

### 4.1 Desenvolvimento do MicroFit

Dentre os principais programas encontrados após o levantamento bibliográfico cita-se ComBase Predictor, DMFit 3.0, GlnaFit, IBPT, PMP 7.0, SSSP, Bugdeath 1.0, Food Spoilage Predictor, PMM Lab e IPMP 2013, escolhidos por terem entre suas funcionalidades a predição microbiológica, mesmo que alguns desse programas extrapolem esse escopo. As soluções analisadas desempenham corretamente as funções básicas descritas pelos desenvolvedores e idealizadores, como ajustes de parâmetros a modelos prefixados e geração de gráficos contendo dados para análise. Apesar disso, todas as soluções analisadas apresentam desvantagens e problemas do ponto de vista técnico e prático.

Dentre os principais problemas identificados, destaca-se o fato de que praticamente todas as soluções apresentam dependências de pacotes e *softwares* pagos para serem executados (como o Microsoft Excel™), não possuem executáveis autônomos (rodando apenas dentro de outro programa, como um complemento), possuem interface pouco intuitiva, baixa curva de aprendizado, impossibilidade de importar ou trabalhar com dados externos aos programas, ausência de funções para

exportar resultados e as soluções são aplicadas apenas para modelos e microrganismos específicos. Dentre as características desejadas à esses programas estão o suporte multilíngua, a capacidade de desenvolver novos modelos para representação do crescimento microbiológico, bem como a possibilidade de adicionar ou remover parâmetros e trabalhar em situações além das pré-estabelecida pelo desenvolvedor. Apesar dos problemas encontrados, as soluções disponíveis apresentam uma diversificada e rica base de dados sobre diversos microrganismos, situação e ambientes, com dados reais, além de algumas soluções permitirem trabalhar com modelos primários e secundários, como o IPMP 2013.

Como citado em Huang (2014), todos esses problemas podem ser sanados através de soluções comerciais de propósito geral, como SAS<sup>®</sup>, Matlab<sup>®</sup>, Mathematica<sup>®</sup>, S-Plus<sup>®</sup>, or SPSS<sup>®</sup>, ou soluções *open source*, como R<sup>®</sup>, apesar disso, cada um desses programas possuem sintaxes e formas de programa específicas e exigem que o usuário compreenda toda a matemática envolvida no processo, além do preço muitas vezes proibitivo.

Com intuito de sanar os problemas identificados e citados anteriormente, cada ferramenta do *software* aqui proposto, intitulado MicroFit, foi cuidadosamente planejada, sobretudo a interface gráfica do usuário. Através de uma interface simples, com menus claros e diretos (Figura 24), o usuário já no primeiro acesso consegue localizar a ferramenta desejada e sente-se como se já conhecesse o programa. Durante o desenvolvimento buscou-se retirar configurações desnecessárias e posicionar cada elemento na ordem de uso mais lógica.

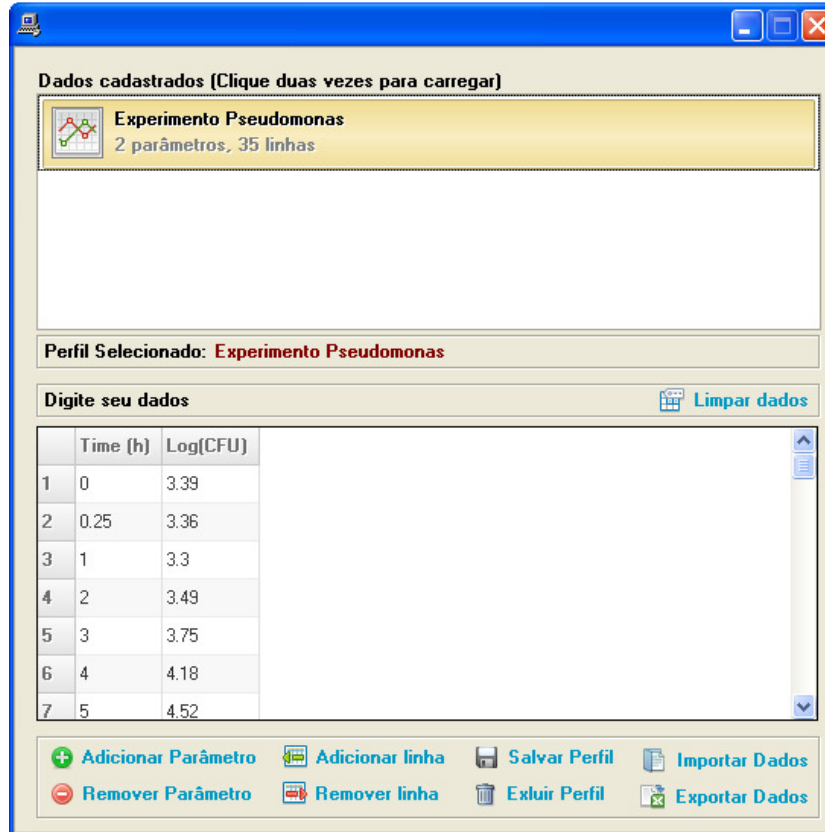
Em cada um dos menus é possível encontrar exemplos, dicas e formas de uso, além de funções para importação ou exportação de dados. Apresentado nesse trabalho em Português do Brasil, o *software* pode ser traduzido para outras línguas dentro do menu “Opções e configurações”, tendo como idioma padrão o inglês.



**Figura 24:** Menu principal do software desenvolvido. Fonte: Elaborador pelo autor.

A interface para entrada de dados (Menu importar ou Digitar dados) é igualmente intuitiva. Através de células semelhantes à planilhas, o usuário pode digitar, importar arquivos, filtrar os dados disponíveis, adicionar e remover colunas (parâmetros), exportar os dados em visualização e aplicar modelos primários e secundários aos dados digitados ou importados, além de trabalhar com múltiplos perfis de dados e modelos (Figura 25).

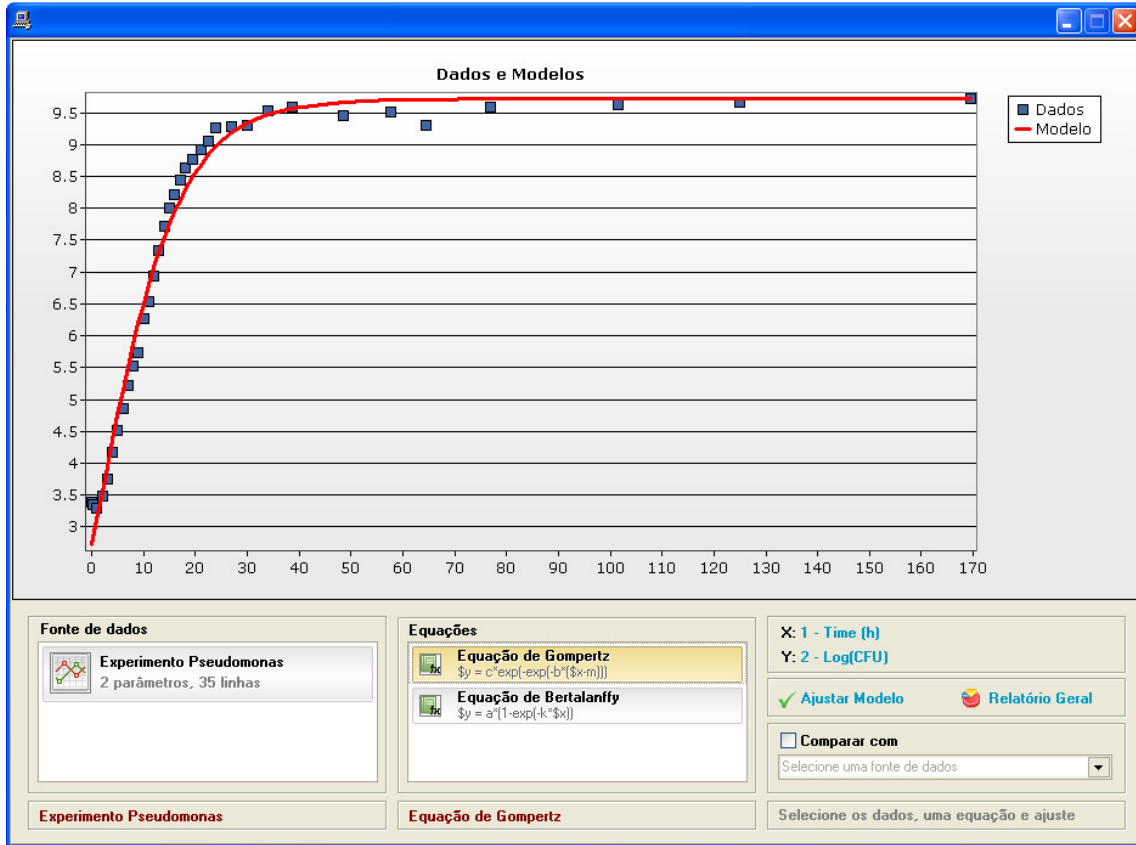
Para testar e validar a aplicação desenvolvida utilizou-se dados disponíveis gratuitamente no site do Combase ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)). Esses dados apresentam a concentração de microrganismo em função do tempo, durante as fases de crescimento microbiano



**Figura 25:** (a) Interface de entrada de dados. Exemplo com *Pseudomonas ssp.* obtidos do Combase. Fonte: Elaborador pelo autor.

Para utilizar um modelo preditivo, o pesquisador escolhe um perfil de dados salvo, seleciona os modelos primários que se deseja ajustar e mapeia as variáveis dos modelos com os dados, como ilustrado na Figura 26. Os dados informados podem ser utilizados em ajustes teóricos de crescimento microbiano de nível primário e secundário, permitindo que o pesquisador estime o tempo de prateleira, parâmetros de inativação e outras possibilidades condizentes com os parâmetros adicionados, de forma muito mais fácil e flexível do que as ferramentas atuais permitem.





**Figura 26:** Aplicação de modelo de Gompertz (linha) para ajuste de dados (pontos).

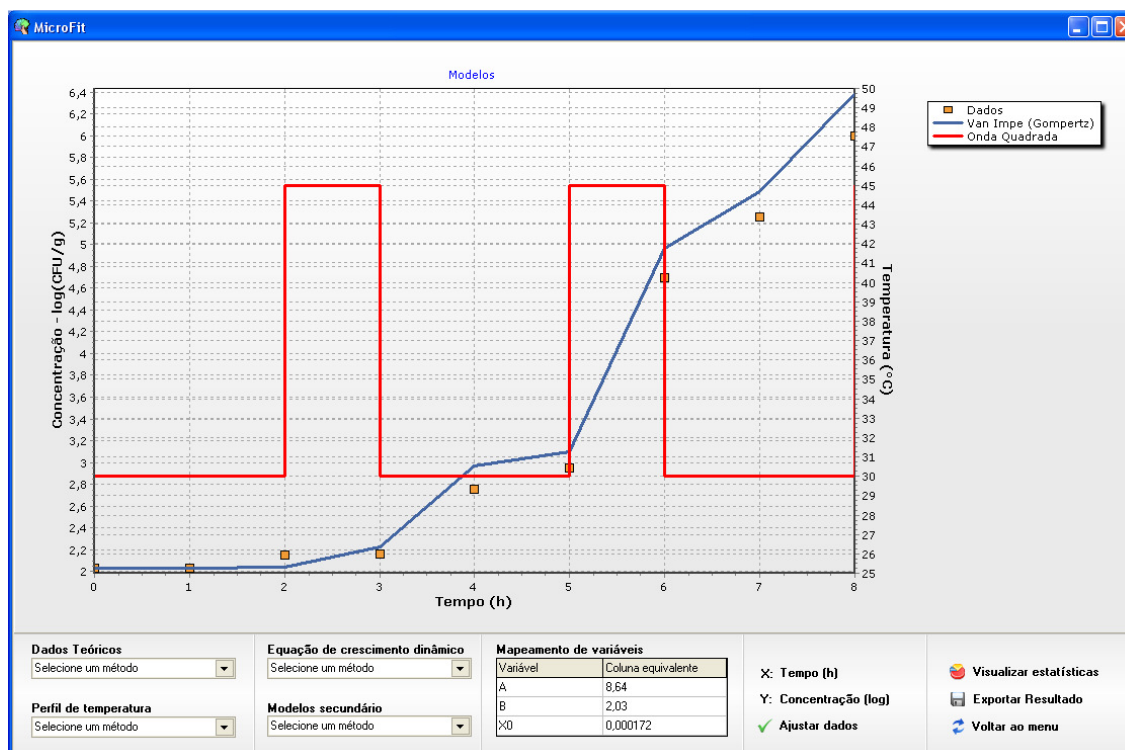
Fonte: Elaborador pelo autor.

A análise estatística, como o erro médio, grau de ajuste, influência dos parâmetros e as ferramentas de comparação entre modelos permitem a desambiguação de resultados e modelos, além de fornecer métricas confiáveis para as escolhas realizadas. Para fornecer essas métricas o programa desenvolvido faz uso do algoritmo de Levenberg-Marquardt, que se diferencia de outras técnicas de minimização pelo fato de não necessitar de uma indicação inicial próxima do valor verdadeiro, como o método de Newton (VALLE, 2012), utilizando o resultado de uma execução como a própria estimativa inicial da próxima execução, com elevada convergência para os principais modelos de crescimento encontrados na literatura.

Para tornar a análise transparente e fácil de reproduzir, os resíduos e as estatísticas intermediárias são apresentados ao usuário, bem como a possibilidade de exportar esses dados e utilizar em outros programas. Durante a comparação dos modelos, o peso de cada parâmetro é apresentado ao usuário, permitindo que seja

decidido numericamente se o parâmetro tem influência no modelo, bem como a verificação do princípio da parcimônia.

No software em questão também estão disponíveis os modelos de nível secundário, que incorporam mudanças das condições ambientais dentro dos modelos primários, na forma de perfis de temperatura ou quaisquer outros parâmetros que afetem a taxa de crescimento (Figura 27). As equações diferenciais são resolvidas pelo método de Runge-Kutta, que se utiliza de aproximações numéricas para estimar o valor da equação em um ponto futuro.



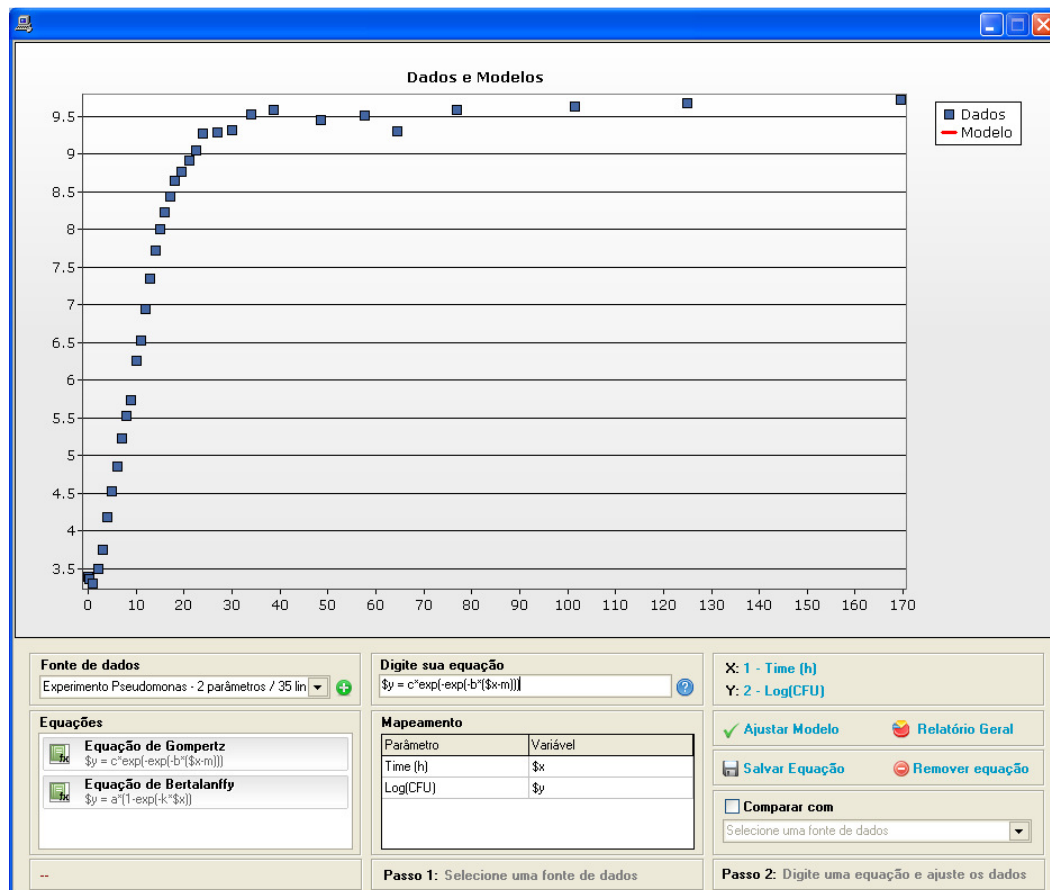
**Figura 27:** Modelos secundários, com um perfil de temperatura em forma de onda.

Fonte: Elaborador pelo autor.

Além de permitir a incorporação de perfis dinâmicos de temperatura, através de importação de planilhas ou digitação de dados, é possível mudar as funções de efeitos do crescimento dinâmico, como equações de Arrhenius e modelo da raiz quadrada (NAKASHIMA et al., 2000).

O *software* descrito nesse trabalho possui uma ferramenta ainda não abordada em outro programa do gênero: a possibilidade de desenvolver modelos,

utilizando funções matemáticas e parâmetros informados livremente pelo usuário (Figura 28), ou seja, o pesquisador pode inferir e testar seu próprio modelo, comparando com os já existentes. Por exemplo, ao invés de utilizar a curva de Baranyi-Robert (Eq. 03) para obter a curva ajustada de um conjunto de dados, o usuário poderá optar por um modelo mais simples, como  $Y(t) = L[1 - \exp(-kt)]$ , mais fácil de trabalhar e explicar.



**Figura 28:** Interface para desenvolvimento de novos modelos teóricos. Fonte: Elaborador pelo autor.

Dentro do programa esse modelo seria digitado utilizando a sintaxe “ $y = L \cdot (1 - \exp(-k \cdot t))$ ”, onde o “\$” representa as variáveis do modelo, com \$t representando o período de tempo, e as letras, como L e k, as constantes que serão estimadas com base nos valores das variáveis. Ao solicitar a estimativa dos parâmetros, o programa plota os dados observados, os estimados, calcula as estatísticas de dispersão e informa o melhor valor para as constantes do modelo. Em questão de segundos o

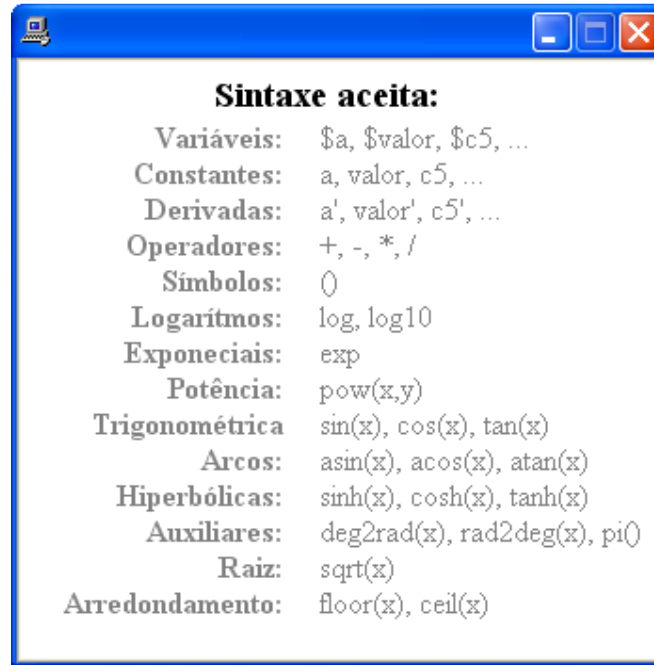
pesquisador poderá desenvolver obter resultados estatísticos dos modelos digitados como equações. De maneira semelhante é possível fazer ajuste de modelos secundários, de resolução ainda mais onerosa quando não se possui conhecimento e ferramentas apropriadas, em geral métodos numéricos para resolução de equações diferenciais que não possuem solução analítica.

A facilidade de trabalhar com equações e dados dentro do programa desenvolvido abstrai a utilização de métodos numéricos de ajuste, permitindo que pesquisadores não familiarizados com esses métodos possam ajustar curvas e desenvolver novos modelos, focando na explicação microbiológica dos parâmetros informados, sem a necessidade de realizar análises matemáticas complexas que podem impedir o empreendimento. Com a curva ajustada, é possível conhecer a taxa de crescimento de um microrganismo, o efeito do ambiente sobre o mesmo, estabelecer a vida útil de um produto e tomar decisões com base nos dados apresentados pelo software.

Essa característica tem como objetivo incentivar o desenvolvimento de novos modelos, cada vez mais precisos, de uma maneira rápida e fácil. O desenvolvimento dessa ferramenta está fundamentado em um interpretador de funções desenvolvido internamente no *software*, capaz de reconhecer uma cadeia de caracteres contendo uma função matemática, que descreve ou não os dados experimentais. Essa cadeia poderá conter variáveis, constantes, derivadas, operações elementares, funções trigonométricas, exponenciais, logarítmicas, raízes e potências, que devem ser escritas como mostrado na Figura 29.

Ao digitar a expressão que representa o modelo a ser testado, as estatísticas de um perfil de dados selecionado são calculadas e apresentadas para o usuário. Todas as funções apresentadas possuem mecanismos de exportação de dados e representação gráfica. Da mesma forma que os modelos primários podem ser livremente montados pelos pesquisadores, os modelos secundários também podem ser montados e resolvidos automaticamente pelo método de Runge-Kutta, que possibilita adicionar o efeito das condições ambientais aos modelos de crescimento primários (temperatura, pH, ou quaisquer outros parâmetros) e exibir graficamente e numericamente os efeitos do ambiente no crescimento dinâmico dos microrganismos. Apesar desse trabalho ter citado apenas o uso em ajuste de

modelos microbiológicos de crescimento, o *software* poderá ser utilizado com as mesmas ferramentas para ajustes genéricos de funções e modelos, não necessariamente ligados à microbiologia preditiva.



**Figura 29:** Sintaxe de funções e operadores aceitos pelo programa. Entende-se como constante os parâmetros dos modelos e variáveis como as colunas de dados do experimento. Fonte: Elaborador pelo autor.

O *MicroFit* é distribuído gratuitamente, não possui dependências externas, é fácil de utilizar, possui interface gráfica amigável e com alta curva de aprendizado, contem um editor de equações não abordado em outras soluções e um conjunto de ferramentas e possibilidades que tornam esse programa mais atrativo, competitivo e distinto de outras soluções disponíveis.

O programa desenvolvido não tem como objetivo substituir nenhuma das soluções analisadas nesse manuscrito, mas complementá-las e oferecer aos pesquisadores de modelos preditivos uma ferramenta para trabalhar com ajuste de modelos microbiológicos e tomada de decisões rápidas. O programa encontra-se em versão estável e novos estudos estão sendo efetuados com intuito de adicionar ferramentas, métricas de comparação e exemplos estão em desenvolvimento para implementação de uma versão futura.

#### 4.2 Caso de uso do *MicroFit* com leite

Através de um experimento realizado com leite de vaca, aferiu-se a quantidade de unidades formadoras de colônias (em log) inoculadas ao longo de 125 horas de análise. Os dados, apresentados na Tabela 2, são provenientes do Combase e foram tabelados na ordem de coleta. Deseja-se saber quais os valores das constantes que melhor ajustam o modelo e se é razoável supor que em temperatura constante o microrganismo em estudo pode ser modelado pela curva logística.

$$Y(t) = A + \frac{C}{1 + \exp[-B(t - \lambda)]}$$

**Tabela 2:** Dado do experimento ao longo de 125 horas.

| Tempo (h) | Log(UFC) | Tempo (h) | Log(UFC) |
|-----------|----------|-----------|----------|
| 0         | 3,39     | 16        | 8,22     |
| 0,25      | 3,36     | 17        | 8,44     |
| 1         | 3,3      | 18        | 8,64     |
| 2         | 3,49     | 19,5      | 8,77     |
| 3         | 3,75     | 21        | 8,91     |
| 4         | 4,18     | 22,5      | 9,05     |
| 5         | 4,52     | 24        | 9,27     |
| 6         | 4,86     | 27        | 9,28     |
| 7         | 5,22     | 30        | 9,31     |
| 8         | 5,53     | 34        | 9,52     |
| 9         | 5,74     | 38,75     | 9,58     |
| 10        | 6,26     | 48,5      | 9,45     |
| 11        | 6,53     | 57,66     | 9,51     |
| 12        | 6,94     | 64,5      | 9,3      |
| 13        | 7,34     | 77        | 9,58     |
| 14        | 7,72     | 101,5     | 9,63     |
| 15        | 8        | 125       | 9,67     |

Fonte: Combase (2014).

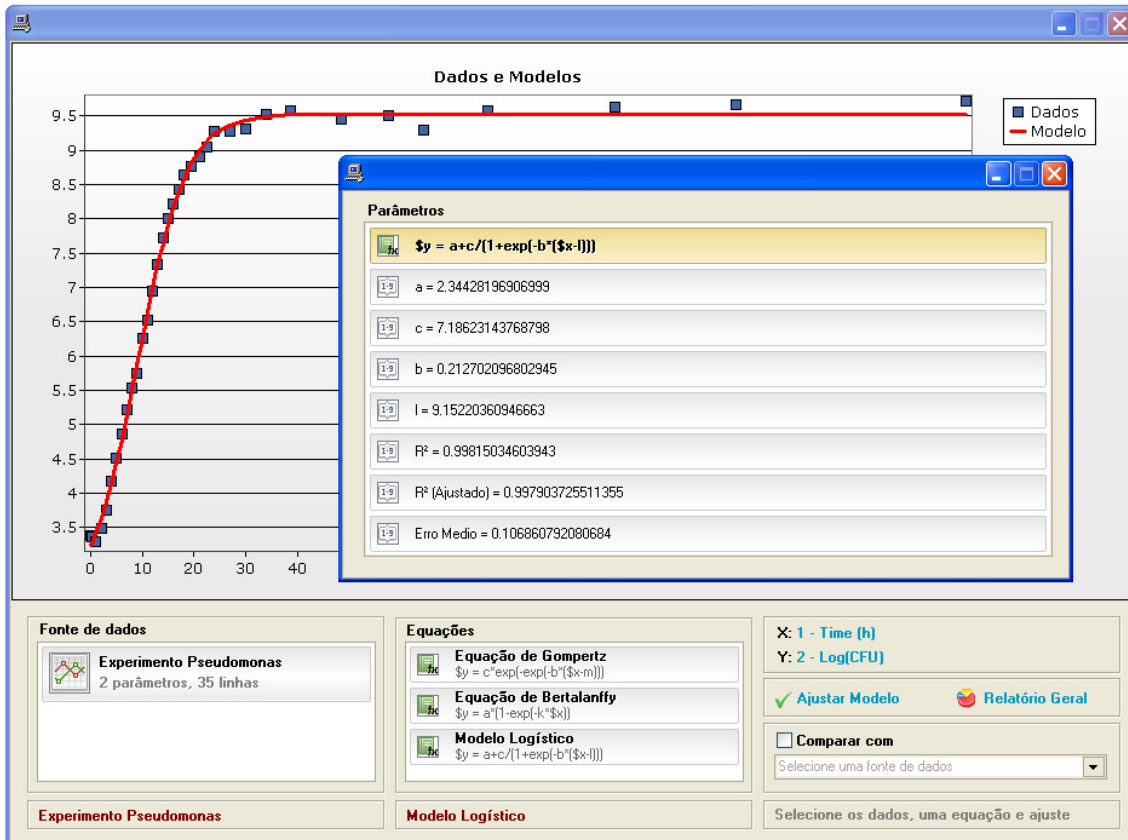
Seguindo os passos abaixo é possível descobrir se a suposição está correta.

- 1) Inicialmente deve-se importar os dados tabelados pela interface de entrada de dados do programa;
- 2) A curva logística é bastante difundida na literatura e já acompanha o software. Caso o Pesquisador deseje fazer alguma modificação no referido modelo, basta informá-la no formato da sintaxe de entrada do programa:  $y = a + c / (1 + \exp(-b * (t - l)))$

3) Seleciona-se o perfil de dados importador, o modelo logístico e clica em Ajustar. De acordo com a saída do software, Figura 30, utilizando os parâmetros abaixo, a curva logística ajusta 99,81% dos dados, com um erro médio de 0,11, indicando que é razoável supor que em temperatura constante os microrganismos se desenvolvem no leite segundo a equação abaixo:

$$Y(t) = 2,34428 + \frac{7,18623}{1 + \exp[-0,21270(t - 9,15220)]}$$

O pesquisador poderá ainda comparar o ajuste obtido para variações da função logística, suprimindo parâmetros para torná-la mais fácil de explicá-la, por exemplo, e plotar tudo em um mesmo gráfico, para comparação visual e numérica.



**Figura 30:** Saída do software para o modelo selecionado. Fonte: Elaborador pelo autor.

### 4.3 Desenvolvimento do MicroCount

Antes do desenvolvimento e codificação da aplicação realizou-se um levantamento por programas criados com intuito de identificar colônias bacterianas, além de uma pesquisa sobre as técnicas, filtros, possibilidades e limitações dos principais editores de imagens, como Adobe<sup>™</sup> Photoshop<sup>®</sup> e Gimp<sup>®</sup>, bibliotecas de visão computacional, como OpenCV (Open Source Computer Vision Library) e programa de propósito geral, como o Matlab<sup>®</sup>. A escolha dos programas e bibliotecas baseou-se nos critérios de popularidade – todos os eleitos são líderes de mercado em seu segmento.

A análise dos editores de imagem, sobretudo do Photoshop, revelou técnicas de pré-processamento de imagens que facilitam significativamente o trabalho das etapas posteriores, como controle, contraste, remoção de ruído, técnicas de separação de histograma, mistura de pixels para ressaltar partes de interesse, controle de nitidez, iluminação, equalização e espaços de cores. O Photoshop<sup>®</sup> é capaz de processar imagens, entretanto, não foi desenvolvido com intuito de identificar objetos, área na qual o OpenCV e o Matlab<sup>®</sup> se destacam, com sofisticados algoritmos de detecção e reconhecimento de padrões que permitem segmentar os objetos de interesse das imagens (MARENGONI & DENISE, 2009). A análise dessas ferramentas permitiu o entendimento das técnicas de suavização, cálculo de operadores de gradientes, como o operador de Sobel, Supressão de Não-Máximos, histerese e threshold, bem como técnicas de identificação de curvas e transformadas de Hough.

Apesar de sofisticados, tanto o OpenCV quanto o Matlab<sup>®</sup> requerem conhecimentos de programação, na maioria das vezes distante da realidade de muitos pesquisadores. Além disso, por serem de propósito geral demandam um tempo elevado e um estudo de caso para que seu uso seja especificado para contagem de bactérias, sem qualquer garantia que o processo seja executado como esperado.

Em seu levantamento sobre o estado da arte da contagem de objetos por fotografia, Barbedo (2012) afirma que programas e soluções específicas para identificação de padrões e objetos funcionam melhor do que soluções de propósito geral. O autor ainda relata no seu levantamento, resumido na Tabela 3, que a



contagem de células e bactérias é a forma de contagem mais comum de objetos por fotografia.

**Tabela 3:** Trabalho correlatos sobre contagem de bactérias (\*).

| Autor  | Pontos ressaltados   |
|--|--|
| <b>Mukherjee et al. (1995) apud Barbedo (2012)</b>   | Possui etapas de pré-processamento e contagens aproximadas pelo transformada da distância. Destaca-se mais pelo pioneirismo do que pelos resultados obtidos.                     |
| <b>Cordiki et al. (1998) apud Barbedo (2012)</b>     | Propõe uma forma de destacar as bactérias com lâmpadas halógenas, atribuindo ao programa apenas a tarefa de separação do limiar ( <i>threshold</i> ) das cores.                  |
| <b>Marotz et al. (2001) apud Barbedo (2012)</b>      | Possui pré-processamento e reconhecimento de objetos com base do programa. Utiliza parâmetros e lógica fuzzy para indicar objetos promissores e possíveis candidatos à colônia.  |
| <b>Osowsky e Gamba (2001) apud Barbedo (2012)</b>    | Propõe a contagem com aparato físico para captura de imagens, com remoção de background, utilização de limiar e correção da iluminação, com excelente taxa de acerto.            |
| <b>Chen e Zhang (2008) apud Barbedo (2012)</b>       | Uma revisão atualizada do método de Osowsky e Gamba (2001), com diferenças sutis.  |
| <b>Schönholzer et al. (2002) apud Barbedo (2012)</b> | Propõe a aquisição de imagens por cada canal (Verde, Vermelho e Azul), distinção da colônia para o background. As colônias sofreram coloração para auxiliar o programa.          |
| <b>Selinummi et al. (2005) apud Barbedo (2012)</b>   | Utiliza um método convencional de correção da imagem e separação por limiar de cores e binarização da imagem.  |
| <b>Zhang R. et al. (2008) apud Barbedo (2012)</b>    | Propõe um sistema para detecção, classificação e contagem de colônias por segmentação hierárquica do background, do da placa de Petri até as colônias.                           |
| <b>Men et al. (2008) apud Barbedo (2012)</b>         | Converte a imagem para tons de cinza e as bordas do recipiente contendo as amostras são eliminadas, seguindo de aplicação de limiar ponderado pelo histograma da imagem.         |
| <b>Goyal (2008) apud Barbedo (2012)</b>              | O autor fornece dicas de como facilitar o reconhecimento das imagens, através da estrutura da aquisição e montagem de hardware específico, sem inovações no algoritmo utilizado. |
| <b>Ates e Gerek (2009) apud Barbedo (2012)</b>       | Após binarizar a imagem, utilizando o limiar do histograma da imagem, o autor faz uso da transformada de Hough, com algoritmo divisor de água para separar e contar as colônias. |

---

|   |  |
|---|--|
| <b>Shen et al. (2010)<br/>apud Barbedo<br/>(2012)</b> | O autor utiliza um filtro de mediano, para reduzir o ruído da imagem, aplica binarização por meio de limiar seletivo e remoção das bordas da placa para contar as bactérias de forma heurística. |
|---|--|

---

(\*) Foram incluídos somente trabalho que utilizam técnicas distintas de abordagens anteriores. Fonte: Barbedo (2012).

Apesar do elevado número de trabalhos sobre contagem de células, nenhuma solução apresentou um método que tornasse obsoleto o método anterior. Nos trabalhos identificados as técnicas foram utilizadas, na maioria das vezes, de forma exclusiva, quando poderia ser utilizadas em conjunto e contribuir de forma significativa para os resultados. Além disso, todas as soluções propostas são completamente dependente da forma de aquisição da fotografia. Imagem sem contraste com background ou com unidades formadoras sem diferenciação aparente geram erros de contagem em todas as soluções. Os projetos apontados anteriormente não podem ser encontrados facilmente na internet, necessitando quase sempre contatar os autores e solicitar uma cópia do programa, que muitas vezes possui dependências de outras ferramentas ou não estão mais disponíveis, restando somente a publicação como forma de contribuição.



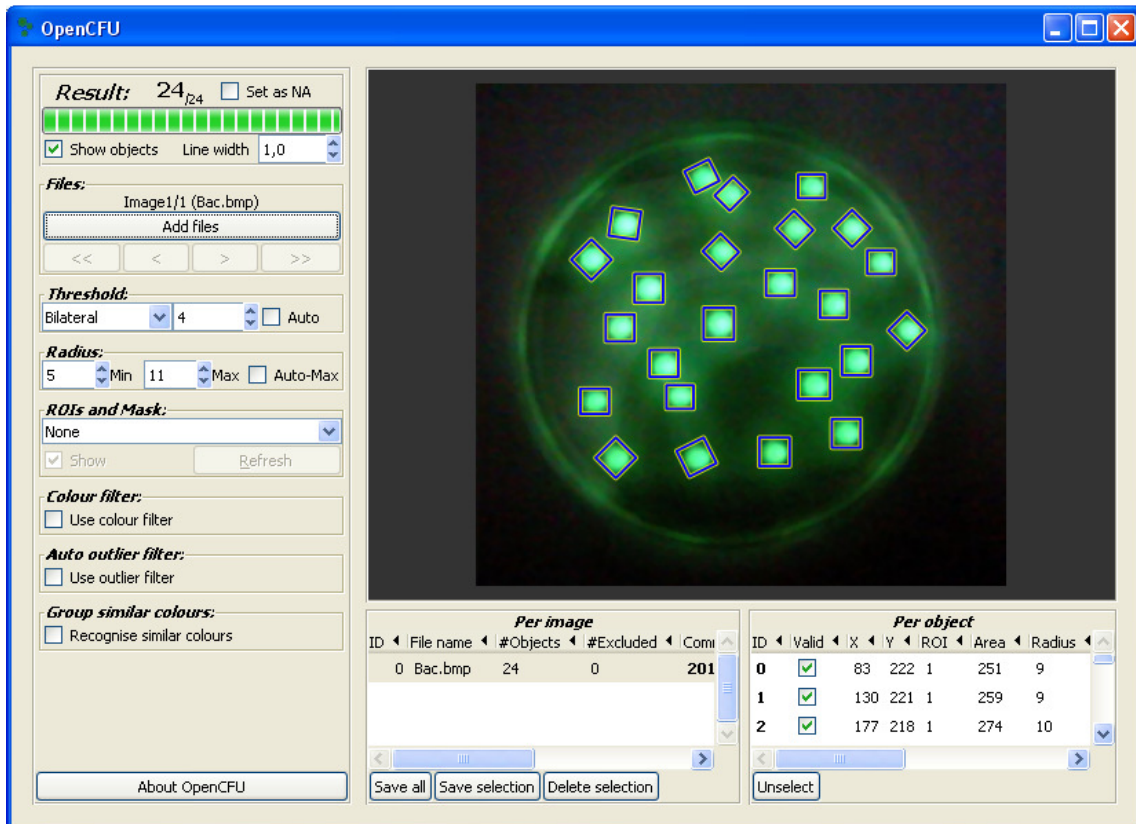
**Figura 31:** Scan<sup>®</sup> 500. Fonte: <http://www.interscience.fr/automatic-colony-counting-scan>.

Além de programas, estão disponíveis no mercado equipamentos dedicados para contagens de Unidade Formadoras de Colônia. Dentre os mais baratos e compactos está o Scan<sup>®</sup> 500, da empresa Francesa *Interscience for Microbiology*, que fornece o hardware, o software, o área de iluminação e todo o aparato

necessário pela contagem, apresentando excelentes resultados. O preço do equipamento, sem taxa de importação é de € 7.500,00 Euros, aproximadamente R\$ 23.000 reais. O preço do equipamento, apresentado na Figura 31, torna a solução inacessível em muitos locais, contudo os resultados obtidos são excelentes e muito próximos do valor exato.

Dentre os projetos disponíveis online, a iniciativa mais bem sucedida é o OpenCFU, um programa gratuito, de código aberto, com interface simples, fácil de utilizar e instalar, rápido e robusto. O projeto é facilmente encontrado no Source Forge (<http://opencfu.sourceforge.net/>) e utiliza OpenCV para analisar as imagens, sendo compatível com Windows e Linux. O programa se destaca pela maturidade, pela contagem correta e direta em uma ampla gama de imagens, além da disponibilidade e iniciativa de torná-lo aberto. A interface básica do programa é apresentada na Figura 32 e por apresentar os melhores resultados dentre as soluções testadas foi escolhido para comparação dos resultados obtidos.

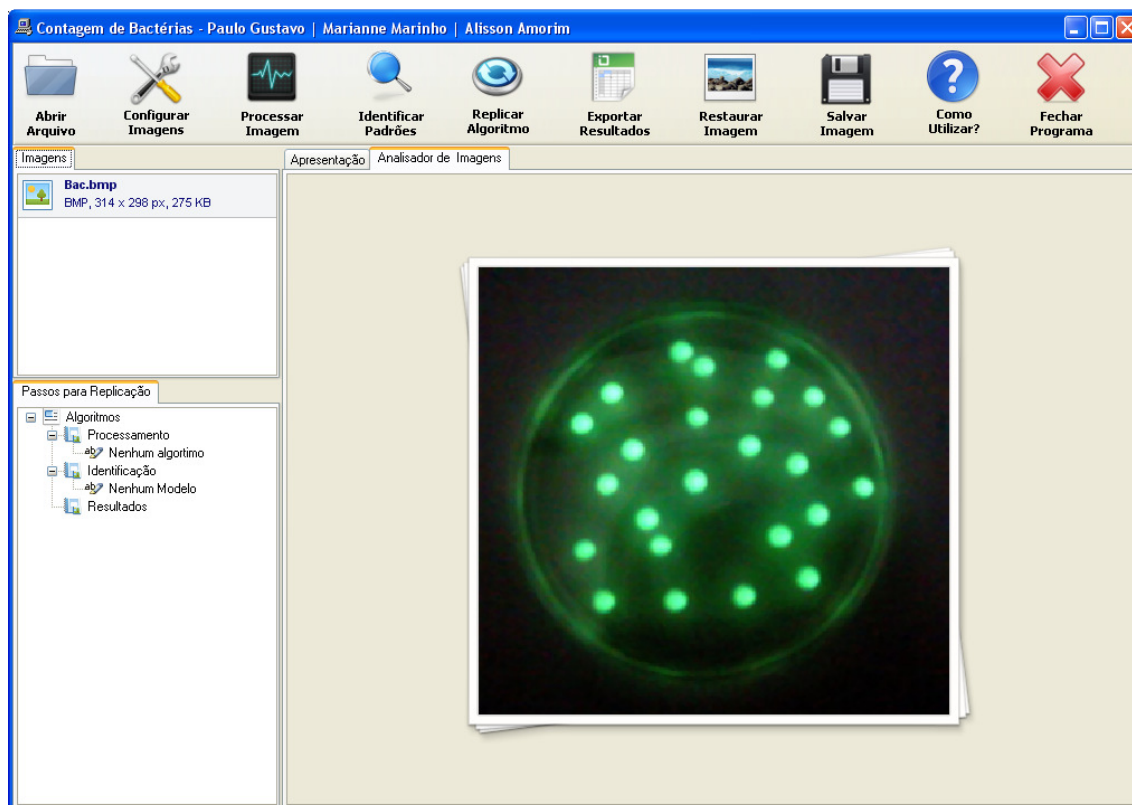
O OpenCFU tem como característica abstrair do usuário final as etapas de pré-processamento, segmentação e contagem de colônias, limitando as opções para análise das imagens. Essa forma automática de processar a imagem, embora cômoda, pode dificultar a contagem de colônias mais aglomeradas ou o uso de imagens de baixa qualidade. A ausência de funções para exportação, bem como o uso de técnicas alternativas estão entre as ferramentas desejadas à solução.



**Figura 32:** Contagem de bactérias pelo OpenCFU. O resultado é indicado na parte superior da interface (Nessa figura foram identificadas as 24 colônias). Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o desenvolvimento desse trabalho, as técnicas encontradas na literatura e utilizadas por outras soluções foram incorporadas ao programa com o objetivo de permitir o processamento de um amplo número de imagens e disponibilizar resultados com elevada precisão. Após a realização do levantamento explicado anteriormente e da análise das diversas soluções existente o programa foi concebido com a interface apresentada na Figura 33.

Filtros para pré-processamento, técnicas de segmentação, identificação e contagem foram implementados sem parâmetros automáticos, para tornar o programa menos dependente do processo de aquisição, do tipo de bactéria e do experimento realizado.

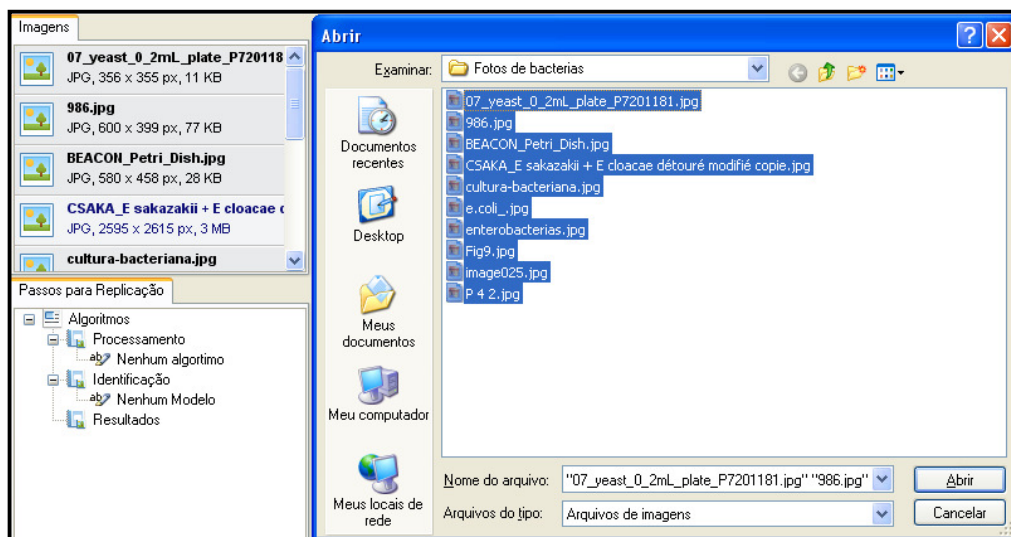


**Figura 33:** Interface principal do programa MicroCount, desenvolvido nesse trabalho, com uma imagem de experimento aberta. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao abrir o software é apresentado um breve tutorial de como utilizar as técnicas e ferramentas. Através do menu principal o usuário pode abrir as imagens, redimensionar, escolher filtros, técnicas de segmentação e contagem de colônias. Na lateral esquerda do programa são exibidas as imagens importadas e uma memorial das técnicas utilizadas, para replicação em um conjunto de imagens provenientes de um mesmo experimento.

Ao fim do processamento é apresentado ao usuário a opção de exportar os dados da contagem. Nenhuma restrição sobre a origem das imagens é feito pelo software. A imagem pode ser pré-processada em qualquer outro programa e importada para o software apenas realizar a contagem ou pode ser processada em diversos níveis dentro do programa e exportada a qualquer momento para outro programa realizar a contagem.

**Menu Abrir Arquivo:** O primeiro menu, apresentado na Figura 34, permite a inclusão de imagens, individuais ou em grupo, que são exibidas na lateral esquerda do programa e permite a seleção com um único clique.



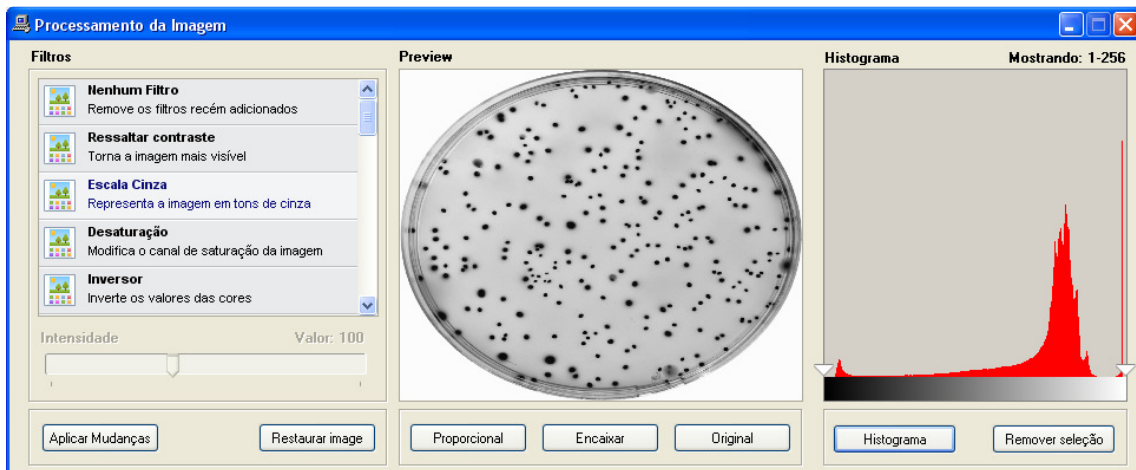
**Figura 34:** Seleção de imagens para trabalho dentro do MicroCount. Fonte: Elaborado pelo autor.

**Menu Configurar imagens:** Permite o redimensionamento das imagens, para acelerar a identificação (Figura 35). O tamanho da imagem tem muito menos influência na identificação do que a forma como as fotografias foram obtidas, como iluminação correta, coloração, ângulo e eliminação de reflexos.



**Figura 35:** Redimensionamento de imagens. Fonte: Elaborado pelo autor.

**Menu Processar imagens:** A opção para processar imagens dispõe de 25 filtros capazes de melhorar o contraste do background com os objetos de interesse, permitindo ainda a eliminação de faixas do histograma da imagem, remoção de canais e o processamento de cores em RGB ou HSL. Esse bloco tem por objetivo facilitar o trabalho da etapa seguinte.



**Figura 36:** Opções para pré-processamento das imagens. Fonte: Elaborado pelo autor.

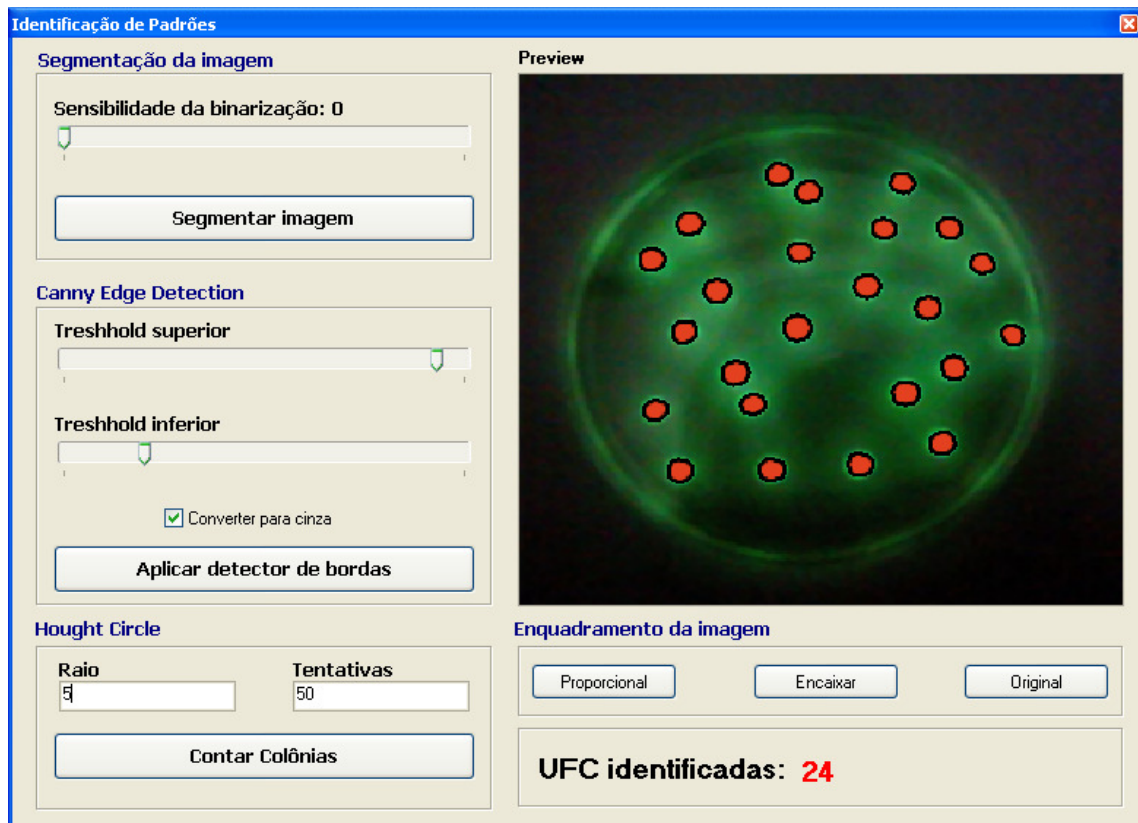
**Menu identificar imagens:** Após processar a imagem é possível identificar os objetos contíguas na mesma, através das técnicas de detecção de borda, Hough Circle e algoritmos de força bruta, que checam se a parte destacada pode formar um círculo. As colônias identificadas são plotadas sobre a imagem, para contra prova e no final da interface gráfica é exibido o número de mais provável (Figura 37).

Os menus restantes não apresentam janelas, pois a ação é executada diretamente na interface principal. Ressalta-se que em cada passo a imagem gerada pode ser restaurada ou exportada e os passos executados para um arquivo pode ser replicado para todos os outros abertos.

O programa desenvolvido trabalha de forma indistinta com arquivos .jpg, .bmp, .tif, .gif e .png, possui executável próprio e não tem dependências externas. Para o pré-processamento da imagem estão disponíveis filtros para correção de contraste, iluminação, conversão para escala cinza, remoção de saturação, ferramentas para



diminuição de ruídos, como desfoque gaussianos, máscaras gaussianas, filtro médio, anti-serrilhado, inversores, filtros de Sobel, remoção de canais, background, eliminação de faixas, mistura de pixels, equalizadores, posterizadores entre outros. Cada filtro pode ser aplicado diversas vezes e os parâmetros de intensidade podem ser selecionados pelo usuário. Para identificar os objetos é executada a técnica de Detecção de Bordas Canny (ZHOU et al., 2011).



**Figura 37:** Opções para identificação de contagem das bactérias. Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os sistemas de identificação de objeto possuem limitações técnicas e com esse projeto não é diferente. As técnicas existentes funcionam em situações controladas, como uma faixa ótima e uma faixa de incerteza, onde não se aplica a solução. Na maioria das vezes, a solução encontra-se fora do programa, sendo necessário atribuir coloração a uma colônia, melhorar a forma de aquisição das



imagens e outras técnicas comuns em fotografia digital. Outras vezes é necessário criar procedimentos específicos, para problemas específicos.

Não foi encontrado na literatura citada softwares que unissem distintas técnicas de edição de imagens, segmentação, detecção de bordas e visão computacional em um mesmo projeto, de forma controlada pelo usuário. Além do *software* desenvolvido por esse programa, foi gerado uma biblioteca com todos os procedimentos utilizados, que pode ser livremente incorporados a outros projetos, para diversos objetivos. Essa biblioteca contém algoritmos utilizados por software como Photoshop<sup>®</sup>, técnicas de detecção de bordas, espaços de cores, funções para manipulação de arquivos e desenho de primitivas, com um único arquivo.

Para testar o programa foram utilizadas imagens disponíveis na internet e algumas imagens provenientes de um experimento realizado com leite de cabra. Os principais resultados obtidos são apresentados a seguir.

#### 4.4 Validação do MicroCount

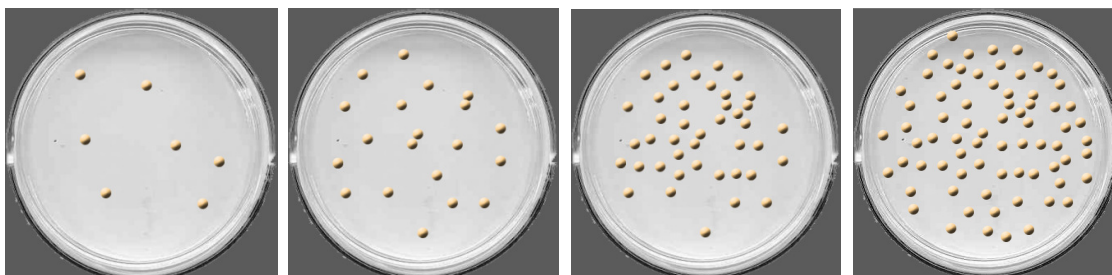
Para validar o programa desenvolvido utilizou-se como base o *software* OpenCFU 3.9, pela sua robustez e maturidade. Utilizou-se o melhor número obtido em cada *software*, que foi aquele mais próximo do valor exato. A validação contou com 6 grupos de imagens:

- 1) Imagens com baixa densidade e alto contraste:** Independente da qualidade, ambos os softwares contaram a mesma quantidade.
- 2) Imagens com alta densidade, alto contraste e alta qualidade:** Ambos os softwares processaram as imagens corretamente, como uma rápida vantagem para o MicroCount, que chegou mais próximo do valor real ou alcançou o número exato.
- 3) Imagens com alta densidade, alto contraste e baixa qualidade:** Com imagens de baixa qualidade o OpenCFU teve dificuldade de localizar as colônias, enquanto que o MicroCount localizou normalmente.
- 4) Imagens com baixo contraste:** Independente da qualidade e densidade, nenhum dos programas identificou corretamente as colônias, mas o OpenCFU conseguiu localizar um número maior de colônias, mesmo algumas vezes errando a posição onde se encontra a colônia.
- 5) Imagens com cores distintas:** Independente de qualidade e densidade o MicroCount processou melhor as imagens com duas ou mais cores.
- 6) Imagens que não representam colônias:** Independente de qualidade e densidade o MicroCount processou melhor contendo outras formas, como moedas e círculos genéricos.

Em linhas gerais os programas apresentaram resultados parecidos, com uma pequena vantagem para o MicroCount, exceto em imagens de baixa nitidez. Notou-se um desempenho de velocidade melhor que OpenCFU, entretanto, algumas vezes ficou difícil identificar o que o OpenCFU estava realmente contando. A qualidade e a falta de contraste do background da imagem com o objeto de interesse pode prejudicar a contagem do número de colônias de bactérias. Em condições de boa visibilidade os resultados obtidos confirmam que a contagem computacional de bactérias é possível e apresenta uma elevada taxa de acerto.

#### 4.5 Integração do MicroCount e do MicroFit

Tratado de forma separada nesse documento, para facilitar a compreensão, dos softwares desenvolvidos, o MicroCount e o MicroFit podem ser utilizados em conjunto. Após processar uma imagem contendo Unidade Formadoras de Colônias é possível exportar o número de colônias identificadas. Partindo do princípio de que em um mesmo experimento as características de tamanho, posição, contraste e iluminação das imagens serão mantidas aproximadamente constantes, é possível replicar os algoritmos utilizados para identificar uma figura (preferencialmente a mais densa em número de colônias) e contar automaticamente todas as imagens abertas no programa. Considerando, por exemplo, um experimento de 4 horas contendo 7, 20, 42 e 73 unidades formadoras de colônias, apresentadas abaixo.



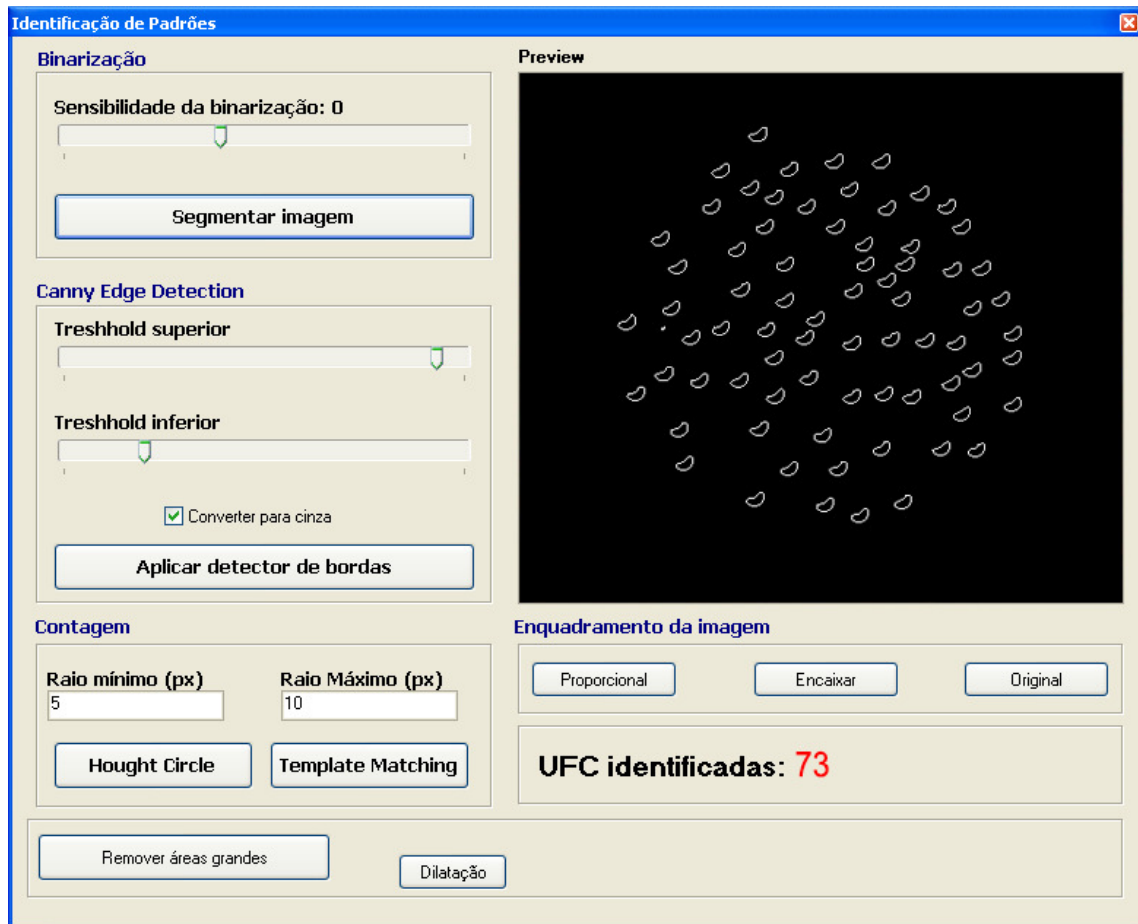
**Figura 38:** Experimento de contagem de microrganismo com duração de 4 horas. Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente deve-se organizar todas as imagens em uma única pasta e solicitar ao MicroCount que localize e carregue os arquivos. Logo em seguida, pode-se aplicar filtros para melhorar a identificação e efetuar a detecção de bordas com contagem da última imagem, pois é a que apresenta a maior complexidade, por ter a maior densidade de colônias. Quando o algoritmo for ajustado para contar corretamente a quantidade de colônias presentes na imagem com maior quantidade, todas as outras imagens poderão utilizar as técnicas aplicadas, pois são mais simples que a imagem final (Figura 39).

Ao verificar que a contagem está condizente com a quantidade de colônias presentes, através da sobreposição das imagens, replica-se o algoritmo (sequência de passo que o usuário efetuou até chegar ao número exato) para todas as imagens

adicionadas à interface do programa. Uma janela de exportação será exibida ao fim do processamento, com a opção de exportação para Excel e CSV. Ao exportar, tanto o número de colônias identificadas quanto o log10 desse número serão adicionados à planilha, em ordem crescente de quantidade, criando um arquivo pronto para ser processada pelo MicroFit. Ao abrir a planilha no MicroFit é possível escolher qual será o parâmetro utilizado (contagem ou o log da contagem) e quais são os tempos correspondentes a cada crescimento e salvar o perfil de dados.

Com o perfil salvo é possível ajustar os dados à modelos primários, secundários e desenvolver novos modelos com base no perfil selecionado.



**Figura 39:** Contagem das colônias. Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que o ajuste de dados experimentais a modelos teóricos de crescimento, explicados por equações não lineares, possui importantes aplicações na microbiologia de alimentos e conseqüentemente na saúde pública mundial, entretanto, a dificuldade, tempo e conhecimentos necessários para realizar esses ajustes podem inviabilizar todo o processo, sendo de suma importância um *software* que auxilie essa atividade e abstraia a complexidade matemática e o trabalho mecânico envolvidos. De forma semelhante, a contagem de bactérias em placas de Petri, utilizado na microbiologia, farmácia, medicina e diversos campos da biologia, demandam um trabalho fatigante de contagem, que poderia ser amenizado por técnicas de processamento e identificação de imagens.

### 5.1 MicroFit – Programa para ajuste de dados e criação de modelos

O *software* MicroFit torna possível o ajuste automático de dados experimentais a modelos microbiológicos de crescimento teórico, possibilitando a criação, o ajuste e validação de novos modelos de forma fácil e rápida, despontando como uma importante ferramenta de auxílio às atividades dos profissionais da microbiologia. Espera-se que o *software* aqui apresentado possa contribuir para a melhoria da segurança alimentar de produtos perecíveis, bem como das estimativas do tempo de vida dos produtos, além de incentivar outros empreendimentos relacionados ao uso de modelos de predição e ajustes de equações a dados experimentais, ligados a Engenharia Agrícola e áreas afins.

### 5.2 MicroCount – Programa para contagem de colônias por fotografias

O MicroCount permite que a identificação e contagem de microrganismos por fotografias seja um processo viável, prático e com uma elevada taxa de acerto, diminuindo consideravelmente o tempo de tabulação de dados referentes à contagem de microrganismos. Os filtros incorporados ao programa para pré-processamento de imagens, unidos à técnicas de identificação de colônias com parâmetros controláveis, tornam o processo de contagem bastante robusto para processar imagens com diferentes níveis de dificuldade, mesmo que em alguns momentos seja necessário assistir o processo de identificação manualmente.

### 5.3 Trabalhos futuros

Os autores acreditam que os programas desenvolvidos nesse trabalho possam ser utilizados em outras situações práticas, envolvendo ajuste de dados, desenvolvimento de modelos e processamento de imagens. Novos esforços estão sendo despendidos para melhorar as funcionalidades de ambos os softwares, bem como a portabilidade para outras plataformas, como o acesso online, via web.

## 6. REFERÊNCIAS

ABELHO, M. **Manual de Monitorização Microbiológica Ambiental**: Curso de Especialização Tecnológica em Qualidade Ambiental. CEF - Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Portugal. 2012. 60p. Disponível em: <[http://www.esac.pt/Abelho/Monitor\\_ambiental/ManualMonitorizacao.pdf](http://www.esac.pt/Abelho/Monitor_ambiental/ManualMonitorizacao.pdf)> Acessado em: 29/12/2015.

ACHARYA, T., RAY, A. K. **Image Processing- Principles and Applications**. John Wiley & Sons, Inc. 2005.

ACHTERT, E; BÖHM, C; DAVID, J.; Kröger, P.; Zimek, A. **Global Correlation Clustering Based on the Hough Transform, Statistical Analysis and Data Mining**. vol 1(3), pp. 111-127, 2008.<http://dx.doi.org/10.1002/sam.10012>

ALVES, G. M. **Método fundamentado em processamento digital de imagens para contagem automática de unidades formadoras de colônias**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2006. 125 p.

ARROYO-LÓPEZ, F.N.; BAUTISTA-GALLEGO, J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. **Role of predictive microbiology in food preservation**. In: BHAT, R.; ALIAS,

A.K.; PALIYATH, G. **Progress in Food Preservation**. 1. ed. Wiley-Blackwell, 10/01/2012. Capítulo 19. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119962045>.

ARROYO-LÓPEZ, F.N.; BAUTISTA-GALLEGO, J.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. **Predictive Microbiology: a valuable tool in food Safety**. In: Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions. BHAT, R. & GOMEZ-LOPEZ, V.M. Wiley Blackwell, 06/2014. Capítulo 25. ISBN 978-1-118-47460-0.

BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. **A dynamic approach to predicting bacterial growth in food**. International Journal of Food Microbiology, v. 23, p.277-294, 1994.

BARIONI, L. G.; MARTHA JÚNIOR, G. B.; RAMOS, A. K. B.; VELOSO, R. F.; RODRIGUES, D. C.; VILELA, L. **Planejamento e gestão do uso de recursos forrageiros na produção de bovinos em pastejo**. In: Simpósio sobre manejo da pastagem, 20., Piracicaba, 2003. Anais. Piracicaba: FEALQ. 2003. p.105-154.

BARBEDO, Jayme Garcia Arnal. **Estado da Arte das Técnicas de Contagem de Elementos Específicos em Imagens Digitais**. Documentos 120. Embrapa ISSN 1677-9274. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Informática Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012.

BIOTEC. Disponível em: <<http://cit.kuleuven.be/biotec/downloads.php>>  
Acessado em: 19/04/2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004**. Ano 5; n. 06; 28/12/2005. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol\\_epi\\_6\\_2005\\_corrigido.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf)>  
Acessado em: 09/05/2014.

BRUNELLI , R., **Template Matching Techniques in Computer Vision: Theory and Practice**, Wiley, ISBN 978-0-470-51706-2, 2009

CARDOSO JORGE, A.O. 2002. **Princípios de biossegurança em odontologia**. Rev. biociênc.,Taubaté, v.8, n.1, p.7-17, jan.-jun.2002.

CAYRE, María E.; VIGNOLO, Graciela M.; GARRO, Oscar A. **Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y Brochothrix thermosphacta sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas**. Información tecnológica, La Serena, v. 18, n. 3, 2007 .

CASSOLI, L.D. **Contagem bacteriana total**: Entendendo o processo de análise. Clínica do Leite – ESALQ/USP. Piracicaba, SP.. 2013. Comunicado No. 013. pp. 05-10

CASTRO, M.F.P.P.M.; SCHMIDT, F. L.; PENTEADO, A. L. **Growth of Salmonella Enteritidis and Listeria Monocytogenes in Melon Pulp**: Predictive Modelling and Evaluation of Model Performance. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 176-182, 2007

COSTA, Andyara Lena dos Santos. **A Microbiologia dos Alimentos e a Importância dos Microorganismos Úteis, Deteriorantes e Patogênicos**. Microbiologia e Higiene Alimentar. Universidade Anhembi Morumbi. 2011.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Estimating Foodborne Illness: An Overview**. 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/estimates-overview.html>> Acessado em: 09/05/2014.

CHORLEY, R.J.; KENNEDY, B.A. **Physical Geography: a system approach**. Londres, Editora Prentice Hall Inc. Co.. 1971. 351p.



CHRISTOFOLETTI, A. **Modelagem de sistemas ambientais**. São Paulo: Blücher, 1999. 256p.

COMBASE. Disponível em: <<http://www.combase.cc/index.php/en/downloads>> Acessado em: 19/04/2014.

DALCANTON, F. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas**. Tese de mestrado. Florianópolis-SC. Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. 2010.

DAMASCENO, R.G. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes**. Porto Alegre-RS. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011. 390 p.

DANNENHAUER, C.E. **Desenvolvimento de um Aplicativo Computacional para Microbiologia Preditiva**. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, SC. Dissertação: Mestrado. 2010. 73 f.

DE TOMINI, E. R. **Modelagem da produtividade potencial de *Brachiaria brizantha* (Variedades cultivadas Marandu e Xaraés)**. Dissertação (Mestrado). Área de Fitotecnia. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. 112p.

DOURADO NETO, D.; TERUEL, D. A.; REICHARDT, K.; NIELSEN, D. R.; FRIZZONE, J.A.; BACCHI, O. O. S. **Principles of crop modeling and simulation: I. uses of mathematical models in agricultural science**. Scientia Agricola, v.55, n. especial Piracicaba, 1998. p.46-50.

FELICIANO, F.F.; Souza, I.L. & Leta, F. R. **Visão computacional aplicada à metrologia dimensional automatizada: considerações sobre sua exatidão**. Engvista, v. 7, n. 2, p. 38-50, dezembro 2005.

FOSTER, C.; RAPOPORT, A; TRUCCO, E. **Some unsolved problems in the theory of non-isolated Systems**. General Systems Yearbook, vol. 2, 1957, pp. 9-29.

FRANCO, B.G.M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1 ed. São Paulo, Atheneu, 1999.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos**. In: Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996, cap.4, p. 33 –82, 182p.

FUJIKAWA, H; KAI, A & MOROZUMI, S. **A new logistic model for Escherichia coli growth at constant and dynamic temperatures**. *Food Microbiology*. v. 21, n. 5, p. 501–509, 2004.

FRÜHLING, S.W. **Modelagem matemática do crescimento bacteriano no leite cru**. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ. Departamento de Ciências exatas e Engenharia. Dissertação: Mestrado. 2013. 80 p.

GAVIN, H.P. **The Levenberg-Marquardt method for nonlinear least squares curve-fitting problems**. Department of Civil and Environmental Engineering. Duke University. 2013. Disponível em <<http://people.duke.edu/~hpgavin/ce281/lm.pdf>> Acessado em: 18/06/2014.

GEERAERD A.H.; VALDRAMIDIS V. P.; VAN IMPE, J. F. **GlnaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves**. A.H. International Journal of Food Microbiology, v. 102, p. 95-105, 2005.

GIBBS, P.; GEKAS V. **Water Activity and Microbiological Aspects of Foods a Knowledge**. Leatherhead Food Research Association, Randalls Road, Leatherhead, Surrey UK, University of Hania, Crete, Greece, 2001.

GONZALEZ, R. & WOODS, P. **Digital Image Processing**. Prentice Hall, 2002, 2nd ed.

HAEFNER, J. W. **Modeling biological systems: principles and applications**. Chapman and Hall, New York, New York, USA. 1996.

HAGGET, P ; CHORLEY, R. J. **Modelos físicos e de informação em geografia**. Modelos em Geomorfologia. Trad. Arnaldo Viriato de Medeiros. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1975. 260 p.

HAIGH, M. J. **Geography and General System Theory, Philosophical Homologies and Current Practice**. Geoforum. Special Issue: Links between the natural and social sciences. v.16, n.2, p.191-203. 1985.

HIRSCH, S. **Almanaque de bichos que dão em gente**. editora correcoitia. 3 ed. Capítulo 7: Bactérias. ISBN: 9788586331060. 2000. 255 pp.

HOSHIRO, S.H. & GOLDSCHMIDT, R.R. **Processamento de imagens**. Instituto Militar de Engenharia. Seção de Engenharia de Computação. Monografias em Sistemas e Computação, No. 05/2008. ISSN: 1982-9035. Rio de Janeiro-RJ. 2008.

HowStuffWorks, Imagem. Disponível em: <<http://electronics.howstuffworks.com/playstation-camera6.htm>> Acessado em: 28/12/2014.

HUANG, L. **Dynamic computer simulation of Clostridium perfringens growth in cooked ground beef**. International Journal of Food Microbiology, Wyndmoor, v. 87, p. 217–227, 2003.

HUANG, L. **IPMP 2013 - A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology**. International Journal of Food Microbiology, 171:100-107. 2014.

HUANG, L. **USDA Integrated Pathogen Modeling Program**. USDA Agricultural Research Service, Eastern Regional Research Center, Wyndmoor, PA. 2013.

LIMA, A.S. & CEZAR, M. A. **Estrutura, Morfologia e Reprodução das Bactérias**. 2013. Disponível em: <<http://www.ccta.ufcg.edu.br/admin.files.action.php?action=download&id=2848>>. Acessado em: 29/12/2014.

MADIGAN, M .T.; MARTINKI, J. M.; BROCK, T . D . (2006). **Biology of microorganisms**. 11<sup>a</sup> edição. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

MARENGONI, Mauricio ; DENISE, Stringhini. **Introdução à Visão Computacional usando OpenCV**. Tutorial. Revista de Informática Teórica e Aplicada, v. XVI, p. 1-36, 2009.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares**. Varela editor, São Paulo, SP, Brazil. 2005.

MIRANDA, E. F. O.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. **Colonization of the roots of weed cultivated in vitro and in pots by ralstonia solanacearum, biovars 1, 2 and 3**. Fitopatologia Brasileira , v. 29, n. 2, p. 121–127, Março/Abril 2004.

MONGELO, A.I. **Validação de método baseado em visão computacional para automação da contagem de viabilidade de leveduras em indústria alcooleiras**. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) apresenta ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. Campo Grande, 2012. Disponível em: [www.gpec.ucdb.br/pistori/publicacoes/arnaldo\\_sbiagro2011.pdf](http://www.gpec.ucdb.br/pistori/publicacoes/arnaldo_sbiagro2011.pdf). Acesso em: 02 jun. 2013.

MOREIRA, S.A. **Alimentação e comensalidade**: aspectos históricos e antropológicos. Ciência e Cultura, Campinas, São Paulo, v. 62, n. 4, 2010. Disponível em: <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252010000400009&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000400009&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em: 18/06/2014.

NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, D.S.; FRANCO, B.D.G.M. **Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva**. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, São Paulo, v. 3, p. 41-51, 2000.

NERBRINK, E.; BORCH, E.; BLOM, H.; NESBAKKEN, T. **A model based on absorbance data on the growth rate of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, NaCl, Nalactate and Na-acetate**. International Journal of Food Microbiology, n°.47, p. 99-109, 1999.

PESSÔA, G.S. **Avaliação de procedimentos para contagem de *Saccharomyces cerevisiae* em sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alfenas. Alfenas/MG. 2008.

PINHEIRO, Arthur Melo, Kathiani Elisa de Souza Valguima Victoria Viana Aguiar Odakura, Willian Paraguassu Amorim. **Contagem Automática de Colônias usando Hough Circles**. Anais do WVC. Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET). Universidade Federal da Grande. 2012.

PIKUTA, E. V.; Hoover, R. B. & Tang, J. **Microbial extremophiles at the limits of life**. Crit. Rev. Microbiol. Ed. 33, pp.183–209. 2007.

PMM LAB. **Predictive Microbial Modeling**. Disponível em: <<http://sourceforge.net/p/pmmlab/wiki/Links>> Acessado em: 18/04/2014.

POPPER, Karl. **Conhecimento objetivo**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1975.

PROSSER, J.I. et al. Brendan J. M. Bohannan , Tom P. Curtis , Richard J. Ellis et al. 2007. **The role of ecological theory in microbial ecology**. Nature Reviews Microbiology ed .5, pp. 384–392. 2007 | doi:10.1038/nrmicro1643.

QUEIROZ, J.E.R. & GOMES, H.M. **Introdução ao Processamento Digital de Imagens**. Departamento de Sistemas e Computação, UFCG. Revista RITA. v. 8. n.1. 2001.

SALYERS, A. A.; Gupta, A.; Wang, Yanping. **Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes**. TRENDS in Microbiology Vol.12 No.9. 2004.

SARMENTO, C.M.P. **Modelagem do Crescimento Microbiano e Avaliação Sensorial no estudo da Vida de Prateleira de mortadela e lingüiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006. 145 f.

SILVA JUNIOR, E.O. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 5. ed. São Paulo. Livraria Varela, 2002. 479 p.

SOUZA, K; Pinheiro, A.; Amorim, W. & Odakura, V. **Contagem automática de unidades formadoras de colônias de bactérias em placas de Petri com o uso do algoritmo Template Matching**. Anais do WVC. Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET). Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). 2012. Disponível em: [http://iris.sel.eesc.usp.br/wvc/Anais\\_WVC2012/pdf/97997.pdf](http://iris.sel.eesc.usp.br/wvc/Anais_WVC2012/pdf/97997.pdf)

SOLVER. **Solver for Nonlinear Programming**. Disponível em: < <http://extensions.openoffice.org/en/project/solver-nonlinear-programming-beta> > Acessado em: 06/07/2014.

SWINNEN, I.A.M., BERNAERTS, K., DENS, E.J.J., GEERAERD, A.H. & VAN IMPE, J.F. **Predictive modelling of the microbial lag phase: a review**. International Journal of Food Microbiology. v. 94, p. 137–159. 2004.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. **Life in Extreme Environments**. Nature 409 (2001): 1092–1101.

TELEKEN, J. T.; ROBAZZA, W. S.; GOMES, G. A. **Mathematical modeling of microbial growth in Milk**. In: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Chapecó, Santa Catarina, v. 31, n. 4, pp. 891-896. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v31n4/10.pdf>>

THORNLEY, J.H.M. **Grassland dynamics: an ecosystem simulation model**. Wallingford: CAB International, 1998. 241p.

TORTORA, G.J. et al., **Microbiologia**. Porto Alegre; ArtMed, 8ª ed., 2005. Capítulo 4.

UC Food Safety. **Pathogen Modeling Programs**. Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. Disponível em: <[http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/Food\\_Safety\\_Links/Pathogen\\_Modeling\\_Programs/](http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/Food_Safety_Links/Pathogen_Modeling_Programs/)> Acessado em: 18/04/2014.

VALSECHI, O.C. **Microbiologia dos Alimentos**. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural. Araras, São Paulo. 2006. Disponível em <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Microbiologia%20dos%20Alimentos.pdf>> Acessado em: 12/05/2014.

VALLE, K.N.F. **Métodos Numéricos de Euler e Runge-Kutta** Monografia de especialização em matemática. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo-Horizonte, Minas Gerais. 2012. 40 f. Disponível em: <[http://www.mat.ufmg.br/~espec/Monografias\\_Noturna/Monografia\\_KarineNayara.pdf](http://www.mat.ufmg.br/~espec/Monografias_Noturna/Monografia_KarineNayara.pdf)>. Acessado em: 18/06/2014.

VIEIRA, A. P. **Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de Listeria monocytogenes em queijo Minas Frescal Processado**

**pelo método de acidificação direta. Piracicaba.** Dissertação Mestrado. Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2011. 107 p.

YUHAI ,Li., L. Jian, T. Jinwen, X. Honbo. **A fast rotated template matching based on point feature.** Proceedings of the SPIE 6043: MIPPR. SAR and Multispectral Image Processing. 2005. pp. 453-459.

WEAVER, J.E. **Classification of root systems of forms of grassland and a consideration of 25 their significance.** Ecology , v. 39, p. 393-401, 1958.

Zhou, K.; Gui, M.; Li, P.; Xing, S.; Cui, T.; Peng, Z. **Effect of combined function of temperature and water activity on the growth of *Vibrio harveyi*.** Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1365-1375, 2012.

ZHOU, Ping. YE,Wenjun. XIA, Yaojie & WANG, Qi. **An Improved Canny Algorithm for Edge Detection.** Journal of Computational Information Systems 7:5 (2011) 1516-1523. 2011 Disponível em: [http://www.jofcis.com/published\\_papers/2011\\_7\\_5\\_1516\\_1523.pdf](http://www.jofcis.com/published_papers/2011_7_5_1516_1523.pdf)