



**FACULDADE DE TECNOLOGIA SENAI CIMATEC
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MODELAGEM COMPUTACIONAL E TECNOLOGIA INDUSTRIAL**

TATIARA LIMA RÉGIS DA SILVA

**ESTUDO DE VIABILIDADE DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
REDUTORAS DE SULFATO PROVENIENTES DE CAMPO
PETROLÍFERO PELA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO ELÁSTICO DA
LUZ**

Salvador
2017

TATIARA LIMA RÉGIS DA SILVA

**ESTUDO DE VIABILIDADE DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
REDUTORAS DE SULFATO PROVENIENTES DE CAMPO
PETROLÍFERO PELA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO ELÁSTICO DA
LUZ**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Faculdade Tecnologia SENAI CIMATEC como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Modelagem Computacional e Tecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr^a. Valéria Loureiro da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Valter de Senna

Salvador
2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Tecnologia SENAI CIMATEC

S586e Silva, Tatiara Lima Régis da

Estudo de viabilidade de identificação de bactérias redutoras de sulfato provenientes de campo petrolífero pela técnica de espalhamento elástico da luz / Tatiara Lima Régis da Silva. – Salvador, 2017.

253 f. : il. color.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Loureiro da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Valter de Senna.

Dissertação (Mestrado em Modelagem Computacional e Tecnologia Industrial) – Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Tecnologia SENAI CIMATEC, Salvador, 2017.

Inclui referências.

1. Bactérias redutoras de sulfato. 2. Corrosão influenciada por micro-organismos. 3. Espalhamento elástico de luz. 4. Microbiologia do petróleo. 5. Polinômios invariantes de Zernike. 6. Processamento digital de imagens. I. Faculdade de Tecnologia SENAI CIMATEC. II. Silva, Valéria Loureiro da. III. Senna, Valter de. IV. Título.

CDD: 620.00113

TATIARA LIMA RÉGIS DA SILVA

**ESTUDO DE VIABILIDADE DE IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO PROVENIENTES DE
CAMPO PETROLÍFERO PELA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO
ELÁSTICO DA LUZ**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Modelagem Computacional e Tecnologia Industrial, Faculdade de Tecnologia SENAI Cimatec.

Aprovada em 06 de junho de 2017

BANCA EXAMINADORA

Valéria Loureiro da Silva (orientadora) _____
Doutorado em Física pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil (1990)
Faculdade de Tecnologia SENAI CIMATEC

Valter de Senna (co-orientador) _____
Doutorado em Pesquisa Operacional pela University of Southampton, Inglaterra (1983)
Faculdade de Tecnologia SENAI CIMATEC

Roberto Luiz Souza _____
Doutor em Difusão do Conhecimento pela Universidade Federal da Bahia
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)

Suzana Telles da Cunha Lima _____
Doutora em Biologia Vegetal pela UNICAMP, Campinas, Brasil
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Dedico este trabalho à
família, à Maria Luiza, à
comunidade acadêmica,
à espiritualidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, aos Cosmos e à Natureza pela inspiração e sorte desde a primeira iniciativa até a finalização desse projeto.

Aos meus pais, Lucineide e João, pelos ensinamentos da vida que me permitiram seguir com perseverança e concentração o caminho do conhecimento e estudos.

Ao meu ex conjugue e professor Dr. Idney Cavalcanti da Silva pela transmissão dos seus conhecimentos em Geologia e Geofísica, nas aulas do curso de especialização em Petróleo, Gás e Biocombustíveis. Também pelos amplos, profundos e irrestritos desafios ofertados que favoreceram à minha resignação, resiliência, autoafirmação profissional e fortalecimento social como mulher.

À minha filha Maria Luiza, minha maior motivação pessoal que me concede incondicionalmente seu amor e proporciona meus momentos de alegria e paz interior.

Aos familiares, dentre os quais encontram-se os amigos de longas datas e outros mais recentes, apresento minha gratidão pelos impactantes incentivos e momentos de diálogo e confraternização.

Sou profundamente grata aos orientadores, Valter e Valéria, que me aceitaram como orientanda, geraram oportunidades de desenvolvimento profissional e acadêmico e nortearam o projeto com paciência e sabedoria. Bem como, ao corpo docente e pesquisadores do mestrado acadêmico em Modelagem Computacional e Tecnologia Industrial e do curso de especialização em Petróleo, Gás e Biocombustíveis pela promoção do processo de ensino e aprendizagem de forma salutar.

Agradeço aos incentivadores da Pesquisa Científica, Senai-Cimatec, Agência Nacional de Petróleo e Gás (ANP), Finep e Queiroz Galvão através dos quais fui beneficiada com a bolsa de pesquisa MSc PRH55, apoio financeiro e acadêmico fundamentais para o desenvolvimento do mestrado.

Meus sinceros agradecimentos ao professor José Erasmo de Souza Filho da Universidade Petrobrás pela gentileza e horas de diálogo científico e concessão de materiais de referência importantes para a compreensão dos processos corrosivos microbiológicos na Indústria do Petróleo.

Ao Laboratório de Biologia e Ecologia dos Micro-organismos (LABEM) da Universidade Federal da Bahia pela parceria para realização de etapas da pesquisa. Em especial, ao professor Dr. Paulo Almeida que dedicou parte seu tempo e conhecimento à nossa pesquisa viabilizando a colaboração institucional.

Ao amigo, Dr. Oberdan Pinheiro, pelo apoio prestado ao me apresentar o programa Image J e por sua amizade.

Ao amigo, Msc Aloísio Nascimento, por transmitir sua sabedoria de vida e me fortalecer nessa jornada.

Agradeço, ainda, aos meus colegas do CIMATEC das turmas do Mestrado, do PRH 55 e do grupo de pesquisa, pelos momentos de trocas de conhecimento, confraternização e incentivos.

À Chopin, pelo seu piano e musicalidade perpetuados, pois me acompanharam em toda escrita científica. Às suas Nocturne e Polonaise que ora colocaram, ora enxugaram as lágrimas dessa veemente e efêmera trajetória.

SILVA, Tatiara Lima Régis da. Estudo de Viabilidade de Identificação de Bactérias Redutoras de Sulfato de Campo Petrolífero Pela Técnica de Espalhamento Elástico da Luz. Dissertação de mestrado. Faculdade de Tecnologia SENAI/CIMATEC, Salvador, 2017.

RESUMO

A técnica de espalhamento elástico da luz (EEL) tem sido aplicada em análises microbiológicas para identificação de colônias bacterianas da microbiologia clínica e de alimentos. As colônias quando iluminadas por feixe de laser de 635nm geram padrões de difração que funcionam como impressões digitais das espécies bacterianas. Baseado em pesquisas do analisador *BARDOT*, foi proposto neste trabalho, aplicar pela primeira vez a técnica EEL para a identificação de bactérias redutoras de sulfato (BRS), anaeróbias estritas, causadoras de corrosão influenciada por micro-organismos (CIM) na indústria do Petróleo e gás. O problema parte das peculiaridades de cultivos de bactérias anaeróbias considerando as variáveis do meio de cultivo, do ambiente óptico, do próprio sistema de medição e àquelas relacionadas a imagem de tal forma que possam ser futuramente classificadas por processos de modelagem computacional. Considerando a não-linearidade dos dados e a complexidade do sistema e baseando-se na literatura científica, o método de extração por polinômios invariantes de Zernike foi adotado para descrição das características das imagens. Este trabalho resulta da pesquisa empírica no qual o objetivo principal é avaliar a viabilidade da técnica EEL para a identificação de BRS cultivadas a partir de águas de produção de Campo Petrolífero. A metodologia constou em desenvolver um sistema de laser óptico que aplica o fenômeno do espalhamento elástico da luz (SOMEEL), em selecionar as colônias de BRS provenientes de poço petrolífero, capturar as imagens de difração geradas pela iluminação individual de colônias e posterior processamento digital de imagens com descrição de fatores. Em torno de 24 imagens foram analisadas pelos softwares *Matlab 2015 Ra* e *Image J*. O processamento digital de imagens constou da aplicação dos polinômios de Zernike para descrição e da análise *Mesh Thermal* ou malha. A descrição pelo algoritmo computacional de Zernike revelou que houve modulação de fase e amplitude da frente de onda pelas colônias. As análises de malha pela escala de calor apresentaram contribuição de picos entre 0-40 na formação dos anéis concêntricos dos padrões de difração de todas as colônias avaliadas. Os resultados apontam para a viabilidade desta aplicação da técnica EEL para análise de BRS, havendo possibilidade de aplicação de vários métodos de modelagem computacional para reconhecimento de padrões em imagens, desde que sejam bem monitoradas todas as variáveis do sistema óptico, microbiológico e computacional. Esta pesquisa tem importante contribuição científica compondo-se em estudo multidisciplinar que integra diversas áreas de conhecimento como a física, biologia, microbiologia, petróleo, gás e biocombustíveis, processamento digital de imagens, modelagem computacional, a fim de promover inovações tecnológicas. Conclui-se que este trabalho permitirá a continuidade do projeto para futura construção do protótipo, automatização do sistema e reconhecimento de padrões aplicado à demanda industrial em análises microbiológicas do solo, águas e petróleo que poderá acrescentar em precisão e exatidão analíticas, além de significativa redução do tempo de análise bacteriológica.

Palavras-Chave: Bactérias Redutoras de Sulfato, Corrosão Influenciada por Micro-Organismos, Espalhamento Elástico da Luz, Microbiologia do Petróleo, Polinômios Invariantes de Zernike, Processamento Digital de Imagens.

SILVA, Tatiara Lima Régis da. Feasibility Study of Identification of Petroleum Field Sulphate Reducing Bacteria by the Elastic Light Scattering Technique. Master's Dissertation. Faculty of Technology SENAI / CIMATEC, Salvador, 2017.

ABSTRACT

The elastic light scattering technique (ELL) has been applied in microbiological analyzes to identify bacterial colonies of clinical and food microbiology. The colonies when illuminated by 635nm laser beam generate diffraction patterns that function as fingerprints of bacterial species. Based on researches of the BARDOT analyzer, it was proposed in this work, to apply for the first time the ELL technique for the identification of sulfate reducing bacteria (SRB), strict anaerobes, causing corrosion influenced by microorganisms (MIC) in the Petroleum industry and gas. The problem stems from the peculiarities of cultures of anaerobic bacteria considering the variables of the culture medium, the optical environment, the measurement system itself and those related to the image in such a way that they can be further classified by computational modeling processes. Considering the non-linearity of the data and the complexity of the system and based on the scientific literature, Zernike's invariant polynomial extraction method was used to describe the characteristics of the images. This work results from the empirical research in which the main objective is to evaluate the viability of the ELL technique for the identification of SRB cultivated from the oil field production waters. The methodology consisted in the development of an optical laser system that applies the elastic light scattering phenomenon (MOSELL), to select the SRB colonies from oil wells, to capture the diffraction images generated by individual colony lighting and subsequent digital processing of Images with descriptions of factors. The methodology consisted in the development of an optical laser system that applies the elastic light scattering phenomenon (MOSELL), to select the SRB colonies from oil wells, to capture the diffraction images generated by individual colony lighting and subsequent digital processing of Images with descriptions of factors. Around 24 images were analyzed by the software Matlab 2015 R and Image J. The digital image processing consisted of the application of the Zernike polynomials for description and Mesh Thermal analysis or mesh. The description by Zernike's computational algorithm revealed that there was phase modulation and amplitude of the front from where by the colonies. The heat scale mesh analyzes showed a contribution of peaks between 0-40 in the formation of the concentric rings of the diffraction patterns of all the colonies evaluated. The results point to the feasibility of this application of the ELL technique for SRB analysis, and it is possible to apply several computational modeling methods to image recognition, as long as all the variables of the optical, microbiological and computational systems are well monitored. This research has an important scientific contribution, being part of a multidisciplinary study that integrates several areas of knowledge such as physics, biology, microbiology, petroleum, gas and biofuels, digital image processing, computational modeling, in order to promote technological innovations. It is concluded that this work allows a continuity of the project for the future construction of prototype, automation of the system and recognition of standards applied to the industrial demand in microbiological analyzes of the soil, water and petroleum that limit in analytical accuracy and precision, besides a significant reduction of the time of bacteriological analysis.

Keywords: Corrosion Influenced by Microorganisms. Digital Image Processing. Elastic Light Scattering. Microbiology of Oil. Sulfate Reducing Bacteria. Zernike Invariant Polynomials.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1	Taxa de crescimento de uma cultura microbiana	26
Figura 2	Diagrama de Relação entre os Ramos de Monitoramento de Bactérias	30
Figura 3	Distribuição de bactérias e arqueas na superfície e subsuperfície da terra	38
Figura 4	Dendograma dos redutores dissimilativos de sulfato	43
Figura 5	Diagrama Metabólico	47
Figura 6	Vias metabólicas para acidificação biogênica anaeróbicas do petróleo	48
Figura 7	Formação do biofilme	51
Figura 8	Árvore de Classificação dos hidrocarbonetos	59
Quadro 1	Constituintes do Petróleo e suas aplicações	60
Figura 9	Biocorrosão provocada por BRS	63
Figura 10	Demonstrando corrosão provocada por MIC	63
Quadro 2	Cenário Nacional de leis e resoluções relacionadas a atividade de exploração dos recursos hídricos.	68
Figura11	Diagrama representando o ciclo das BRS na indústria produção do Petróleo e Gás	69
Figura12	Diagrama que demonstra as principais diferenças entre sensores e biossensores	80
Figura13	Diagrama representando os elementos dos biossensores	80
Figura 14	Árvore de classificação dos biossensores quanto aos tipos de Bioreceptores ou de Transdutores utilizados	81
Figura 15	Representação esquemática do aparato óptico de espalhamento elástico da luz usado para realizar análises de colônias bacterianas	89
Figura 16	Imagens dos padrões de espalhamento de culturas de <i>Listeria</i> contendo seis espécies	90
Figura 17	Desenho esquemático de um 'scatterometer'.	91
Figura 18	Espécies de <i>Listeria</i> identificados por espalhamento da luz laser	91
Figura 19	Comparação das imagens BARDOT (coluna da esquerda) e o modelo proposto baseado na teoria escalar da difração (coluna	93

	da direita)	
Figura 20	Diagrama esquemático de plataforma automática BARDOT (detecção rápida bacteriana usando tecnologia de dispersão óptica) com dois sensores de imagem digital	95
Figura 21	Tempo de incubação versus padrão de difração de três espécies da filogenia Listeria	98
Quadro 3	Panorama histórico de espécies bacterianas identificadas pelo método ELL (scatterometer, Bardot, μ Bardot e outros sistemas similares) publicadas em artigos científicos	106
Figura 22	Sistema de espalhamento da luz (scatterometer) para análise de padrões de difração de bactérias de interesse nas análises clínicas	109
Figura 23	Apresenta as cinco primeiras ordens de polinômios de Zernike	114
Figura 24	Apresenta o mapeamento da imagem normalizada [0,1]	118
Figura 25	Diagrama de fluxo para identificação de BRS em cultivo misto por SOMEEL	120
Figura 26	Fluxograma de cultivo de BRS realizado pela equipe do LABEM apresentado no Workshop anual de avaliação do PRH 55 2016	123
Figura 27	Sistema de alinhamento do LASER 635nm	126
Figura 28	A detecção de BRS pelo SOMEEL.	129
Quadro 4	Seleção de Imagens Capturadas	132
Figura 29	Diagrama de fluxo de trabalho experimental para detecção de BRS com uso do SOMEEL	133
Figura 30	Fotografia da Placa de Petri com cultivo de Bactérias redutoras de sulfato em meio Postgate modificado	135
Figura 31	Fotografias da placa de Petri apresentando as colônias selecionadas para análise conforme características de circularidade e diâmetros.	136
Figura 32	Fotografia do sistema montado para testes com o laser óptico	136
Figura 33	Fotografias do processo de alinhamento e centralização manuais do laser óptico utilizando como referência a régua óptica (Thorlabs).	137

Quadro 5	Teste de Foco e Iluminação	138
	Apresenta as posições, acima, abaixo e lateral da iluminação externa da placa de Petri	
Figura 34	Diagramas de difração de bactérias anaeróbias pelo SOMEEL	139
Figura 35	Gravura apresentando cinco tipos de materiais testados como anteparo.	140
Figura 36	Fotografias apresentando o modelo do sistema óptico para espalhamento elástico da luz por iluminação de colônias bacterianas	142
Figura 37	Imagem de placas de Petri como diferentes meios de cultura	144
Figura 38	Padrões de difração obtidos com a iluminação individual de 5 colônias de bactérias redutoras de sulfato e do meio de cultivo	146
Figura 39	Segmentação das ROIs dos padrões de difração de uma imagem representante de cada colônia de BRS (1280x1024, 8 bits) salvos em arquivos tiff	149
Figura 40	Padrão de difração da colônia um 1280x1024	150
Figura 41	ROI (a) do padrão de difração da colônia um 1280x1024	151
Figura 42	ROI (b): processo de equalização e normalização do ROI (a)1280x1024	151
Figura 43	Região de recorte do ROI a	152
Figura 44	ROI (C): ROI (B) equalizado, normalizado e subtraído 1280x1024	152
Figura 45	ROI (D): padrão de difração da colônia dois equalizado, normalizado e subtraído 1280x1024	153
Figura 46	ROI (e): padrão de difração da colônia três equalizado, normalizado e subtraído 1280x1024	153
Figura 47	ROI (F) padrão de difração da colônia quatro equalizado, normalizado e subtraído 1280x1024	154
Figura 48	ROI (G): padrão de difração da colônia cinco equalizado, normalizado e subtraído 1280x1024	154
Figura 49	ROI (H): padrão de difração do meio de cultivo equalizado, normalizado e subtraído 1280x1024	155
Figura 50	Análise de Contraste de imagem de padrões de difração	157

Figura 51	Análise de Contraste de imagem de padrões de difração	158
Figura 52	Análise de Contraste de imagem de padrões de difração	159
Quadro 6	Distribuição de intensidades e valores dos histogramas antes (a) e após (b) da equalização	160
Figura 53	Análises de superfícies dos padrões de difração de BRS	167
Figura 54	Análise 3D MESH da ROI I	169
Figura 55	Análise 3D MESH da ROI II	170
Figura 56	Análise 3D MESH da ROI III	170
Figura 57	Análise 3D MESH da ROI IV	171
Figura 58	Análise 3D MESH da ROI V	171
Figura 59	Análise 3D MESH da ROI do meio de cultivo	172
Figura 60	Análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI (C)	173
Figura 61	Principais picos formadores dos anéis análise 3d Mesh <i>Thermal Lut</i> da ROI (c)	173
Figura 62	Análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI (D)	174
Figura 63	Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI (D)	174
Figura 64	Análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI (E)	175
Figura 65	Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI (E)	175
Figura 66	Análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> DA ROI (F)	176
Figura 67	Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI (F)	176
Figura 68	Análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI (G)	177
Figura 69	Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI (G)	177
Figura 70	Análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI do meio de cultivo	178
Figura 71	Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH <i>Thermal Lut</i> da ROI do meio de cultivo	178
Figura 72	Análise de invariância à rotação e momentos de ZERNIKE do diagrama de difração	180
Figura 73	Cálculos dos momentos de ZERNIKE	181
Figura 74	Cálculos dos momentos de ZERNIKE	182
Figura 75	Cálculos dos momentos de ZERNIKE	183
Figura 76	Cálculos dos momentos de ZERNIKE	184
Figura 77	Cálculos dos momentos de ZERNIKE	185

Figura 78	Cálculos dos momentos de ZERNIKE	186
Figura 79	Cálculos dos momentos de ZERNIKE	187
Figura 80	Cálculos dos momentos de ZERNIKE	188
Figura 81	Cálculos dos momentos de ZERNIKE	189
Quadro 7	Resultados do PDI aplicados a colônia um	190
Figura 82	ROI (C)	192
Figura 83	ROI (C) rotacionada 90°	192
Figura 84	ROI (D)	193
Figura 85	ROI (E)	193
Figura 86	ROI (G)	194
Figura 87	ROI C (COL I) teste de invariância à rotação 1280X1024	194
Figura 88	ROI D (COL II) teste de invariância à rotação 1280X1024	195
Figura 89	ROI E (COL III) teste de invariância à rotação 1280X1024	195
Figura 90	ROI F (COL IV) teste de invariância à rotação 1280X1024	196
Figura 91	ROI G (COL V) teste de invariância à rotação 1280X1024	196

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais características distintivas de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> . Modificado de Madigan, 2016	40
Tabela 2	Filogenia dos procariontes redutores de sulfato	44
Tabela 3	Compostos sulfurados e doadores elétron na redução do sulfato	46
Tabela 4	Composição do meio Postagate modificado	123
Tabela 5	Análise da interferência da coloração do meio de cultura na transmissão do laser	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada (charge-coupled device)
CIM	Corrosão Influenciada por Micro-organismos
CMOS	Semicondutor de metal-óxido complementar (Complementary Metal Oxide Semiconductor)
HE	Hektoen Enteric Agar
EEL	Espalhamento Elástico da Luz
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
LIA	Ágar Lisina Ferro
NMP	Número Mais Provável
PDI	Processamento Digital de Imagens
PRH 55	Programa de Formação de Recursos Humanos da ANP com ênfase no setor petróleo, gás e biocombustíveis
PRSP	Processo de Recuperação Secundária do Petróleo
PPGGETEC	Pós-graduação em Gestão e Tecnologia Industrial
RNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
SOMEEL	Sistema Optico de Medição por Espalhamento Elástico da Luz
TSA	Trypticase soy agar
TSI	Triple Sugar Iron
XLD	Ágar de desoxicolato-lisina-xilose
WWW	Word Wilde Web

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	DEFINIÇÕES DO PROBLEMA	23
1.2	OBJETIVOS	25
1.2.1	Geral	25
1.2.2	Específicos	25
1.3	IMPORTÂNCIA DA PESQUISA	26
1.4	MOTIVAÇÃO	28
1.5	LIMITES E LIMITAÇÕES	31
1.6	ASPECTOS E QUESTÕES METODOLÓGICAS	33
1.6.1	Do diâmetro do laser versus diâmetro da colônia	33
1.6.2	Da aquisição de imagens	33
2	FUNDAMENTAÇÃO TÓRICA	36
2.1	MICROBIOLOGIA DO PETRÓLEO	36
2.1.1	Bactérias redutoras de sulfato (BRS)	39
2.1.1.1	Morfologia, Classificação e Fisiologia	39
2.1.1.2	Metabolismo e Termodinâmica Microbianos	45
2.1.1.3	Biofilme	49
2.1.2	CIM e outros danos	53
2.2	PETRÓLEO, FORMAÇÃO E CARACTERÍSTICAS	56
2.3	CICLO DAS BRS NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO E GÁS	61
2.3.1	Processo e impactos da CIM motivadas por BRS	61
2.3.2	Custos diretos e indiretos	64
2.3.3	Prevenção e Controle	66
2.3.4	Regulação ambiental para controle dde águas	67
2.3.5	Métodos de análise e biofilmes e BRS	70

2.3.5.1	Testes bioquímicos e caracterização com anticorpos	71
2.3.5.2	Deteccção, quantificação e caracterização com anticorpos	72
2.3.5.3	Técnicas moleculares baseadas na Genômica	73
2.3.5.4	Técnicas baseadas em análise de sinais espectrais	74
2.4	IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR TÉCNICA DE ESPELHAMENTO ELÁSTICO DA LUZ	77
2.4.1	Aspectos Gerais sobre sensores e biossensores	77
2.4.2	Lasers	84
2.4.3	Identificação e contagem de colônias bacterianas por ELL	86
2.4.4	Inovação tecnológica: biossensores para identificação de espécies bacterianas	88
2.4.4.1	Solucionando o problema do modelo matemático	88
2.4.4.2	Biossensor: por trás da física óptica	90
2.4.4.3	Avanços importantes do biossensor	94
2.4.4.4	Análises biofísicas, novos desafios e constatações	95
2.4.4.5	Nova visão microscópica	99
2.4.4.6	Desempenho na rotina laboratorial	101
2.4.4.7	Alto desempenho do biossensor	102
2.4.4.8	Perspectivas futuras	105
2.5	MOMENTOS INVARIANTES	109
2.6	POLINÔMIOS DE ZERNIKE	110
2.6.1	Definição	110
2.6.2	Aplicação como descritores de imagem	114
2.6.3	Computação dos momentos de Zernike	116
2.6.3.1	Dos polinômios radiais	116
2.6.3.2	Das funções de base	116
2.6.3.3	Da projeção da imagem para a base funções	117
2.6.4	Custo computacional	119

3	MÉTODOS E TÉCNICAS DA PESQUISA	120
3.1	ABORDAGEM METODOLÓGICA	120
3.2	MATERIAIS E METODOS	121
3.2.1	Delimitação do grupo de bactérias	121
3.2.2	Amostras	122
3.2.3	Cultivo de BRS	122
3.2.4	Características Morfológicas	124
3.2.5	SOMEEL	124
3.2.5.1	Teste com laser óptico	125
3.2.5.2	Foco e iluminação da Placa de Petri	125
3.2.5.3	Anteparo	127
3.2.5.4	Câmara escura e protótipo óptico	127
3.2.6	Testes dos meios de cultivos	127
3.2.7	Padrões de difração de BRS	128
3.2.8	Processamento digital de imagens (PDI)	130
3.2.8.1	Análise computacional com imagem J	131
3.2.8.2	Descrição de imagens	132
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	135
4.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	135
4.2	TESTE COM LASER	136
4.3	FOCO E ILUMINAÇÃO DA PLACA DE PETRI	137
4.4	ANTEPARO	139
4.5	CÂMARA ESCURA E PROTÓTIPO ÓPTICO	140
4.6	TESTE DOS MEIOS DE CULTIVOS	143
4.7	PADRÕES DE DIFRAÇÃO DE BRS	144
4.7.1	Análise qualitativa	144
4.8	PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS (PDI)	149

4.8.1	Análise computacional com imagem J	149
4.8.1.1	Segmentação	149
4.8.1.2	Histogramas	155
4.8.1.3	Análises de Superfície	166
4.8.2	Descrição das imagens	179
4.8.2.1	Rotação	190
5	CONCLUSÕES	197
	REFERÊNCIAS	200
	APÊNDICE A - Algoritmo computacional para cálculo dos momentos de Zernike do padrão de difração da colônia um modificado do algoritmo de Amir Tahmasbi (toolboxes, matlab)	213
	APÊNDICE B - Algoritmo para análise de invariância à rotação dos polinômios de Zernike aplicados às imagens modificado do algoritmo por amir tahmasbi (toolboxes, Matlab)	216
	APÊNDICE C - Algoritmo de análise rotação das ROIS da Colônia um referente ao quadro ()	217
	APÊNDICE D - Algoritmo computacional para análise da invariância à rotação e cálculo das amplitudes dos momentos de Zernike apresentado em quadro comparativo entre os padrões de difração das cinco colônias.	218
	APÊNDICE E - Quadros comparativos da análise de Zernike nos diagramas de difração para a colônia um em software Matlab sem etapas de processamento de imagens	262
	ANEXO A - Algoritmo computacional para cálculo dos polinômios radiais de Zernike em imagens por Amir Tahmasbi (toolboxes, Matlab)	274
	ANEXO B - Algoritmo computacional do toolbox matlab para cálculo da função de Zernike aplicada como descritores de imagens	275
	ANEXO C - Cálculo dos momentos de Zernike e análise da invariância à rotação por Amir Tahmasbi (toolboxes, Matlab)	276

ANEXO D - Quadro comparativo do Cálculo dos momentos de Zernike e análise da invariância à rotação por Amir Tahmasbi (toolboxes, Matlab) 278

“Eu nunca vejo o que já foi feito. Eu somente vejo o que ainda falta para ser feito.”

— Marie Curie

1. INTRODUÇÃO

Esta dissertação de mestrado é resultado de pesquisa científica empírica desenvolvida em laboratório de óptica e fotônica e integra um projeto mais amplo do grupo de pesquisa que visa construir um sensor óptico por técnica a laser. Como fase inicial de desenvolvimento do protótipo foi construído um sistema óptico de medição por espalhamento elástico da luz (SOMEEL) e difração do laser baseando-se em modelos anteriores descritos na literatura científica (BAE, 2008; BANADA, GUO, *et al.*, 2007; BUZALEWICZ, WIELICZKO e PODBIELSKA, 2011, 2014). O sistema e método para identificação automatizado caracteriza-se por ser um dispositivo de detecção não-invasivo, livre de marcadores e kits de reagentes imunoenzimáticos, bioquímicos e genômicos (BAE, 2011; ROBINSON, RAJWA, *et al.*, 2008). Capaz de contar e identificar espécies bacterianas cultivadas em placa de Petri em tempo real (BAI, 2009; HUFF, 2012), com baixos tempos e custo operacionais e analíticos (SEQUIN, 2016).

Em geral, o sistema óptico funciona aplicando-se os fenômenos de espalhamento elástico da luz (EEL) e difração do laser para gerar imagens de colônias bacterianas cultivadas em meio de cultivo específico. A luz dispersa para frente de cada colônia iluminada individualmente gera um padrão de difração que varia conforme as características morfológicas que são atributos variáveis entre as espécies bacterianas.

Assim, a colônia fornece *fingerprint* ou assinatura que é fotografada por câmera fotográfica (CMOS) e analisada em software para processamento digital de imagens e determinação dos padrões de difração.

Este trabalho representa os primeiros testes de aplicação prática do SOMEEL para o estudo inédito de viabilidade da técnica EEL para identificação de bactérias redutoras de sulfato (BRS) provenientes de Campo Petrolífero, consistindo em desafio ao nível do desenvolvimento científico-tecnológico.

1.1 DEFINIÇÕES DO PROBLEMA

A análise de bactérias por reconhecimento de padrões de imagem gerados pela técnica EEL já é uma realidade em laboratórios de pesquisa e análises microbiológicas. Embora pouco difundida, tornou-se um novo método, patenteado que admitiu evoluções tecnológicas ao longo do tempo (CHIN, CHEN e HILERMAN, 2013; ROBINSON, RAJWA, et al., 2008, 2014; SEQUIN, 2016). No entanto, tem limitado sua aplicação para identificar agentes patogênicos de origem alimentar. Nos modelos propostos, anteriormente descritos na literatura científica, aplicou-se a teoria dos momentos ortogonais invariantes de Zernike como descritores na fase de extração de características das imagens de difração, geradas ao iluminar colônias de espécies de *Listeria sp*, *Escherichia coli sp*, *Salmonella*, *Klebsiella*, entre outras (ABDELHASEIB, 2016; BANADA, 2007; ROBINSON, RAJWA, et al., 2008, 2014; TANG, 2014). De fato, os momentos de Zernike mapeiam a imagem dentro de um conjunto de polinômios complexos ortogonais entre si representando as propriedades da região de interesse (RDI) sem dados redundantes ou sobreposição de informações entre os momentos (HWANG e KIM, 2006). Sendo este, um passo importante que confirma, ainda que parcialmente, a possibilidade de uma imagem capturada proveniente dessa tecnologia poder ser representada e descrita (GONZALEZ e WOODS, 2010). Entretanto, o fato de se promover o padrão de difração ou mesmo a imagem não é garantia de produção de assinaturas que possam ser aplicadas em visão computacional. Gonzalez (2010, p.523), com muita propriedade lembra que independentemente da escolha do esquema de representação de uma RDI, “as características selecionadas como descritores devem ser tão insensíveis quanto for possível às variações de tamanho, translação e rotação”. É evidente que uma quantidade suficiente de dados representativos da imagem deve ser garantida para que seja exequível atribuir um rótulo de reconhecimento a um objeto baseado em seus descritores. Portanto, o processo de descrição ou seleção de características que consiste em extrair atributos que constituam informação úteis permitindo ser utilizados para diferenciação de classes entre objetos (GONZALEZ e WOODS, 2010) é preliminar fundamental para que o reconhecimento de padrões se complete com eficiência e eficácia.

Neste contexto, as assinaturas de colônias dependem da regulação e controle das variáveis de medição.

Os múltiplos fatores relacionados ao meio e métodos de cultura de bactérias anaeróbicas como as características do meio de cultivo, tais quais coloração, opacidade, estriação, rugosidade, umidade podem interferir diretamente na propagação da luz através das colônias (BAI, 2010; BUZALEWICZ, WIELICZKO e PODBIELSKA, 2011,2014). Os fatores como tempo de cultivo, temperatura, demanda nutricional, técnica de plugueamento e aeração podem modular as variações no padrão de crescimento da cultura, tamanhos e formas das colônias individualmente (ABDELHASEIB, 2016; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Essas variáveis precisam ser bem definidas e controladas para obtenção de cultivos adequados à análise por SOMEEL, caso contrário pode implicar na inviabilidade da técnica ou formação de diagramas de difração não representativos da espécie.

Na fase de cultivo em meio semissólido, em placas de Petri utilizadas para o crescimento e a observação de colônias isoladas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012), o método de esgotamento por estrias, mais comumente utilizado para o isolamento de BRS tende a formar ranhuras indesejáveis na superfície do meio.

Outro fator importante é que normalmente utiliza-se o sulfato ferroso (FeSO_4) para melhor observação e confirmação da presença de BRS nos cultivos de isolados de óleo e águas de produção, atribuindo-lhe coloração negra às colônias (ALMEIDA, 2006).

Referente à biologia das BRS, algumas peculiaridades são importantes para a análise do problema como a formação de biofilmes. Os biofilmes são estruturas de matrizes de polissacarídeos, DNA e proteínas ou polímeros complexos que residem em sistemas biológicos de comunicação entre bactérias da mesma espécie ou de espécies distintas (POPOOLA, 2013; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Neste hábitat, as BRS podem conviver por cooperação associadas ao crescimento de outros grupos aeróbicos facultativos, dificultando o isolamento de cepas (OLLIVIER, 2005, TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Sobretudo, a heterogeneidade microbiológica das amostras provenientes de fluidos de reservatórios (ALMEIDA, 2006; TORTORA, FUNKE e CASE 2012) dificultam esse processo que é fundamental para o método EEL por garantir a não contaminação da cultura por outros micro-organismos, aglomerações e sobreposições de colônias que representam entraves para a difração e formação de imagem útil para visão

computacional. Argumento que sustenta a crença da inaplicabilidade da técnica proposta neste trabalho às BRS.

Compreende-se que a complexidade da pesquisa abrange desde os fundamentos físicos envolvidos na construção do sistema óptico-instrumental, passando pela biologia dos micro-organismos e microbiologia prática, quanto, também, a análise computacional das imagens que devem ser invariantes à rotação para que sejam aplicadas ao propósito final.

Diante deste contexto, o problema central é: até que ponto pode-se gerar imagens de diagramas de dispersão pela técnica EEL viáveis para visão computacional a partir de colônias de BRS provenientes da microbiota de reservatórios petrolíferos?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Avaliar a viabilidade da aplicação do método analítico microbiológico de espalhamento elástico da luz para a identificação de bactérias redutoras de sulfato cultivadas a partir de amostra de água de produção de um poço petrolífero.

1.2.2 Específicos

1. Construir do sistema óptico
2. Selecionar as colônias de BRS provenientes de Campo Petrolíferos
3. Obter imagens de padrões de difração de colônias de BRS pela técnica EEL
4. Definir as etapas do algoritmo computacional de processamento digital de imagens

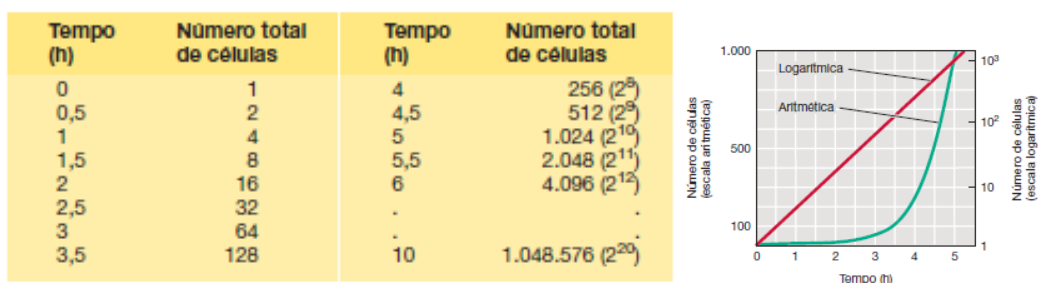
5. Analisar as imagens obtidas pelo processamento digital a partir da aplicação dos polinômios de Zernike

1.3 IMPORTÂNCIA DA PESQUISA

O tempo é sem dúvida um dos bens mais preciosos da atualidade. A otimização do tempo torna-se uma ferramenta importante de trabalho em diversos aspectos. Reduzir o tempo necessário para obtenção de resultados, válidos, por exemplo, pode acarretar ganhos materiais, financeiros, conceituais e mesmo morais ao possibilitar respostas individuais mais rápidas.

No universo da ciência e tecnologia, o controle do tempo é utilizado constantemente para limitar os procedimentos, os custos, obtenção de resultados mais rápidos, manutenção do padrão de desenvolvimento de métodos e técnicas. No ambiente microbiológico, o tempo pode significar reprodução populacional: uma única célula bacteriana em condições ambientais adequadas reproduz por divisão binária em média a cada trinta minutos. Demonstrado pela cinética de crescimento exponencial que é definida em progressão geométrica de razão dois (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012; TRABULSI e ALTERTHUM, 2004), apresentado na figura (1).

Figura 1 - Taxa de Crescimento de uma Cultura Microbiana



Fonte: MADIGAN, MARTINKO, et al. (2016)

Legenda: (a) Dados de uma população que se duplica a cada 30 minutos. Verde: segundo maior emprego

(b) Dados plotados em escalas aritmética (ordenada à esquerda)

(c) Logarítmica (ordenada à direita).

A importância atribuída às análises microbiológicas faz dessa uma das áreas mais pesquisadas mundialmente. Na bacteriologia, em especial, busca-se não somente localizar e quantificar como identificar bactérias mais rapidamente. Os métodos mais utilizados em análise de rotina baseiam-se em métodos bioquímicos convencionais e os ensaios imunológicos / *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012) ou genotipagem (GENUER, 2016) que retardam em muito os resultados, algumas vezes ocorrendo falsos positivos ou negativos. Pois, além de requerer várias etapas de análises que demandam tempo de cultura, tempo de análise de identificação e quantificação, estão vinculados ao uso de reagentes como os anticorpos marcadores, muitos deles proveniente de laboratórios estrangeiros. O retardo na liberação de resultados bacteriológicos resulta na ágil proliferação de populações bacterianas resistentes impactando na bacteriologia.

Ao considerar os efeitos sobre o indivíduo, este viés incorre no rápido avanço do processo saúde/doença e o uso inespecífico de medicamentos pode agravar o quadro infeccioso com risco de septicemia; sobre o meio ambiente amplifica o processo de desequilíbrio ambiental, contaminação de águas fluviais e marítimas, tornando-se fator de risco para os seres vivos; para a microbiologia industrial, a exemplo da alimentícia e cosmetologia, pode comprometer os procedimentos de inspeção e controle gerando a desqualificação nas especificações dos produtos finais. Semelhante analogia pode ser associada ao nível da indústria do petróleo e gás, onde a formação de biofilmes capazes de ocasionar a corrosão induzida por micro-organismos (CIM) induz ao comprometimento do sistema de produção, transporte e armazenamento de fluidos de reservatórios, óleo e gás, além de contribuir para a aplicação de biocidas inespecíficos elevando os níveis de contaminação do meio ambiente e riscos ocupacionais.

A abordagem em questão é justamente sobre a otimização da análise bacteriológica em função do tempo para a identificação de BRS, observando que pesquisas anteriores com o método EEL (BAE, 2008;BAI, 2010; BHUNIA, 2007; BUZALEWICZ, WIELICZKO e PODBIELSKA, 2011,2014; ROBINSON, RAJWA, *et al.*, 2008) revelaram uma redução brusca de tempo de cultura, em pelo menos 24hs e 12hs em amostras que seriam analisadas em pelo menos 36 h. Acredita-se que, a aplicação da técnica EEL para identificação de BRS, comumente monitoradas na Indústria de Petróleo, Gás e Biocombustíveis, implicará na detecção e identificação

de espécies bacterianas causadoras da CIM em menor tempo, possibilitando o controle assertivo desses micro-organismos.

Sob o ponto de vista tecnológico, a relevância da metodologia analítica por EEL está em possibilitar redução dos custos no processo de diversas maneiras, seja pelas intervenções direta ou indiretas.

De forma direta, os benefícios se incluem especialmente na redução de custos em análises bacteriológicas em função do tempo e da praticidade dos métodos, tais quais: a) facilidade de treinamento do recurso humano, b) redução das etapas de bancada, c) redução dos altos custos com testes de confirmação, ao reduzir ou mesmo eliminar os falsos positivos e negativos de testes de reações bioquímicas, imunológicas e genotipagem.

Indiretamente, os benefícios na prevenção da CIM se distribuem nas diferentes áreas aplicadas da cadeia produtiva, desde a produção, passando pelo refino até a distribuição e armazenamento do Petróleo, Gás e Biocombustíveis.

1.4 MOTIVAÇÃO

A escolha do tema envolveu inicialmente a adaptação do projeto de desenvolvimento de protótipo do método EEL de identificação de bactérias à aplicação na área de Petróleo, Gás e Biocombustíveis no âmbito do programa intitulado “PRH 55 especialização em petróleo e gás”, desenvolvido em parceria com o Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI/DR/BA. Considerando este, o ponto de partida para o estudo de aplicação do método EEL para identificação de bactérias importantes para a esse ramo industrial. Ao menos quatro ramos de monitoramento microbiológico foram considerados importantes para a produtividade deste setor (fig. a), são estes:

- a) Identificação de micro-organismos importantes para as intervenções contra as corrosões causadas por bactérias surfactantes em tubulações e armazenamento reduzindo a qualidade do produto final - controle de qualidade;
- b) Controle microbiológico da biomassa em biorreatores de biocombustíveis atuando diretamente na produtividade;

c) Biorremediação dos derramamentos de óleo em ambientes aquíferos e solo por meio de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos: a intervenção precoce permite reduzir os custos com multas diárias em casos de crimes ambientais;

d) A regeneração de campos maduros de petróleo por proliferação de bactérias degradadoras de petróleo, ampliando a capacidade produtiva do poço;

Após a seleção deste projeto pelo PRH 55 houve a escolha do grupo de bactérias de interesse para indústria do Petróleo ou Biocombustíveis o que culminou na escolha das bactérias redutoras de sulfato (BRS).

As BRS estão entre as principais causadoras de biocorrosão na Indústria de petróleo e Gás sendo alvo de monitoramento na produção. A biocorrosão está associada à vazamentos de óleo, elevada produção de gás sulfídrico (H_2S) e *fouling* biogênico (GROPOSO, CLAUDIA, MIGUELETI, DEIVID, SOUSA, MAIRA, AKAMINE, RUBENS., Dezembro/2014; OLLIVIER, 2005) que gera tanto o dano ambiental quanto onera a indústria em multas e perdas de produto, além de elevar os riscos operacionais (MARANGON, 2001; OLLIVIER, 2005; POPOOLA, 2013). Há a constante preocupação sobre os malefícios gerados pela corrosão na indústria, mas especificamente às CIM, devido à necessária aplicação de biocidas que são poluentes ambientais e propulsores de comunidades bacterianas mais resistentes.

Cada vez mais pesquisadores buscam encontrar métodos de análise que visem contar, classificar e identificar estes micro-organismos de maneira mais rápida e com poucos resultados falsos.

Segundo Regras e Planilhas para Cálculo do Número Mais Provável (NMP):

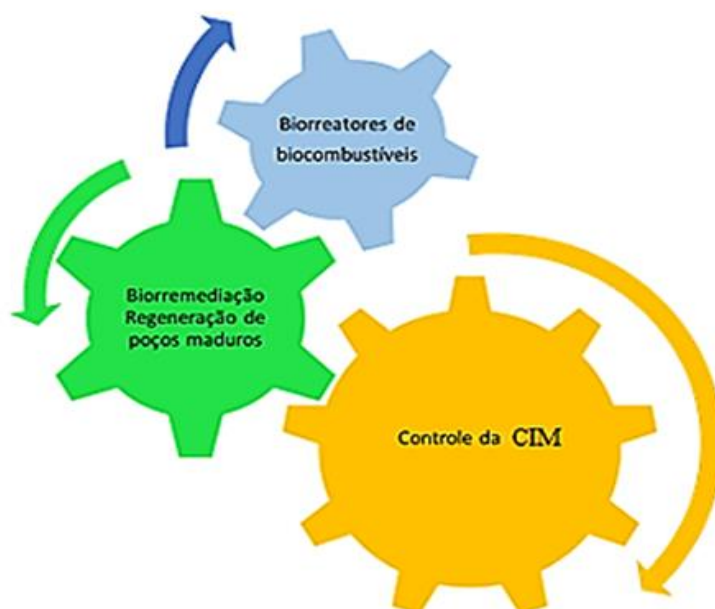
O NMP é o método mais utilizado na análise quantitativa de bactérias anaeróbias. Na PETROBRAS, as concentrações de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS) e Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais (BANHT) presentes em amostras de água de injeção, água produzida, resíduos de corrosão, entre outras amostras, são obtidas por esta técnica [...] estima a densidade da população de microrganismos em tubos (McCrary, 1915), sem a necessidade de contagem direta (Alexander, 1982), consistindo em várias etapas de bancada, tais quais: diluições sucessivas, amostragens de cada diluição, incubação em meios apropriados, avaliação do crescimento (PETROBRÁS/CENPES/PDEDS/BTA, 2008,p.1-4).

Os resultados pelo método NMP são difíceis de interpretar e são liberados em torno de 28 dias, sendo, portanto, tardios. Esta condição promove a aplicação de biocidas inespecíficos e ineficazes para a prevenção da CIM (GROPOSO, MIGUELETI, *et al.*, 2014), portanto sem eficiência comprovada (PENNA, 2014).

Consequentemente, as buscas por novos métodos de análise microbiológica têm sido levadas em consideração para redução de custos, tempo em análise e resultados falso negativos, a fim de obter melhores respostas para o controle da CIM. Para a indústria do Petróleo e Gás esta pesquisa envolve-se com *upstream* (exploração e produção).

A pesquisa de aplicação do método por EEL para identificação de BRSé de elevado potencial científico, devido à inserção em todos os ramos acima relacionados e à aplicabilidade da tecnologia na vida real, contribuindo em muito ao contemplar as vantagens mencionadas (ver figura 2).

Figura - 2 Diagrama de Relação entre os Ramos de Monitoramento de Bactérias



Fonte: O autor (2016).

Legenda: Amarelo: maior emprego da bacteriologia na indústria do petróleo

Verde: segundo maior emprego

Azul: terceiro emprego

Sob o ponto de vista computacional, a classificação de objetos, a que se destinam os resultados deste trabalho, permitirá analisar os dados visando sua aplicação em visão computacional, consistindo em uma etapa crítica, que envolve no âmbito do PDI, a aquisição da imagem, o pré-processamento, extração de características. Gonzalez (2010) entende que a classificação bem-sucedida dos

dados extraídos da imagem depende das decisões assertivas nas etapas que antecedem à classificação como o pré-processamento da imagem e a aplicação do método adequado de extração de fatores.

Neste sentido, a aplicação dos polinômios de Zernike em processamento digital de imagens apresenta vantagens em relação aos demais modelos de descrição de objetos. Uma vez aplicados ao processamento digital de imagens, caracterizam-se pela baixa complexidade computacional, baixa sensibilidade ao ruído, boa precisão de recuperação e maior quantidade de informações em finsos detalhes da imagem, comumente utilizados para resultados em tempo real (BAYRAKTAR, 2006; TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011), funcionam bem para a compressão de imagens e descrição em casos de necessária invariância à rotação, apresentando baixo custo computacional. São frequentemente utilizados para variadas aplicações, dentre as quais, detecção de bordas, como um conjunto de fatores em reconhecimento de padrões, recuperação das formas de imagens (HWANG e WHOI-YUL, 2006), a exemplo da aplicação em extração de forma e contorno de nódulos malignos e benignos (TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011).

1.5 LIMITES E LIMITAÇÕES

No âmbito da física óptica, este trabalho limita-se a montar um sistema óptico EEL não automatizado, que permita a incidência de um laser óptico de comprimento de onda conhecido e definido sobre a colônia de bactéria, de modo a gerar um diagrama de difração que possa ser fotografado. Algumas limitações tornaram a análise mais trabalhosa e com menor qualidade da imagem, tais quais:

- a) demanda de aquisição de materiais ópticos mais adequados, como lentes apropriadas;
- b) melhoramento no processo de captura da imagem como necessária atenuação do laser incidente;
- c) localização manual das colônias na placa de Petri o que implicou limitação para trabalhar com número maior de colônias;

d) a luminosidade do ambiente, o que foi corrigido com a fabricação de uma caixa preta;

e) limitação óptica do sistema para focalização das colônias que produziam diagramas de difração com diâmetros elevados, aumentando a distância focal;

f) as imagens fotografadas de frente do diagrama de dispersão em anteparo, elevando os ruídos;

Ressalta-se que estas limitações não foram impeditivas do trabalho, visto que para o estudo da viabilidade, essas condições poderiam ser limitantes para se atingir resultados positivos, mas não negativos. Pois, partiu-se do pressuposto de que uma vez viável nessas condições, havendo o progresso e aperfeiçoamento futuros do sistema, as variáveis do sistema seriam melhor ainda controladas.

No âmbito da microbiologia, este trabalho limita-se a analisar bactérias do grupo das BRS provenientes de água de produção de reservatórios de petróleo. Ainda que, inicialmente, não seja conhecida a espécie. Esta decisão foi admitida perante a dificuldade em aquisição de cepas padrões de espécies de maior relevância e predominância neste habitat, como as do gênero *desulfovibrios* e *Desulfotomaculum*, e principalmente, pela necessidade de um laboratório de microbiologia devidamente equipado para desenvolvimento das etapas de isolamento e cultivo de bactérias anaeróbias. A forma encontrada para superar esta limitação foi realizar uma parceria de pesquisa externa para realização das etapas de cultivo.

No âmbito da modelagem computacional, o trabalho limita-se na etapa de extração de dados da imagem, mais precisamente, em extrair os dados da imagem aplicando os polinômios invariantes de Zernike. A limitação principal parte do desafio do conhecimento técnico em torno de processamento digital de imagens e utilização da ferramenta Matlab para esta finalidade.

A estratégia adotada foi o estudo auto didático por meio de recursos multimídia (tutoriais MathWorks, Verduca, Coursera), referência bibliográfica e ainda, utilização de software preexistente para aplicação dos polinômios de Zernike em processamento digital de imagens.

1.6 ASPECTOS E QUESTÕES METODOLÓGICOS

1.6.1 Do diâmetro do laser versus diâmetro da colônia

Colônias bacterianas são formadas por milhões de bactérias estruturadas empacotadas em uma matriz ou meio de cultivo, incorporando materiais extracelulares que variam a estrutura geométrica das colônias. Trabalhos iniciais sobre modelos biofísicos de colônias de bactérias analisadas segundo a teoria de difração escalar para previsão do padrão para frente de dispersão avaliaram a interferência das características morfológicas das colônias na formação de diagramas padrões de dispersão, concluindo que ao menos dois parâmetros morfológicos são críticos e, portanto, devem ser monitorados: a espessura do centro da colônia e o diâmetro da colônia (BAE; BAI, 2010). Assim, deve-se observar o alinhamento do centro do laser com o centro da colônia considerando que o diâmetro do laser não deve ultrapassar ou retroagir ao diâmetro da colônia. Em geral, os estudos realizados partiram de diâmetro do raio laser de 635nm em torno de 1mm para análise de colônias com diâmetros variando em torno de 1 a 2 mm (BAE, 2007, 2008,2010, 2016). A técnica mais adotada para o controle do diâmetro da colônia foi o monitoramento do tempo de cultivo (BAE, 2007, 2008), verificando-se que o tamanho do diâmetro da colônia aumenta com o tempo, em mesmas condições ambientais, inclusive, de demanda nutricional do meio.

Neste sentido, um dos problemas é o de alcançar um tamanho de colônia que permita a dispersão de frente de onda quando iluminada por um laser de 635nm de 4mm de diâmetro. Então, considerando a dificuldade em isolamento das BRS e controle da etapa de incubação seria possível observar o diâmetro mínimo entre 0,5-2 mm necessários para a difração?

Assim, para capturar imagens de dispersão de frente de onda para este grupo de bactérias precisava-se, antemão, superar os limites técnicos solucionando essas dúvidas.

1.6.2 Da aquisição de imagens

A análise de componentes da imagem em visão computacional requer a compressão da imagem que normalmente ocorre por dois caminhos: a escolha de parâmetros mais relevantes em detrimento dos menos importantes ou a junção de parâmetros para formação de um novo fator de medição (BAYRAKTAR, 2006).

A visão computacional permite a análise mais refinada ou minuciosa da imagem ao conseguir avaliar detalhes dos dados de imagem imperceptíveis a olho nu. (TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011). Nesta mão, os instrumentos ópticos de medição propiciam a melhor observação de um objeto ou analito por mecanismos físicos de decomposição da luz (refração, difração, reflexão e absorção) transformando em informação nas formas de sinais ou imagens.

Neste projeto, as informações processadas são imagens de diagramas de difração geradas por um sistema óptico de medição a laser. Uma vez geradas as imagens, estas podem ser processada por softwares específicos para compressão da imagem e extração de fatores. Para tanto, as imagens capturadas devem caracterizar ao máximo o objeto para que mais detalhes de conteúdo sejam gerados (TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011).

Contudo, não somente a quantidade de sinais, mas especialmente, a qualidade do sinal deve ser atingida. Imagens em que os maiores números de sinais são provenientes de ruídos durante formação da imagem, por exemplo, podem gerar dados insuficientes para o processamento digital de imagens, reduzindo em muito, a eficácia da visão computacional, ainda que esses ruídos possam ser retirados por meio de filtros de processamento de imagens e técnicas de pré-processamento digital de imagens. Logo, a qualidade da imagem gerada a partir de instrumento óptico de medição consta da conjunção entre os controles de qualidade do sistema do instrumento de medição óptica (técnica de escolha, aparatos ópticos, controle das variáveis), o sensor óptico de captura da imagem (câmera fotográfica) e o processamento digital de imagens como processamento do histograma e aplicação de filtros.

Por outro lado, a aplicação de processamento digital de imagens para reconhecimento de padrões e análise de objetos, requer que a técnica de extração seja invariante aos movimentos de rotações, translação e alterações na escala

(GONZALEZ e WOODS, 2010; TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011), comuns durante o processo de captura das imagens em vários ângulos de medida. Neste caso em estudo, durante o processo de localização e centralização das colônias deve-se levar em consideração que as mesmas estão posicionadas em vários pontos do meio de cultivo em placa de Petri, de tal maneira que, faz-se necessário rotacionar a placa e movimenta-la em um eixo (x, y). Assim, as variáveis de rotação estão presentes nas imagens geradas da difração de frente de onda.

Mediante as condições do sistema de medição física por EEL construído em laboratório, questiona-se sobre a possibilidade de gerar padrões de difração que contenham dados de relevância para o processamento digital de imagens para visão computacional.

Ainda, qual técnica de compressão de imagens será a melhor para representar os padrões de difração obtidos considerando que as extrações de características não poderão variar com rotação?

Finalmente, para responder aos questionamentos foram realizados vários experimentos que serão discutidos a posteriori, norteados pela problemática que é responder em até que ponto é viável a aplicação da técnica de difração da frente de onda de laser óptico (EEL) para identificação de bactérias redutoras de sulfato provenientes de cultivos de fluidos de reservatório petrolífero.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A MICROBIOLOGIA DO PETRÓLEO

A microbiologia está presente na indústria do petróleo e biocombustíveis desde a origem com a produção de hidrocarbonetos e gás a exemplo do metano até o armazenamento e transporte do produto final, abrangendo as etapas de produção. Mesmo que seja secular a evidência da presença de bactérias na produção de óleos utilizados para produção de energia, ainda é recente a identificação desses micro-organismos haja visto a diversidade de espécies de bactérias e dos hidrocarbonetos envolvidos. Segundo *Kenneth, et al., 2010*, os mecanismos bioquímicos de produção de hidrocarbonetos por micro-organismos ainda são pouco conhecidos e é complexo por envolver consórcios de bactérias.

O primeiro estudo sobre a ecologia microbiana de águas de produção de reservatórios de petróleo data de 1926 por Edson S. Bastin e colaboradores que concluíram ser os campos petrolíferos ambientes comuns para as bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Ollivier et al., 2005), mas somente teve a primeira cepa isolada por Beijerinck em 1985 batizada pelo pesquisador de *Spirillum desulfuricans* (POSTGATE, 1979).

Os micro-organismos estão distribuídos dentro e fora da superfície terrestre. Os principais ecossistemas microbianos são os aquáticos (oceanos, lagoas, lagos, riachos, gelo, fontes termais) e os terrestres (solos superficiais, sedimentos profundos) (MADIGAN, MARTINKO, et al., 2016), em que fazem parte os fluidos de reservatórios de petróleo, águas de produção e óleo cru. Muitos deles estão adaptados a ambientes aparentemente de condições inóspitas como na biosfera continental, onde há verdadeiros ecossistemas geologicamente isolados com características físico-química e geológicas diversas e temperaturas elevadas de 50-120°C. Procariontes termofílicos subterrâneos são comuns nesse habitat e estão entre aqueles capazes de reduzir sulfato e ferro, em que mais da metade populacional pertence ao filo *Firmicutes* (SLOBODKIN e SLOBODKINA, 2014).

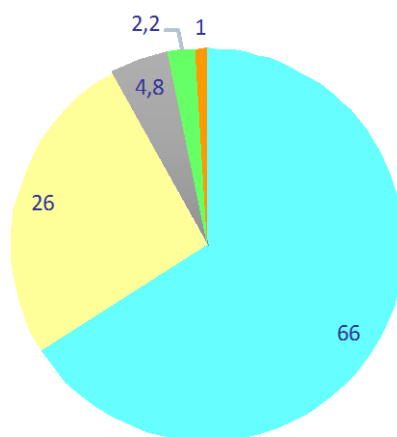
BRS formam a principal base microbiana nos ambientes com ausência de oxigênio (anóxico) ricos em sulfato. Essa condição aplica-se aos sedimentos

marinhos, visto que as concentrações de sulfatos nas águas oceânicas são iguais ou superiores a 30mM (BARTON e HAMILTON, 2007). Algumas espécies também são isoladas de águas superficiais, como lagos de água doce com baixa concentração de sulfato (1mM) por meio da re-oxidação de H₂S (convertendo-o em SO₄²⁻ ou S₀ para tanto realizam comensalismo com bactérias quimiolitotróficas oxidantes e fotolitotróficas (BARTON e HAMILTON, 2007 apud Holmer and Storkholm, 2001).

Os sedimentos marinhos profundos são caracterizados por um baixo teor de carbono orgânico e contagem de células totais de <10⁷ células por ml de sedimento. Estudos recentes que analisaram a predominância de micro-organismos na profundidade subterrânea nesse ecossistema, revelou quantidades semelhantes de *Archaea* e *Bacterias* presentes em menor profundidade e prevalência de *Bactérias* em parte mais baixa do sedimento, em direção ao núcleo terrestre, em profundidade máxima de 50 metros abaixo do fundo do mar. Entre as bactérias um elevado número de replicações de genes foi identificado para bactérias redutoras de sulfato (BREUKER, STADLER e SCHIPPERS, 2013).

As bactérias e arqueias desempenham papel fundamental em sedimentos marinhos, como a oxidação de matéria orgânica, produção de metano e hidrocarbonetos e remoção de sulfato do oceano, este último especialmente, pelas BRS. KALLMEYER, POCKALNY, *et al.*, 2012 estimou por estudos de correlação a distribuição global geográfica (figura 3) de micro-organismos na subsuperfície sedimentar em $2,9 * 10^{29}$ células e considerou a variação da distribuição nos locais da concentração fortemente correlacionada com a taxa média de sedimentação e distância da Terra.

Figura 3 - Distribuição de bactérias e arqueas na superfície e subsuperfície da terra



Fonte: Modificado de Madigan (2016) apud William Whitman (2007).

Legenda: ■ Subsuperfície marinha

■ Subsuperfície terrestre

■ Solo superficial

■ Oceanos

■ Demais habitats

Os valores estão representados em termos de percentuais da distribuição por área

Os reservatórios de petróleo são considerados ambientes geológicos de elevada profundidade, de constituição físico-química heterogênea e ecossistema anaeróbico que oferece nutrientes para o crescimento e sobrevivência de populações bacterianas nas condições diversas de temperatura e pressão (OLLIVIER, 2005). Entre o período de 1988 a 2004 foram identificadas em amostras de fluidos de reservatório, óleo e água por meio do método independente de cultura baseado na análise dos genes 16s rRNA, a presença dos gêneros *Desulfacinum*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfobubus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Thermodesulfobacterium* (OLLIVIER, 2005).

No ambiente do petróleo existem procariontes que resistem às elevadas temperaturas, como as termófilas a ex. das espécies do gênero *Thermodesulfovibrio*, à elevada salinidade e ao ambiente anóxico. Dentre os quais estão as bactérias redutoras de sulfato.

2.1.1 Bactérias redutoras de sulfato (BRS)

2.1.1.1 Morfologia, Classificação e Fisiologia

Os procariotos têm diâmetros celulares variáveis entre 0,2 a 700 µm (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016).

A morfologia das BRS é bastante variada. Geralmente apresentam morfologia dos tipos: circular ou esférica, oval, vibrio ou filamentosa. Espécies do gênero *Desulfovibrio* são semelhantes a bastonetes e possuem filamento único que facilita a movimentação em ambientes aquáticos. Outras, dos gêneros *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacterium*, *Desulfosarcina* são de forma oval. *Desulfococcus* e as espécies do gênero *Archaeoglobus* (*Euryarchaeota*) são esféricas, em formato de cocos. *Desulfobacter* podem apresentar-se oval ou vibrio. *Desulfonema* tem morfologia multicelular. *Desulfotomaculum* podem ser retas ou curvadas (*tomaculum* deriva de salsicha). Enquanto que *Desulfomonile* e *Thermodesulfobacterium* têm formas de bastão (bastonetes) (OLLIVIER, 2005).

As BRS são procariotos que se localizam nos domínios, Eubactérias e Archaea. Neste último somente fazem parte o gênero *Archaeoglobus* (KAKSOMEN, 2004). O domínio Eubactérias são os procariontes bactérias propriamente ditas. Enquanto que Archaea são procariontes com relações evolucionárias ou filogenéticas distintas das bactérias.

Segundo a classificação obtida do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology são pertencentes ao filo das mesófilas *Delta-proteobactérias*, com os gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacter* e *Desulfobulbus*, o gênero das bactérias termofílicas Gram-negativas, *Thermodesulfovibrio* (BARTON e HAMILTON, 2007; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Mas, de acordo com a

classificação baseada no polimorfismo do 16SRNAr (KAKSONEN, 2004) também são encontradas dentro das filogenias *Firmicutes* exemplo das espécies Gram-positivas do gênero *Desulfotomaculum*, *Thermodesulfobacteria*, *Nitrospiras*, *Euryarchaeota* e seu único gênero *Archaeoglobus* (Castro et.al, 2000). Ressalta-se no filo *Nitrospira* os *Thermodesulfovibrio* e a linhagem mais recentemente descoberta, *Thermodesulfobiaceae* (Mori et al.,2003). Ver tab. (1)

Tabela 1 - Principais características distintivas de *bacteria* e *archaea*.

Características Morfológicas	Bactéria	Archaea
Estrutura celular procariótica	Sim	Sim
Parede celular	Presença de peptideogliano	Sem peptideogliano
Lípídeos de membrana	Ligações éster	Ligações éster
Núcleo envolto por membrana	Ausente	Ausente
Movimento dos flagelos	Rotacional	Rotacional
Sensibilidade acloranfenicol, estreptomicina, canamicinae penicilina	Sim	Não
Estruturas fisiológicas		
Redução dissimilativa de S ⁰ , SO ₄ ²⁻ , H ₂ S, Fe ³⁺ , Fe ²⁺	Sim	Sim
Nitrificação	Sim	Sim
Fotossíntese	Sim	Não
Desnitrificação	Sim	Sim
Fixação de nitrogênio	Sim	Sim
Metabolismo energético baseado em rodopsina	Sim	Sim
Quimiolitotrofia (Fe ₂₊ , NH ₃ , S ⁰ , H ₂)	Sim	Sim
Endósporos	Sim	Não
Vesículas de gás	Sim	Sim
Síntese de grânulos de armazenamento de carbono, compostos por poli-b-hidroxialcanoatos	Sim	Sim
Crescimento acima de 70°C	Sim	Sim
Crescimento acima de 100°C	Não	Sim

Fonte: Modificada de Madigan (2016).

Conforme Ollivier (2005, p.35), tradução nossa, sobre a importância desses micro-organismos, afirma:“eles desempenham um papel importante no ciclo mundial do enxofre e em sedimentos marinhos que podem representar até 50% do processo total de mineralização do carbono”.

Na microbiologia do petróleo as BRS podem ser consideradas indígenas aos ambientes do reservatório ou gerados na água de formação ou contaminantes de aparatos de perfuração (ex. instalações, junções, dutos) nas formas de biofilmes microbianos ou ainda, carregadas pelas águas de reinjeção (MBADINGA, 2011; OLLIVIER, 2005). Os ambientes salinos como oceanos e mesmo hipersalinos como lagos anóxicos possuem concentração de sulfato suficientes para a vida das BRS. O gênero *Archaeoglobus* estão presentes nos ambientes hidrotermais e subsuperfície de reservatórios de petróleo (OLLIVIER, 2005).

As espécies mais comumente isoladas de águas de produção e óleo cru são aquelas pertencentes aos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfacinum*, *Desulfobacterium*, *Thermodesulfobacterium* (Ollivier et al. 2005; Vigneron et al, 2016; Zhang et al. 2012) e os membros da família *Desulfobacteraceae* (MBADINGA, 2011).

A população de BRS é de filogenia heterogênea e crescem nos meios ambientes marinho e terrestre, primordialmente anóxicos e ricos em sulfato (SO_4^{2-}). O habitat rico em íons sulfato propicia o metabolismo anaeróbico em que realizam a sua redução em sulfetos produzindo sulfetos biogênicos, bissulfetos, gás sulfídrico (H_2S), além de metabólitos intermediários e auxiliares da corrosão anaeróbica do ferro (MADIGAN;VIGNERON, 2016; OLLIVIER, 2005; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Esta população de um grupo de micro-organismos procariontes primordialmente anaeróbios estritos ou obrigatórios, sendo que alguns destes procariontes podem ser tolerantes ao oxigênio. A espécie *Desulfovibrio Oxyclinae* em condições de microaerofilia pode crescer utilizando O_2 como acceptor de elétrons” (MADIGAN, MARTINKO, et al., 2016). São também quimiolitotróficas ao utilizarem o metabolismo da oxirredução para obtenção da energia.

O domínio delta-proteobactérias abriga o maior número de gêneros das BRS. Neste domínio, a ordem *Desulfovibrionales* é “responsável pela liberação de milhões de toneladas de H_2S na atmosfera a cada ano” (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012, p. 312). Neste grupo faz parte o gênero *Desulfovibrio*, da família *Desulfobrionaceae* (KAKSONEN, 2004). Logo, é possível inferir que a presença desses procariontes no sistema produtivo de petróleo e gás é fator de risco para o aumento de produção de gás sulfídrico.

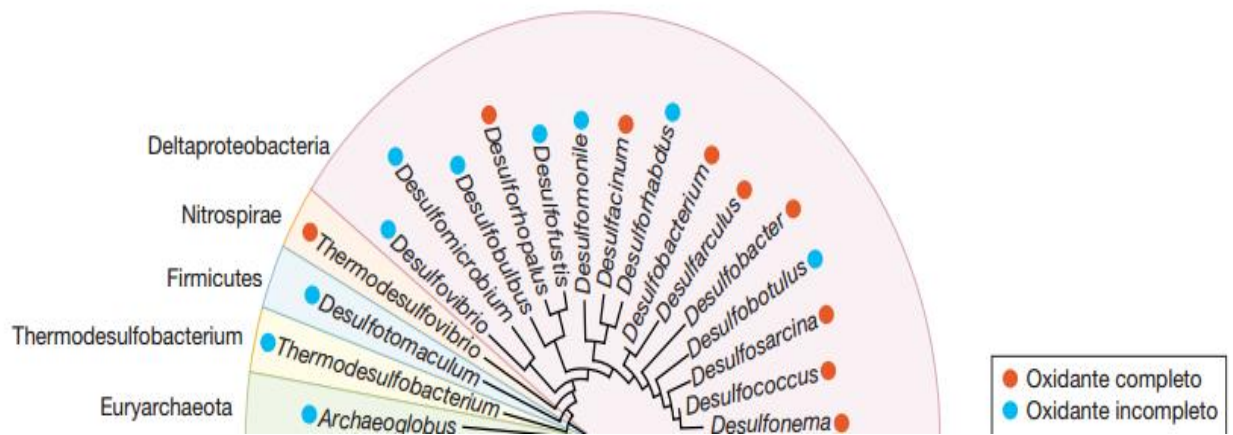
Embora algumas espécies possam realizar respiração aeróbia, o crescimento populacional somente ocorre em ambiente estritamente anóxico, com ausência ou quase ausência de oxigênio. (BARTON e HAMILTON, 2007)

As BRS fazem parte da diversidade bacteriana no ciclo do enxofre capazes de realizar o metabolismo dissimilativo do enxofre (POSTGATE, 1965). Conservam energia por meio da redução de compostos sulfurados, decompondo a forma mais oxidada do enxofre (SO_4^{2-} , estado de oxidação +6) em sua forma mais reduzida, o sulfeto de hidrogênio ou ácido sulfídrico ou gás sulfídrico (H_2S , estado de oxidação -2). Por isso são também classificadas como **bactérias dissimilativas redutoras de sulfato** (grifo nosso) (figura 4) (BARTON e HAMILTON, 2007; MADIGAN, 2016; POSTGATE, 1965).

A fisiologia desses organismos estabelece que compostos químicos orgânicos como piruvato, lactato e álcoois de cadeia curta (etanol, propanol e butanol) e inorgânicos como hidrogênio (H_2) e hidrocarbonetos que compõem uma ampla variedade de substratos são utilizados como doadores de elétrons (MBADINGA, 2011; MADIGAN, 2016). Algumas espécies crescem de formas quimiolitotróficas e autotrófica, utilizando o CO_2 como única fonte de carbono e os respectivos H_2 e SO_4^{2-} como agente redutor e agente oxidante. (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016). Essas espécies também são denominadas de **mitoxotróficos** (grifo nosso) (MADIGAN, 2016), devido à dependência da matéria orgânica para obtenção de energia.

Os redutores dissimilativos de sulfato (figura 4 e tabela 2) subdividem-se em duas categorias: oxidantes completos e os oxidantes incompletos. Os primeiros são capazes de oxidar acetato e ácidos graxos completamente a CO_2 , dentre os quais estão os gêneros *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema*. Os segundos não oxidam o acetato a CO_2 , ao qual fazem parte um dos gêneros de BRS mais pesquisados na microbiologia e biomonitorados na indústria do Petróleo e Gás, devido principalmente à sua abundância na formação dos biofilmes, as *Desulfovibrio* (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016). Adicionando-se às *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum* e *Desulfobulbus*.

Figura 4 - Dendograma dos redutores dissimilativos de sulfato.



Fonte: Madigan, Martinko, et al. (2016).

O dendrograma retrata as relações filogenéticas entre alguns gêneros de redutores de sulfato, como inferido por análise da sequência do gene 16S de seu RNA ribossomal. O sombreamento colorido diferencia cada um dos cinco principais filos que contêm gêneros de redutores de sulfato. Os círculos coloridos indicam se a espécie é um oxidante completo, capaz de oxidar acetato a CO_2 , ou um oxidante incompleto, incapaz de oxidar o acetato.

Tabela 2 - Filogenia dos procariontes redutores de sulfato

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero		
<i>Proteobacteria</i>	<i>δ-Proteobacteria</i>	<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio</i>		
			<i>Desulfomicrobiaceae</i>	<i>Desulfomicrobium</i>		
			<i>Desulfohalobiaceae</i>	<i>Desulfohalobium</i>		
						<i>Desulfonatronovibrio</i>
						<i>Desulfonauticus</i>
						<i>Desulfothermus</i>
				<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfobacter</i>
						<i>Desulfobacterium</i>
						<i>Desulfobacula</i>
						<i>Desulfobotulus</i>
						<i>Desulfocella</i>
						<i>Desulfococcus</i>
						<i>Desulfofaba</i>
						<i>Desulfofrigus</i>
						<i>Desulfomusa</i>
						<i>Desulfonema</i>
						<i>Desulforegula</i>
						<i>Desulfosarcina</i>
						<i>Desulfospira</i>
		<i>Desulfotignum</i>				
			<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfobulbus</i>		
				<i>Desulfocapsa</i>		
				<i>Desulfofustis</i>		
				<i>Desulforhopalus</i>		
				<i>Desulfotalea</i>		
		<i>Desulfarcales</i>	<i>Desulfoarculaceae</i>	<i>Desulfoarculus</i>		
		<i>Syntrophobacterales</i>	<i>Syntrophobacteraceae</i>	<i>Desulfacinum</i>		
				<i>Desulforhabdus</i>		
				<i>Desulfovirga</i>		
				<i>Thermodesulforhabdus</i>		
			<i>Syntrophaceae</i>	<i>Desulfobacca</i>		
				<i>Desulfomonile</i>		
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Peptococcaceae</i>	<i>Desulfonispota</i>		
				<i>Desulfosporosinus</i>		
				<i>Desulfotomaculum</i>		
<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Thermodesulfobacteriales</i>	<i>Thermodesulfobacteriaceae</i>	<i>Thermodesulfobacterium</i>		
				<i>Thermodesulfatator</i>		
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Thermodesulfovibrio</i>		
<i>Unclassified</i>	<i>Unclassified</i>	<i>Unclassified</i>	<i>Thermodesulfobiaceae</i>	<i>Thermodesulfobium</i>		
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Archaeoglobi</i>	<i>Achaeoglobales</i>	<i>Archaeoglobaceae</i>	<i>Archaeoglobus</i>		

Fonte: Adaptada de Kaksomen (2004)

2.1.1.2 Metabolismo e Termodinâmica Microbianos

As BRS são micro-organismos que realizam a respiração anaeróbia, uma vez que utilizam outros aceptores de elétrons em lugar do oxigênio. Mas, possuem sistemas respiratórios similares aos aeróbios, pois possuem um complexo sistema de transporte de elétrons contendo citocromos, quinonas, proteínas de ferro e enxofre, e proteínas típicas transportadoras de elétrons (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016).

Realizam a respiração anaeróbia pelo mecanismo da redução dissimilativa em que o composto inorgânico SO_4^{2-} é reduzido como fonte de enxofre, o produto final é principalmente, o radical sulfidril ($_{-}\text{SH}$) (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016). O ambiente para proliferação das BRS deve ser anóxico, tendo em vista que o mecanismo de redução dissimilativo é inibido na presença oxigênio (BARTON e HAMILTON, 2007).

Diversamente da redução assimilativa, o consumo do íon SO_4^{2-} ocorre em larga escala e uma vez reduzido, o produto final H_2S é excretado para o meio ambiente, não sendo, portanto, assimilado para biossíntese (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016). Consequentemente, a formação do produto final primário (H_2S) se dá em larga escala.

Outra característica é a versatilidade das BRS em seus mecanismos de sobrevivência e proliferação. Isso porque, utilizam uma diversidade de compostos orgânicos e inorgânicos como doadores de elétrons ver tabela (3).

O uso de inorgânicos para o metabolismo deve satisfazer a condição de que o potencial redutor (E_0) do seu par redox (o doador de elétrons) seja mais eletronegativo que o par receptor de elétrons na respiração anaeróbia. (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016), ver tabela 3.

O metabolismo deste grupo bacteriano ocorre de forma facilitada por reação catalítica, pois diante da maior eletropositividade do íon SO_4^{2-} (-217mV) em relação ao íon HS^- (-200mV), o auxílio de proteínas transportadoras de elétrons torna a redução do sulfato possível (BARTON e HAMILTON, 2007).

Tabela 3 - Compostos sulfurados e doadores de elétrons na redução de sulfato

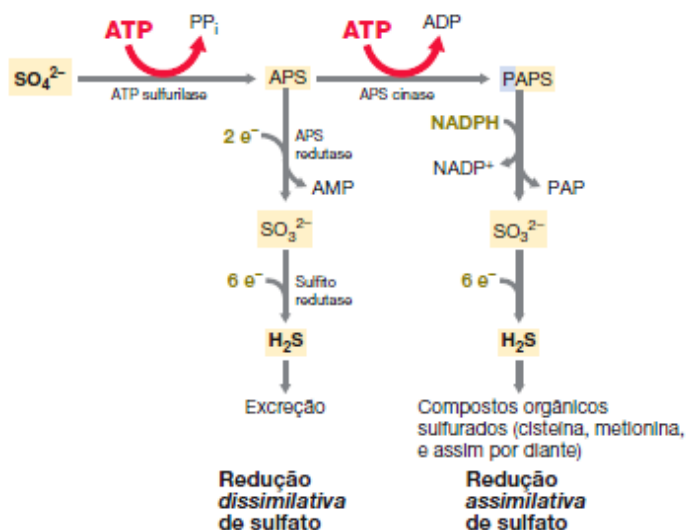
Compostos sulfurados e doadores de elétrons na redução de sulfato	
Composto	Estado de oxidação por átomo de S
<i>Estados de oxidação de importantes compostos sulfurados</i>	
S orgânico (R-SH)	-2
Sulfeto (H ₂ S)	-2
Enxofre elementar (S ⁰)	0
Tiosulfato (-S ₂ -O ₃ ²⁻)	+2/+6
Dióxido de enxofre (SO ₂)	+4
Sulfito (SO ₃ ²⁻)	+4
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	+6
<i>Alguns doadores de elétrons utilizados na redução de sulfato</i>	
H ₂	Acetato
Lactato	Propionato
Piruvato	Butirato
Etanol e outros alcoóis	Ácidos graxos de cadeia longa
Fumarato	Benzoato
Malato	Indol
Colina	Vários hidrocarbonetos

Fonte: Adaptada de MADIGAN, MARTINKO, et al. (2016)

Indica os compostos orgânicos e inorgânicos que funcionam como aceptores e doadores de elétrons na respiração anaeróbia das BRS e metabolismo dissimilativo.

A bioquímica de redução do SO₄²⁻ ocorre mediante a ativação catalítica da ligação do íon sulfato a um fosfato do ATP por intermédio da enzima ATP sulfurilase. (BARTON e HAMILTON, 2007; MADIGAN, 2016) Duas formas de sulfato ativo podem ser geradas, adenosina fosfosulfato (APS redutase ou APS, *adenosinephosphosulfate*) ou fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS). A APS redutase é doadora de elétrons ao íon sulfato, (NOX S = +6), reduzindo-o ao intermediário, SO₃²⁻ (NOX S = +4) (MADIGAN, 2016). Desta maneira, o potencial eletronegativo eleva de E₀ = - 0,52 V (SO₄²⁻) para quase 0,00 V (SO₃²⁻), possibilitando que o NADH (E₀ = -0,32 V) possa transferir elétrons para o íon sulfato (SO₃²⁻). (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016). Logo, o íon sulfato é reduzido à forma de H₂S (NOX S = -2). Esse mecanismo é promovido pela oxidação de compostos que é fonte de energia para a redução de sulfatos a sulfetos. Na figura (5) é possível visualizar o diagrama de metabolismo bacteriano por redução do sulfato.

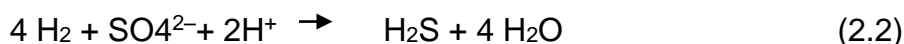
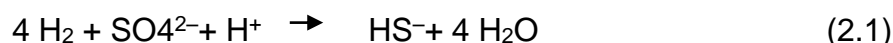
Figura 5 - Diagrama Metabólico



Fonte: Adaptada de Madigan (2016)

Bioquímica da redução de sulfato: sulfato ativado. Esquemas das reduções assimilativas e dissimilativas do sulfato. As BRS realizam o primeiro metabolismo.

Os doadores de elétrons mais largamente usados pelas BRS são H_2 , lactato e piruvato. Conforme a reação geral descrita utilizando substrato oH_2 (Thauer and Badziong, 1980 apud Ollivier, 2005).



Dentre os compostos orgânicos mais utilizados como substratos no reservatório de petróleo, estão os ácidos graxos. Os ácidos graxos voláteis (AGV) são os doadores de elétrons mais comumente usados por BRS em campos de petróleo (HASEGAWA, 2014 apud Handa et al. 2010) AGV. Na água de campo de petróleo são produzidos pela degradação microbiana dos componentes de petróleo bruto ou óleo cru (OLLIVIER, 2005). Ácidos graxos podem ser degradados por bactérias dos filos *Deltaproteobacteria* e *Firmicutes* (HASEGAWA, 2014; OLLIVIER, 2005). As vias metabólicas de anaerobiose por dissimilação do sulfato acarretam a acidificação do óleo.

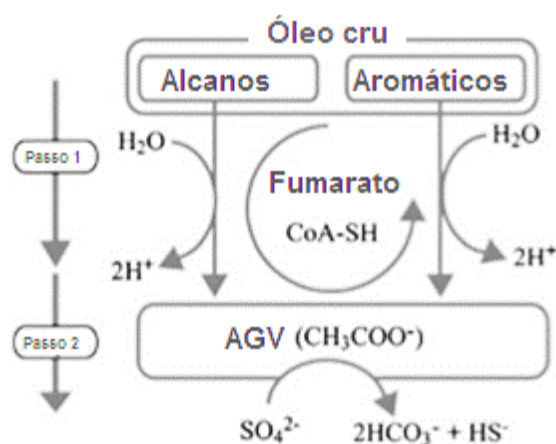
Os compostos aromáticos e alcanos presentes no petróleo são nutrientes amplamente degradados durante a respiração anaeróbia. Desde os trabalhos de

Aeckersberg et al., 1991 foi possível a constatação empírica da degradação de n-alcanos por BRS, ratificando a condição hipotética até então predominante. BRS mesofílicas membros dos gêneros *Desulfococcus*, *Desulfatibacillum*, *Desulfococcusoleovorans*, *Desulfatibacillum alkenivorans*, *Desulfosarcina* e principalmente da família *Desulfobacteraceae* foram vinculadas às degradações de diversos alcanos (propano, butano, n-decano, p-xileno) (MBADINGA, 2011)

Recentemente, Hasegawa (2014), investigou a conversão biológica de componentes de petróleo bruto em condições anaeróbicas para identificar os componentes químicos e micro-organismos envolvidos na acidificação anaeróbia em reservatórios de petróleo. Ao analisar os micro-organismos na água de campo de petróleo em Akita, Japão, concluiu-se que compostos aromáticos como tolueno e etilbenzeno são degradados pelo gênero *Desulfotignum* (uma deltaproteobactéria redutora de sulfato) por duas vias metabólicas, a via adição fumarato e não somente, a via dos ácidos graxos aromáticos voláteis (AGVs-VFAs *volatile fatty acids*), representados na figura (6). Reação de redução de sulfato a partir da degradação do tolueno (HASEGAWA, TOYAMA, *et al.*, 2014):



Figura 6 - Vias metabólicas para acidificação biogênica anaeróbicas do petróleo



Fonte: Adaptada de Hasegawa (2014).

Possíveis vias metabólicas para produção de acidificação biogênica de petróleo em condições anaeróbicas.

A investigação sobre os mecanismos e fatores da biodegradação de alcanos em ambientes anóxicos, como o reservatório de petróleo, especialmente promovidos

pelas BRS, é fundamental para os controles da biodegradação de óleo em poço profundo em reservatórios de subsuperfície e da biorremediação em áreas contaminadas por vazamentos de óleo e efeitos maléficos, como a CIM.

2.1.1.3 *Biofilme*

Na natureza as BRS coexistem com micro-organismos que utilizam doadores e receptores de elétrons diferentes daqueles consumidos pelas BRS ou competem com outras BRS por nutrientes. A vida simultânea com bactérias comensais é frequente quando estas catabolizam produtos finais que são substratos que, por sua vez, servem como doadores de elétrons para as BRS, especialmente na quimiolitotrofia de H₂ (BARTON e HAMILTON, 2007). Nesse modo de vida, os benefícios são mutualmente compartilhados e os mecanismos de difusão de receptores e doadores de elétrons são, portanto, facilitados.

Os biofilmes são comunidades bacterianas que crescem fixadas (vida sésil) em uma superfície e envoltas por uma matriz adesiva excretada pelas células e agregados celulares. A matriz autoproduzida é composta por substâncias extracelulares poliméricas hidratadas (SPE). (FLEMMING e WINGENDER, 2010). Nessa arquitetura estrutural há canais que funcionam para a circulação de água e outros compostos. (MOISSAN, CURIE e GRIGNARD, 2006).

Os polissacarídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos e ribonucleicos, proteínas e lipídeos são os principais SPEs. Exercem funções de estabilização mecânica, mediação à adesão às superfícies, conformação tridimensional e coesão da rede polimérica, e ligação e imobilização transiente de células (FLEMMING e WINGENDER, 2010).

As comunidades bacterianas que constituem o biofilme podem ser de uma única, duas ou mais espécies de tipos diferentes. Grupos como bactérias aeróbias e anaeróbias, bactérias produtoras de ácidos, BRS, ferrobactérias, fungos e microalgas formam verdadeiros consórcios aderidos a superfície, veiculados por sistemas aquosos (MADIGAN, 2016; MOISSAN, CURIE e GRIGNARD, 2006).

As superfícies são importantes habitats que ofertam maior quantidade de nutrientes e maior segurança contra agentes biológicos, físicos e químicos externos.

O transporte de nutrientes para a superfície é aumentado para os organismos em biofilme em relação à disponibilidade para as células planctônicas (vida livre), em um mesmo ambiente. Um outro organismo ou um nutriente, como uma partícula de matéria orgânica, por ex. polissacarídeos podem servir de superfície. Neste caso, a superfície da partícula é substrato através da qual os micro-organismos aderidos catabolizam seus próprios nutrientes. (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016)

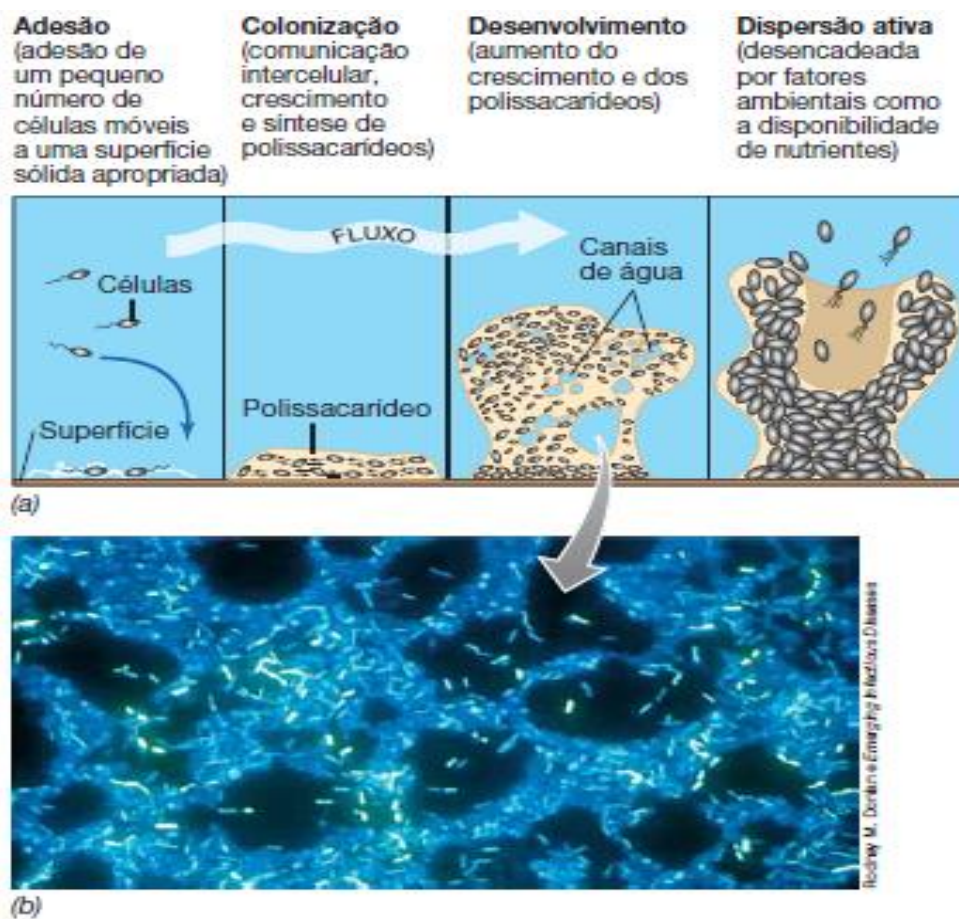
Desse modo, as bactérias se estruturam e se organizam formando comunidades funcionais sustentáveis em sistemas complexos de elevado grau de organização. A escassez de compostos orgânicos ou inorgânicos essenciais para a vida, pode não ser limitante para um organismo ao considerar a presença de um outro organismo vizinho que possa fornecer fontes nutritivas ou mesmo, consumir produtos tóxicos. O equilíbrio entre a demanda e oferta dos recursos necessários é, então, propiciado pela heterogeneidade das espécies e diferentes formas de vida.

O crescimento e o metabolismo dos micro-organismos dependem da disponibilidade de água e dos nutrientes nas proximidades das superfícies. Sob condições favoráveis, algumas bactérias podem duplicar em número a cada 20 minutos ou menos. Assim, uma única bactéria pode produzir uma massa de mais de um milhão de micro-organismos em menos de 7 h (SASTRI, 2015).

As bactérias podem sobreviver entre $-10 > 100$ °C, em ambiente ácido ou básico (pH ~0-10.5), e oxigênio dissolvido a 0 de saturação, a pressão do vácuo superior a 31MPa. A maioria das bactérias encontradas na corrosão crescem melhor em ambientes com temperatura entre 15-45 °C e pH de 6-8 e salinidade em torno de 30% emppb (SASTRI, 2015).

Em Madiga (2016, p.603): “uma determinada espécie crescendo em um biofilme pode ser até 1.000 vezes mais tolerante a uma substância antimicrobiana que as células planctônicas da mesma espécie”. Representado na figura (7).

Figura 7- Formação do biofilme



Fonte: Madigan (2016)

Legenda: (a) Os biofilmes são iniciados pela adesão de um pequeno número de células que então crescem e se comunicam com outras células. A matriz é formada, tornando-se mais extensa à medida que o biofilme cresce, eventualmente liberando células. (b) Fotomicrografia de um biofilme corado com DAPI formado em uma tubulação de aço inoxidável. Observe os canais de água.

A tolerância amplificada à agentes antimicrobianos quando na formação de biofilmes representa para a indústria, a dificuldade em realizar o controle microbiológico. A indústria de Petróleo e gás geralmente utiliza biocidas (GROYSMAN e STREET, 2015) como agentes bactericidas para inibir o crescimento de BRS e outras espécies em biofilme que se formam em dutos, colunas de perfuração, e em tanques de armazenamento.

Embora bem-sucedidas formas de vida para os micro-organismos, os biofilmes representam um problema para a indústria. São os principais responsáveis pela corrosão de materiais que funcionam como suporte e aquisição de nutrientes.

Outros efeitos são decorrentes da formação de biofilmes. França (2006 apud MOISSAN, CURIE e GRIGNARD, 2006) dispõe que “danos em equipamentos, entupimentos de tubulações e válvulas, redução da transferência de calor, diminuição da velocidade de fluxo, deterioração de produtos em processamento e processados”

Materiais como concretos, polímeros, materiais metálicos (MOISSAN, CURIE e GRIGNARD, 2006), aço inoxidável (SHENG, TING e PEHKONEN, 2007), podem ser facilmente degradados pelos biofilmes.

Na indústria do petróleo e gás, materiais como aço que formam as estruturas de oleodutos e gasodutos, reatores, válvulas e reservatórios de armazenamento de combustíveis e substância como combustíveis (gasolina, diesel, biocombustíveis), e ainda, reservatórios sedimentares de petróleo, os próprios, petróleo e óleo cru, funcionam bem como superfícies para formação de biofilmes e ataque dos materiais por bactérias (BREUKER, STADLER e SCHIPPERS, 2013; FLEMMING e WINGENDER, 2010; GROYSMAN e STREET, 2015; MBADINGA, 2011).

As BRS formam o principal grupo causador de biocorrosão na indústria associada aos biofilmes (XU, LI e GU, 2016.). A espécie *Desulfovibrio desulfuricans* é uma das mais estudadas na formação de biofilmes causadores de biocorrosão em metais, como em tubulações e reatores. São comumente utilizadas para a avaliação mecânica de novos materiais em que se busca promover a desagregação do biofilme na superfície. Os efeitos dessas bactérias na passividade e resistência a CIM são comumente avaliados em aços inoxidáveis. (DEC, MOSIAIEK, *et al*; XU, LI e GU, 2016).

Vale ressaltar que as BRS apresentam importante papel na degradação da matéria orgânica e conversão de hidrocarbonetos, ácidos graxos e aromáticos, álcoois e hidrogênio (BARTON e HAMILTON, 2007).

A depender do ponto de vista ou área de aplicação, as BRS atribuem vantagens ou desvantagens para Indústria do Petróleo por exercer, ora função benéfica ora maléfica. Por exemplo, quando exercem atividades distintas na biorremediação e na corrosão micro biologicamente influenciada (OLLIVIER, 2005), respectivamente.

Em síntese, a ação de micro-organismos na Indústria de Petróleo e Gás causa os seguintes eventos indesejáveis (OLLIVIER, 2005; PENNA, 2014; SASTRI, 2015):

Corrosão Influenciada por Micro-organismos (CIM): promove a deterioração e fraturamento das estruturas metálicas dos sistemas de injeção e produção, e de transporte de fluidos;

Souring biogênico: acidificação dos fluidos na rocha reservatória e diminuição da qualidade do petróleo;

Plugueamento: incrustações que geram obstrução ou tamponamento dos poços injetores e da formação rochosa.

2.1.2 CIM e outros danos

Groysman e Street, 2015, p.58 (tradução nossa) define a corrosão como: “ a reação entre um metal e o meio ambiente”. Alguns ambientes podem ser exemplificados: água, atmosfera, misturas de compostos orgânicos e inorgânicos, solventes, diluentes, biofilmes, óleos e combustíveis como petróleo, gás natural e biocombustíveis.

A corrosão pode se desenvolver por algum dos dois mecanismos distintos: eletrolítico e não eletrolítico. Não eletrolítico é mediante a interação de substâncias que não são dissociáveis e não conduzem corrente elétrica quando dissolvidas em água. Enquanto que a corrosão eletrolítica ocorre com a participação de eletrólito, ou seja, substâncias dissociáveis em íons na presença de água e com capacidade de conduzir corrente elétrica (H^+ , Na^+ , Ca^{2+} , OH^- , Cl^- , SO_4^{2-} , Fe^{2+} etc.) (GENTIL, 2007; GROYSMAN e STREET, 2015). Água do mar e a água produzida são fortes eletrólitos devido à elevada concentração de sais minerais.

Os principais materiais alvos da corrosão são os metálicos. Contudo, materiais não metálicos como plásticos, cimento e concreto também são passíveis de corrosão (PAPAVINASAM, 2013).

A CIM ou biocorrosão é a corrosão associada à ação de micro-organismos (ex. bactérias e algas cianofíceas) ou organismos biológicos maiores (ex. algas, legionella, mexilhões) que formam biofilmes sobre os materiais, conduzindo aos efeitos prejudiciais como degradação ou fraturamento (OLLIVIER, 2005; SASTRI, 2015). Embora nem sempre a formação de biofilme implique em efeitos significativos da corrosão (SASTRI, 2015).

Existem dois tipos de biocorrosão: i) Tipo I: envolve oxidantes que não são oxigênio, tais quais o sulfato e nitrato, que são biocatalizados por bactérias como bactérias BRS e bactérias redutoras de nitrato (BRN), ii). Tipo II: envolve prótons oxidantes que são segregadas por micróbios a exemplo das bactérias produtoras de ácido (BPA) (XU, LI e GU, 2016.).

Entre os mecanismos de processo de CIM estão a deterioração de revestimentos, despolarização catódica (POPOOLA, GREMA, *et al.*, 2013), mineralização da superfície de biofilme, produção de biopolímeros, produção de substâncias corrosivas, criação de zonas de aeração diferencial (MOISSAN, CURIE e GRIGNARD, 2006). Deterioração de querosene, diesel e óleo cru são comuns pela ação das BRS (GROYSMAN e STREET, 2015).

Algumas medidas são utilizadas para a prevenção e controle microbiológico da formação de biofilmes e suas consequências, tais quais o uso de revestimentos anti-*fouling* ou antiincrustantes tóxicos, aplicação de biocidas. No entanto, essas medidas, podem promover a poluição do meio ambiente (MOISSAN, CURIE e GRIGNARD, 2006).

Os biocidas são injetados, normalmente nas concentrações variáveis 10-300 ppm dependendo do tipo de biocida, o combustível e o objetivo (GROYSMAN e STREET, 2015). Os biocidas são substâncias tóxicas que funcionam como veneno para os micro-organismos. O efeito de biocidas depende de fatores como (PAPAVINASAM, 2013, p. 400, tradução nossa): “o grau de desareamento, o grau de filtração, a presença de sólidos, salinidade, concentração de H₂S, o pH, temperatura, tempo de residência, fonte de água, e outros produtos químicos”.

Os biocidas mais utilizados são (GROYSMAN e STREET, 2015, p. 178, tradução nossa): “isotiazolona, isotiazolin, compostos de amônio quartenários, organoborinanes, piridinotona, hexahydrotriazines, imidazolcarbamate”, dentre outros. Contudo, caso o biofilme forme uma camada muito espessa sobre a superfície, a penetrabilidade do biocida pode ser comprometida, não alcançando o local de ação e, portanto, não surtindo o efeito desejado (GROYSMAN e STREET, 2015). A eficiência dos biocidas pode ser amplificada por auxílio dos biodetergentes e biodispersantes que favorecem a quebra de agregados microbianos suspensos na água, dispersão dos biofilmes e penetração do veneno (PAPAVINASAM, 2013).

A utilização de *pigging* é associada à aplicação de biocidas para mitigação interna da MIC. O *pigging* é utilizado para remover as incrustações como as de calcário e o próprio lodo (PAPAVINASAM, 2013).

O termo 'pig' é utilizada no sector do gasoduto para representar o processo de utilização de um dispositivo chamado de "porco" (PAPAVINASAM, 2013, p. 361, tradução nossa). *Pigging* envolve orientar o fluxo do fluido a partir do ponto de lançamento, empurrando na calha a uma velocidade controlada até o ponto de chegada, para obter o melhor resultado sem obstrução nas condições de fluxo. A operação é equivalente a uma raspagem mecânica realizada e ocorre nas fases de construção, limpeza, manutenção, inspeção, reparos e reabilitação (PAPAVINASAM, 2013).

Outra alternativa é o uso de materiais mais resistentes à fixação de bactérias (DEC, MOSIAIEK, *et al.*, 2016), mas ainda não são amplamente utilizados.

PAPAVINASAM (2013) observa que o controle da corrosão deve ser observado internamente (corrosão interna) e externamente à infraestrutura (corrosão externa). Segundo o autor, a mitigação da corrosão interna, o monitoramento da corrosão externa, as medições e medidas de precaução, a manutenção de equipamentos e estruturas, e o gerenciamento do processo são fundamentais para o controle das causas e efeitos da corrosão.

O custo global da corrosão foi avaliado em aproximadamente 4% do Produto Nacional Bruto PNB dos países industrializados e em cerca de 28 bilhões de euros para a França, dentre qual uma parcela de 10% dos custos está associada à biocorrosão (MOISSAN, CURIE e GRIGNARD, 2006).

A biocorrosão está entre as principais causas de vazamentos de óleo que gera tanto o dano ambiental quanto onera a indústria em multas e perdas de produto, além de elevar os riscos operacionais.

Estudos sobre os efeitos econômicos da corrosão no mundo (ano de 2001) revelaram que a corrosão na indústria compromete ao menos de 1% a 5% do Produto Interno Bruto ao ano e no Brasil, cerca de \$ 10 bilhões. A maior fração está para a indústria petrolífera, culminando até mesmo na suspensão de exploração de campos de petróleo, como ocorreu em 2006 no Campo de Prudhoe, no Alasca (MARANGON, 2001).

O custo da corrosão na Indústria de Petróleo e Gás nos Estados Unidos (USA) chegou a atingir no ano de 2013, mais de \$ 27 bilhões e no mundo esse valor excedeu a \$ 60 bilhões (PAPAVINASAM, 2013).

2.2 PETRÓLEO, FORMAÇÃO E CARACTERÍSTICAS

A etimologia da palavra petróleo deriva do latim *petra* (pedra) ou *oleum* (óleo). O petróleo é caracterizado por ser uma mistura complexa de compostos orgânicos, gerado por processo natural, não sintético, durante milhões de anos em rochas sedimentares (THOMAS, 2001).

A Teoria Orgânica do Petróleo (ABBAS, 1996), mais aceita atualmente, postula que o petróleo é de origem orgânica (não inorgânica) sendo um bem escasso limitado a pequenas reservas no mundo. Desta maneira provém da decomposição dos micro-organismos como os plânctons e outros micro-organismos unicelulares, evidenciado pela presença dos esteranos decorrentes da degradação dos esteróides encontrados nas algas. Os plânctons, em ambiente anaeróbico teriam formado sedimentos no fundo do mar que se acumulariam e sob elevadas condições de temperatura e pressão sofreriam reação de craqueamento produzindo o petróleo e o gás, sendo está caracterizada a primeira fase de formação do óleo.

A matéria orgânica animal e vegetal depositada no sedimento é decomposta por agentes físicos e microbiológicos, originando o petróleo. A matéria orgânica composta por micro-organismos e fito plâncton determina um ambiente não oxidante, inibidor da água circulante e de sedimentos com baixa permeabilidade que sob condições de elevada pressão e temperatura adequadas produz o óleo líquido. (OLLIVIER, 2005; THOMAS, 2001; TISSOT e WELTE, 2013,1984)

Dois estágios evolutivos, um primário e outro secundário, determinam a formação química do petróleo: a) Diagenese- produção de querogêneo em variações baixas de temperatura (aproximadamente, 65°C) e pressão, a partir da ação bacteriana sobre a matéria orgânica e minerais depositados em ambientes subaquáticos e de alta porosidade. (THOMAS, 2001; TISSOT e WELTE, 2013,1984). b) Catagenese, termo proposto por Vassoevich, 1957 - formação de hidrocarbonetos líquidos e gás a partir da quebra de moléculas de querogêneo sob o

incremento da temperatura (165 ° C) (THOMAS, 2001; TISSOT e WELTE, 2013,1984).

O petróleo gerado em uma rocha geradora migra através das porosidades das rochas sedimentares. A migração pode ser limitada por meio de armadilhas geológicas provocando o acúmulo do óleo em rochas ditas reservatórias. As rochas-reservatórios permeáveis, em geral, arenitos e calcarenitos e impermeáveis, folhelhos e carbonatos, possuem poros por onde o óleo flui (THOMAS, 2001). Na formação, juntamente com óleo cru, encontra-se mais dois fluidos: a água e o gás natural.

Na natureza, nas rochas reservatórias, em presença de água e ausência de oxigênio, os alcanos são produzidos por processo lento (milhões de anos) de decomposição de matéria orgânica, de origem animal e vegetal. Por um processo de conversão do petróleo denominado de pirólise, os alcanos de cadeia longa sob condição de elevada temperatura podem se romper formando mistura de vários alcanos e alcenos (VOLLHARDT e SCHORE, 2004).

As propriedades e composição química são variáveis entre os reservatórios. Assim, o petróleo é classificado de acordo com os seus constituintes que variam com a rocha-mãe ao qual foi originado (THOMAS, 2001; TISSOT e WELTE, 2013,1984).

A composição química elementar do óleo cru inclui os seguintes percentuais de peso: “carbono (80 a 90% em peso), hidrogênio (10 a 15%), enxofre (até 5%), oxigênio (até 4%), nitrogênio (até 2%) e traços de outros elementos (ex: níquel, vanádio, etc.)”. A queima dos alcanos presentes constitui principal fonte de energia e matéria-prima para a indústria petroquímica.

O petróleo é uma substância oleosa como fração líquida e gás natural como fração gasosa, de densidade inferior à da água, inflamável. Apresenta características organolépticas de cheiro característico e cor que varia na escala negro a castanho (THOMAS, 2001). Pode ser encontrado nos estados sólido (xisto, asfalto, betumem), líquido e gasoso (nas condições normais de temperatura e pressão). A composição química é uma mistura de compostos orgânicos, os hidrocarbonetos e de compostos orgânicos ricos em heteroátomos (não-hidrocarbonetos) (TISSOT e WELTE, 2013,1984;PGT, 2013)

Este combustível fóssil é um grande reservatório de material orgânico através do qual é possível obter diversos outros compostos orgânicos: ácidos carboxílicos,

álcoois e compostos aromáticos. Amplamente utilizados em diversos ramos da indústria, combustíveis, textil, plásticos e outros polímeros. Sobretudo, constituem-se em fonte de energia, considerada não renovável e fonte (MORRISON e BOYD, 1994).

No gás natural que acompanha o petróleo há abundância dos alcanos de cadeia leve, ou seja, baixo peso molecular (metano, etano, propano, butano)(VOLLHARDT e SCHORE, 2004; THOMAS, 2001).

Hidrocarbonetos são compostos orgânicos que contêm apenas os elementos carbono e hidrogênio na constituição da molécula (C_xH_y). Este grande grupo está subdividido em dois outros: alifáticos e aromáticos. Os compostos alifáticos subdividem-se em alcanos, alcenos, alcinos e alicíclicos (homólogos cíclicos)(MORRISON e BOYD, 1994). A classificação dos hidrocarbonetos está apresentada na figura (8).

Os hidrocarbonetos que constituem o petróleo podem ser saturados (alcanos ou parafinas), insaturados (olefinas) ou aromáticos (arenos) e são atributos variáveis das características físico-químicas do petróleo(THOMAS, 2001).

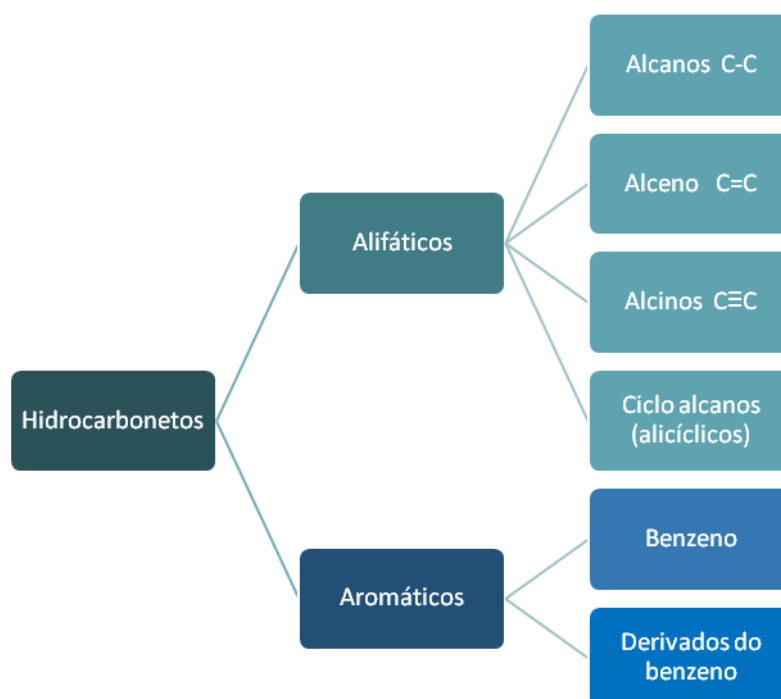
O fracionamento por destilação do óleo cru produz uma variedade de produtos finais (querosene, gasolina, diesel, lubrificantes, agrotóxicos) conforme sua composição em hidrocarbonetos(THOMAS, 2001) (figura 8). Todavia, a aplicação comercial das frações depende essencialmente da volatilidade e viscosidade, independentemente da fração ser pura ou mistura complexa (MORRISON e BOYD, 1994).

Os principais componentes do petróleo são os hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, as resinas, os asfaltenos e naftenos. No gás natural, são abundantes os alcanos formados por um a seis carbonos (metano a hexano) (MORRISON e BOYD, 1994; THOMAS, 2001).

Os hidrocarbonetos podem reagir com halogênios e outros compostos inorgânicos produzindo não-hidrocarbonetos. Não hidrocarbonetos são compostos classificados como sulfurados (enxofre), nitrogenados (nitrogênio), oxigenados (oxigênio) e metálicos (metais). As resinas ou asfaltenos são compostos aromáticos de cadeia longa halogênicos_ compostos orgânicos de elevada relação carbono/hidrogênio com presença de enxofre, nitrogênio e oxigênio) (THOMAS, 2001).

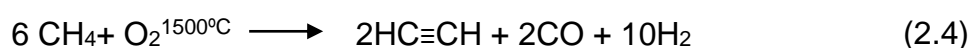
Os alcanos ou parafinas compõem os hidrocarbonetos mais simples, ausentes de grupos funcionais, relativamente apolares e de baixa reatividade. O composto de menor peso molecular deste grupo é o metano (CH₄) (VOLLHARDT e SCHORE, 2004). As moléculas da mistura de alcanos do petróleo podem conter de 1 a 40 átomos de carbono (MORRISON e BOYD, 1994).

Figura 8 - Árvore de Classificação dos hidrocarbonetos.



Fonte: Modificado de Morrison e Boyd, 1994

O metano (CH₄), um dos alcanos produtos finais da decomposição anaeróbica das plantas e algas, pode constituir até 97% do gás natural (MORRISON e BOYD, 1994). A reação de oxidação do metano é a determinante para uso como combustível. A combustão do metano produz água e dióxido de carbono, no entanto seu maior valor está na geração de calor (calor de combustão de 891 kJ) (MORRISON e BOYD, 1994). A oxidação parcial do metano proveniente do petróleo sintetiza o acetileno. O acetileno possui alto valor agregado para a indústria devido a ser ponto de partida para formação de matéria prima para a fabricação de polímeros (MORRISON e BOYD, 1994).



Devido à necessidade de atender a elevada demanda de combustíveis de baixo peso molecular como óleos, querosene e gasolina, a indústria utiliza o processo sintético de produção dos hidrocarbonetos leves. O craqueamento é a técnica de quebra de alcanos em fragmentos menores através da pirólise (VOLLHARDT e SCHORE, 2004). Ver quadro (1).

Outros dois processos como a isomerização catalítica e reformação catalíticas são transformações das frações em outros constituintes químicos (MORRISON e BOYD, 1994) empregados pela indústria petroquímica. No primeiro, transforma-se alcanos de cadeia contínua em alcanos de cadeia ramificada. No segundo, sintetiza-se hidrocarbonetos aromáticos a partir de alcanos e ciclo-alcanos (MORRISON e BOYD, 1994).

Quadro 1 - Constituintes do Petróleo e suas aplicações.

Fração	Temperatura de Destilação	Números de Átomos de Carbono	Aplicação comercial
Gás	< 20°	C ₁ - C ₂	Combustível
Éter de petróleo	20-60°	C ₅ - C ₆	Combustível
Ligroína (nafta leve)	60-100°	C ₆ - C ₇	Solventes
Gasolina natural	40-205°	C ₅ - C ₁₀ e cicloalcanos	Motores de combustão
Petróleo de iluminação (Ceroseno)	175-325°	C ₁₂ -C ₁₈ e aromáticos	Motores a jato e tratores/ de aquecimento
Gasóleo	< 275°	C ₁₂ e mais altos	Motores Diesel/ de aquecimento
Óleo de lubrificação	Líquidos não voláteis	Cadeias mistas	Parafina sólida e preparação de vaselina
Asfalto	Sólidos não voláteis	Estruturas policíclicas	Impermeabilização

Fonte:Modificado de Morrison, 1994

2.3 CICLO DAS BRS NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO E GÁS

2.3.1 Processo e impactos da CIM motivadas por BRS

O processo da CIM causada por BRS na Indústria do petróleo ocorre em verdadeiro ciclo produtivo em que os mecanismos de controle, prevenção e monitoramento estão regulados por normas específicas e devem satisfazer as especificações de qualidade de produto final e mitigação dos impactos gerados. Os impactos causados pela Biocorrosão perpassam os riscos ambientais, operacionais e ocupacionais implicando em efeitos econômicos sobre a indústria.

Na indústria do Petróleo e Gás, as BRS podem ser consideradas indígenas, ou seja, oriundas da formação de reservatórios de óleo. Mas ainda, existem divergências científicas diante da dificuldade em promover a amostragem estéril do fluido, livre de contaminações (OLLIVIER, 2005).

No entanto, é pacificado que as BRS podem ser transportadas aos reservatórios de petróleo pelas águas dos oceanos no processo de injeção de água para recuperação de poços petrolíferos.

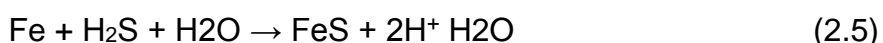
A água de formação do reservatório e a água de injeção formam a água produzida. A água de produção deve ser tratada para descarte em oceano (plataformas *off-shore*) ou reinjetadas em processo de recuperação secundária do petróleo (PRSP) (plataformas terrestres) (ALMEIDA, ALMEIDA, *et al.*, 2006; VIGNERON, ALSOP, *et al.*, 2016).

O PRSP por injeção ou reinjeção de água é utilizado para pressurizar o reservatório, visando elevar a pressão para aumento do rendimento. Este procedimento é uma causa importante para a produção de ácido, geração de gás sulfídrico (H_2S) por BRS, denominado na indústria de processo de acidulação biogênica (*acid-fouling*) (PENNA, 2014). Se a água do oceano ou de outras fontes que contém sulfato for introduzida, há a redução de SO_4^{2-} em HS^- mediadas por micro-organismos redutores de sulfato que oxidam os compostos orgânicos (doadores de elétrons) do óleo cru (OUTI PRIHA ; POPOOLA; SHERRY, GRAY, *et al.*, 2013).

No processo PRSP, um agravante para a formação de biofilme associada aos anaeróbios é a remoção do oxigênio da água injetada para controlar outros tipos de

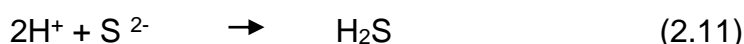
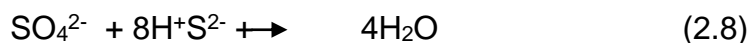
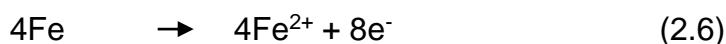
corrosão que termina fornecendo um ambiente propício para o crescimento de BRS (SHERRY, GRAY, *et al.*, 2013).

O ácido biogênico (H₂S), por sua vez, pode reagir com superfícies metálicas (ex. Ferro (Fe)) das linhas de transmissão de gases, insumos e produtos finais. A consequente degradação desses materiais pode causar rupturas ou vazamentos em oleodutos com elevado risco de explosões (POPOOLA, GREMA, *et al.*, 2013). Os vazamentos de gás sulfídrico são críticos para a Indústria devido ao elevado grau de toxicidade e letalidade.



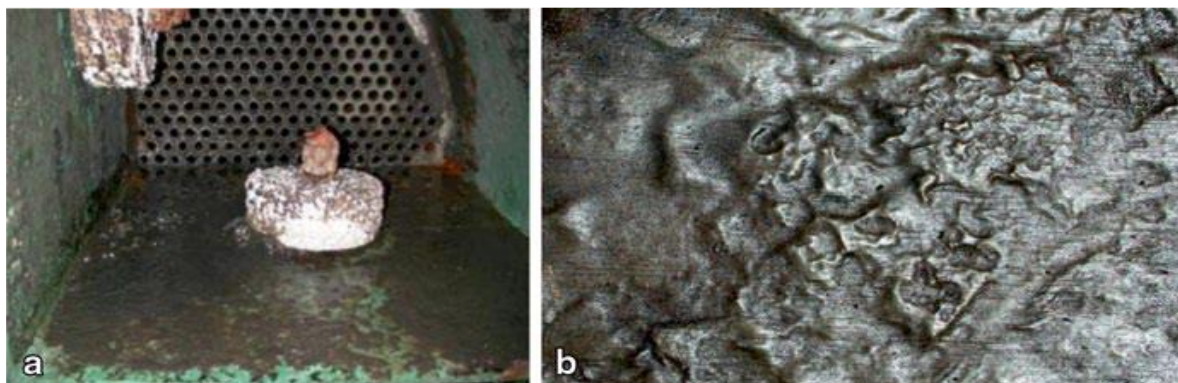
A despolarização catódica é descrita como o principal mecanismo de ação das BRS em superfícies metálicas como o aço (BARTON e HAMILTON, 2007). No processo de degradação do aço há uma demanda de H₂ que é removido pelas BRS por mediação de enzimas potencializando a corrosão, resultando em vários pontos de corrosão, denominados de pites (*pitting*) (JAVASHERDASHTI, 2011; POPOOLA, 2013), ver figura (10).

As seguintes reações definem a ação corrosiva das BRS sobre os materiais (GROYSMAN e STREET, 2015):



A acumulação de material biológico associado com depósitos de sais minerais, como os resíduos excretados pelos biofilmes em que fazem parte as BRS, geram incrustações nas superfícies de materiais, exemplificado na figura (9). A bioincrustação por micróbios ou *microfouling* (DOBRETISOV, WILLIAMS e THOMASON, 2014) provoca consequências graves para a produção industrial, tais quais: corrosão, entupimentos de tubulações, obstruções e tamponamentos dos poços injetores e o plugueamento (formação rochosa) (PENNA, 2014), fig. (10).

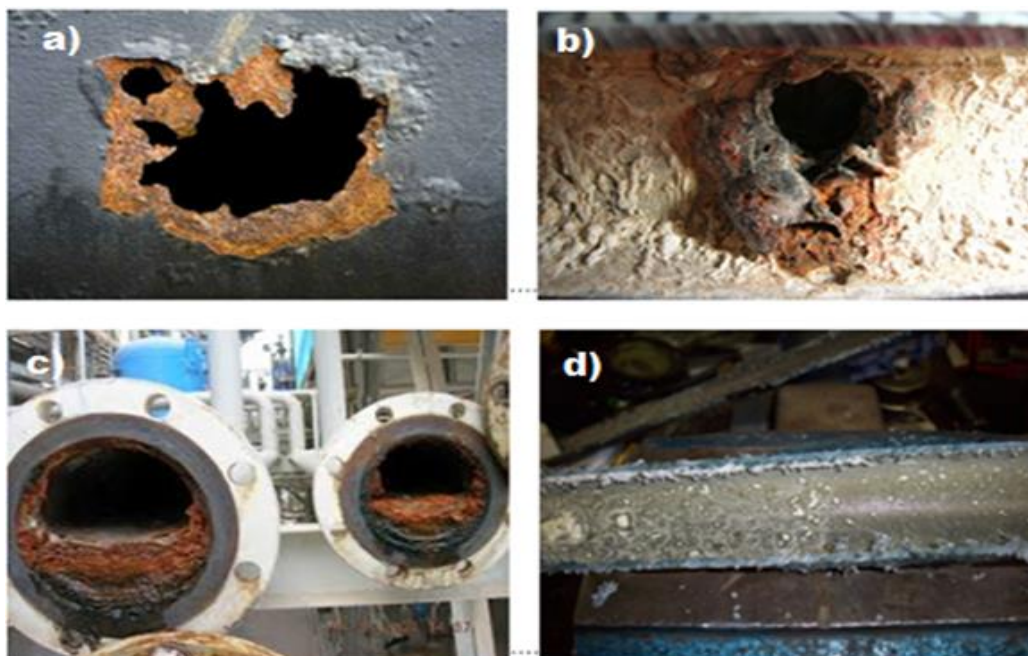
Figura 9 - Biocorrosão provocada por BRS



Fonte: Adaptado de GROYSMAN e STREET, 2015, p.84

A) BRS formado em permutador de calor (4 anos). B) Parte inferior do aço de carbono do tanque de armazenamento acima do solo de petróleo bruto corroído após 18 anos de serviço como resultado da atividade SRB

Figura 10 - Demonstrando corrosão provocada por MIC



Fonte: Imagens retiradas do Google images

Tipos: fig. a) Corrosão tipo Pitting, b) MIC, Bioincrustação em linhas de produção d) Biofilme com formação de microfouling

Na Petrobrás, a presença de microrganismos, a demanda de oxigênio e sólidos em suspensão que se apresentam relacionados a fenômenos de corrosão,

de plugueamento e de geração biogênica de H₂S são considerados “fatores determinantes na qualidade do fluido de injeção” (PENNA, 2014).

2.3.2 Custos diretos e indiretos

Os custos com a CIM podem ser diretos, como na degradação do óleo e acidificação que ao diminuir a qualidade do óleo conduz ao menor valor do barril. Bem como, indiretos, envolvendo os gastos com reposição de materiais, ferramentas de controle, monitoramento, perdas em rendimento da produção, além de prejuízos com multas e indenizações ambientais, entre outras.

Segundo, SASTRI, 2015, por exemplo, “os custos diretos e indiretos para a economia da Indústria de Petróleo e gás dos EUA foram estimados em quase \$ 300 bilhões por ano”. Estimou-se que a cada 100 bilhões de dólares de gastos na indústria por ano (em 1978), 20% eram referentes ao desgaste de materiais e 80% para a corrosão durante o mesmo período.

Estudos recentes (PAPAVINASAM; POPOOLA et al., 2013), estimou o custo de \$ 4,0 bilhões com as despesas de capital anual do setor da produção de petróleo e gás em terra nos EUA. O custo direto com o controle da corrosão consome 8% (\$ 320 milhões). Ao menos 76% (\$ 1,372 bilhões) das despesas de funcionamento anual, nesse mesmo setor e país, é diretamente relacionada ao controle de corrosão. O controle da corrosão em unidades de fundo de poço consome cerca de \$ 589.000.000 e US \$ 463 milhões em unidades de superfície e cada falha tubular *onshore* no fundo do poço consome \$ 3.000 de custo direto, ressaltando que 30% destas falhas são causadas pela corrosão.

Dos custos totais com a corrosão na indústria, a CIM representa 20% dos gastos (JAVAHERDASHTI, 2011) e em média 20% dos gastos totais na indústria para prevenção da corrosão são destinados ao uso de inibidores, enquanto 80% são voltados para materiais resistentes a corrosão (SASTRI, 2015).

No Brasil, os efeitos econômicos da corrosão comprometem entre 1% a 5% do Produto Interno Bruto (PIB) anual e custo direto com a corrosão em torno de 3,5% PIB Brasileiro (MARANGON, 2001).

Os acidentes causados por corrosão em geral repercutem nos âmbitos econômicos, sociais e jurídicos, implicando em multas elevadas. Alguns dos principais acidentes no Brasil envolvendo a Indústria Petroquímica tiveram como causa a corrosão.

Na década de oitenta, dois acidentes por motivos de corrosão contaminaram com óleo e outro com combustível, um importante manancial em São Paulo, a Represa Billings. O rompimento de uma linha de transporte de gasolina, interligação da Refinaria Presidente Bernardes, em Cubatão (RPBC) ao Terminal de Utinga, em São Caetano do Sul, causou o vazamento do combustível (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

Em torno de dez anos depois, vazamentos do oleoduto do Sistema OSVAT, Refinaria do Vale do Paraíba (REVAP) provocou uma extensa contaminação de zonas fluviais derramando ao todo de 2200m³ de óleo (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

Áreas como Mata Atlântica, comunidade locais na região de Tamboré e o Rio Tietê foram amplamente prejudicados por contaminação de óleo combustível causados por corrosão nos Sistemas OSSP (ano de 2000) e OPASA (ano de 2001), respectivamente. Em Tamboré, o impacto social afetou moradores que tiveram suas casas interditadas (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

Grande impacto sócio econômico e ambiental foi devido à corrosão de oleoduto dentro de Unidade de Conservação Ambiental, área do Parque Estadual da Serra do Mar (ano de 2004), acarretando em afloramento de petróleo e contaminação do rio Guaecá na região da Praia de Guaecá, em São Sebastião e áreas de preservação permanente da Mata Atlântica e Mata Ciliar (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

Estudo de caso de 64 incidentes/acidentes em Plataformas de Petróleo da Bacia de Campos, Rio de Janeiro Brasil, sobre as possíveis causas imediatas de acidentes de trabalho reportou que 86% dos casos analisados estavam relacionadas às falhas de componentes e corrosão (16%) (FREITAS, SOUZA, *et al.*, 2001).

De acordo com POPOOLA (2013, tradução nossa) “custos atribuídos aos danos de corrosão de todos os tipos foram estimados para ser da ordem de 3% a 5% de produto nacional bruto dos países industrializados.” Refletidos em \$ 10 bilhões em perdas de rendimento e tratamentos ao ano.

Papavinasam(2013) alerta que para as companhias de infraestrutura de Petróleo e Gás há a necessidade urgente de redução dos custos inerentes a corrosão.

2.3.3 Prevenção e controle

As causas e efeitos da ação de BRS podem ser mitigados através de ferramentas de monitoramento e inspeção. Na atualidade, o controle da CIM ainda é crítico e carente de maior atenção. Os riscos operacionais diretamente ligados a estrutura de produção e exploração geram perdas em reparos e trocas de colunas de perfuração e linhas de veiculação. Os riscos ocupacionais (aos trabalhadores) estão intimamente conectados aos operacionais devido à periculosidade justificada pelas manobras de operação, toxicidade do gás sulfídrico e explosões. Vazamentos de gases e derrames de petróleo afetam a comunidade por atingir gravemente a fauna e flora marinhos, contaminação da água e atmosfera e desequilíbrio ecológico figura (11).

O combate à corrosão por uso de inibidores é amplamente empregado nas indústrias de Petróleo e gás. Substâncias como nitratos, nitritos, molibdatos, antraquinonas (ALMEIDA, 2006; POPOOLA, 2013;) e carbonatos (LIENGEN, 2014) reduzem a atividade das BRS por ação competitiva ou por formação de filme protetor na superfície de materiais impedindo o ataque por bactérias e formação de biofilme.

Apesar dos esforços destinados para atenuar os efeitos indesejáveis, a aplicação de inibidores de corrosão, biocidas oxidantes e não oxidantes e oxigenação da água de produção, não são suficientes e eficazes.

Os biocidas e seus metabólitos são inconvenientes devido à susceptível contaminação da água de produção (OLLIVIER, 2005) e pelo potencial de ecotoxicidade (GROYSMAN e STREET, 2015).

Sobre a atuação da Indústria de Petróleo e Gás nos impactos gerados pela corrosão, Papavinasam (2013) afirma que há forte empenho para o alcance da “falha-zero”. Em consonância com o autor, alguns elementos-chave são imprescindíveis para granjear a “falha-zero” no tocante à corrosão e compreende:

- √ Precisão na avaliação dos riscos de corrosão,
- √ Implementação de métodos de melhor custo/benefício para controlar a corrosão,
- √ Controle exato da taxa de corrosão em várias etapas da infraestrutura,
- √ Manutenção de estratégias de controle de corrosão para toda a duração da infraestrutura,
- √ Integração de boas práticas da indústria e padrões de gestão de corrosão
- √ Tratamento de infraestrutura de petróleo e gás, como um sistema de modo a evitar os impactos de um programa de gestão de corrosão do segmento em outro segmento.

2.3.4 Regulação ambiental para controle de águas

No âmbito jurídico, a Indústria de Petróleo e Gás deve realizar a Gestão Ambiental da água produzida (PNRH) relacionada à atividade de Exploração de Recursos Hídricos mediante critérios estabelecidos em normas legais, resoluções e a Leis Federais que visam o uso responsável e sustentável das águas subterrâneas. Quadro (2).

O art. 10, Resolução nº 393/07 do CONAMA determina a obrigação das operadoras de plataformas de fazer o monitoramento semestral da água produzida a ser descartada para a identificação da presença de concentração de compostos contaminantes. Desse dispositivo legal, ressalva-se o inciso V que trata do parâmetro de “toxicidade crônica da água produzida determinada através do método ecotoxicológico padronizado com organismos marinhos”.

Substâncias como polifosfatos, sulfetos (H₂S) e ferro dissolvido, entre outros compostos inorgânicos e orgânicos, muitos dos quais presentes em óleo cru, petróleo, inibidores e biocidas têm seus limites especificados na resolução CONAMA 357/05.

A Lei Federal nº 9.966/00 difere os princípios básicos a serem obedecidos em portos organizados, instalações portuárias, plataformas e navios em águas sob jurisdição nacional para a movimentação de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas. Maior ênfase pode ser dada aos capítulos IV e V.

O capítulo IV dispõe sobre a descarga de óleo, substâncias nocivas ou perigosas e lixo, estabelecendo proibições sobre descarga de substância nocivas poluentes. A lei tem valor punitivo uma vez que determina as infrações e sanções (Capítulo V), atribuindo multas, suspensão, retenção e responsabilidades. Como por exemplo, a punição com pena de multa para o descumprimento do art.22. A saber, Art. 22.

Qualquer incidente ocorrido em portos organizados, instalações portuárias, dutos, navios, plataformas e suas instalações de apoio, que possa provocar poluição das águas sob jurisdição nacional, deverá ser imediatamente comunicado ao órgão ambiental competente, à Capitania dos Portos e ao órgão regulador da indústria do petróleo, independentemente das medidas tomadas para seu controle.

Quadro 2 - Cenário Nacional de leis e resoluções relacionadas a atividade de exploração dos recursos hídricos.

Leis e Resoluções		Especificações
LEIS FEDERAIS	Lei n.º 9.433/97	Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989.
	Lei n.º 9.966/00	Dispõe sobre a prevenção, o controle e a fiscalização da poluição causada por lançamento de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional e dá outras providências.
RESOLUÇÕES DO CNRH	Res 15/01	Estabelece diretrizes gerais para a gestão de águas subterrâneas.
	Res. 22/02	Estabelece diretrizes complementares para a elaboração dos Planos de Recursos Hídricos.
RESOLUÇÕES DO CONAMA	Res. 20/86	Resolve estabelecer a classificação das águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional
	Res. 357/05	Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.
	Res. 393/07	Complementa a Resolução CONAMA no 357/05 (art. 43, § 4o). Dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo e gás natural, e dá outras providências.
	Res. 396/08	Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências.
	Res. 430/11	Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.

Fonte: O Autor 2016

Destaque para as resoluções do CONAMA 357/05 e 393/07 e para a Lei Federal n.º 9.966/00 64

Figura 11 - Diagrama representando o ciclo das BRS na indústria produção do Petróleo e Gás



Fonte: Próprio autor. Google Images

As BRS presentes na formação, em águas de injeção e água produzida podem retornar a sua origem (reservatório ou oceano). Durante o processo operacional podem ser transportadas para as linhas de transmissão causando corrosão, plugueamento e elevando os níveis de gás sulfídrico. Os impactos causados são ambientais, operacionais e ocupacionais. Todo o sistema de controle depende de inspeção e monitoramentos. O uso de biocidas é comum, mas nem sempre resolvem os problemas causados pelas BRS e são ecotóxicos. Leis e Resoluções regulamentam o uso Racional dos Recursos Hídricos, atribuindo obrigações ao Setor de Petróleo e Gás. Por fim, a qualidade da água deve ser garantida para despejo ou reinjeção sob pena de sanções como multas diárias e suspensão. Os sistemas de medição e controle da CIM devem garantir a eficiência e eficácia focando a redução do custo e do tempo despendido. Nesse ciclo cada etapa está relacionada com as causas e efeitos promovidos pela formação de biofilmes nas quais fazem parte as BRS. Autoria própria. Fonte: Diagrama.

Como observado, as estratégias de controle da CIM atendem a normas legais e não são adotadas de forma discricionária. Pois estão pautadas em técnicas de inspeção e monitoramento da água produzida, óleo cru e controle da qualidade do produto final.

Testes laboratoriais são aplicados para avaliar a quantidade de micro-organismos maléficos. A caracterização de biofilmes e a correta identificação de espécies bacterianas são fundamentais para a escolha assertiva das estratégias de

controle microbiológico. Parâmetros da qualidade da água produzida são constantemente monitorados, por ex. a demanda química de oxigênio (DQO) e a demanda biológica de oxigênio (DBO) que estão relacionados com a ação de bactérias. Alta quantidade de anaeróbios pode indicar um ambiente anóxico ou quase anóxico indesejável.

2.3.5 Métodos de análise de biofilmes e BRS

Os métodos para quantificação, visualização, classificação ou identificação de micro-organismos dividem-se em duas categorias: os métodos dependentes de cultivo e os métodos independentes de cultivo (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Os métodos dependentes de cultivo podem ser clássicos de técnicas manuais ou instrumentais, automatizados ou não automatizados. Algumas técnicas manuais contemplam os testes reativos–bioquímicos, os testes de coloração de gram, os testes de antibiogramas. Os instrumentais podem ser de microscopia e os de contagem, como o NMP.

No entanto, os métodos destinados ao estudo da evolução dos micro-organismos em comunidade são modernos e estão alicerçados no binômio biodiversidade e atividade microbiana (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016) em que buscam analisar os micro-organismos em seu habitat como em biofilmes e *biofouling*.

Os métodos moleculares surgem como alternativas àquelas dependentes de cultivo para quantificação e identificação de micróbios em consórcios microbianos. As mais utilizadas para esta finalidade são a hibridização por fluorescência FISH (*hibridização fluorescente in situ*) e qPCR (Reação em cadeia Polimerase em Tempo Real) (DOBRETSOV, WILLIAMS e THOMASON, 2014).

Em geral, quatro modelos classificam os testes microbiológicos: i) testes bioquímicos clássicos ou instrumentais, ii) ensaios baseados na detecção, quantificação e caracterização dos anticorpos, iii) análise genômica e iv) análises espectrais (GENUER *et al.*, 2016).

2.3.5.1 Testes bioquímicos clássicos manuais ou instrumentais

Embora de menor custo laboratorial, dependem de muitas etapas de bancada, são passíveis de muitos erros e multofadigosos. Além disso, solicitam muito tempo de cultura em média de três a 15 dias, inerente à espécie em pesquisa. Mas bactérias como BRS dependem entre 15 a 28 dias de crescimento.

Nos laboratórios brasileiros, a identificação da presença de BRS em amostras de águas e outros materiais, normalmente é realizado pela metodologia do número mais provável para (NMP). Esta técnica é regulamentada pela RDC da Anvisa nº 12 e determina a presença e quantificação de BRS de forma indireta (avalia a concentração de H₂S).

A fim de analisar as BRS os fluidos de reservatórios e controle da CIM, a metodologia por NMP é ineficiente, pois apresenta resultados tardios em 28 dias e não identifica as espécies. É ineficaz porque é de fácil erro de interpretação e traduz resultados falsos negativos (PENNA, 2014).

Além de ser laborioso, dependendo de várias etapas de diluição e isolamento (PENNA, 2014; PETROBRÁS/CENPES/PDEDS/BTA, 2008).

As técnicas de enriquecimento e isolamento são insuficientes para uma avaliação completa do ambiente microbiano. Ambas servem para comprovar a presença de determinado organismos no ambiente, mas não podem prever a inexistência de um organismo no mesmo ambiente, e podem informar sobre a abundância e importância do micro-organismo em seu habitat (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016).

A coluna de Winogradsky é uma técnica de produção artificial de proliferação de bactérias mimetizando o meio ambiente natural a partir do enriquecimento. O enriquecimento da cultura com nutrientes utilizados determina quais micro-organismos irão se desenvolver. A coluna é um cilindro de vidro preenchido em 50% da sua extensão com lodo orgânico, podendo conter sulfeto, suplementados com carbonato de cálcio e carbonato de sulfato, além de substratos orgânicos. Esta técnica é utilizada para o isolamento de bactérias, bactérias redutoras de sulfato, púrpuras e verdes fototróficas e outros organismos anaeróbios (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016). Aplicada para detecção de BRS, essa técnica analisa o

teor sulfetogênicos que pode ser visualizado através da pigmentação com azul de metileno (CARVALHO, CEDRAZ e DOS SANTOS, 2010).

2.3.5.2 Detecção, quantificação e caracterização com anticorpos

Baseiam-se na característica de especificidade nas respostas dos anticorpos. Esse método é molecular e as técnicas mais utilizadas apesar de automatizadas dependem de marcadores imunológicos, instrumentos sofisticados e são altamente dependentes de Kits de ensaios. Os kits de ensaio variam conforme a técnica e são, geralmente, comercializados em sistemas restritos ao fabricante do instrumento automatizado. Desvantagens relacionadas aos kits é a facilidade de degradação com exposição à luz solar ou a elevadas temperaturas.

Os ensaios imunoenzimáticos como o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) baseiam nas reações entre anticorpo/antígeno. A medida da ligação é detectada quando anticorpo marcado com um cromógeno reage com a enzima (antígeno) alterando a cor. Geralmente, são utilizados marcadores antiimunoglobulinas (JR. JANEWAY, TRAVERS, *et al.*, 2007). Necessita de matérias como placas de elisa, kit e do instrumento de medição (leitorna ELISA). São considerados testes de alta especificidade e sensibilidade, de custo médio a alto em comparação com outros métodos imunológicos, mas requer mão-de-obra especializada e são susceptíveis a pequenos erros de pipetagem, variações nos tempos de incubação e lavagens e alterações química e biológicas nos reagentes.

A microscopia por imunofluorescência por sua vez, é uma técnica molecular que detecta o anticorpo marcado (direta) ou antiimunoglobulina (indireta) por um corante fluorescente por um cromógeno, substância de cor ou de luminescência. (JR. JANEWAY, TRAVERS, *et al.*, 2007) São testes indiretos, relativamente de custo razoável, mas são dependentes de instrumentos sofisticados, de kits analíticos, etapas de padronização e calibração.

2.3.5.3 Técnicas moleculares baseadas na Genômica

As técnicas moleculares baseadas na genômica são amplamente utilizadas para avaliação dos micro-organismos presentes em amostras ambientais.

A técnica reação de polimerase em cadeia (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica em que pequenos segmentos de DNA podem ser rapidamente amplificados em milhões de outros fragmentos, quantidade suficiente para viabilizar a análise genômica (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Nesta técnica cada fita de DNA-alvo funciona como um molde para a transcrição ou síntese de novo DNA. Reagentes contendo quatro nucleotídeos, DNA-polimerase e os fragmentos de DNA (primers) complementares são adicionados ao analito obtido da amostra dando partida à síntese de novo DNA.

A análise por PCR é dependente de Kits reagentes contendo os *primers* ou iniciadores de cadeia. Um termociclador é necessário para realizar os ajustes de tempo, número de ciclos e temperatura. Todos esses parâmetros são fundamentais para que a amplificação seja bem-sucedida. O uso de uma enzima, DNA-polimerase, proveniente de uma espécie bacteriana termofílica *Thermus aquaticus* (resistente a variação de temperatura) permite o uso de termociclador automatizado (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Um avanço dessa técnica foi a adição de marcadores moleculares fluorescentes permitindo a análise dos níveis de fluorescência a cada ciclo, designando, assim, de PCR em tempo real (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

A visualização ou leitura do DNA é realizada a partir de uma outra técnica, eletroforese, geralmente, em gel. O tempo de análise total varia entre duas a quatro horas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Resultados obtidos por PCR retratam valores normalmente mais elevados quando comparados com métodos clássicos e de cultura. Uma explicação é a identificação de células mortas e vivas, e não somente vivas (GROPOSO, MIGUELETI, *et al.*, 2014).

PCR, no entanto, não constitui um método de identificação. Mas, é uma ferramenta importante para todos os procedimentos de identificação que demandam amplificação de cadeia. Por outro lado, devido ao necessário acoplamento com os primers, específicos e o uso associado à leitura em eletroforese, é viável a aplicação na classificação de espécies e testes de confirmação genética. Uma limitação para a

técnica é que não é possível amplificar o genoma inteiro, somente os fragmentos de DNA(TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

PCR assay(CANCINO-FAURE, FISA, *et al.*, 2016), tem sido aplicada para detecção de bactérias anaeróbias dentre as quais as BRS. Este método de identificação de bactérias é baseado na detecção dos genes funcionais. Pesquisadores identificaram as espécies causadoras de corrosão entre as culturas obtidas de uma coleção de micro-organismos, *Desulfotomaculum sp.*, *Desulfovibrio sp.* e *Desulfobulbus spa* partir de primers que codificam para as enzimas chave da via de redução dissimilativa de sulfato, isto é, a subunidade DSRA. (ABDULINA, PUSISH, *et al.*, 2016).

Outra limitação do método PCR em geral, tem sido a não distinção de sinais entre células mortas e vivas, conduzindo à quantificação de ambas.

No entanto, através de uma técnica considerada inovadora que utiliza o corante intercalante de DNA mono-azeído de propídio (PMA) em PCR ou o corante de ligação ao DNA PMA, é possível inibir especificamente à amplificação de DNA a partir de células mortas. Quantificar apenas as células vivas de bactérias viáveis em tipos diferentes de amostras, tais como amostras alimentares, ambientais e microbiológicas. Embora a detecção e identificação continuem mediante a amplificação de reação em cadeia de polimerase fluorescente em tempo real(TIAN, FENG, *et al.*, 2016).

2.3.5.4 Técnicas baseadas em análise de sinais espectrais

A tecnologia FISH (*hibridização fluorescente in situ*) é baseada na reação de hibridização entre o analito (alvo de pesquisa) e uma sonda de ácido nucleotídeo (oligonucleotídeo de DNA ou RNA complementar a uma sequência de um gene ou RNA do alvo) marcada por agentes fluorescentes (corantes filogenéticos) (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2015). A metodologia identifica micro-organismos que possuem sequência de ácidos nucleicostrechos que são complementares aos pré-determinados na sonda de ácido nucleotídeo.

Devido a possível especificidade dos diferentes corantes filogenéticos desenvolvidos é possível a identificação de espécies microbianas. Contudo, a

possibilidade de reação genérica com todas as células de um domínio filogenético não é descartada (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). A técnica possui a vantagem de poder rastrear e identificar um organismo ou um domínio a partir da amostra natural (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016), permitindo a análise da abundância do organismo diretamente na natureza em tempo real. (DOBRETISOV, WILLIAMS e THOMASON, 2014). O uso do FISH pode ser combinado a microscopia confocal permitindo a análise mais profunda em biofilmes (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016). Uma limitação está na necessária abundância de sequenciamento de ácido nucleico para a expressão de sinais que possam ser visualizados por microscopia.

A tecnologia de Deposição Catalisada do Repórter (CARD-FISH, *catalyzed repórter deposition FISH*) surge como solução para a principal limitação do FISH (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016). Nesta técnica o sinal de fluorescência é amplificado por meio da substituição do corante fluorescente por uma enzima peroxidase conjugada. A ativação da enzima ocorre dentro da célula mesmo em concentrações discretas de ácido nucleico (MADIGAN, MARTINKO, *et al.*, 2016). Essa técnica é aplicada para análise filogenética e para medição de expressão genética por organismos no ambiente. As análises por FISH e CARD-FISH são independentes de cultivo e são realizadas diretamente no biofilme (DOBRETISOV, WILLIAMS e THOMASON, 2014).

A análise de BRS por FISH e CARD-FISH depende de uma maior concentração de sonda, devido especialmente, à grande diversidade desse grupo de bactérias no ambiente. Ainda, a etapa de enriquecimento com nutrientes que podem ser lactato, acetato ou hidrogênio é dispensada (GITTEL, MUßMANN, *et al.*, 2008).

De Jesus Santos, Batista e Torres(2010) identificaram a população de eurobactérias (98%) em amostras de água de produção de campo petrolífero, dentre as quais 61% foi relacionada a BRS. O gênero *Desulfovibrio* foi predominante na filogenia.

A abundância e identificação de BRS de diferentes camadas de profundidade em sedimento profundo no Mar de Wadden, Alemanha, foi determinada por técnica de enriquecimento com lactato, acetato ou hidrogênio e CARD-FISH. BRS pertencentes ao *Desulfobulbaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Firmicutes* foram detectadas entre 0,5 a 4 m de profundidade. Também foi possível a identificação de isolados de BRS, '*Desulfobacterium corrodens*' (95-97%) e quatro isolados como

membros de Desulfobacteraceae, estando relacionada a qualquer *Desulfobacter psychrotolerans* (98%) ou *Desulfobacula phenolica* (95-97%) (GITTEL, MUßMANN, *et al.*, 2008).

Outro método, a cromatografia líquida de alta definição foi recém aplicada por Outhi Phria *et al.*, 2013 para detectar a presença de bactérias em amostras de óleo e água contaminadas de poços de petróleo sendo possível a identificação de gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfococcus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobulbus*, *Desulfotignum*, *Desulfonatronovibrio* e *Desulfonaticus*, porém consiste em método de elevado custo para a rotina laboratorial.

Outras técnicas são aplicadas para visualização e identificação de diferentes grupos microbiológicos em biofilmes, como a *Laser Scanning Confocal Microscopy* (LSCM).

Estudos em uma indústria de Petróleo e Gás foram desenvolvidos a fim de implementar as tecnologias FISH e PCR – tempo real para identificação de BRS em amostras provenientes de diferentes poços de petróleo na medida em que os testes apresentam resultados mais rápidos (1 a 3 dias) se comparados com a técnica NMP. Os resultados apontaram para a viabilidade de aplicação de ambas metodologias para o monitoramento microbiológico de campo na Companhia. Não obstante, os parâmetros de cada técnica serem padronizados de acordo com os tipos de amostras (GROPOSO, MIGUELETI, *et al.*, 2014).

2.4 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR TÉCNICA DE ESPALHAMENTO ELÁSTICO DA LUZ

2.4.1 Aspectos gerais sobre sensores e biossensores.

Os dispositivos de detecção por meio de transdução de sinal podem ser tipificados em sensores e biossensores, figura (12). Ambos detectam estímulos e os transmitem em forma de impulsos mensuráveis. Mas há distinções importantes entre os dois tipos que precisam ser esclarecidas.

Um sensor pode ser definido como um dispositivo utilizado para detectar uma variável física convertendo-a em um sinal analógico, universal, acessível; e processável para sinal digital, que se altera proporcionalmente com a grandeza física correspondente (YOON, 2013,2016).

A tensão ou diferença de potencial e a corrente, na maioria dos casos, são o sinal analógico resultante da transdução, enquanto que as variáveis mais comumente detectadas são tensão, umidade, temperatura, pressão, massa, luz e o processador é um computador ou um microprocessador (YOON, 2013, 2016).

Turner, Kaube e Wilson (1987) definiram biossensor como um dispositivo que incorpora um componente biológico sensor intimamente conectado ou integrado em uma transdução.

No sentido estrito aplicado à química, o termo biossensor é definido como: “um dispositivo que utiliza reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células intactas para a detecção de compostos químicos geralmente por sinais elétricos, ópticos ou térmicos (IUPAC, 1992, p. 143, tradução nossa).

No entanto, devido às constantes transformações observadas nos princípios aplicados aos sensores, é possível, na atualidade, desenvolver dispositivos, que embora não façam uso de reações bioquímicas possam detectar a forma e gerar assinaturas de organismos biológicos, sem a necessária vinculação a reatividade química.

Neste aspecto, o termo biossensor adota uma concepção mais ampla contemplando os sistemas de medição em que uma interface biológica seja reconhecida por um mecanismo de transdução de sinal:

Biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico compacto incorporando um elemento sensor biologicamente derivado ou biológico, quer integrado no, ou intimamente associado com um transdutor físico-químico. Dois princípios operacionais fundamentais de um biossensor são "o reconhecimento biológico" e a "detecção".

Portanto, um biossensor pode ser geralmente definido como um dispositivo que consiste de três componentes básicos conectados em série: (1) um sistema biológico de reconhecimento, frequentemente chamado de bioreceptor, (2) um transdutor, e (3) microeletrônica. **O princípio básico de um biossensor é detectar este reconhecimento celular e transformar em outro tipo de sinal usando um transdutor.** (KARUNAKARAN, BHARGAVA e BENJAMIN, 2015, p. 2;3, tradução nossa, grifo nosso).

Um elemento de reconhecimento molecular e um mecanismo de transdução de sinal compõem um biossensor (NARAYANASWAMY e S. WOLFBEIS, 2004). Acrescenta-se aos dois, um terceiro elemento, um sistema de processamento de sinal. Os dois primeiros são critérios de classificação dos biossensores, ver figuras. (13) e (14). Os Métodos óticos de detecção são um exemplo de classe de biossensores baseada na transdução (KARUNAKARAN, BHARGAVA e BENJAMIN, 2015).

O bioreceptor ou o elemento de reconhecimento molecular na tecnologia de biossensores pode incluir as seguintes categorias: biologia molecular (antígeno/anticorpo, enzimas ou ácidos nucleicos/DNA), sistema biológico (estruturas celulares, membranas, tecidos ou células inteiras) ou biomiméticos (uma espécie que camufla o local de ligação ativa de uma biomolécula natural)(KARUNAKARAN, BHARGAVA e BENJAMIN, 2015, SPICHIGER-KELLER, 2008), fig.(14).

Transdução de sinal é o processo de conversão do bioreconhecimento (reconhecimento de um elemento biológico ou bioreceptor) em sinal detectável através de um dispositivo denominado transdutor. O bioreceptor é a espécie molecular que utiliza um mecanismo bioquímico de reconhecimento que inclui, as categorias: enzimas, antígeno/anticorpo, ácidos nucleicos RNA/DNA, estrutura celular/célula, e biomimética (KARUNAKARAN, BHARGAVA e BENJAMIN, 2015).

Os métodos de detecção óticos são baseados na optoeletrônica em que dispositivos eletrônicos interagem com a luz. (KARUNAKARAN, BHARGAVA e

BENJAMIN, 2015). Dispositivos de emissão de luz como LEDs ou diodos de LASER são exemplos de elementos optoeletrônicos (YOON, 2013,2016).

Os biossensores ópticos apresentam pontos fortes quando comparados com alguns outros sensores e biossensores. São caracterizados por altas seletividade e especificidade, ausência de interferência eletromagnética, tempo real, resultados rápidos, flexibilidade em aplicação, portabilidade, e mínima invasividade para medições diretamente em pessoas (NARAYANASWAMY e S. WOLFBEIS, 2004).

No método de detecção óptico o processo de transdução induz uma mudança na fase, amplitude, polarização ou frequência da luz incidida em resposta a alteração química ou física produzida por processo de bioreconhecimento (KARUNAKARAN, BHARGAVA e BENJAMIN, 2015, p. 25).

Os biossensores ópticos podem ainda ser considerados de detecção livre de marcadores (*label-free*) (FANG, 2011; KARUNAKARAN, BHARGAVA e BENJAMIN, 2015). Ou seja, a detecção não é dependente da alteração molecular do analito ou da marcação de moléculas alvo (por uso por ex. de cromógenos): a integridade da molécula alvo é preservada.

Este tipo de detecção é relativamente fácil e barato de executar e permite a medição quantitativa e cinética da interação molecular (KARUNAKARAN, BHARGAVA e BENJAMIN, 2015, p. 25).

Muitos biossensores estão compreendidos nas categorias de acordo com os mecanismos de detecção e transdutores. No entanto, o interesse da aplicação, ou seja, o motivo ao qual se destina (variáveis de interesse) devem ser consideradas para a melhor escolha. Geralmente, a delimitação do analito a ser medido está intimamente relacionado ao método de escolha.

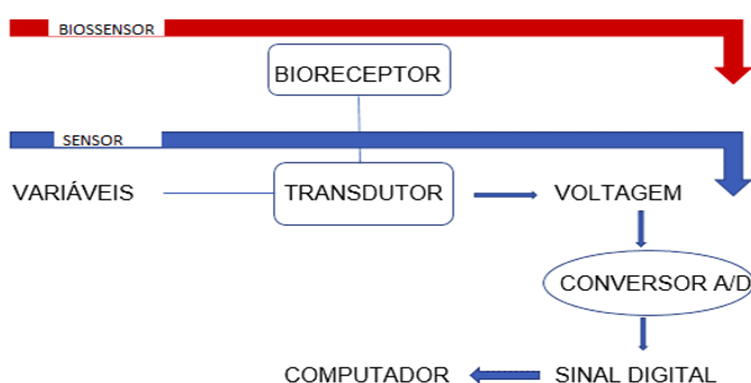
Os alvos de pesquisa em biossensores são comumente relacionadas a espécie e concentração de um analito específico (YOON, 2013, 2016), que podem ser integrantes bioquímicos das vias metabólicas (exs. hormônios, glicose, colesterol, bioquímico), fragmentos de ácido nucleico (ADN ou ARN), proteínas, células e tecidos, micro-organismos de vírus, uma bactéria, partículas e nanopartículas, entre tantas.

Estas variáveis não podem ser determinadas com os sensores convencionais (transdutores de temperatura, tensão, pressão ou luz) (YOON, 2013, 2016)

Biossensores baseados na luz, como espectrofotometria, fluorescência, sensores para glicose, imunossensores, *Lab-on-a-Chip*, Biossensores, DNA

Biossensores são alvos de pesquisa e podem ser aplicados a análise de materiais biológicos em diversificadas áreas das ciências aplicadas. Segurança de alimentos e bioterrorismo (NIKOLELIS e NIKOLELI, 2016), controle da poluição ambiental, diagnósticos de patologias.

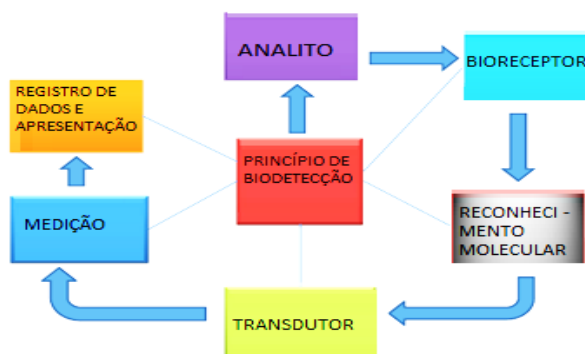
Figura 12 - Diagrama que demonstra as principais diferenças entre sensores e biossensores.



Fonte: Baseado em Yoon (2013, 2016).

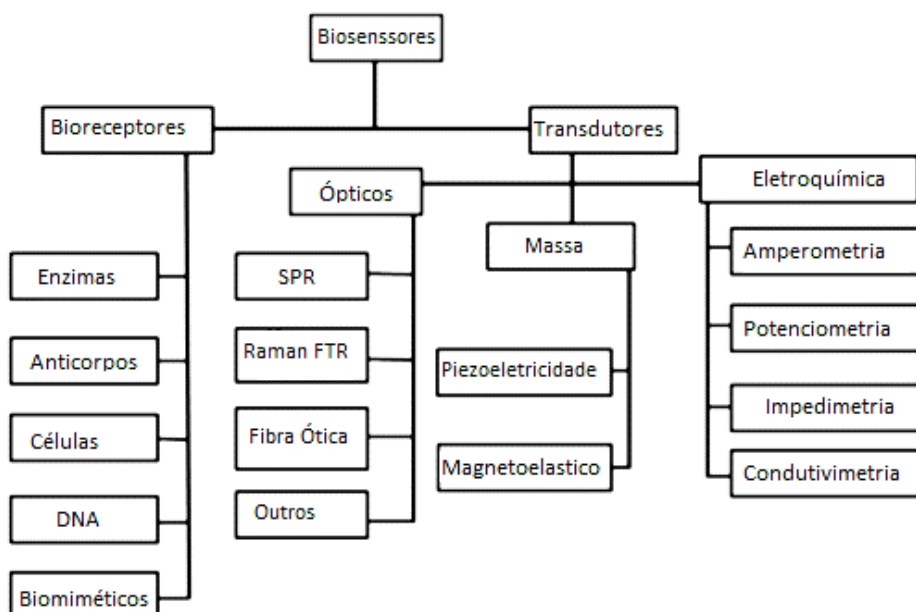
Os sensores medem diretamente a variável física ou química, enquanto nos biossensores há um componente biológico que modula a variável que será medida. Em ambos há a transdução fornecendo um sinal analógico que é convertido em digital por tecnologia determinada.

Figura 13 - Diagrama representando os elementos dos biossensores.



Fonte: Adaptado de (KARUNAKARAN, BHARGAVA e BENJAMIN, 2015, p.4)

Figura 14 - Árvore de classificação dos biossensores quanto aos tipos de Bioreceptores ou de Transdutores utilizados



Fonte: Adaptado de Karunakaran, Bhargava e Benjamin (2015)

Alguns desses elementos podem ser alterados de acordo com a técnica instrumental.

Com o advento das câmeras fotográficas e de filmagem de alta resolução uma nova concepção de sensores ópticos e biossensores é introduzida no mundo da vida. O foco em questão na inovação é a busca em maximizar os resultados e otimizar os sistemas de detecção para designs compactos e portáteis, de baixo custo e de fácil acesso. Nesta mão, os melhores sistemas de processamento das informações e capturas da imagem são elementares nos processos em que a imagem bidimensional a partir de sensores de imagem baseados em dispositivo de carga acoplada (CCD) é um elemento de caracterização de espécies ou de analitos (KARUNAKARAN, BHARGAVA e BENJAMIN, 2015).

Embora tradicionalmente as câmeras digitais sejam dominantes no campo da imagem biomédica. Os geradores de imagens de semicondutores de óxido metálico (CMOS) complementares estão sendo testados quanto à sensibilidade para produção biossensores de baixo custo e versáteis. As câmeras CMOS comparativamente às câmeras digitais são associadas a imagens fracas, de baixa

luminosidade, devido à baixa sensibilidade (MURARI, ETIENNE-CUMMINGS, *et al.*, 2011). Contudo, pesquisas nos últimos anos, têm revelado o aumento de sensibilidade das CMOS para novos sensores na área da biotecnologia (WANG, SMITH, *et al.*, 2014), como na microscopia (PHILLIPS, GRIEVE, *et al.*, 2011).

O princípio físico em que partículas carregadas podem ser tocadas pelas lentes magnéticas foi empregado por E. Ruska (1986) para a construção pioneira de microscópio eletrônico de transmissão (TEM) no começo do século XXI, rendendo-lhe o Prêmio Nobel de Física. Desde então, a TEM tornou-se uma ferramenta-chave de pesquisa na caracterização da matéria condensada resultando em diversas técnicas que possibilitam gerar imagens de estruturas cristalinas em resolução atômica (WANG, 1995,2013).

A interação de elétrons com uma matéria sólida é extremamente forte em comparação com qualquer outra, de raios-X ou neutrons, de modo que os múltiplos efeitos de espalhamento estão sempre presentes em difração de elétrons (WANG, 1995, 2013). A forte interação de elétrons incidente com elétrons e núcleos em cristais viabilizou analisar as estruturas de sólidos baseado sem micrografias eletrônicas. (WANG, 1995, 2013).

Algumas das principais técnicas de determinação de estruturas cristalinas são baseadas na difração e imagem de elétrons de alta energia transmissíveis. A evolução permitiu o desenvolvimento da microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM), do dispositivo de carga acoplada recentemente comercializada, câmera (CCD) e do filtro de energia de elétrons, iniciando uma nova era eletrônico-microscopia quantitativa (WANG, 1995, 2013).

Com o avanço tecnológico das câmeras digitais, as técnicas de medição por análise da imagem encontraram um papel importante no desenvolvimento de novas tecnologias que buscam analisar a estrutura e morfologia dos materiais. Assim, uma recente geração de biossensores e biodetectores ópticos acoplados às câmeras digitais abrem o mercado para produtos mais econômicos, práticos de construir, de fácil manuseamento e eficácia, voltados para a nova tendência de resultados em tempo real (RASOOLY e HEROLD, 2009).

Análise de sinais de imagens associadas a variadas técnicas moleculares como eletroforese (SEGURA-CARRETERO e FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2009) , luminescência, fluorescência (CHRISTENSEN e N. HERRON, 2009), SPR *immoassay*, ELISA e *Surface plasmon resonance* (SPR) (ARIMA, TERAMURA, *et*

al.; DING, LIU e YU, 2009), eletroluminescência (KOSTOV, SERGEEV, *et al.*, 2009), *fluoroimunoassays* (GOLDEN e SAPSFORD, 2009) e detecção espectrométrica de fibra óptica (KAPOOR, 2009), são frequentemente pesquisadas e implementadas para criação de novos dispositivos capazes de analisar tecidos e células.

Day (2009) aplicou um dispositivo simples com câmeras digitais para detecção de infecção por HIV, provando a possibilidade de análise rápida, livre de marcadores, com boa reprodutibilidade, acurácia e relativamente de baixo custo, comparado com outras tecnologias moleculares.

Sistemas ópticos que acoplam câmeras digitais a tecnologia da Luz LASER, transformou-se em potente ferramenta para desenvolvimento de biossensores ópticos aplicados à saúde e bioengenharia, como no diagnóstico sorológico (NAGEL, EHRENTREICH-FÖRSTER e BIER, 2009).

O espalhamento elástico da luz (EEL) tem sido uma ótima ferramenta utilizada na área das ciências da saúde, engenharia biomédica e ciências dos alimentos. Diversas pesquisas aplicam o princípio para a caracterização de corpos macroscópicos e microscópicos considerando seus atributos como alternativa aos métodos de diagnósticos invasivos. Atualmente, EEL é utilizada, com sucesso, em uma nova metodologia para identificação de culturas de células. Instrumentos sensores de medição, com uso dessa técnica, estão sendo comercializados para a detecção, quantificação e contagem de espécies bacterianas presentes em alimentos (BAE, PATSEKIN, *et al.*, 2012).

Inicialmente, o espalhamento elástico da luz foi aplicado na espectroscopia óptica, gerando resultados espectrais usados como a assinatura do objeto. Na medicina, este método foi testado visando a substituição às biopsias em que há remoção de tecidos, minimizando os danos causados em indivíduos. Uma característica importante da aplicação do Laser nas tecnologias em saúde, é além de viabilizar processos não invasivos, a possibilidade de obtenção de resultados em tempo real (BIGIO e MOURANT, 1997).

O diagnóstico precoce reduz substancialmente o trauma em pacientes, especialmente em processos patológicos de rápida evolução ou doenças sistêmicas de alto risco, como o câncer (GONZAGA, RIECHELMANN, *et al.*, 2008).

Contrastando os instrumentos ópticos de medição baseados em espectros, em que a especificidade se distingue nas informações específicas do analito a partir dos espectros obtidos; os medidores ópticos com aplicação do espalhamento

elástico da luz observam as características morfológicas e estruturais (BIGIO e MOURANT, 1997).

Observando as vantagens direcionadas ao paciente no processo saúde/doença, a aplicação do diagnóstico por sistema ótico com uso do espalhamento elástico da luz associado ao processamento digital, pode refletir em resultados precoces, tratamento imediato com redução de riscos, inclusive de óbito.

2.4.2 Lasers

Diodo de Laser emite luz ou radiação eletromagnética polarizada (feixe coerente de luz) extremamente monocromática, ou seja, em um determinado comprimento de onda (YOON, 2013,2016).

Laser é um acrônimo de *Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação por Emissão Estimulada de Radiação). A coerência do laser decorre da amplificação numa direção preferencial do movimento dos fótons pelo meio de ganho (*gain medium*), de material semicondutor, no caso de lasers de diodo. A direção preferencial é determinada pela geometria do meio de ganho e espelhos colocados em sua extremidade que refletem os fótons emitidos de volta para o meio de ganho. Os espelhos constituídos de material semitransparente permitem a transmissão desse feixe de luz. Assim o Laser é um feixe de luz monocromático, convergente e coerente (YOON, 2013, 2016).

O diodo de laser apresenta a vantagem de ser mais barato, pequeno e requer muito menos energia de tensão que outros tipos de Lasers. Contudo, uma desvantagem importante é que seu feixe apresenta determinada divergência, com forma elíptica e astigmatismo exigindo reorientação devido a geometria do meio de ganho com seção transversal retangular e de curto comprimento (YOON, 2013, 2016; KOSTOV, SERGEEV, *et al.*, 2009.).

A combinação do diodo laser com a teoria do espalhamento elástico da luz tornou-se um instrumento versátil quanto à aplicação em biossensores para caracterização de variadas partículas distintas.

Lorenz-Mie-Debye, 1908, descreveram o espalhamento elástico da luz incidida em partículas e agregados de partículas. Os primeiros estudos sobre a

dispersão da onda plana incidente por uma partícula esférica, dielétrica homogênea, isotrópica restringiu as aplicações a um meio não absorvente. O método descrito buscou calcular a intensidade de luz dispersa por esferas uniformes de qualquer tamanho em comparação com o comprimento de onda do raio incidente (WALKER, 1954).

Derivações da teoria de Mie (1908), especialmente por Mundy et al (1974); Chylek (1977); Bohren e Gilra 1979) elucidaramos métodos para espalhamento da luz por uma partícula esférica incorporando o meio absorvente ou a teoria de Mie (1908) e aplicando as aproximações do campo distante (FU e SOL, 2000; BOHREN e GILRA, 1979; MUNDY, ROUX e SMITH, 1974).

Espalhamento de Rayleigh é semelhante ao Mie, mas não se limita às partículas circulares, porém requer que elas sejam menores com tamanho de raio muito menores que o comprimento de onda do feixe disperso. No espalhamento Rayleigh a probabilidade do espalhamento é proporcional ao inverso da quarta potência do comprimento de onda (XU, 2015).

Segundo (HERGERDT e WRIEDT, 2012), o espalhamento de Mie (1908) é aplicado em instrumentos à base de difração para caracterizar partículas ou agregados de partículas: toda vez em que uma partícula for considerada esférica pode-se aplicar a teoria de Mie (1908).

Exemplos práticos como medidores ópticos de partículas, microscopia confocal, captura óptica e manipulação óptica de espalhamento por um feixe de laser focalizado aplicam o espalhamento inelástico da luz, Raman, na caracterização de superfícies (HERGERT e WRIEDT, 2008). Algumas aproximações como as de Rayleigh podem estar associadas.

Por sete décadas a teoria de Mie (1908) e as derivações de Boren & Gilra e Rayleigh tem sido aplicada para a caracterização de materiais e elucidação de sistemas biomoleculares. Comumente promovendo o desenvolvimento de sensores e biossensores.

Um exemplo é o seu emprego na análise quantitativa de formação de fuligem. Neste caso, a fuligem é compreendida como a partícula esférica e isotrópicas, muito menor que o comprimento de onda da radiação eletromagnética (no limite de Rayleigh). A extinção e dispersão da luz causados por essas partículas pode ser útil no estudo da produção de fuligem em processos de combustão.

Os rápidos avanços em técnicas de medição por espalhamento da luz e as possíveis aplicações em sistemas microbiológicos já eram observados na década de oitenta. Nesse período, a diversidade abrangia as técnicas físicas e físico-químicas e os possíveis analitos, alvos de pesquisa (XU, 2015). Pesquisa dos bacteriófagos, esporobacterianos, tripanossomos, monitoramento de água de produção e contaminação de fermentos foram na época considerados para análise à luz da Teoria de Mie (1908) e suas derivações por técnica de turbidimetria (HARDING, 1986).

Um exemplo, muito recente, é a sua aplicação inovadora na classificação de colônias bacterianas, visando a identificação de espécies de bactérias cultivadas em meios sólidos e semissólidos. A utilidade é refletida na nova geração de sistemas ópticos de medição.

2.4.3 Identificação e contagem de colônias bacterianas por ELL

Wyatt (1968) realizou um dos primeiros trabalhos que aludiu sobre a viabilidade de utilização das células de bactérias como partículas nos limites de Rayleigh, apresentando um arcabouço matemático rigoroso para caracterização de espécies como *Bacillus subtilis*, *B. anthracis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, e os esporos de *B. megaterium* e *B. cereus*. Sugeriu, pela primeira vez, a aplicação do espalhamento elástico da luz geradas por micro-organismos morfológicamente distintos como uma impressão digital das espécies bacterianas: “é um padrão de espalhamento essencialmente único, isto é, um diferencial de intensidade e polarização único. Embora o autor tenha considerado que as técnicas de espalhamento diferencial da luz era de fato um método físico atraente para a identificação rápida de diversos micro-organismos, o rigor científico matemático exigido tornou-se uma limitação do método para aquele momento.

A partir de então, trabalhos realizados por estudiosos da microbiologia, medicina, físicos e matemáticos, foram empenhados em analisar a morfologia e metabolismo por uso da teoria de Mie (1908) e suas derivações, sendo esta a abordagem a seguir. Entretanto, a ferramenta matemática que permitisse modelar o

processo empírico para representação do padrão de espalhamento da luz e aplicá-la na rotina laboratorial, ainda consistia em grande desafio.

Estudos como os de Hukins e P.(1979) consideraram as bactérias como esferas homogêneas e aplicou a teoria de Mie (1908) e cúbicos (*splines*) para a representação de padrões de dispersão de luz a partir de bactérias em fase logarítmica de crescimento. Os resultados revelaram que a parede celular bacteriana foi parcialmente responsável por pequenos ajustes. Mas, concluíram que não havia disponível na época um modelo teórico simples para a dispersão da luz por bactérias, recorrendo a análise de curvas cúbicas como método empírico.

Após 35 anos, referenciando-se nos estudos de Wyatt (1968), o espalhamento elástico da luz foi avaliado por análise espectral, utilizado para terminação do tamanho e forma de bactérias por Katz, Alimova, et al (2003). O estudo visou um método de análise em tempo real com menor demanda de tempo de cultivo, apesar da necessidade de culturas menos populosas, ou seja, mais diluídas.

O importante estudo (KATZ, ALIMOVA, *et al.*, 2003) ratificou a capacidade de detecção e identificação de células bacterianas a partir do espalhamento da luz ao analisar separadamente, três espécies de bactérias com características morfológicas distintas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Bacillus subtilis*) variando a diluição do meio. Uma vez que os resultados alcançados do tamanho e forma foram positivos ao compará-los com os determinados por microscopia eletrônica de varredura. Matematicamente, seu trabalho baseou-se nas aproximações de Rayleigh-Gans (teoria de difração anômala) para determinar o tamanho médio das bactérias a partir dos espectros transmitidos. Aplicações matemáticas basearam-se na descrição do momento angular da dispersão e raios das partículas. Um algoritmo simples de aproximação numérica de mínimos quadrados foi usado para determinar o raio da partícula e a relação de aspecto para bactérias com formas de bastonete. E a distribuição do tamanho de um conjunto de partículas e do tamanho de uma partícula foi dada em função da intensidade da luz espalhada.

Mais adiante, no início do século XXI, novas pesquisas retomaram a idéia da análise de padrões de espalhamento da luz de bactérias baseadas na teoria de Mie (1908) (KATZ, ALIMOVA, *et al.*, 2003) que culminou em um novo biossensor. Desta vez, diante dos avanços tecnológicos das câmeras digitais, da modelagem

computacional e a importante ferramenta de processamento digital de imagens, uma nova tecnologia foi desenvolvida e introduzida no mercado consumidor, voltado para a investigação microbiológica na indústria alimentícia. Solucionando o problema do modelo matemático para descrição do espalhamento elástico da luz por bactérias. O melhor detalhamento dessa nova tecnologia é encontrado nas próximas subseções.

2.4.4 Inovação tecnológica: Biossensores para identificação de espécies bacterianas

2.4.4.1 Solucionando o problema do modelo matemático

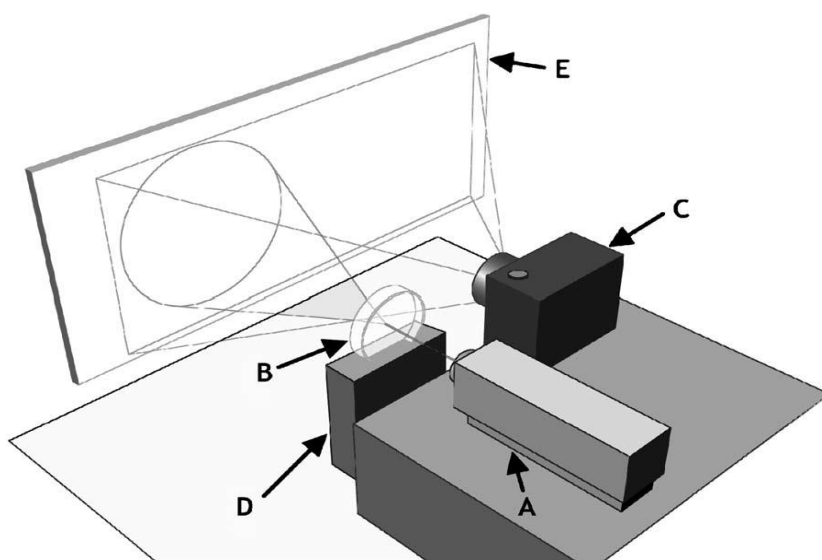
BAYRAKTAR, BANADA, *et al.*, 2006, continuando os estudos de (GUO, 2004) desenvolveram e descreveram um eficiente sistema de extração de fatores baseados nos momentos ortogonais de Zernike para classificação de espécies de bactérias encontradas em alimentos, da filogenia *Listeria*, patogênicas e não patogênicas. Desta forma, conquistaram pela primeira vez a solução para o problema da descrição de características dos padrões de dispersão, necessitando, contudo, de aperfeiçoamentos do sistema óptico e do método de classificação de imagens.

Para tanto, BAYRAKTAR, BANADA, *et al.*, 2006, lançaram mão de um aparato óptico a laser e de uma câmera digital. Esse trabalho contrastou as pesquisas anteriores em vários aspectos: neste sistema o laser 635nm e diâmetro de 1mm interagiu com as colônias bacterianas, estado do meio que continha as colônias bacterianas era sólido ou semissólido, o feixe de luz foi espalhado pelas colônias e transmitida para frente do objeto formando uma imagem no anteparo; a imagem do padrão de difração foi fotografada e o resultado foi gerado por meio de processamento digital de imagens; o algoritmo foi baseado em polinômios invariantes como descritores das imagens e foram aplicados para a extração do fatores, ao final um classificador foi utilizado para análise dos componentes principais. Desta maneira, o momento angular que descreveu as características foi

fornecido pelos momentos de Zernike, para posteriormente serem reconhecidas em um processo de visão computacional.

A etapa de classificação da imagem foi realizada por meio de aproximações lineares e redes neurais. De tal maneira, que as características das imagens variaram com as espécies das bactérias, descrevendo-as como impressões digitais. Nesse relevante trabalho, as colônias apresentavam tamanhos variáveis entre 1,8 a 1,9 mm e altura do centro da colônia em torno de 0,3 a 0,4 mm. O sucesso do sistema proposto (fig.15) permitiu avaliar os classificadores de imagens em busca da precisão e exatidão analíticas, atingindo bons resultados para as espécies, exceto entre as duas filogeneticamente muito próximas, *L. monocytogenes* e *L. innocua* (fig.16).

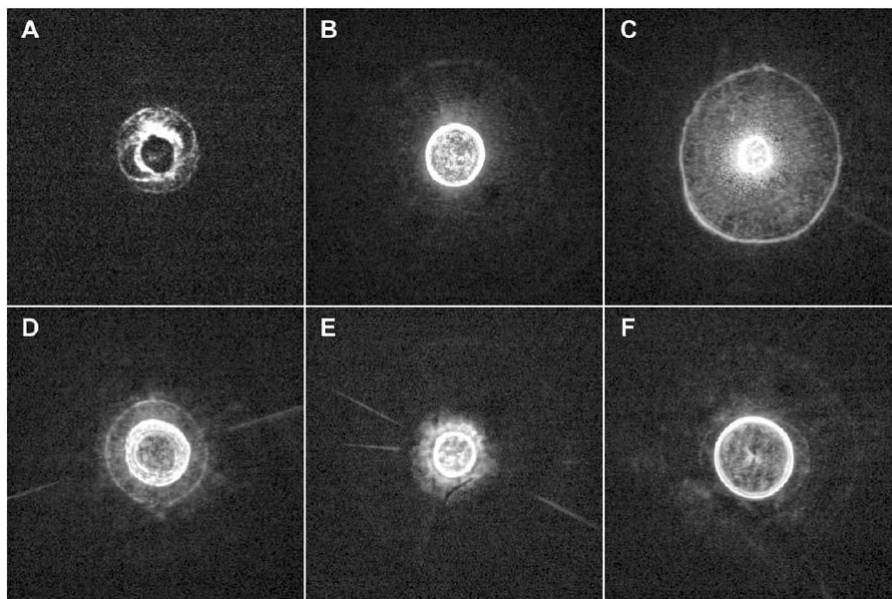
Figura 15 - Representação esquemática do aparato óptico de espalhamento elástico da luz usado para realizar análises de colônias bacterianas.



Fonte: Retirado de Bayraktar, Banada, *et al.* (2006).

Constituído por laser a 635 nm, Placa de petri cultivada, Câmera digital e eixo de rotação e anteparo de detecção. O laser incide sobre as colônias imobilizadas em meio semissólido. A luz é dispersa pelas colônias, gerando uma imagem que é capturada e processada computacionalmente. O sistema foi construído pelo grupo de pesquisa pelo centro de Saúde dos alimentos e engenharia, Universidade de Purdue, USA, entre os períodos de 2004 a 2005, incorrendo na primeira publicação em 2007.

Figura 16 - Imagens dos padrões de espalhamento de culturas de *Listeria* contendo seis espécies



Fonte: Retirado de Bayraktar, Banada, et al. (2006)

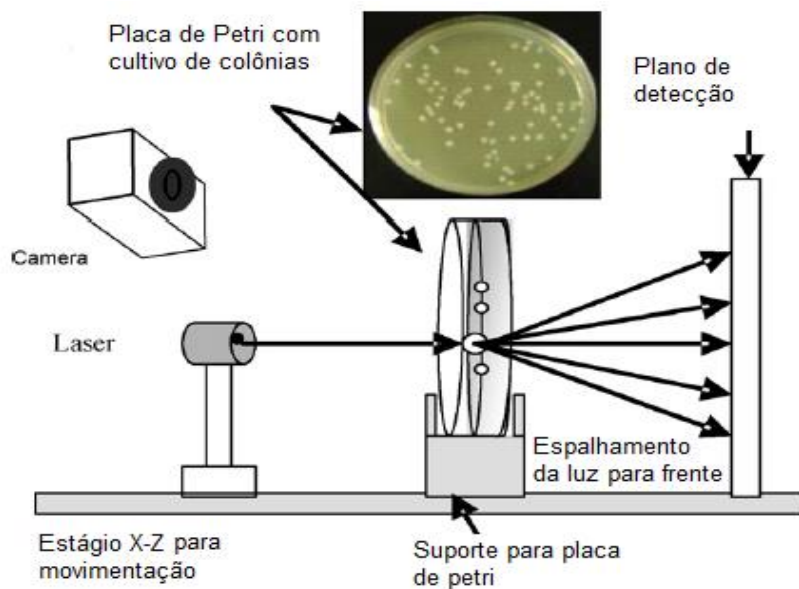
a) *L. grayi* LM37, b) *L. innocua*, c) *L. ivanovii*, d) *L. monocytogenes*, e) *L. seeligeri*, and f) *L. welshimeri*. As espécies patogênicas: *L. monocytogenes* (em humanos) and *L. ivanovii* (em animais) e todas as demais são não patogênicas. *L. monocytogenes* e *L. innocua* são muito próximas filogeneticamente apresentando padrões de dispersão muito próximos.

2.4.4.2 Biossensor: por trás da Física Óptica

O mesmo modelo e experimento, também foi simultaneamente apresentado por BANADA, GUO, *et al.*(2007) (fig.17), que demonstraram o princípio de funcionamento do sistema não-invasivo de espalhamento óptico na direção frontal para identificação de colônias bacterianas, ao qual chamaram inicialmente de 'scatterometer'. Cada espécie de *Listeria* teve uma estirpe eleita para representação do grupo (fig.18). Observaram que a análise visual da imagem (não processada computacionalmente) revelava características únicas, tais quais: ponto brilhante central, anéis concêntricos, raios radiais e algumas regiões locais difusas com vários semiângulos. Os autores ainda entenderam como relevantes para o processamento da imagem, os fatores como área, perímetro e descritores Fourier. Ainda, a considerada robustez dos polinômios de Zernike para a análise de imagens associada à invariância à rotação, translação, escala e reflexão, foi requisito

para escolha do método de extração de informações. A conclusão foi um resultado de classificação entre 91-100% de exatidão.

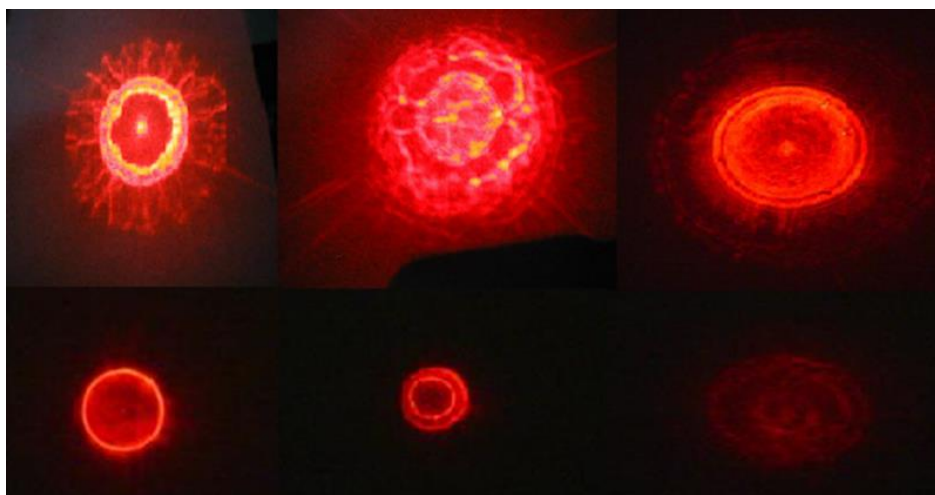
Figura 17 - Desenho esquemático de um 'scatterometer'



Fonte: Adaptado de Banada, Guo, et al.(2007).

Inserção: fotografia de uma típica placa (BHI), com colônias de *Listeria*

Figura 18 - Espécies de *Listeria* identificados por espalhamento da luz laser



Fonte de Banada, 2007.

Da esquerda para a direita, primeira linha: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. innocua* F4248; segunda linha: *L. seeligeri* LA 15, *L. welshimeri* ATCC 35897, *L. grayi* LM37. Arun K. Imagens anteriores ao processamento dos padrões de espalhamento elástico da luz do Laser, 635 nm, 1mm de diâmetro, espalhado por cada colônia separadamente em cultura mista de espécies de *Listeria*

Três importantes considerações podem ser abstraídas do trabalho de Banada, Guo, *et al.*, 2007.

A primeira está na explicação dada pelos autores (p.1666) para o espalhamento da luz: “Quando um feixe incidente passa através de uma série de objetos físicos, a frente de onda que sofreu modificação é obtida multiplicando a modulação de amplitude e fase causada por cada objeto independente”. A outra está no uso associado de uma técnica de microscopia, microscopia confocal, para aquisição precisa dos parâmetros envolvidos com as assinaturas e dados necessários para a simulação. Neste caso, parâmetros como: diâmetro da colônia, espessura do centro da colônia e raio de curvaturas foram mensurados para simular o espalhamento computacional. A terceira, é referente a influência existente dos substratos nutrientes dos diferentes tipos de meios de cultivo na formação dos padrões.

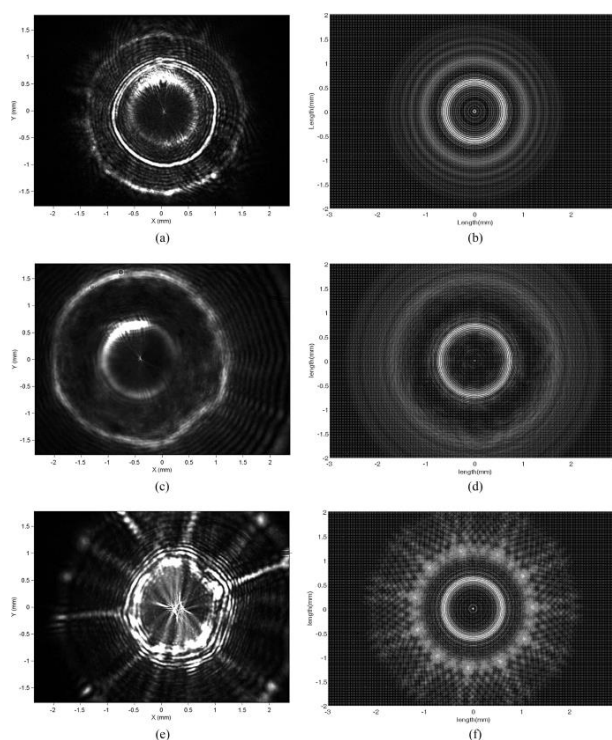
Paralelamente, BAE, BANADA, *et al.*, 2007, adicionaram pequenas alterações no sistema, especialmente, ao incrementar um espelho entre o laser e a placa de petri para direcionar o laser para o centro da colônia, denominados pelo acrônimo de BARDOT (*bacterial rapid detection using optical scattering technology*) e esclareceram como ocorre a formação dos padrões de espalhamento das colônias a partir dos conceitos da teoria escalar da difração e formação da imagem. As características das colônias como curvatura e espessura foram determinadas analisando os diferentes índices de refração em três regiões distintas, o centro da colônia, a borda da colônia e o meio de cultura. As colônias das espécies foram avaliadas em função da variação do tempo de incubação de 6h em 6h, até um máximo de 46h. Os resultados obtidos por BARDOT foram comparados com um modelo proposto onde as colônias são simuladas como um modulador de amplitude e fase de formato semiesférico, a partir de medidas morfológicas obtidas por análise com microscópio confocal e contraste de fase.

A explicação física apresentada por BAE, BANADA, *et al.* (2007, p.3645) para o evento diz que “a imagem do espalhamento para espécies de *Listeria* pode ser interpretado como a combinação de um padrão de disco de Airy, um anel luminoso secundário no meio do padrão de difração, um efeito de salpicos aleatórios (*speckle*), e raios radiais”. Os anéis são formados quando a luz transmitida ou bloqueada atravessa uma abertura circular ou obstáculo circular causando a difração do feixe. Segundo o autor, quando o feixe de luz Gaussiano excede a extensão

lateral da colônia, a região central atenua a passagem da luz, enquanto que a fração do feixe que ultrapassa a colônia é transmitida. Como consequência, uma variação na fase e amplitude máxima da abertura são provocados, propiciando a formação do disco de Airy no plano da imagem (fig.19).

Um segundo aspecto relevante do padrão de difração, ressaltado pelos pesquisadores é o anel brilhante no centro. Explicado como a diferença entre o coeficiente de transmissão que compreendem as áreas do centro e da borda. Assim no centro da colônia, onde a espessura é maior, há menor índice de refração e maior absorção da luz. A maior espessura no centro da colônia deve-se à maior aglomeração das bactérias. Ainda, a região da colônia mais próxima à superfície e mais central agrega mais produtos metabólicos excretados, havendo aumento de massa no centro. Enquanto que nas bordas haveria menor número de bactérias e, portanto, maior quantidade de luz emerge da colônia. Os autores revisaram essa explicação em um trabalho posterior (BAE et al, 2010) que será discutido mais à frente.

Figura 19 - Comparação das imagens BARDOT (coluna da esquerda) e o modelo proposto baseado na teoria escalar da difração (coluna da direita).



Fonte: Retirado de Bae, Banada, et al. (2007)

(A) e (b), *Listeria innocua*, (c) e (d), *Listeria ivanovii*, (e) e (f) *Listeria monocytogenes*

O testes iniciais foram estimuladores na medida em que conquistavam avanços científicos e tecnológicos para análise microbiológica com precisão, exatidão e menor tempo de cultivo com resultados rápidos (tempo máx. total de análise de 5 min), contudo, considerando que o método descrito era todo manual. Os testes posteriores vislumbraram a automatização do sistema proposto, BARDOT. Os avanços de pesquisa posteriores ocorreram mediante um instrumento automatizado. A partir de então, foram iniciados os testes de validação da nova metodologia instrumental.

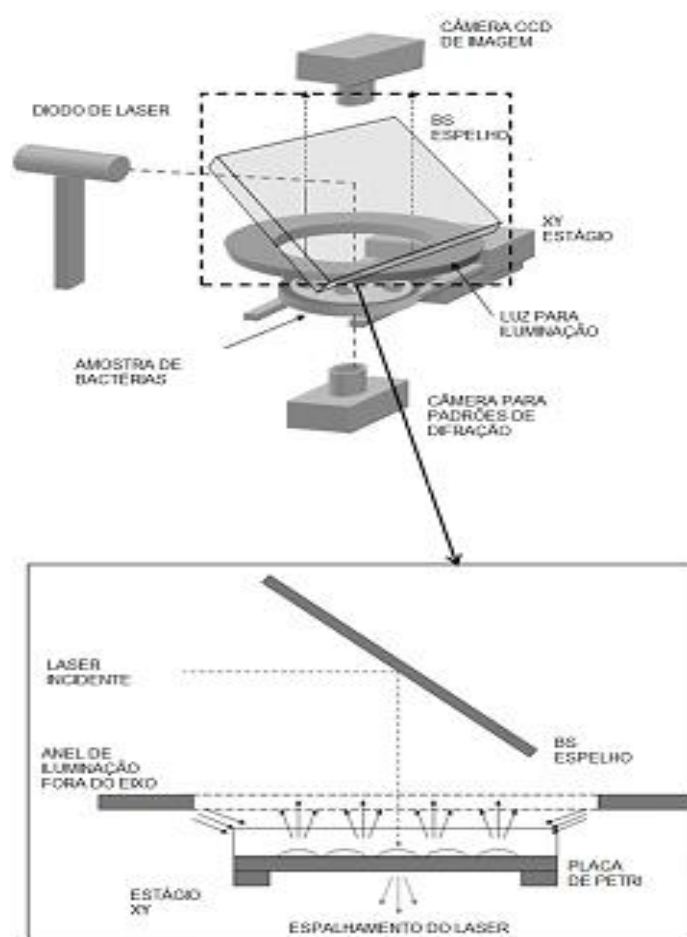
2.4.4.3 Avanços importantes do biossensor

Bae, Aroonual *et al.* (2008,2009) descreveram um sistema para automatização do BARDOT (fig.20), com a plataforma automática para identificação e localização dos micro-organismos. A concepção do sistema óptico foi dividido em três componentes: um localizador de colônia, um *scatterometer* para frente e um controlador de movimento. O localizador utilizou uma fonte de luz externa ao raio laser para auxiliar na captura da imagem da placa de Petri, por uma câmera localizada acima da placa, que servia para fornecer o número e a localização das colônias. Neste sistema uma placa de iluminação externa foi colocada acima da Placa de Petri de tal forma que 70 % da luz retroespalhada era transmitida para a câmera enquanto 30% da luz laser era direcionada para a colônia. A adição de uma câmera acima da placa de Petri permitiu a localização da colônias enquanto uma outra de *scattering*, posicionada abaixo da placa, capturava os padrões de dispersão. No entanto, uma desvantagem encontrada, foi o aumento do ruído devido a reflexão de imagens de quatro lados elevando o nível de ruído do background dificultando o processamento da imagem. Então, buscando reduzir a reflexão foram colocados dois gabinetes.

Nesse mesmo trabalho ficou definido o processo das etapas de automatização do BARDOT anteriores à geração dos padrões de dispersão, sendo essas: localização das colônias (etapa de segmentação), centralização da colônia com o centro do laser, captura e contagem das colônias. A localização da colônia foi realizada mediante algoritmo binário de segmentação e um algoritmo de crescimento

de regiões, baseado em histograma; a contagem das colônias foi incrementada com a análise por algoritmo computacional do caixeiro viajante e uma otimização para o modelo foi implementada.

Figura 20 - Diagrama esquemático de plataforma automática BARDOT (detecção rápida bacteriana usando tecnologia de dispersão óptica) com dois sensores de imagem digital.



Fonte: Modificado de Bae, Aroonual, et al.(2008).

Observar que o modelo deixou de ser horizontalizado e passou a ser verticalizado. Modificado de Bae, Aroonual, et al. (2008).

2.4.4.4 Análises biofísicas: novos desafios e constatações

Preocupados com a padronização do método analítico, BAE, BANADA, *et al.*(2008), investigaram a relação do tempo de incubação (crescimento das colônias)

e padrão de espalhamento na direção frontal (difração) do feixe laser pelas de colônias de bactérias cultivadas nas superfícies do meio de cultivo para os sistema *fowad scatterometer* (câmera lateralizada) e a plataforma BARDOT. Portanto voltando-se a compreensão das implicações das características da cultura de bactérias patogênicas para a evolução das assinaturas. A caracterização macróscopia e microscópica das colônias foi definida, então, em função do tempo. E as variações nas modulações da fase e amplitude foram inerentes às mudanças ocorridas nos cultivos.

No proposto estudo foi realizada uma análise da curva de crescimento em função do tempo de incubação, aferindo os diâmetros das colônias em intervalos de 6h, até o máximo de 42h. Um estudo de comparação foi efetuado para analisar a implicação do tempo de incubação para o diâmetro da colônia e do tempo para o diâmetro do padrão de difração (espalhamento). Algumas informações importantes podem ser retiradas deste experimento e do modelo BARDOT (BAE, BANADA, *et al.*, 2008):

- ✓ Quando o tamanho da colônia é maior que o tamanho do laser, medido por seu diâmetro, a porção da colônia que excede ao laser não produz espalhamento, embora ainda tenha algum efeito de modulação de fase e amplitude devido a mudança na curvatura da colônia;
- ✓ A inclusão do estágio de translação (XY) reduziu em muito o tempo total da análise;
- ✓ A incrementação de uma plataforma de suporte de amostras (*holder sample plataforma*) para dois tamanhos de placas (2 a 4 polegadas) possibilitou a rápida condução de placas para o campo da leitora óptica e maior flexibilidade para a adaptação das placas;
- ✓ O BARDOT necessitou de menos espaço entre as colônias bacterianas (placa de Petri) e o plano da imagem tornando o equipamento mais compacto;
- ✓ A adaptação de uma nova câmera apropriada para tarefas de visão de máquinas industriais que fornece o máximo controle e flexibilidade para aplicações de imagem digital favoreceu a melhor aquisição do sinal de imagem. A câmera foi selecionada considerando a elevada quantidade de eficiência e elevada resolução. As especificações do sensor câmera digital foram as seguintes: tamanho de unidade

pixel, 7.4 μm IEEE-1394 camera from Micropix, London, UK, (model M-640) com resolução 640 x 480.

O estudo demonstrou a importância na padronização da técnica de cultivo para cada espécie, especialmente, no que diz respeito ao tempo de incubação e diâmetro das colônias. Já que as colônias funcionam como moduladoras de fase e amplitude, servindo de pequena abertura ou obstáculo para o laser, sob a ótica da teoria da difração e espalhamento da luz;

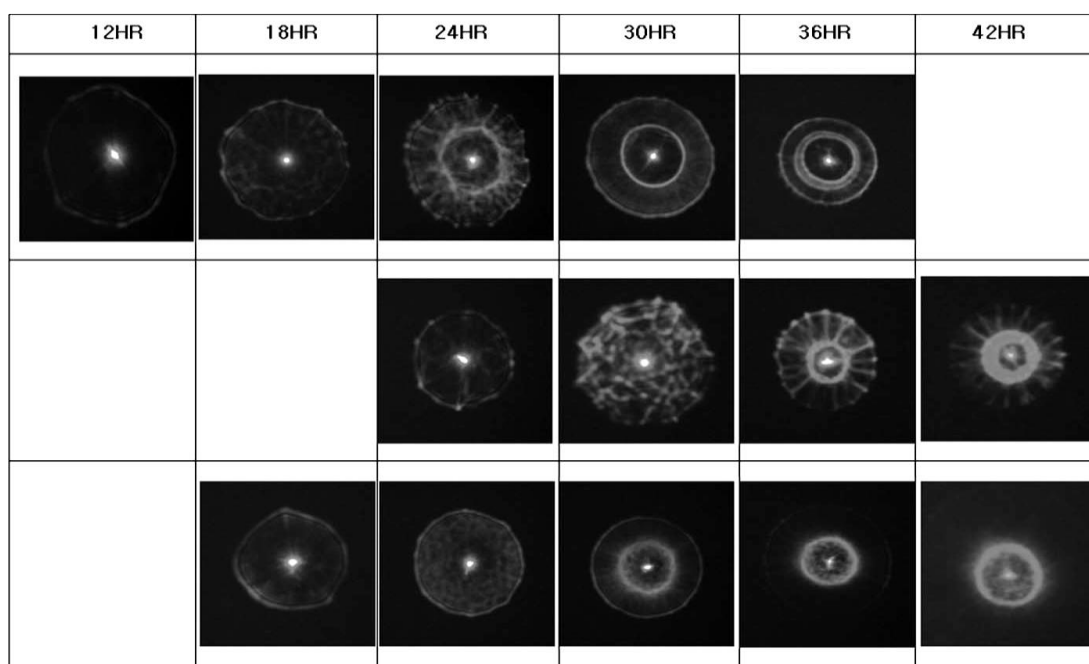
Há relação entre o padrão de espalhamento e fatores como: diâmetro do raio laser, tempo de crescimento das colônias, variação do diâmetro das colônias, variação espacial da densidade da bactéria e do material extracelular excretado durante a proliferação (modifica a densidade).

Os resultados obtidos (BAE, BANADA, *et al.*, 2008, p. 014010-4) revelaram que há um tempo de crescimento da colônia até uma fase estacionária e um diâmetro que cria a metade do ângulo máximo de espalhamento dos anéis da borda no padrão de difração; que o anel brilhante interno aparece em determinado tempo de incubação.

Os autores expressaram a relevante abordagem à luz da teoria escalar da difração. Explicando o resultado do efeito de maior índice de refração à medida em que o tempo de cultivo atinge seu pico (o máximo), significando que o raio angular e diâmetro do padrão de difração (*scatterogram*) aumentana fase de crescimento inicial da colônia. Até que se atinja um valor de decaimento metabólico e fase estacionária.

Por outro lado, o aumento do diâmetro da colônia (abertura) é inversamente proporcional a distribuição angular, de forma que com o maior tempo de incubação o tamanho do padrão de espalhamento diminua. Sendo que, o efeito maior da densidade ocorre no núcleo da colônia (fig.21).

Figura 21 - Tempo de incubação versus padrão de difração de três espécies da filogenia *Listeria*



Fonte: BAE, BANADA, et al., 2008, p. 014010-5

Primeira linha: *Listeria innocua*; segunda linha—*Listeria monocytogenes*, terceira linha — *Listeria ivanovii*

Em sequência, diversos estudos de modelagem computacional buscaram modelar o perfil padrão de espalhamento considerando as peculiaridades relativas aos cultivos, como o padrão de crescimento. Todos esses estudos aceitaram a concepção de que as colônias funcionam como moduladoras de fase e amplitude, e visaram compreender como o feixe de onda Gaussiano é alterado para os diferentes crescimentos. Nesse viés, alguns modelos matemáticos foram propostos.

Bae, Bai, et al.(2009), investigaram a correlação entre as variáveis (concentração de nutrientes, coeficiente de difusão, consistência do ágar, um modelo 2-dimensional reação-difusão (RD) e os diversos perfis de agregação bacteriana, bem como as mudanças evolutivas com o tempo. Para tanto utilizaram um modelo espaço-temporal capaz de caracterizar os padrões formados por colônias de bactérias ao longo de toda a sua curva de crescimento, o Modelo bidimensional reação-difusão (*2-dimensional reaction-diffusion (RD)*).

Os estudos de modelagem sobre as características ambientais dos cultivos e suas implicações nas medições por BARDOT, cancelaram os avanços posteriores.

2.4.4.5 Nova visão microscópica

A busca por menores tempos de incubação conduziu a transformação do sistema para análise de colônias na faixa de 127 a 180 μm de diâmetro (BAI, BAE, *et al.*, 2009). Neste novo modelo, μ -BARDOT, foi construído, em conjunto com o sistema, uma micro incubadora para o crescimento bacteriano sem realizar qualquer bloqueio ao espalhamento da luz para a frente de dispersão. Além disso, foi adicionada uma lente biconvexa com lente focal de 100 mm para promover a redução do diâmetro do feixe a valores bem mais baixos entre 100-200 μm (dentro dos limites de Rayleigh) sem alteração no caráter Gaussiano do laser. Também, um outro modelo de câmera para Scattering foi utilizado (IEEE1394 CMOS array; PixeLINK, Ottawa, ON, Canada), com resolução de 1280 \times 1024 e 6.7 \times 6.7 μm^2 . As análises de PCM e CDM foram associadas, para a detecção precoce, investigando-se as diferenças óptica e morfológicas entre as duas espécies de bactérias, *Samonella montivideo* e *E. Coli DH 5 α* , facilmente confundidas, durante seus primeiros tempos de crescimento.

As variadas assinaturas de uma mesma espécie e estirpe bacteriana devido, especialmente a produção de matriz polimérica, alertou para a necessidade de um sistema robusto de processamento digital de imagens com a construção de um banco de padrões de difração. A equipe de Banada, Huffet *al.*, 2009 utilizou um segundo protótipo BARDOT. Neste sistema o laser é transmitido por uma linha óptica de varredura (*scan*) e os sinais dos padrões são lidos por meio de uma leitora scanner e posteriormente fotografados pela câmera de Scattering, atingindo um tempo de leitura de 40s por placa e 5s para captura da imagem por colônia. Para tanto, um sistema computacional de análise por quadrante foi incrementado para localização das colônias e para construção das assinaturas foram empregados, os descritores de Haralick e os polinomiais invariantes de Zernike. A análise linear por discriminante (LDA) permitiu, primeiramente, a visualização da complexidade e a classificação dos 120 fatores extraídos e selecionados (critério de base Fisher) ocorreu, desta vez, através de algoritmo de máquina vetores de suporte (SVM).

A vantagem encontrada na aplicação do método SVM de classificação foi devido à capacidade que esses algoritmos têm de gerar “hiperplanos de decisão em um espaço multidimensional que segregam classes os diferentes rótulos,

efetivamente permitindo decisão para parâmetros não-lineares no espaço das bordas” (BANADA, HUFF, *et al.*, 2009, p. 1687). O resultado foi uma validação cruzada obtida como uma matriz de confusão, posteriormente utilizada para calcular a sensibilidade e precisão dos classificadores. Outra técnica por classificação quadrada (GC^2) foi complementada na análise de qualidade de classificação das imagens.

Nesse estudo, os pesquisadores também avaliaram a influência do *stress* ambiental, tais quais, nutricional e de variações da temperatura, na distribuição das imagens padrões, por meio de análise quantitativa de produção de EPS (exopolissacarídeos). Os resultados foram bem-sucedidos com ótima precisão para a distinção entre os cinco gêneros (90-99%) e entre as espécies de cada filogenia, confirmando ainda que o modelo Gaussiano é satisfatório para a descrição das colônias bacterianas por BARDOT.

Novos estudos descritivos e de comparação foram desenvolvidos para o segundo protótipo BARDOT, correlacionando-os modelos físicos e computacionais com as imagens dos padrões de espalhamento formadas. Os trabalhos retrataram a teorias física na derivação da interação laser/colônia por modelos de difração; efeito da amplitude da partícula; componente de fase no modelo Gaussiano, a modelagem da propagação da luz através das colônias; e os testes com variadas espécies bacterianas foram comparados e validados (BAE, BAI, *et al.*, BAI, BAE, *et al.*, 2010). A partir de então, foi possível tornar o sistema mais sofisticado, a caminho das análises em tempo real em escala micrométrica.

Importante contribuição inovadora para a biodeteção foi dada pelos pesquisadores aos modelos BARDOT e μ BARDOT (AKOVA, DUNDAR, *et al.*, 2010; RAJWA, DUNDAR, *et al.*, 2010) motivados a sanar o problema da impraticabilidade e exaustividade na definição das classes das inúmeras imagens de padrões. A técnica de Modelagem Bayesiana não paramétrica foi proposta, favorecendo a previsão de novas classes a partir da rotulação pautada em um limiar.

Uma análise adicional de espécies bacterianas com micro colônias de diâmetros dentro dos limites de Rayleigh apresentou a suficiência das três variáveis, tempo de crescimento, diâmetro da colônia e número de anéis como requisito para construção do padrão (BAE, BAI, *et al.*, 2011). Portanto, em micro colônias os efeitos da altura ou centro são insignificantes para a predição das assinaturas.

2.4.4.6 Desempenho na rotina laboratorial

Diante da oportunidade de análise em tempo real através do instrumento μ BARDOT, (ROBINSON, RAJWA, *et al.*, 2011a) indagaram quanto ao termo “precoce” (*early*) repetidamente utilizado nas publicações ao se referirem ao tempo da identificação das espécies de bactérias e urgência nas respostas, já que dependem de um banco de dados atualizado. A sugestão dada foi de que haveria no mercado de segurança dos alimentos e de bioterrorismo uma necessidade proeminente de resultados imediatos, especialmente para micro-organismos pouco conhecidos ou inéditos. Portanto, as novas espécies encontradas precisariam ser imediatamente adicionadas em banco de padrões a ser distribuído pelo mundo independentemente da localização. O questionamento propôs a medição “in loco” ou no local do controle e o envio de *feedback* (retorno) da informação de uma nova espécie. A nova informação retornada seria alarmada por uma bandeira vermelha para o centro de banco de dados distribuído que, então, definiria a espécie como conhecida ou desconhecida, e a depender da resposta atualizaria o banco de dados.

Simultaneamente, Robinson, Rajwa, *et al.*, 2011b, apresentavam as vantagens e desvantagens do BARDOT ou μ BARDOT. Dentre as vantagens estão a robustez, reprodutibilidade nos resultados, baixo custo, livre de marcadores, análise com resultados em torno de poucos segundos (tempo-real), tempo de cultivo reduzido (12-24h) e ainda, leitura completa da placa sem perdas analíticas, sem destruição da amostra e com contagem e identificação de estirpes, espécies e subespécies. A desvantagem estaria na limitação em análise de apenas micro-organismos cultiváveis, que além disso, apresentem colônias transparentes e com tamanhos nos limites de Rayleigh. Contudo, comparativamente com os demais métodos que em maioria são dependentes de cultura ou marcadores, os pontos fortes são preponderantes aos fracos.

A diversidade de espécies analisadas em pesquisa, até então, estavam incluídas em dois grupos morfológicos, com formas de cocos ou bastonetes sem flagelos. Huff, Aroon, *et al.*, 2012 apresentaram estudos de identificação dos patógenos vibrios *Vibrio*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* presentes em água e frutos do mar. O modelo BARDOT identificou *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* com precisão de 99% e tempo para

resultado entre 1-2 min em culturas puras e provenientes de amostras de águas e ostras. Outra importância foi a análise em placa cultivada por outros meios de cultivo, além do BHI.

Perante os estudos anteriores sobre as plataformas de feedback e distribuição das informações, Bae, Ying, *et al.*, 2012 criaram um modelo portátil para tecnologia BARDOT e realizaram testes de campo com cultivos de cepas puras e de amostras de alimentos. Nessa pesquisa, aplicaram os algoritmos de Zernike e Haralick como descritores das imagens e atingiram resultados entre 95-100% de precisão na classificação das quatro espécies *L. innocua F4248*, *E. coli stbl*, *E. faecium*, and *S. aureus*.

2.4.4.7 Alto desempenho do biossensor

Bae, Patsekin, *et al.*, 2012 publicaram o desenvolvimento de um sistema microbiano high-throughput screening (HTS) via espalhamento elástico da luz, para aumentar a velocidade da triagem das colônias bacterianas, utilizando análise combinatória. Sistemas de calibração e correções foram realizados para corrigir erros e reduzir passos durante a aquisição dos padrões. Três outros programas de software de controle foram implementados para aumento do desempenho. Este trabalho conduziu à alta *performance* do BARDOT, porque através dos teste pelo sistema HTS microbiano foi possível constatar a possibilidade de redução de tempo médio de varredura (4,9 s por colônia) e a capacidade de captura por *screening* de enorme quantidade de padrões (mais de 4000 padrões) do ELS, dentro de um intervalo de tempo de 7 h. Também foram utilizados pseudo-zernike e Haralick como descritores de características.

Duas observações consideráveis foram feitas (BAE, PATSEKIN, *et al.*, 2012, p. 044304-3, tradução nossa) que determinam a precisão necessária ao alinhamento dos feixe laser com a colônia:

Quando a distância entre os centros da colônia e do feixe de laser é superior que o raio da colônia, o laser incidente não gera um padrão de difração a partir dessa colônia”;

Se a distância entre os centro da colônia e a do feixe laser é menor que o seu raio, o laser incidente gera um espalhamento distorcido que requer passos de correção adicionais a fim de um padrão circularmente simétrico.

Em continuidade com seus trabalhos, Kim, Bai, *et al.*, 2013, desenvolveram um analisador óptico integrado que aliou o princípio de triangulação em medidor de deslocamento à laser (*CDM-Laser confocal displacement meter*) com um circuito fotodiodo integrado personalizado (*custom built photodiode*) para melhor descrever os padrões a partir dos efeitos simultâneos de modulação da fase e amplitude pelas colônias. Assim, enquanto o medidor de deslocamento confocal media o perfil de a colônia, o laser examinou a colônia e o fotodiodo mediu a transmissão da intensidade da luz. A fração do laser transmitida através da colônia foi capturado pela objetiva microscópica e pelo circuito fotodiodo personalizado. Esta maneira, os autores mediram simultaneamente as características inerentes ao perfil (fase) e à transmissão (amplitude), e correlacionaram o padrão de crescimento bacteriano com o padrão de espalhamento. Logo, uma nova forma de analisar os padrões de espalhamento foi realizada ao identificar as espécies pelos seus distintos padrões de proliferação bacteriano que estariam correlacionados a diversidade e, portanto, aos específicos efeitos de modulação de fase e amplitude.

Entre outras características de inovação, o instrumento proposto por Kim, Bai, *et al.*, 2013, implementou um conjunto de fotodiodo e um conversor Digital/analógico em lugar da câmera digital. O conjunto de informações foi transmitido ao computador para a análise da imagem. Ainda, um conjunto de lentes objetivas microscópicas foram posicionadas na saída do laser (2 μ m e 670nm) espalhado pela colônia, logo abaixo da placa de Petri. De forma que, as lentes capturavam os padrões e realizavam o foco para um fotodiodo. Este novo instrumento supriu as deficiências do sistema ELS na caracterização simultânea do perfil relacionada às importantes informações sobre as variáveis de crescimento das colônias, tais quais, altura, densidade óptica, relação de aparência e densidade óptica).

O novo sistema confocal foi utilizado conjuntamente ao μ Bardot para investigação dos efeitos de salpicos aleatórios (*speckle*) formados por colônias de bactérias do gênero *Baccillus*, com exceção da espécie *B. polymyxa*(KIM, SINGH, *et al.*, 2014) em EEL (*ELS-elastic light scattering*). O artigo apresentou o primeiro estudo de explicação teórica para a formação dos salpicos gerados pelo espalhamento da luz (laser) sobre colônias de bactérias. Segundo os autores, a

medida em que havia o aumento da rugosidade, o tamanho dos salpicos diminuía e a sua quantidade era aumentada, de tal maneira que os círculos concêntricos eram suprimidos em lugar de uma massa de salpicos aleatórios (*speckle*). Esse comportamento estaria intimamente ligado à rugosidade prevista pelo mecanismo de motilidade por enxameação (*swarming*) na espécie, altamente dependente da viscosidade do meio de cultura e da composição de nutrientes.

A viabilidade da metodologia EEL (Bardot e μ Bardot) também foi testada para meios de cultivos específicos geralmente utilizados em análises de rotinas laboratoriais para avaliação da qualidade dos alimentos. Uma análise detalhada buscou identificar diversos sorotipos de *Salmonella* em meios específicos distintos do BHI, mais comumente testado em pesquisas anteriores (SINGH, BETTASSO, *et al.*, 2014). Os resultados foram de alta precisão para cultivos em meios como BG (verde brilhante/*brilliant green*), XLD (*xylose lysine deoxycholate*) e XLT4 (*xylose lysine containing tergitol 4, a sodium salt de 7-ethyl-2-methyl-4-undecanol hydrogen sulfate*). Outro teste semelhante, revelou precisão em mais de 90% para cultivos de sorotipos de *Escherichia coli* (O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157) em meio de cultivo seletivo, sorbitol *MacConkey* (SMAC)(TANG, KIM, *et al.*, 2014).

Os trabalhos iniciados por Bae e colaboradores para análise de cultivos bacterianos em meios sólidos e semissólidos, diretamente das placas de Petri, por meio do espalhamento elástico da luz e tratamento de dados baseados em imagem, foram a chave que abriu a porta para uma nova geração de biossensores não destrutivos, não invasivos, livres de marcadores e reações bioquímicas e de medição em tempo real. As suas pesquisas tornaram-se, portanto, referência para outros pesquisadores em diversos países.

Somente em 2015, foi realizado o primeiro trabalho direcionado para um novo campo de aplicação da metodologia ELL, as análises clínicas microbiológicas e não somente da perícia em saúde dos alimentos (MINONI, SIGNORONI e NASSINI, 2015). Os autores foram motivados pelas indagações referentes à maior complexidade das amostras de aplicação clínica. Sob o ponto de vista microbiológico, as diferenças compreendem desde a maior variedade de espécies bacterianas (ver quadro 3) em uma mesma amostra até as modificações características de acordo com o tipo de amostra, ampla carga bacteriana e o grau de infecção.

Minoni, Signoroni e Nassini (2015) ressaltaram que as principais dificuldades na medição, estaria em fixar o diâmetro ótimo das colônias (ver quadro 3) ocasionando um problema na delimitação do tempo de cultivo mediante as peculiaridades desse perfil de amostras, sugerindo a implementação de um sistema que independente quanto ao tamanho das colônias. E prover um processo de incubação eficiente. Já que o processo de incubação automatizado seria inadequado para essas amostras.

Neste importante trabalho, os pesquisadores construíram um protótipo manual, automatizável, baseado no BARDOT e analisaram um rol de bactérias consideradas mais impactantes causadoras de infecção urinária em pacientes hospitalizados em UTI. *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Família *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium* e *Yersinia enterocolitica*. Além disso, meios de cultivos como Agar Muller Hinton, CHROMA garby BD, dos fornecedores BD e Biomérieux foram testados nessa pesquisa (quadro 3).

Em contradição com o sistema proposto pelos demais trabalhos em que se referenciam, Minoni, Signoroni e Nassini (2015) sugeriram a independência do sistema óptico de medição em função do diâmetro da colônia e propuseram um novo protótipo em que a adaptação de uma lente objetiva entre o laser e a placa de Petri faria variar o diâmetro do laser adequando-se ao diâmetro da colônia. Nesse caso, ao invés de fixar o tamanho da colônia variando o tempo de cultivo, foi fixado o tempo de detecção. Além disso, os pesquisadores realizaram a mudança da posição da câmera de scattering para compensação das diferenças dos tamanhos das imagens à medida em que as dimensões das colônias eram variáveis. Conforme apresenta a fig. (22).

2.4.4.8 Perspectivas futuras

Em todos os biossensores de medição por espalhamento elástico da luz, como BARDOT e correlatos, a medição somente seria possível sob a condição de transparência do meio de cultivo. Diante disso, Genuer, Gal, *et al.*, 2016, divulgaram

o surpreendente trabalho em que obtiveram padrões de espalhamento de microcolônias cultivadas em meio opaco. Nesse modelo denominado *MICRODIFF system*, com um conjunto óptico modificado, os padrões foram obtidos atrás da frente de difração (backward) em substituição ao padrão para a frente de dispersão (forward). Desta maneira, favoreceu o uso de placas de Petri com meios de cultivos prontos, comerciais.

Não obstante, Genuer, Gal, et al., 2016, compararam resultados de aplicação dos polinômios invariantes de Zernike e momentos invariantes de Fourier-Bessel como descritores de imagem. Os resultados com os segundos descritores foram incrivelmente melhores nessa nova proposta quanto ao tempo de detecção se comparados com os sistemas anteriores em que se inspiraram. Outro fator relevante, foi a aplicação da metodologia em cultivos de análises clínicas.

Os projetos similares desenvolvidos por outros grupos de pesquisa no mundo foram importantes para incrementação de melhorias no sistema de medição para solucionar algumas limitações dos modelos BARDOT e μ Bardot. Observa-se que as alterações posteriores são principalmente de cunho instrumental quanto à física-opto mecânica e às aplicações e interpretações de profundo conhecimento microbiológico, sem os quais os trabalhos estariam inadequados ou mesmo, inviabilizados. Como decorrência, o arcabouço computacional para automação e visão computacional fora geralmente adaptado às evoluções.

Quadro 3. Panorama histórico de espécies bacterianas identificadas pelo método ELL

Bactérias	Meio de Cultivo	Tempo De Incubação	Diâmetro da colônia	Altura do centro das	Diâmetro do Feixe do Laser	Autores
<i>L. grayi</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. Seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i> ,	BHI	18-36h	1,8 a 2,0 mm	0,3 a 0,4 cm	1 mm	BAYRAKTAR, BANADA, et al., 2006
<i>L. grayi</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. Seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i> ,	BHI	24-36h	1.0-1.5 mm	0.1-0.3 cm	1 mm	(BANADA, GUO, et al., 2007)

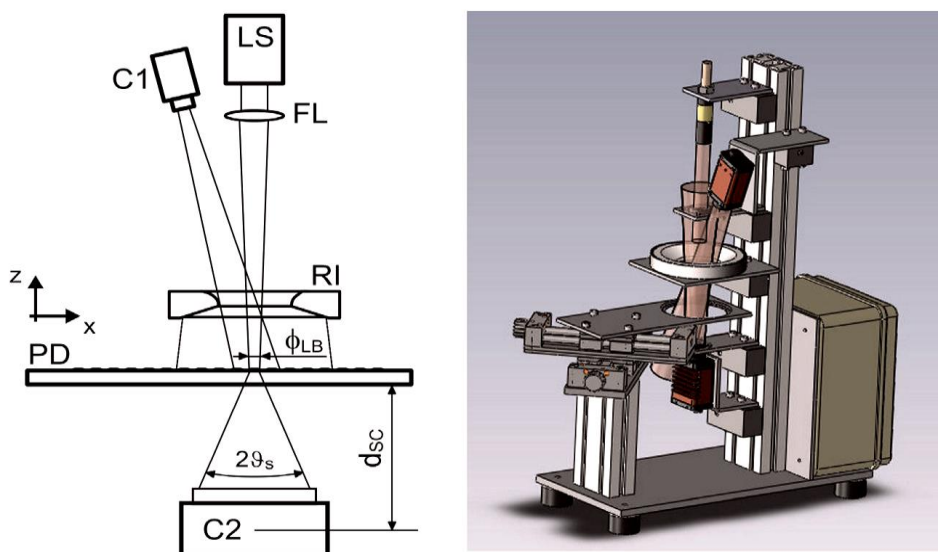
Bactérias	Meio de Cultivo	Tempo De Incubação	Diâmetro da colônia	Altura do centro das	Diâmetro do Feixe do Laser	Autores
<i>L.innocua,L.ivanovii,L.monocytogenes</i>	BHI	15-46h	0,8 – 1,5		1 mm	BAE, BANADA, et al., 2007
<i>Listeria innocua F4248</i>	BHI	30-42 h	1.1-1.5 mm		1 mm	BAE, AROONNUAL, et al., 2008
<i>Listeria innocua, Listeria ivanovii, Listeria monocytogenes</i>	BHI	15-18h 42 h. 24 h 36h	0,3-1,5		1 mm	(BAE, BANADA, et al., 2008)
<i>Salmonella Typhimurium</i>	BHI	6 h	100~200 µm)		< 1mm	(BAI, BAE, et al., 2009)
<i>Listeria innocua F4248</i>	BHI	30-42h	1.3±0.2 mm		1 mm	(BAE, AROONNUAL, et al., 2009)
<i>Listeria, Escherichia, Salmonella, Staphylococcus e Vibrio</i>	BHI	42h; 16h; 16h	1.3±0.2 mm		1 mm	(BANADA, HUFF, et al., 2009)
<i>Salmonella entérica</i>	BHI	12-18h	1.3±0.2 mm		1 mm	(RAJWA, DUNDAR, et al., 2010)
<i>E. coli, Listeria, Salmonella, Staphylococcus and Vibrio</i>	BHI	-	-		1 mm	(AKOVA, DUNDAR, et al., 2010)
<i>Salmonella montevideo</i>	BHI	6,5 h- 9,0 h	300- 900µm		1 mm 100-200µm	(BAE, BAI, et al., 2010)
<i>EcoliDH5 ListeriaF4244</i>	BHI		657 e 684 µm	66-84	1 mm 100- 200µm	(BAI, BAE, et al., 2010)
<i>S.Montevideo, E. coliDH5a L.monocytogenes F4244</i>	BHI	7-9 6,5h- 12	79- 136µm			
<i>V. cholerae, V. parahaemolyticus e V. vulnificus; Vibrios</i>	6h BHI, HI ou TCBS	12h	1.3±0.2 mm		1mm	(HUFF, AROONNUAL, et al., 2012)
<i>Escherichia coli and Listeria.</i>		14 h, 18 h, 22 h, and 26 h				(BAE, PATSEKIN, et al., 2012)
<i>L. innocua F4248, E. coli stbl, E. faecium, and S. aureus,</i>						(BAE, YING, et al., 2012)
<i>E. coli O157: H7) e Staphylococcus aureus ATCC 25</i>	14h BHI		100- 1000 µm		100-200µm	(KIM, BAI, et al., 2013)

Bactérias	Meio de Cultivo	Tempo De Incubação	Diâmetro da colônia	Altura do centro das	Diâmetro do Feixe do Laser	Autores
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 (<i>B. subtilis</i>), <i>Bacillus polymyxa</i> B719W (<i>B. polymyxa</i>), <i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 (<i>B. cereus</i>), and <i>Bacillus thuringiensis</i> DUP6044 (<i>B. thuringiensis</i>)	BHI 16h	6-8 h	550, 750, 900µm		100-200µm	(KIM, SINGH, <i>et al.</i> , 2014)
<i>Salmonella</i> serovars (<i>Enteritidis</i> , <i>Hadar</i> , <i>Heidelberg</i> , <i>Montevideo</i> , <i>Newport</i> , and <i>Typhimurium</i>)	BHI brilliant green (BG) xylose lysine deoxycholate (XLD), and xylose lysine containing tergitol 4, a sodium salt of 7-ethyl-2-methyl-4-undecanol hydrogen sulfate (XLT4)	11-20h	1.1 – 0.2 mm		1mm	(SINGH, BETTASSO, <i>et al.</i> , 2014)
<i>Escherichia coli</i> (O26, O45, O103, O111, O121, O145, O157)	BHI, SMAC, Rainbow, C HROMagar e R&F	10-12h	1.0 +/- 0.3 mm		1 mm	(TANG, KIM, <i>et al.</i> , 2014)
<i>S. agalactiae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> e <i>Yersinia enterocolitica</i>	Agar Muller Hinton (BD) e Biomérieux IICHROMAGarby (BD),	16 h e 24 h,	0,5-2,5 mm		0,1- 5mm	(MINONI, SIGNORONI e NASSINI, 2015)
<i>Candida</i> ATCC 14053, 2001 e 18303; <i>E. coli</i> (ATCC 25922, 35421, 11775 e 8739)	Commercial COSPetri Dishes (Columbia agar +5% sheep blood	6h			30 µm to 100 µm (532nm)	(GENUER, GAL, <i>et al.</i> , 2016)

Fonte: Próprio Autor

(scatterometer, Bardot, μ Bardot e outros sistemas similares) publicadas em artigos científicos.

Figura 22 - Sistema de espalhamento da luz (scatterometer)



Fonte: Retirado de Minoni, Signoroni e Nassini (2015)

LS: laser source; FL: lente objetiva para foco; PD: placa de Petri; RI: anel de iluminação; C1: câmera de imagem de alta definição; C2: câmera de padrão de espalhamento; ϕ_{LB} : diâmetro do laser ajustável; θ_s : ângulo de espalhamento; d_{sc} : distância ajustável da câmera de espalhamento.

Desenvolvido por (MINONI, SIGNORONI e NASSINI, 2015) para análise de padrões de difração de bactérias de interesse nas análises clínicas.

2.5 MOMENTOS INVARIANTES

Uma imagem digital de tamanho $M \times N$ pode ter o momento 2-D de ordem $(p + q)$, definido como (GONZALEZ e WOODS, 2010):

$$m_{pq} = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} x^p y^q f(x, y) \quad (2.12)$$

Em que p e q são números inteiros positivos incluindo o zero.

Nesta definição, o momento central de ordem $(p+q)$ é expresso como:

$$\mu_{pq} = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} (x - \bar{x})^p (y - \bar{y})^q f(x, y) \quad (2.13)$$

Considerando-se que p e q são números inteiros positivos incluindo o zero, temos:

$$\bar{x} = \frac{m_{10}}{m_{00}} \quad \bar{y} = \frac{m_{01}}{m_{00}} \quad (2.14)$$

A normalização dos momentos centrais (n_{pq}) são assim estabelecidos:

$$n_{pq} = \frac{\mu_{pq}}{\mu_{00}^y} \quad (2.15)$$

Em que, para $p+q = 2, 3, \dots$, temos:

$$y = \frac{p+q}{2} + 1 \quad (2.16)$$

2.6 POLINÔMIOS DE ZERNIKE

2.6.1 Definição

Frits Zernike (1888 - 1966), cientista físico e matemático foi ganhador de prêmio Nobel de Física (1953) pela invenção do microscópio de contraste de fase, um novo método para análise de objetos transparentes (ZERNIKE, 1942.). Em seus estudos sobre a óptica não linear (1934), elaborou o sistema de equações

matemáticas para descrever aberrações ópticas de frentes de onda monocromáticas (*wavefronts*) a partir de superfícies geométricas.

As tecnologias que envolvem medição e análise de frente de onda, geralmente com uso de LASERs, utilizam os momentos invariantes de Zernike para caracterizar os padrões de patologias oftalmológicas, por exemplo, em que os erros de uma imagem óptica do olho humano são quantificadas e classificadas (JANKOV, 2002).

Sob a perspectiva das ópticas geométrica e fisiológica, cada polinômio de Zernike representa uma forma geométrica única (ver fig 23), interpretada como uma aberração típica isolada. O exemplo mais usual da aplicação dos polinômios é na classificação de patologias oftalmológicas, como no Desfoco ou ‘esfera’ e Astigmatismo ou ‘cilindro’. Nessa aplicação, o somatório de todos os componentes descreve a aberração total, de maneira que os componentes são descritos variando-se a ordem (JANKOV, 2002).

Os momentos invariantes de Zernike compõem um conjunto de função momento ortogonal integrados dentro de um círculo unitário, ($x^2 + y^2 \leq 1$), e são considerados uma classe complexa de polinômios reconhecidos em óptica geométrica que podem ser descritos como (WANG, MOTTERSHEAD e MARES, 2009):

$$\mathcal{V}_{n,m}(x, y) = \mathcal{V}_{n,m}(\rho, \theta) = \mathcal{R}_{n,m}(\rho)e^{im\theta} \quad (2.17)$$

Onde os índices n e m representam a ordem e a repetição, respectivamente. Os valores de n e m devem atender as seguintes condições:

- n pertence aos números inteiros positivos, tal que $n \geq 0$
- m pertence ao conjunto de números inteiros positivos e negativos, tal que $n - |m|$, $|m| \leq n$, ou seja, a ordem (n) é sempre maior ou igual à frequência (m)
- ρ é o vetor que mede a distância radial normalizada entre 0 e 1 ($0 \leq \rho \leq 1$),
- θ é o ângulo azimutal entre o vetor ρ e o eixo x no sentido anti-horário

A descrição geral dos polinômios radiais $\mathcal{R}_{n,m}(\rho)$ é representada na equação 2.18 como:

$$\mathcal{R}_{n,m}(\rho) = \sum_{s=0}^{(n-|m|)/2} (-1)^s \cdot \frac{(n-s)!}{s! \left(\frac{n+|m|}{2} - s\right)! \left(\frac{n-|m|}{2} - s\right)!} \rho^{n-2s} \quad (2.18)$$

Em que $\mathcal{R}_{n-m}(\rho) = \mathcal{R}_{n,m}(\rho)$

A matemática dos polinômios de Zernike é definida considerando-se a ordem (n) e a repetição ou frequência (m). também podem ser distintos em pares (equação 2.19) ou ímpares (equação 2.20):

$$Z_n^m(\rho, \theta) = \mathcal{R}_n^m(\rho) \cos(m\theta) \quad (2.19)$$

$$Z_n^{-m}(\rho, \theta) = \mathcal{R}_n^m(\rho) \sin(m\theta) \quad (2.20)$$

A óptica geométrica classifica os momentos de Zernike conforme a ordem em polinômios (ver fig.23) de: baixa ordem, $0 \leq n \leq 2$, e alta ordem, com $n > 2$ (JANKOV, 2002; TEAGUE, 1980).

O sistema de equações dos polinômios de Zernike é caracterizado pela ortogonalidade dos polinômios entre si dispostos em estrutura piramidal contidos em um círculo de raio unitário (VON F, 1934). A característica da ortogonalidade é fator precípuo que confere a esses polinômios a não redundância de informação quando aplicadas em análise de imagens. Diferenciando-se dos momentos regulares ou centrados geométricos, a exemplo dos momentos invariantes de Hu (TEAGUE, 1980).

Matematicamente, a ortogonalidade entre duas funções $f(x)$ e $g(x)$ no intervalo $a \leq x \leq b$ existe se o produto interno for igual a zero:

$$\langle f, g \rangle = \int f(x)g(x)dx \quad (2.21)$$

ou

$$\langle f(x)|g(x)\rangle = \int_a^b f(x)g(x)w(x)dx = 0 \quad (2.22)$$

Em que $w(x)$ é função de ponderação.

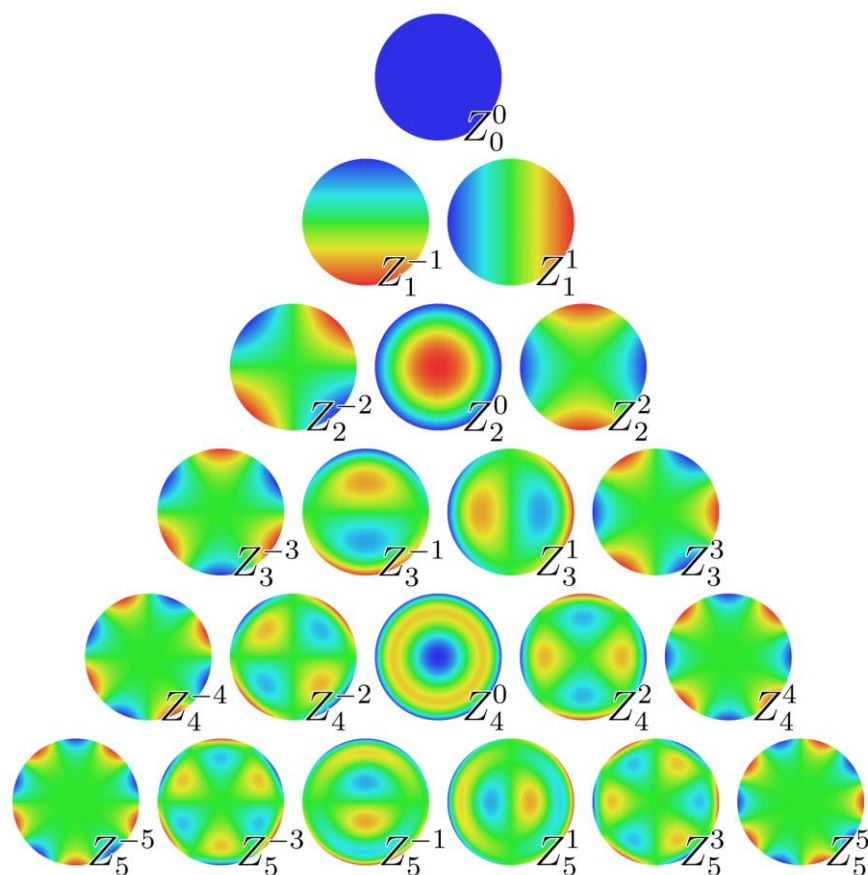
A ortogonalidade entre os polinômios de Zernike pode ser calculada como o produto entre as frações radiais e angulares, expressa na equação 2.23:

$$\int Z_n^m(\rho, \theta)Z_{n'}^{m'}(\rho, \theta)d^2r = \frac{\epsilon_m \pi}{2n+2} \delta_{n,n'} \delta_{m,m'} \quad (2.23)$$

Em que ϵ_m é determinado como $m=0$ e 1 se $m \neq 0$; $d^2r = \rho d\rho d\varphi$; é o Jacobiano do sistema de coordenadas do círculo; $\delta_{n,n'}$ representa o cálculo da ortogonalidade dos polinômios contidos na parte radial e $\delta_{m,m'}$, ortogonalidade polinomial na parte angular.

Nas análises por imagem, os momentos ortogonais de Zernike já foram aplicados para recuperação de imagens baseada em conteúdo, classificação de objetos, reconhecimento de padrões (KIM, SINGH, *et al.*, 2014), modelo de reconhecimento de forma e cognição de elemento finito (WANG, MOTTERSHEAD e MARES, 2009), descrição de formas e margem para a classificação de nódulos de massa em benigno e malignos em mamografias (TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011).

Figura 23 - Apresenta as cinco primeiras ordens de polinômios de Zernike.



Fonte: <http://astro.if.ufrgs.br/telesc/aberracao.htm>

2.6.2 Aplicação como descritores de imagem

Os polinômios de Zernike são amplamente utilizados em visão computacional em que através dos momentos de Zernike é possível mapear uma imagem em um conjunto de polinômios de Zernike complexos (HWANG e KIM, 2006).

Teague(1980) introduziu a teoria geral dos momentos para análise de imagens bi-dimensionais a partir dos polinômios de Zernike, em que revelou como vantagem desses algoritmos, a propriedade de invariância para translação, orientação e tamanho das imagens.

Os momentos de Zernike podem representar as propriedades de uma imagem sem redundância ou sobreposição de informações entre os momentos. Essas características são principais argumentos para seu uso em reconhecimento de padrões (BANADA, HUFF, *et al.*, 2009, HWANG e KIM, 2006, TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011), funcionam, portanto, como descritores de imagem.

Matematicamente, uma imagem pode ser expressada como funções bidimensionais de amplitude (quantidade escalar positiva) ou valor $f(x, y)$, a partir de uma origem (GONZALEZ e WOODS, 2010). A função da imagem é diferente de zero e infinito toda vez que uma imagem for gerada por um instrumento físico (por exemplo: câmeras, filmadoras, microscópios e outras tecnologias), comum às aplicações em visão computacional. Condição em que os valores de intensidade da imagem são proporcionais à energia irradiada, representada como (equação 2.24):

$$0 < f(x, y) < \infty \quad (2.24)$$

A quantidade de iluminação sobre o cenário que está sendo visualizado ou componente de iluminação, $i(x, y)$, e a quantidade de iluminação refletida pelos objetos do cenário ou componente de refletância $r(x, y)$ caracterizam a função. Mas em casos de haver transmissão da luz, é determinada a função de transmissividade $t(x, y)$ (GONZALEZ e WOODS, 2010).

Expressos como:

$$i(x, y); 0 < i(x, y) < \infty \quad (2.25)$$

$$r(x, y); 0 < r(x, y) < 1 \quad (2.26)$$

$$\text{ou } t(x, y); 0 < t(x, y) < 1 \quad (2.27)$$

Considerando-se os componentes de iluminação e refletância, a função da imagem é definida pelo produto dos seus componentes, como:

$$f(x, y) = i(x, y)r(x, y) \quad (2.28)$$

2.6.3 Computação dos momentos de Zernike

Ao menos três etapas determinam a computação dos momentos de Zernike de uma imagem de entrada: computação de polinômios radiais, computação de funções de base de Zernike, e computação de momentos e Zernike da projeção da imagem para a base de funções (HWANG e KIM, 2006; TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011). Contudo, algumas etapas de pré-processamento, como equalização do histograma, suavização, realce ou mesmo invariância à translação e escala das imagens (TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011) podem ser requisitadas anteriormente à etapa de extração de características pelos polinômios.

Os polinômios de Zernike são invariantes somente a rotação, no entanto somente após a primeira normalização das imagens, usando os momentos geométricos regulares é obtida a invariância em relação aos parâmetros de escala e translação (KHOTANZAD e HONG, 1990).

Adotando-se a representação algorítmica para construção de algoritmo computacional dos momentos de Zernike, cada etapa é, em seguida, descrita separadamente (HWANG e KIM, 2006; TAHMASBI, 2011):

2.6.3.1 *Dos polinômios radiais*

Sendo este o primeiro passo para a computação dos polinômios de Zernike para uma imagem de entrada, em que se determina o valor real do polinômio radial 1-D (TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011), como descrita na equação 2.18.:

2.6.3.2 *Das funções de base*

O polinômio de Zernike complexo é dado pela equação 2.17 e satisfaz à condição de ortogonalidade, descrita pela equação 2.30:

$$\int_0^{2\pi} \int_0^1 V_{n,m}^*(\rho, \theta) V_{p,q}(\rho, \theta) \rho d\rho d\theta = \begin{cases} \frac{\pi}{n+1} & n = p, m = q \\ 0 & \end{cases} \quad (2.30)$$

2.6.3.3 Da projeção da imagem para a base funções

Em geral, as imagens geradas por sensores são retangulares (RASHID, 2015), devido ao sensor ser retangular. Embora a lente seja circular. Ao aplicar os polinômios invariantes, a extensão da imagem está delimitada em um espaço de raio entre 0 e 1. Em que, $x \in [-1, +1]$ e $y \in [-1, +1]$. A invariância à rotação dos momentos de Zernike é determinada considerando-se a região de interesse (ROI – Regions of Interest) definida no interior do círculo e toda a região externa ao círculo e que desaparece no processo de descrição da imagem, conforme apresenta a figura 24. Assim, a equação dos momentos complexos de Zernike conforme a ordem (n) e a repetição (m) é definida (TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011) como:

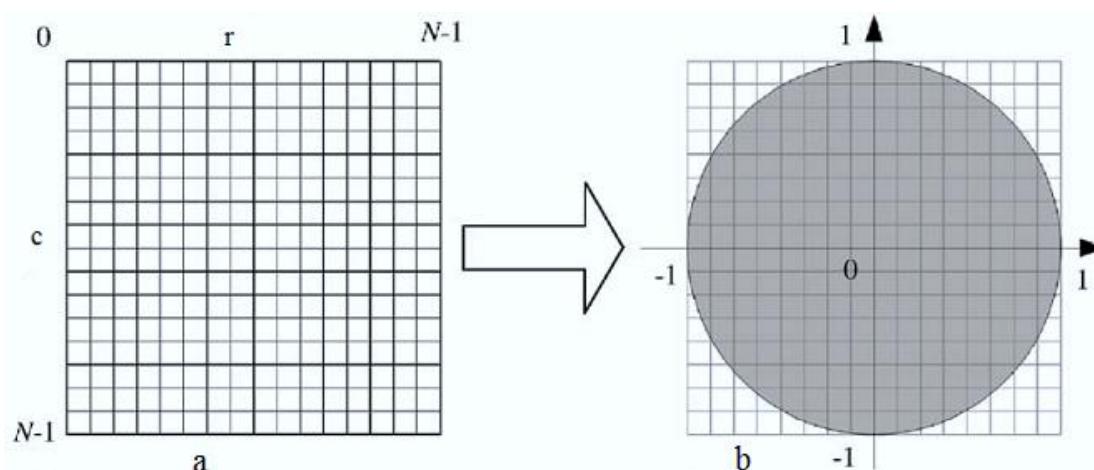
$$Z_{n,m} = \frac{n+1}{\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^1 f(\rho, \theta) V_{n,m}^*(\rho, \theta) \rho d\rho d\theta \quad (2.29)$$

Em imagens digitais os polinômios (equação 2.29) são definidos em somatórios normalizados $[0,1]$. Assim, em imagens digitais a determinação dos momentos assume a forma:

$$\begin{aligned} Z_{n,m} &= \frac{n+1}{\lambda_N} \sum_{c=0}^{N-1} \sum_{r=0}^{N-1} f(c, r) V_{n,m}^*(c, r) \\ &= \frac{n+1}{\lambda_N} \sum_{c=0}^{N-1} \sum_{r=0}^{N-1} f(c, r) R_{n,m}(\rho_{cr}) e^{-jm\theta_c} \end{aligned} \quad (2.30)$$

Onde, λ_N é um fator de normalização, $0 \leq \rho_{c,r} \leq 1$, e $f(c,r)$ é a função da imagem transformada, sendo $\rho_{c,r}$ e $\theta_{c,r}$ a distância transformada e a fase, respectivamente, do pixel (c,r) da imagem apresentados nas equações 2.34 e 2.35 abaixo. Sendo que c e r são respectivamente, o número da coluna (*column*) e da linha (*row*) da imagem, de acordo com a representação abaixo (fig.24).

Figura 24 - Apresenta o mapeamento da imagem normalizada [0,1].



Fonte: Adaptado de Hwang e Kim, 2006.

Em que r e c representam linha e coluna, respectivamente. Os pixels representados na porção externa aos círculos não são computados para os polinômios de Zernike da imagem. A imagem digital de tamanho $N \times N$ ou $f(c,r)$ em (a) e (b) a imagem mapeada dentro do círculo unitário ou $f(\rho,\theta)$.

Continuando, para $f(\rho, \theta)$, a computação do vetor que mede a distância radial normalizada ($\rho_{c,r}$) e a fase do pixel ($\theta_{c,r}$) é assim definida:

$$\rho_{c,r} = \frac{\sqrt{(2c - N + 1)^2 + (2r - N + 1)^2}}{N} \quad (2.31)$$

$$\theta_{c,r} = \tan^{-1} \left(\frac{N - 1 - 2r}{2c - N + 1} \right) \quad (2.32)$$

2.6.4 Custo computacional

Os trabalhos de uso dos momentos de Zernike como descritores de imagens revelam elevada precisão. Apesar da maior demanda de tempo para resultados computacionais alguns trabalhos têm evoluído o modelo, propondo expansões para expressão de resultados em tempo-real (HWANG e KIM, 2006).

Segundo, Teague (1988) quando aplicadas ao processamento de imagens, as propriedades dos polinômios invariantes diferenciam-se segundo a ordem (n) obtendo-se interpretações distintas entre aqueles conhecidos como de baixa ordem e de alta ordem. O autor afirma que os polinômios de primeira ordem ($0 \leq n \leq 10$) funcionam para a localização do centroide da irradiação distribuída no plano da imagem, enquanto que os momentos de segunda ordem definem o tamanho e orientação da imagem.

Além disso, a sensibilidade ao ruído será menor com a redução da ordem do momento apesar de momentos com elevada ordem serem favoráveis a captação de informações de detalhes finos de uma imagem (BAYRAKTAR, BANADA, *et al.*, 2006). Esta última condição é importante no processo de visão computacional direcionada ao reconhecimento de padrões.

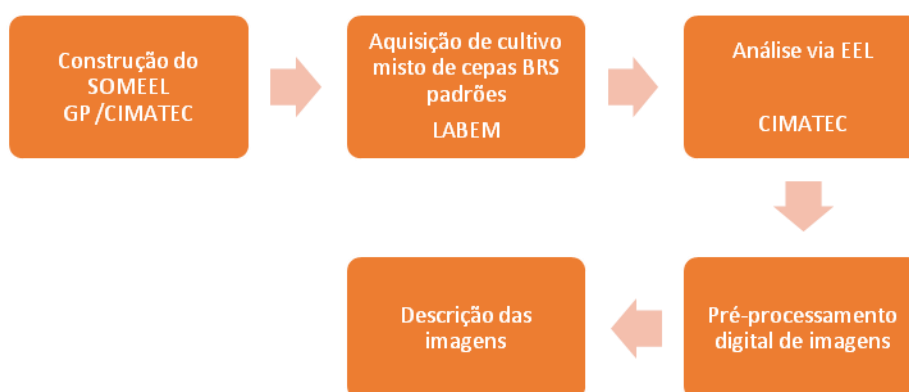
3. MÉTODOS E TÉCNICAS DA PESQUISA

3.1 ABORDAGEM METODOLÓGICA

Este trabalho baseia-se em pesquisa empírica, quali-quantitativa que consta em aplicar a teoria escalar da difração e a técnica do espalhamento elástico da luz para detecção de bactérias redutoras de sulfato presentes em água de produção de poço petrolífero. O desenvolvimento da pesquisa envolve as etapas de: construção de um sistema óptico de medição por espalhamento elástico da luz (SOMEEL), análise de bactérias redutoras de sulfato pelo SOMEEL e o processamento digital de imagens com a aplicação dos polinômios invariantes de Zernike. O resultado final deverá indicar as condições de viabilidade para identificação desse grupo bacteriano pela metodologia, apresentando possíveis soluções.

Este projeto integra um projeto mais amplo que consiste em construir um protótipo do instrumento óptico da técnica EEL para medição de bactérias de diversas espécies, em várias áreas que admitem o controle microbiológico. A partir do momento em que se delimitou o grupo alvo de bactérias, foi elaborado o fluxo de trabalho que se iniciou com a identificação de bactérias BRS de um poço de petróleo e conclui-se com a extração de fatores, como segue na figura 25.

Figura 25 - Diagrama de fluxo para identificação de BRS em cultivo misto por SOMEEL



Fonte: Próprio autor (2016)

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Delimitação do grupo de bactérias

A escolha do grupo de bactérias para teste de viabilidade de análise pelo SOMEEL ocorreu mediante revisão de literatura sobre o controle de micro-organismos na indústria do petróleo e gás, utilizando as palavras-chave: microbiologia do petróleo, biocorrosão, identificação de bactérias redutoras de sulfato. Utilizou-se as plataformas de pesquisa: periódicos Capes, Bireme e LibGen; adotou-se o seguinte referencial teórico: Popoola (2013), Almeida (2006), Ollivier (2005), Trabulsi e Alterthum (2004).

Adotou-se a visita técnica às Instituições e laboratórios para agregar conhecimento em torno da microbiologia do petróleo, dentre as quais estão:

Universidade Petrobrás para compreensão à cerca da importância da técnica EEL para o biomonitoramento na Indústria de Petróleo, Gás e Biocombustíveis foram realizadas contribuindo para a escolha do grupo de bactérias alvo de pesquisa, as BRS;

Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Senai/Cetind para atualização do conhecimento sobre a prática laboratorial em microbiologia, meios de cultivo e métodos analíticos instrumentais;

A delimitação das bactérias alvo de pesquisa ocorreu considerando os aspectos morfológicos como circularidade, diâmetros das colônias; as características de cultivo a exemplo do meio de cultivo, tempo de cultivo, facilidade de cultivo e a importância para o biomonitoramento da indústria. Após delimitado para o grupo BRS, realizou-se uma vasta pesquisa literária para seleção das espécies mais monitoradas na indústria e àquelas que seriam mais facilmente cultivadas; seguindo-se do levantamento de coleções de micro-organismos e de fornecedores de cepas padrões de BRS como dos gêneros *Desulfotomaculum* e *Desulfovibrios*;

A seguir, foi realizada uma parceria com o Laboratório de Biotecnologia e Ecologia dos Micro-organismos (LABEM) na UFBA. Através dessa parceria foi adquirida uma placa de Petri contendo cultivo de bactérias redutoras de sulfatos cultivadas em a partir de amostra de águas de produção de poço de Taquipe,

ressaltando-se que todas as etapas de cultivo (figura 26) foram realizadas pelo LABEM. Os experimentos e informações a seguir.

3.2.2 Amostras

Para o presente estudo foi utilizado o cultivo em placa de Petride BRS desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos (LABEM), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), a partir de cepas isoladas de fluido de reservatório de Campo Petrolífero, poço de Taquipe. As cepas utilizadas neste trabalho fazem parte da coleção de microrganismos depositados no LABEM.

3.2.3 Cultivo de BRS

As cepas isoladas foram reativadas em meio Postgate modificado (tab.4) contido em frasco de penicilina purgado com nitrogênio para expulsão do oxigênio, vedados com tampas de butila e lacre, esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Adicionou-se 1 ml da cultura em cada frasco contendo 9ml do meio, sob condições de ambiente anaeróbico e incubadas simultaneamente a 38 ° C por 48h em estufa bacteriológica. Em seguida, foi realizado repique de cada cultivo e diluições decimais seriadas até 108. Procedeu-se a etapa de isolamento das colônias inoculando-se 100 µl de cada diluição em meio Postgate (tab. 4) solidificado com acréscimo de 2% ágar bacteriológico em câmara de anaerobiose (BACTRON) e incubado a 38° C por cerca de 48h, conforme apresenta o fluxograma na figura 26.

A placa de cultivo adquirida foi mantida em armazenamento refrigerado no LABEM por 21 dias e 03 horas em temperatura ambiente para eliminação do efeito de condensação da água. No momento do experimento com o SOMEEL o meio de cultivo apresentava uma altura de aproximadamente 1cm, cor amarelo claro, translúcido, sem gotículas de água ou umidade. As colônias cresceram na superfície do meio de cultivo, característico da técnica de plaqueamento por espalhamento ou

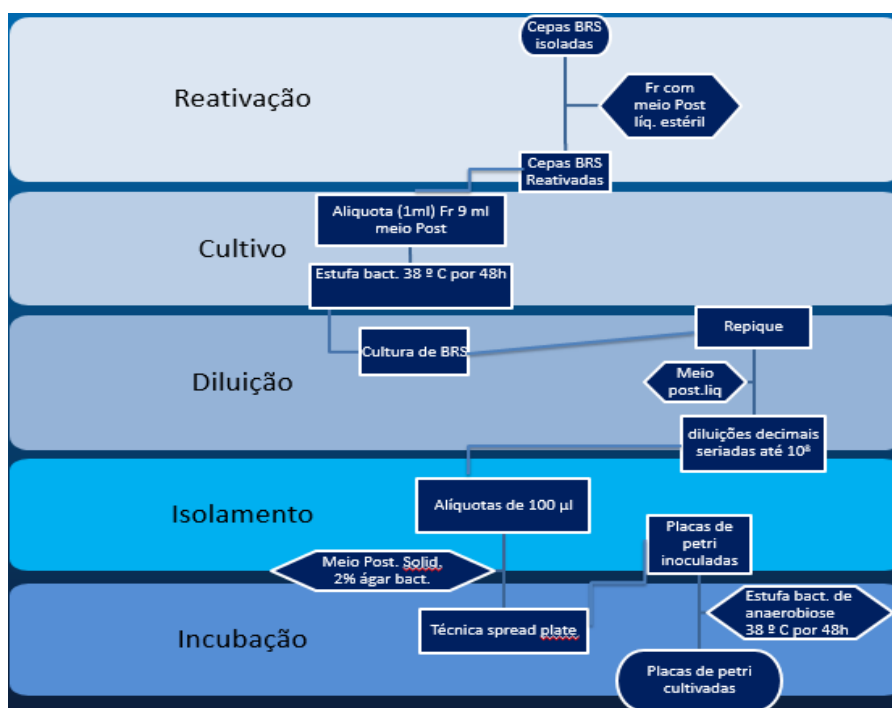
spread plate. Um total de 28 colônias de BRS foram adquiridas na cultura, das quais cinco foram selecionadas para a análise no laboratório de Fotônica.

Tabela 4 - Composição do meio Postgate modificado.

Substâncias	Quantidade	Concentração
Cloreto de Sódio(NaCl)	15g	1,5%
Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,5g	0,05%
Cloreto de amônio(NH ₄ Cl)	1,0g	0,1%
Sulfato de sódio(Na ₂ SO ₄)	1,0g	0,1%
Cloreto de cálcio(CaCl ₂)	1,0g	0,1%
Cloreto de Magnésio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	1,83g	0,183%
Extrato de levedura	1,0g	0,1%
Ácido ascórbico	0,1g	0,01%
Tioglicolato de sódio	0,0129g	0,0013%
Citrato de sódio	6,38g	0,638%
Lactato de sódio	1,75mL	0,175%

Fonte: Próprio autor (2016)

Figura 26 - Fluxograma de cultivo de BRS realizado pela equipe do LABEM apresentado no Workshop anual de avaliação do PRH 55 2016



Fonte: Próprio autor (2016)

3.2.4 Características morfológicas

A seleção das colônias de BRS cultivadas em placa de Petri ocorreu mediante análise qualitativa a olho nu da morfologia e por meio de lente de aumento. Foram consideradas para a análise pelo SOMEEL as colônias que apresentaram circularidade, diâmetros entre 0,5 e 1,0 cm (figuras 29 e 30). Os conglomerados de colônias, as colônias sobrepostas ou muito próximas e as colônias parcialmente degradadas foram desconsideradas para a análise no sistema óptico.

3.2.5 SOMEEL

A construção do sistema óptico foi baseada em revisão de literatura e foi construído com base nos modelos desenvolvidos nos trabalhos de Bae (2008), Banada (2007) e Buzalewicz (2014). Em torno de oito experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Óptica e Fotônica para desenvolvimento do protótipo óptico visando a promoção do espalhamento elástico da luz pelas colônias de BRS. Envolvendo, inclusive, testes com bactérias aeróbias e anaeróbias de amostras de alimentos e efluentes. Os experimentos relativos ao sistema são apresentados no item Experimentos.

Utilizou-se as plataformas de pesquisa, periódicos Capes, Bireme, e sites específicos como da Institut Purdue, SPIE, LibGen, para a pesquisa de referências, através das palavras-chave: métodos ópticos de identificação de bactérias, LASERs ópticos, *elastic light Scattering*, Bardot, *Scatterograms*; estudos auto didáticos acerca do tema foi realizado adotando-se o seguinte referencial teórico sobre princípios físicos de difração, lasers e instrumento de medição de bactérias via EEL: Bai (2009) Banada, Guo, et al.(2007), Bae (2012b), Bayraktar (2006), Buzalewicz, Wieliczko E Podbielska (2011,2014), Robinson, Rajwa et al.(2008).

3.2.5.1 *Teste com laser*

A metodologia constou em incidir o laser sobre um corpo esférico translúcido. O teste foi realizado com um material não biológico. Um sistema a laser foi montado em bancada óptica para os testes iniciais com o laser.

Uma lâmina de vidro hematológica foi preparada com gotículas de material polimérico transparente para os testes com o laser. As gotículas foram dispostas entre si evitando a sobreposição e atingindo diâmetros de aproximadamente ≥ 1 mm. Após as gotículas estarem solidificadas foram conduzidas ao teste com laser.

O sistema simples incluindo laser de diodo (Thorlabs, modelo CPS 180) de 635 nm de comprimento de onda (zona do vermelho), potência de 1mW e diâmetro de 4mm foi montado em bancada óptica. Dois espelhos foram posicionados para direcionamento do LASER no caminho óptico. Uma íris foi colocada para centralização do laser. Após a íris foi adicionada uma lente com a função de reduzir o diâmetro do feixe do Laser. O laser foi posicionado em linha paralela ao caminho óptico de leitura da placa. A centralização do laser foi avaliada por meio de um anteparo ou régua óptica específica para a função fornecido pela Thorlabs. O sistema é apresentado na fig. (27).

3.2.5.2 *Foco e iluminação da placa de Petri*

Testes para captura de imagem da placa inteira e localização de cada colônia bacteriana foram realizados com colônias de espécies bacterianas monitoradas em alimentos, conforme a figura 27, cultivadas no laboratório de microbiologia de alimentos cedidas pelo Senai/Cetind.

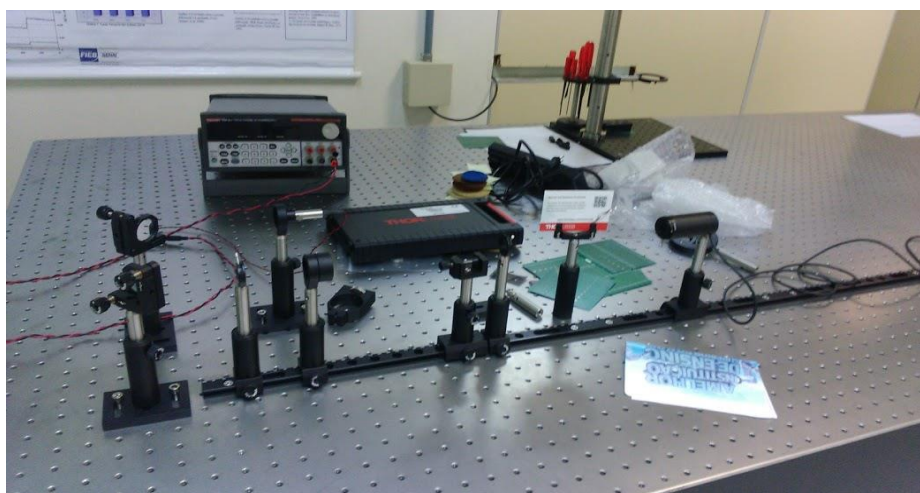
Placas de cultivo do gênero *Salmonella* spp., *Proteus* spp. cultivadas em meio BHI e culturas mistas de bactérias anaeróbias presentes em águas efluentes cultivadas em meio Tripse Soy Agar (TSA) foram, gentilmente, cedidas pelo laboratório de microbiologia de alimentos, Senai/Cetind. Os meios apresentaram coloração amarelada. As colônias de *Salmonella* spp. apresentaram coloração róseo-avermelhado, bem como algumas colônias do cultivo misto. Outros cultivos apresentaram colônias sem pigmentação.

O desenvolvimento do experimento contou com a participação dos mestrandos Roberto Espinheira (engenheiro eletricitista); Tatiara L.R da Silva (farmacêutica) e da orientadora Valéria L. da Silva (Dra. em Física).

O experimento foi realizado montando um sistema para captura de imagens das placas de Petri na posição vertical (montagem ao fundo da Figura 27). Em um suporte foi adaptados uma garra com uma base de apoio vasada para a placa de petri, na posição acima da placa foi posicionada uma webcam para notebook da Microsoft, modelo Lifecam HD-6000, utilizada para fotografar as colônias cultivadas em placas de Petri. A câmera foi conectada via cabo USB a um notebook para captura através de software específico. As distâncias do sistema são: distância entre a placa de Petri e a câmera (d) é de aproximadamente 12 cm; altura entre a câmera e a base do suporte de 13,5 cm, a altura total do sistema em torno de 25,5 cm.

Inicialmente foram utilizados papéis do tipo ofício branco e papel cartolina preto para avaliar o quanto a coloração do fundo do suporte implica na visualização das colônias. Com ambos os papéis de fundo foram avaliados a iluminação da placa incidindo luz branca a partir de uma lanterna de LED luz branca. Nessa etapa, foram fotografadas as imagens considerando iluminação direta acima, abaixo e lateral às placas. Nas três condições foram consideradas cultivos com colônias pigmentadas e não pigmentadas.

Figura 27- Sistema de alinhamento do LASER 635nm



Fonte: DA SILVA, DA SILVA e SENNA, 2015

3.2.5.3 Anteparo

Ao menos seis tipos de materiais foram selecionados para o teste de escolha do anteparo. Um deles em plástico e os demais em papel. Todos em tons de branco.

Placas cultivadas com cultivo misto de bactérias anaeróbias provenientes de águas efluentes que haviam sido utilizadas no experimento 03 e armazenadas em geladeira, foram colocadas em temperatura ambiente até eliminação das gotículas de águas. As placas que apresentaram umidade no meio de cultivo foram desconsideradas para a análise.

Os materiais foram testados individualmente quanto à capacidade de promover melhor transferência da imagem formada na frente para o verso do anteparo. Características como brilho, contraste, textura, ruídos e distorções acrescentados à imagem capturada foram observados.

3.2.5.4 Câmara escura e Protótipo Óptico

Uma caixa escura com material de isopor foi construída, com as faces externas e internas cobertas de papel cartolina fosco, preto (fig. 28). Uma tampa superior e frontal foi elaborada para facilitar o manuseio durante a leitura das placas de Petri, sem comprometimento do isolamento total da luz.

3.2.6 Teste dos meios de cultivos

Este experimento consistiu em adquirir placas de Petri de vidro e de plástico com diferentes meios de cultivos para com o laboratório de microbiologia dos alimentos (Senai/Cetind). As placas foram dos diferentes meios de cultivo: Triple Sugar Iron (TSI agar: ágar açúcar/ferro), Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar: Ágar de Desoxicolato-lisina-xilose), Lysine Iron Agar (LIA agar: Ágar Lisina Ferro), Trypticase Soy Agar (TSA agar: Ágar Triptico de Soja), Hektoen Enteric Agar (HE agar: Ágar Hektoen Entérico).

O sistema utilizado nessa etapa foi o da Figura 27. Também foram repetidas as etapas de alinhamento e centralização do laser conforme o experimento do teste com laser óptico, anteriormente descrito.

As placas foram posicionadas no caminho ótico do laser observando a transmissão da luz do laser. Em seguida, foram analisadas as características de opacidade, estriação e humidade em meios de cultivo semissólido sem cultura bacteriana, avaliando a transmissão da luz e efeitos de difração.

3.2.7 Padrões de difração de BRS

Um laser de diodo (Thorlabs, modelo CPS180) operando em 635nm e 4mm de diâmetro, com potência de 1 mW foi utilizado para iluminar algumas das colônias de bactérias cultivadas numa placa de Petri fixada num estágio de translação x-y. O laser foi posicionado em linha paralela ao eixo do caminho ótico. Dois espelhos paralelos dispostos em posição cruzada perpendiculares entre si e uma íris foram utilizados para auxiliar no alinhamento e direcionamento do laser. Em seguida, uma lente óptica foi usada para maior colimação do laser. O feixe de laser passa por um orifício de 2 cm de diâmetro localizado no centro da bandeja circular, adaptada em um estágio de translação x, y, ambos posicionados verticalmente ao eixo do laser. A função da bandeja é funcionar como suporte para a placa de Petri que contém o cultivo bacteriano em análise.

As placas de Petri são de material plástico, polipropileno, transparente que permite a passagem da luz. Compõem-se de duas partes: a base e a tampa. Todas as placas foram analisadas com a tampa, padronizando a posição da base em contato direto com a bandeja de fixação. A placa de Petri com cultivo de BRS utilizada foi de 0,80 cm de diâmetro e 0,2 cm de altura total.

O alinhamento do laser, a localização e a centralização das colônias foram realizadas de forma manual, não automatizada. Ao posicionar o laser sobre cada colônia, foi realizado o ajuste fino para se atingir o ponto ótimo de centralização laser/colônia observando a imagem formada.

Uma vez que o laser é centralizado sobre a colônia, iluminando-a, ocorrem os fenômenos da difração e espalhamento elástico do feixe de laser, gerando um

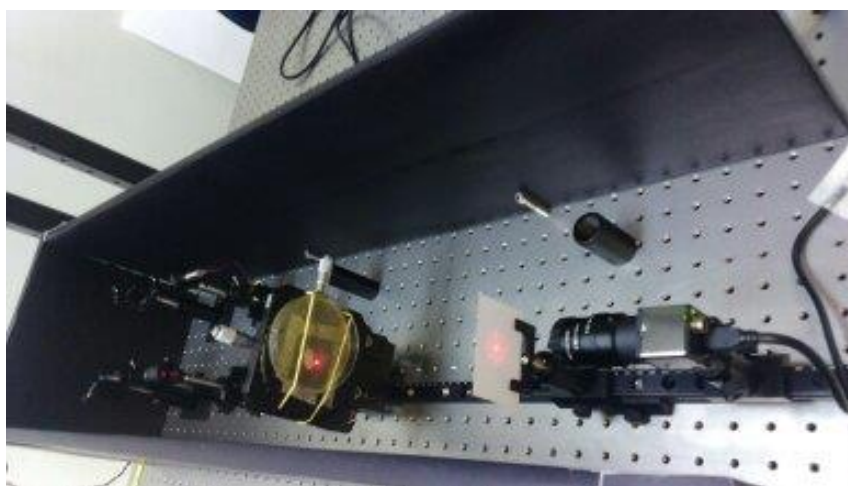
diagrama de difração, facilmente observado por meio de um anteparo. Os padrões de difração variam com a morfologia das colônias que se diferenciam entre as espécies bacterianas.

O anteparo constituiu-se de um papel branco de ofício translúcido com gramatura de 56 g/m², que permite a transmissão do diagrama de difração projetado à frente do anteparo para trás do anteparo. De tal maneira que o diagrama de difração formado no verso do papel foi considerado para a captura da imagem. Apesar da formação da imagem no anteparo gerar uma imagem com ruído e degradação da resolução da imagem do padrão de difração, essa abordagem permitiu a flexibilidade necessária para os estudos iniciais.

Os padrões de difração projetados para o verso do anteparo foram capturados por uma câmera monocromática com 1280x1024 pixels (Thorlabs, modelo DCU224M) com uma objetiva de 12mm (Thorlabs, modelo MVL12M23), posicionados a uma distância de 2 cm em relação ao anteparo.

Todo o sistema óptico de medição (fig.28) foi montado em linha horizontal sendo fixadas as posições e distâncias dos componentes durante o teste com a placa de cultivo de BRS. A íris para alinhamento do laser foi mantida com abertura máxima. A melhor posição do anteparo foi definida conforme os tamanhos do diâmetro de difração distintos entre os variados diâmetros das colônias. A objetiva acoplada à câmera permite ajuste manual de foco e abertura da íris da objetiva.

Figura 28 - A detecção de BRS pelo SOMEEL.



Fonte: Próprio autor (2016)

A placa de Petri está na bandeja de fixação e a colônia é iluminada pelo laser 635nm. O diagrama é formado no anteparo

3.2.8 Processamento digital de imagens (PDI)

As etapas de processamento digital de imagens de difração correspondem às análises quantitativas dos diagramas de difração provenientes da iluminação de colônias de BRS. O desenvolvimento do PDI seguiu as propostas dos trabalhos desenvolvidos de Banada, Guo, *et al.*(2007), Bae (2008) e Buzalewicz (2014). Portanto, a técnica de descrição de imagens e o software para processamento digital de imagens foram definidos pautados nas pesquisas que desenvolveram o Bardot e outros estudos similares. Um fluxograma de atividade foi seguido na fase de capturas de imagens e PDI, ver figura 31.

Foi realizada revisão de literatura em plataformas científicas: periódico Capes, Bireme, LibGen e por sites específicos. Foram adotadas as palavras-chave: polinômios invariantes, óptica adaptativa, polinômios invariantes de Zernike, *scatterograms*, Bardot, processamento digital de imagens, extração de características. Selecionando para referencial teórico desta etapa os autores: (citar os autores).

O cumprimento da fase de produção de resultados de PDI dos diagramas de difração obtidos se deu principalmente devido aos estudos auto didáticos realizados para aprendizado sobre processamento digital de imagens, processamento digital de imagens em Matlab, polinômios invariantes de Zernike e aplicação dos polinômios invariantes de Zernike para extração de fatores de imagens. Nesta fase, também foram realizadas a busca e a escolha do algoritmo computacional através do site MathWorks.

As ferramentas de PDI utilizadas foram, o software adquirido pela Thorlabs fornecedora da câmera CMOS DCC3240M, Image J (*Image Processing and Analysis in Javae* MATLAB Starter Application, R2015a, MathWorks®).

O PDI ocorreu em dois blocos, de análise computacional da qualidade das imagens e descrição das imagens. Os processos computacionais de ambos foram independentes entre si, adotando-se etapas distintas de pré-processamento e softwares específicos, Image J e Matlab, respectivamente. As análises computacionais realizadas pelo programa Image J não interferiram na computação dos polinômios de Zernike para descrição dos diagramas de difração por meio do software MATLAB, no entanto seus resultados foram importantes para a delimitação

de imagens em que foram avaliados os momentos invariantes. O método computacional será apresentado a seguir.

Ao final do PDI, foram promovidas sessões de co-orientação para interpretação e discussão dos resultados obtidos do processamento digital de imagens.

3.2.8.1 Análise computacional com Image J

Análise computacional da qualidade das imagens e etapas de pré-processamento dos diagramas de difração. Para o estudo foi utilizada a ferramenta Image J (*Image Processing and Analysis in Java*) (Sobre o software: ImageJ Image Processing and Analysis in Java) para analisar as cinco colônias de BRS e o meio de cultivo considerando características do Histograma, aplicação de filtros, e análises de superfície através das ferramentas *Surface Plot* e *Surface Plot Lire Lute Mesh 3D*.

Das cinco colônias de BRS de espécies desconhecidas e do meio de cultivo foram capturadas um total de 27 imagens (ver apêndice). Após a avaliação qualitativa das 27 imagens capturadas foram descartadas as quatro primeiras imagens da colônia um. As 23 imagens (1280X1024) e intensidade de 8bits, foram segmentadas definindo-se a região de interesse (ROI) pelo software Image J e posteriormente foram analisados os parâmetros a partir das ferramentas computacionais do próprio software (ver quadro 4). A fim de apresentação dos resultados foi selecionada uma imagem representante de cada colônia e uma do meio de cultivo.

Testes comparativos com os padrões de difração representantes de cada colônia foram realizados aplicando-se a equalização e normalização do histograma nas respectivas ROIs e a análise Mesh da imagem equalizada, a fim de avaliar as alterações possíveis na qualidade do PDI dos padrões de difração.

Quadro 4 – Seleção de Imagens Capturadas

Colônia	Imagens capturadas (MxN)	Image J
Um	8	4
Dois	4	4
Três	4	4
Quatro	4	4
Cinco	4	4
Meio de Cultivo.	3	3

Fonte: Próprio autor (2017)

3.2.8.1 Descrição de Imagens

A descrição das imagens foi mediante a aplicação computacional dos polinômios de Zernike. O software de escolha para esse estudo foi o MATLAB Starter Application, R2015a, MathWorks®. Os algoritmos computacionais utilizados para aplicação dos polinômios Zernike em imagens foram adaptados a partir dos momentos de Zernike (*ZernikeMoments*) (TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011) *toolboxes custom manage*, Matlab.

A partir do *toolboxes custom manage*, Matlab (TAHMASBI, FATEMEH e SOUKOUHI, 2011), foi incrementada a automatização dos algoritmos computacionais escrevendo um novo *script* que unificou e adaptou as etapas de computação dos polinômios de Zernike para a finalidade desse estudo (ver apêndice).

Nessa fase da pesquisa, foram avaliadas quatro imagens da colônia um. A análise dos momentos de Zernike dos padrões de difração foi definida em duas etapas: pré-processamento e outra de análise com descritor de imagens.

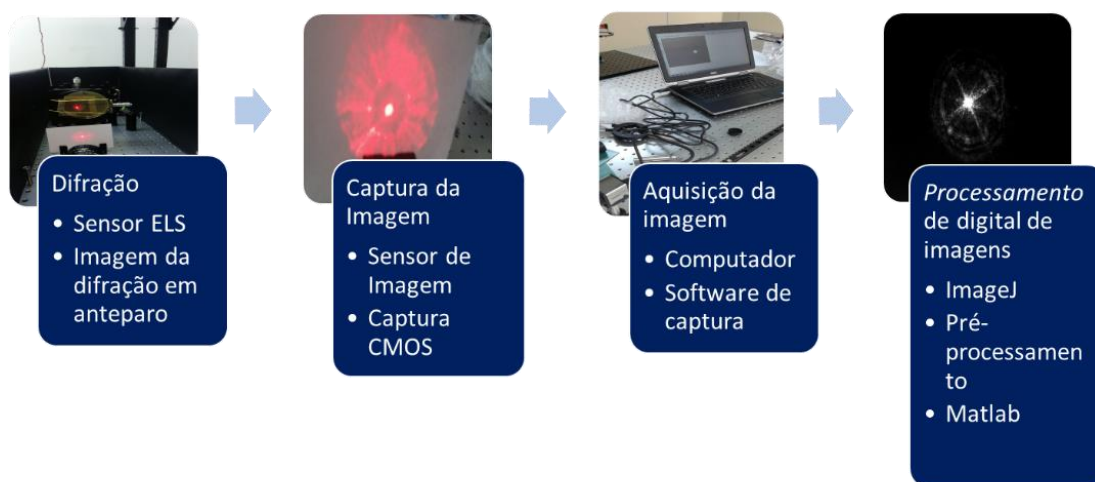
Na etapa de pré-processamento, as imagens (1280X1024) selecionadas após análise computacional pelo Image J, foram recortadas retirando as partes que apresentavam o suporte do anteparo. Posteriormente, todas as imagens foram dimensionadas para o tamanho (447x640) para assim serem descritas computacionalmente pelos algoritmos de Zernike.

A descrição foi realizada para as imagens de difração da colônia um considerando os estudos sobre os seguintes parâmetros: invariância à rotação e as magnitudes ou amplitudes dos momentos de Zernike.

Para a análise de invariância à rotação e definição dos momentos de Zernike foram considerados os valores de m e n que melhor avaliam as bordas e os centros das imagens considerando a representação matemática de Zernike em que os valores próximos de zero se aproximam do centro do círculo unitário. O total de nove ordens (n,m) foram computadas para determinação das amplitudes (A) dos momentos de Zernike das imagens de difração iniciando pela análise do centro para as bordas.

Um fluxograma das atividades é apresentado na figura (29).

Figura 29 - Diagrama de fluxo de trabalho experimental para detecção de BRS com uso do SOMEEL



Fonte: Próprio autor (2016)

Considerando as etapas ii (Difração e captura da imagem) e iii (Aquisição da imagem e PDI) a partir de cultivo misto de BRS de água de produção do Poço de Taquipe. Um teste computacional adicional comparativo foi incrementado a etapa de PDI, em que uma breve análise de qualidade de imagem foi realizada levando em consideração o efeito do contraste da imagem, a partir das análises dos histogramas.

Foram delimitadas pelo Image J as ROIs dos padrões de difração imagens representantes de cada uma das colônias de BRS e do meio de cultivo. A partir desse ROI foram salvam duas imagens considerando o ROI sem e com equalização

e normalização como arquivos BMP. A ROI foi equalizada com saturação de 0,3% dos pixels da imagem. Todas as imagens ROIs foram automaticamente centralizadas em uma imagem de tamanho (1280X1024).

As ROIs equalizadas e normalizadas foram computacionalmente rotacionadas à 90° à direita com uso do software Image J e salvo em BMP. Os arquivos de imagem dos ROIs em BMPs, resultantes da segmentação e processamento pelo Image J, foram posteriormente descritos computacionalmente pelos polinômios invariantes de Zernike com uso do MATLAB Starter Application, R2015a, MathWorks®. Os resultados foram comparados com os obtidos na etapa anterior em que houve segmentação independente entre os softwares Image J e Matlab, quanto a variação dos valores de amplitude com rotação física e rotação computacional. Nessa etapa foi escolhida uma ordem e frequência, $n=4$ e $m=0$, para cálculo da função de Zernike.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

No total de cinco colônias foram analisadas quanto a capacidade de gerar espalhamento elástico da luz LASER e de fornecer diagramas de difração.

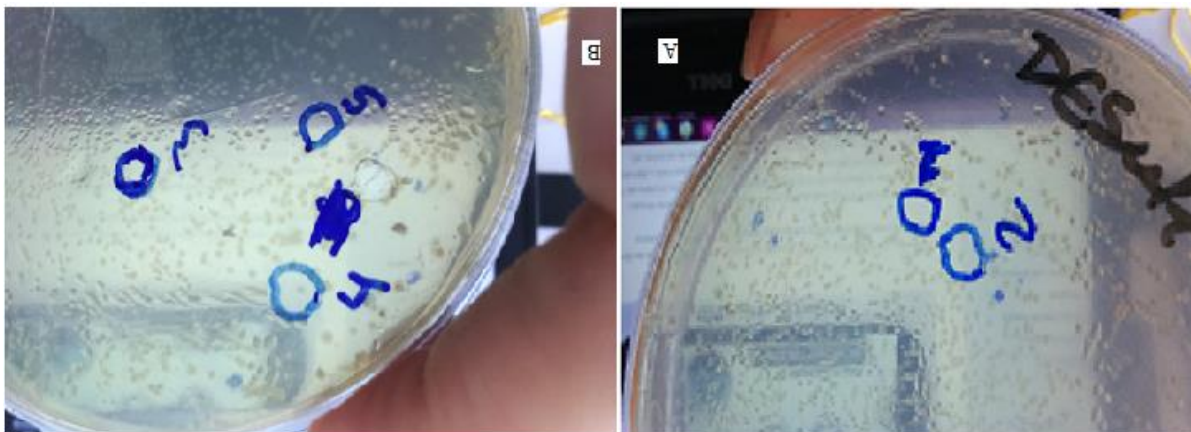
Figura 30 - Fotografia da Placa de Petri com cultivo de Bactérias redutoras de sulfato em meio Postgate modificado.



Fonte: Próprio autor (2016)

As BRS foram cultivadas a partir de amostra de águas de produção do poço petrolífero de Taquipe pelo LABEM. A numeração anotada na placa refere-se às cinco colônias selecionadas para análise no SOMEEL.

Figura 31 - Fotografias da placa de Petri apresentando as colônias selecionadas para análise conforme características de circularidade e diâmetros.

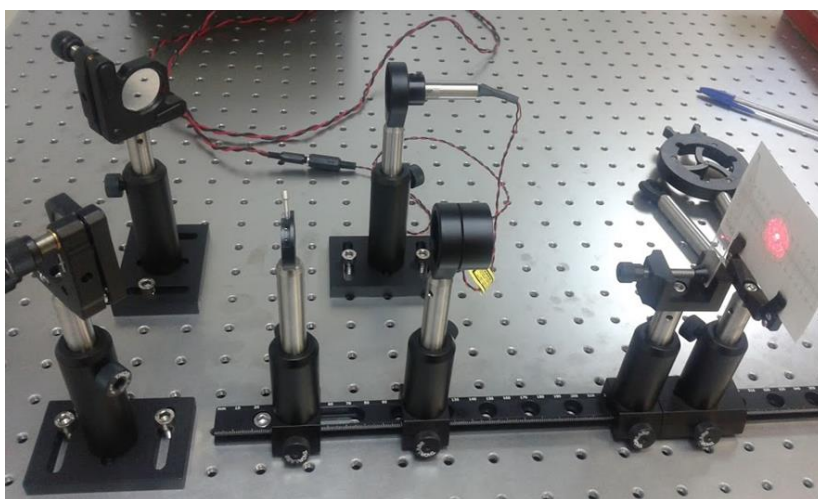


Fonte: Próprio autor (2016)

4.2 TESTE COM LASER

A centralização do laser foi realizada manualmente ajustando o centro da imagem circular por meio de uma régua óptica (Thorlabs). As gotículas iluminadas pelo laser geraram um padrão de difração.. Um centro de luz branco brilhante foi formado, mas sem observação de anéis, como apresentam as figuras 32 e 33.

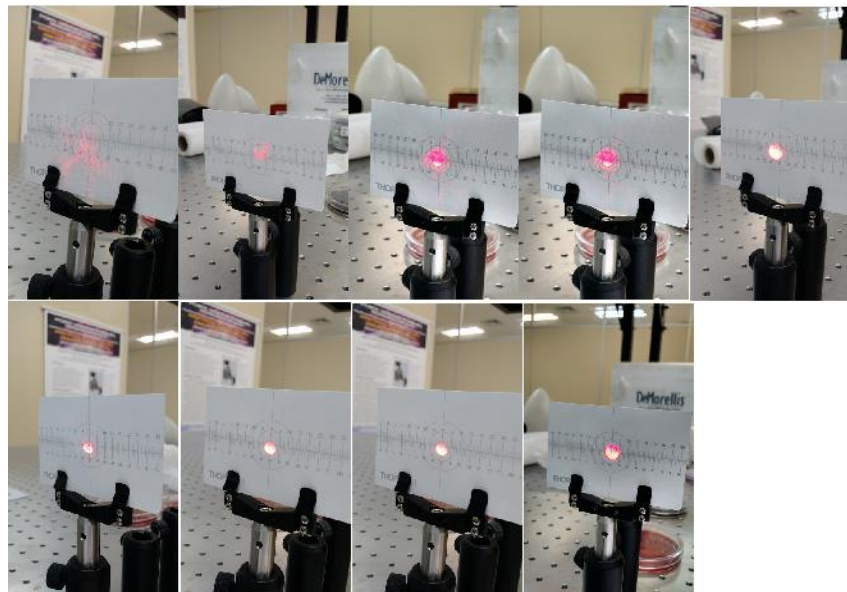
Figura 32 - Fotografia do sistema montado para testes com o laser.



Fonte: Próprio autor (2016)

O LASER ilumina as gotículas de material polimérico translúcido gerando um sinal de espalhamento observado na através da reflexão da imagem em um anteparo de papel ou régua óptica.

Figura 33 - Fotografias do processo de alinhamento e centralização manuais do laser óptico utilizando como referência a régua óptica (Thorlabs).



Fonte: Próprio autor (2016)

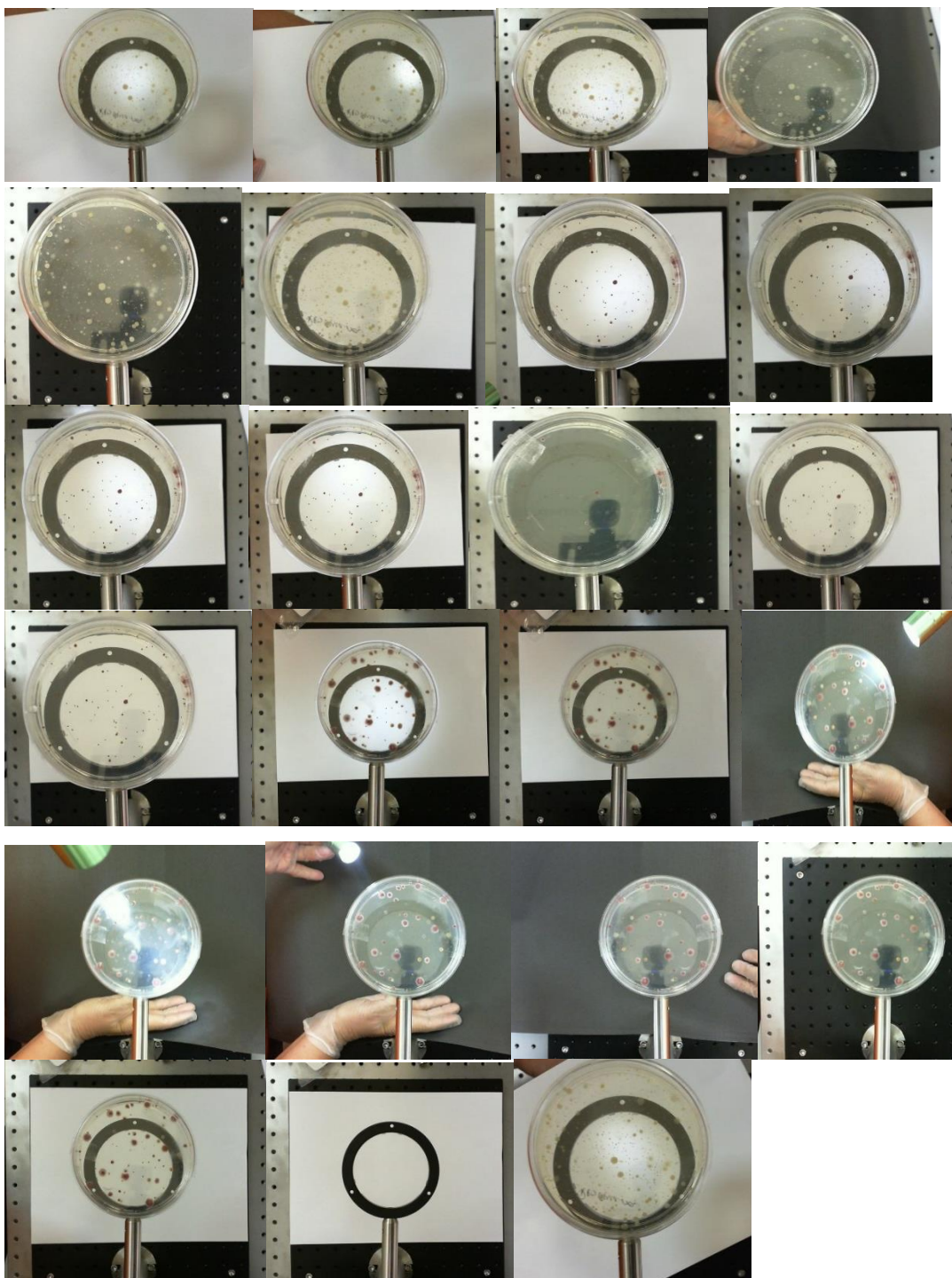
Na primeira imagem há difração provocada por uma gotícula. A partir da terceira fotografia é possível verificar algum nível de espalhamento. A centralização do LASER ao coincidir o centro da circunferência com centro circular representado na régua óptica, visualizado na última gravura.

4.3 FOCO E ILUMINAÇÃO DA PLACA DE PETRI

Os testes para aquisição da imagem das placas de petri com as colônias revelaram que a iluminação difusa por baixo da placa de Petri apresentam melhores resultados. Quando iluminação direta é utilizada, ela deve ser oblíqua para evitar captura da reflexão do LED de iluminação. é possível visualizar as colônias pigmentadas e não pigmentadas tanto no fundo claro quanto no fundo escuro. As colônias não pigmentadas são melhor visualizadas em fundo escuro. No entanto, não foram consideradas colônias enegrecidas. Ver quadro 5.

Observou-se o problema de profundidade de foco entre das colônias posicionadas em diferentes alturas no meio de cultivo. Este problema foi minimizado ao distanciar a câmera da placa de Petri, mas com perda deresolução dos pixels devido ao aumento do tamanho da imagem.

Quadro 5 - Apresenta as posições, acima, abaixo e lateral da iluminação externa da placa de Petri.



Fonte: Próprio autor (2016)

As placas de Petri apresentam cultivos pigmentados e não pigmentados. Observa-se as diferentes visualizações das colônias de acordo com alteração de cor do fundo claro (branco) ou escuro (preto).

4.4 ANTEPARO

Como vimos anteriormente, o feixe laser difratado é muito intenso e satura o sensor da câmera, necessitando de atenuadores de boa qualidade, indisponíveis naquele momento. Uma outra alternativa é a formação da imagem num anteparo. A proposta é de que o anteparo seja translucido e que a imagem seja capturada no verso do anteparo para que o laser, colônia e imagem sejam colineares e evitem distorções adicionais. Os resultados obtidos para os vários anteparos testados são:

Papel vegetal : Muita formação de speckle da luz central, amassa fácil, pouca rigidez e aumento do efeito de textura na imagem

Papel manteiga de rolo: Muita formação de speckle da luz central

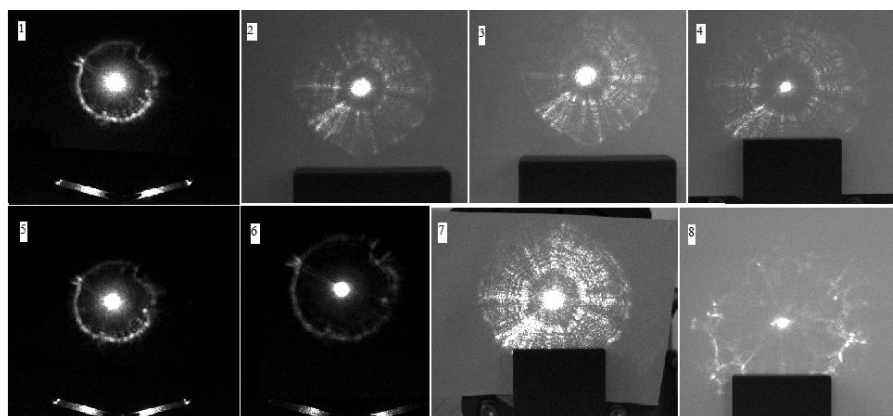
Papel de bloco (56g/m²): Boa qualidade na imagem em relação aos anteriores

Papel ofício: Boa qualidade na imagem em relação aos anteriores, melhor transmissão da imagem em comparação ao papel de bloco

Plástico branco leitoso: Muito brilho no material, maior reflexão da imagem.

Papel couche fosco: Semelhante ao papel de desenho. Figura (34 e 35).

Figura 34 - Diagramas de difração de bactérias anaeróbias pelo SOMEEL

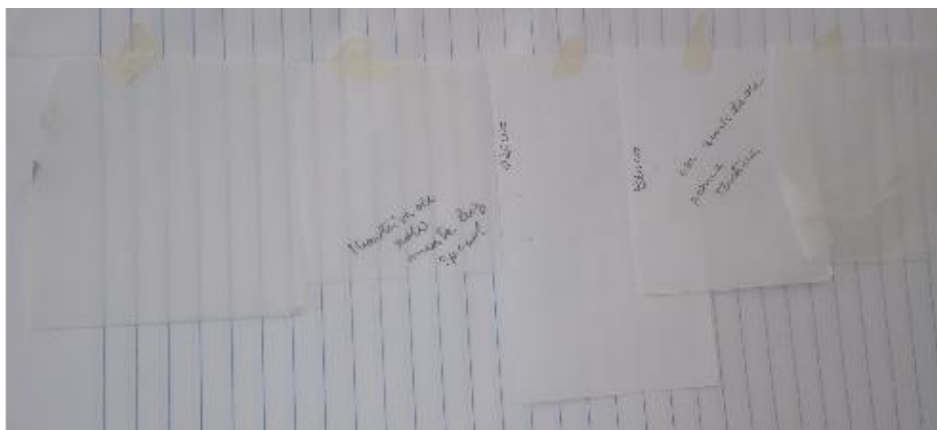


Fonte: Próprio autor (2016)

Teste com papel couche (1), papel ofício (2 e 4), papel de bloco (3), papel desenho (5 e 6), papel seda (7) e papel bloco (8).

Teste realizado com iluminação das colônias de cultivo misto de bactérias anaeróbias proveniente de efluentes (figs. 1- 7) e de *Salmonella* spp (fi.08)

Figura 35 - Gravura apresentando cinco tipos de materiais testados como anteparo.



Fonte: Próprio autor (2016)

Da esquerda para a direita: Plástico, papel manteiga de rolo, ofício, bloco, papel vegetal

4.5 CÂMARA ESCURA E PROTÓTIPO ÓPTICO

O sistema óptico para a leitura das Placas de Petri cultivadas (figura 36) foi desenvolvido baseado nos trabalhos de Banada (2007), Bae (2008) e Buzalewicz (2014). Nesta fase, foram utilizados os seguintes componentes: um laser de diodo (Thorlabs, modelo CPS180) operando em 635nm com potência de 1 mW um estágio de translação x-y, dois espelhos para alinhamento do laser, uma íris, uma lente focalizadora, um suporte para placa de Petri, um suporte para anteparo posicionado entre 250-300 mm, distância entre anteparo e câmera de aproximadamente 15,00 cm; uma câmera monocromática com 1280x1024 pixels (Thorlabs, modelo DCU224M) com uma objetiva de 12mm (Thorlabs, modelo MVL12M23) (fig.05) foco ajustado no limites 55-110 mm e acoplada a um Notebook com software específico (fig.36 (06)). Todo o sistema óptico foi montado na bancada óptica, em linha horizontal e envolvido pela caixa escura. Conforme apresentam a figura 36.

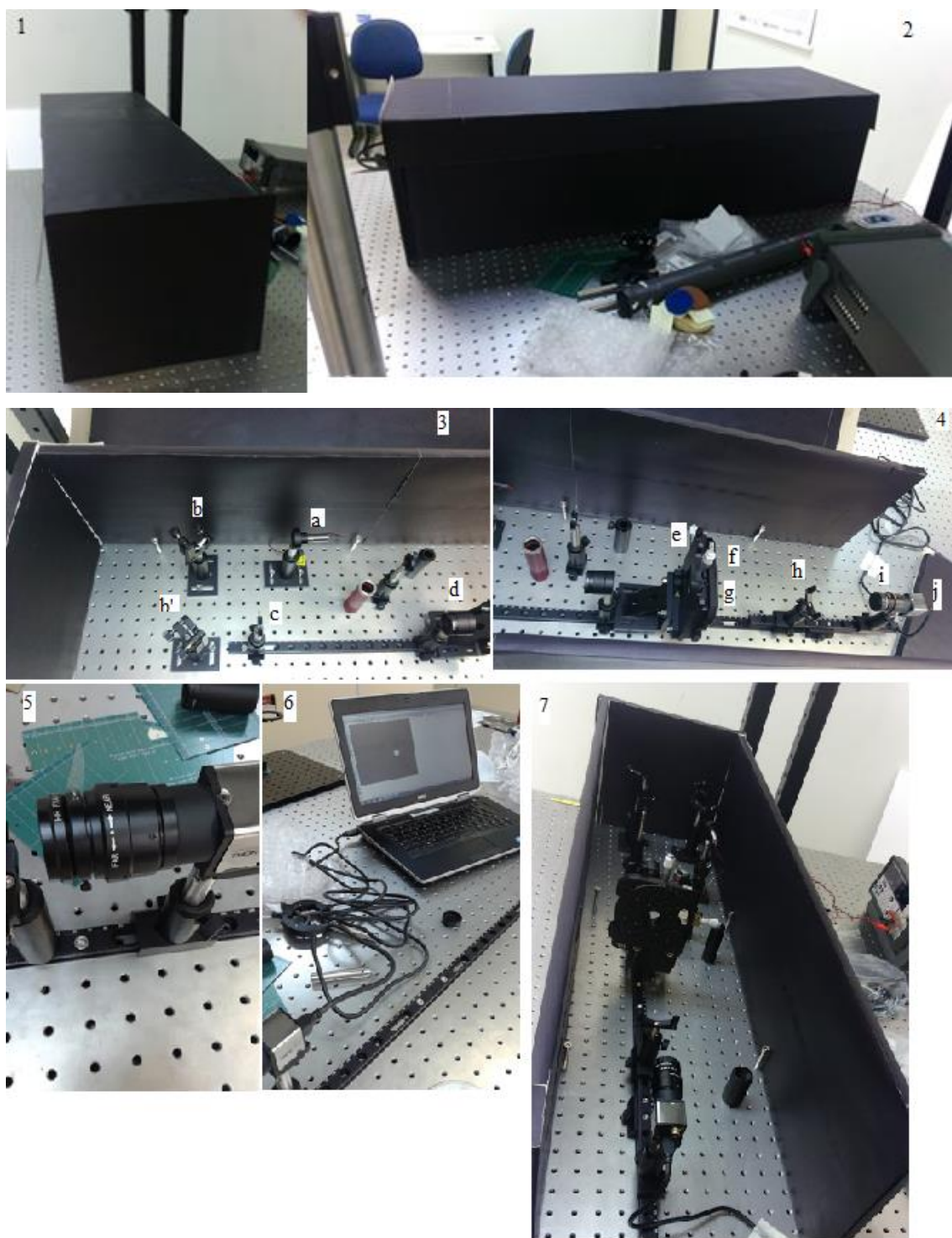
Os testes de atenuação do laser foram repetidos e observados os seguintes resultados.

Os ajustes de alinhamento são realizados manualmente por meio do eixo de rotação x, movimento lateral e y, movimento vertical. Todos os componentes da

fração de propagação e alinhamento do laser no caminho óptico são fixados. Na fração de leitura das placas de Petri e captura da imagem, somente o suporte do anteparo é móvel. De tal maneira que a distância focal com a câmera digital é fixa. A abertura da lente no processo de foco pode ser realizada por meio de uma íris conjugada a lente objetiva (12 mm). Desta maneira, é possível controlar a entrada de luz.

O movimento do anteparo para frente e para trás facilita no processo de dimensionamento da imagem, considerando que os diagramas de difração gerados não possuem tamanho padrão, podendo inclusive, superar a dimensão do papel.

Figura 36 -. Fotografias apresentando o modelo do sistema óptico para espalhamento elástico da luz por iluminação de colônias bacterianas.



Fonte: Próprio autor (2016)

As fotografias 01 e 02 mostram a caixa escura com total isolamento da luz externa ou ambiente. A evolução do sistema óptico é observada nas imagens 03 a 07. Fig. 03. Fração do sistema composto pelos componentes de iluminação, dos quais: a Laser (Thorlabs, modelo CPS180) operando a 635nm e 1mW de potência, espelhos para alinhamento (b e b'), íris (c), lente objetiva colimadora (d). Fig. (04) apresenta a fração das etapas de localização e centralização das colônias pelo Laser, efeito do espalhamento da luz, formação dos diagramas de difração e geração da imagem. Composto por: eixo

de rotação x (e) e y (f) para ajustes fino e grosso durante o processo de localização das colônias, uma bandeja para placa de Petri (g), um suporte para anteparo (h), lente objetiva 12mm (Thorlabs, modelo MVL12M23) (i, fotografia. 05) e uma câmera monocromática digital com 1280x1024 pixels (Thorlabs, modelo DCU224M). Na fotografia 06, apresenta a integração da câmera digital com o Notebook por meio de cabo USB. O sistema completo é apresentado na imagem. 07.

4.6 TESTE DOS MEIOS DE CULTIVOS

Os meios de cultivo HE e LIA apresentaram resultados negativos para a transmissão da luz, que devido à coloração escura do meio, o que pode gerar maior absorção da luz. Enquanto que o TSI apresentou uma superfície rugosa que produziu um feixe de luz transmitido com muito espalhamento, e que afetaria de forma indesejável a difração do laser pelas colônias de bactérias (Figura 37 e Tabela 5).. .

Nos testes com a técnica EEL é esperado que a iluminação de meios de cultura sem cultivos de bactérias, ou seja, sem colônias, não apresentam sinais de difração do laser. Pois para o método SOMEEL é importante que a formação de imagens seja proveniente somente da difração gerada pelas colônias. Dessa forma, cuidado deve ser usado na preparação do meio para evitar estriações, rugosidade assim como formação de gotículas por condensação na tampa da placa de Petri .

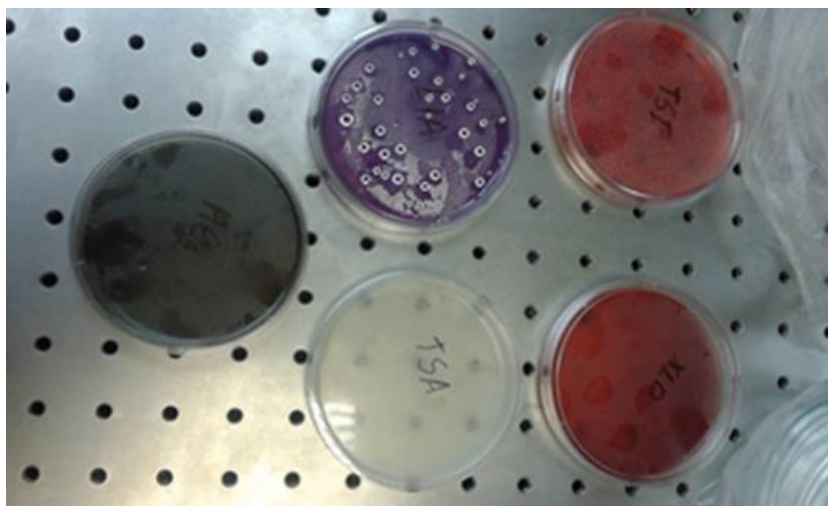
Tabela 5 -Análise da interferência da coloração do meio de cultura na transmissão do laser

Meio de cultivo	Cor	Transmissão da luz
TSI	vermelho	-
XLD	vermelho	+
TSA	incolor	++
LIA	roxo	-
HE	verde escuro	-

O sinal negativo (-) indica o bloqueio da transmissão do laser ao atravessar o meio de cultivo; (+) transmissão fraca; (++) transmissão normal

Fonte: Próprio autor (2016)

Figura 37 - Imagem de placas de Petri como diferentes meios de cultura



Fonte: Próprio autor (2016)

4.7 PADRÕES DE DIFRAÇÃO DE BRS

4.7.1 Análise Qualitativa

Os resultados iniciais foram adquiridos conforme análise qualitativa da imagem.

A análise qualitativa do processo de leitura das colônias de BRS para o espalhamento da luz e difração do Laser revelou que uma vez que cada colônia foi iluminada pelo LASER, o feixe de luz foi modificado e uma imagem da difração foi gerada e propagada com o feixe laser. As imagens variaram com as colônias iluminadas, embora mantivessem algumas características semelhantes conforme apresenta a figura 38. As características foram melhor observadas a olho nu, durante o processo de leitura das colônias. As imagens visualizadas a olho nu sobre a face frontal do anteparo apresentaram mais detalhes que as imagens formadas na escala de cinza. Ou seja, na face posterior ou verso do anteparo, as imagens dos diagramas eram menos nítidas e perdiam algumas características. Por exemplo, alguns anéis mais finos não eram transmitidos para o verso do papel. Uma explicação é que no processo de transposição da imagem através do material do

anteparo houve perda de intensidade por absorção e espalhamento pelo papel, com decorrente perda de resolução.

Em geral, a análise qualitativa revelou que as imagens geradas ao iluminar as colônias forneceram poucas informações considerando àquelas obtidas em trabalhos anteriores.

As colônias quando iluminadas pelo Laser desenvolveram perfis de imagem correspondente aos diagramas de difração e espalhamento da luz apresentados na figura 38. Por meio de análise qualitativa a olho nu, foi possível observar um centro brilhante, círculos concêntricos, alguns pontos brilhantes.

A colônia enumerada como um (b) na placa de Petri apresenta um disco central semelhante ao disco de Airy e anéis circunscritos. Na colônia quatro (d), foram observados os anéis circunscritos mais finos, não revelados na imagem capturada e um anel intenso brilhante. Enquanto que a colônia dois (a) apresentou anéis circunscritos muito próximos, embora pouco revelados na captura.

A imagem da colônia três (c) apresenta um formado distinto das demais devido à uma formação central não circular. A causa desta deformação não foi determinada mas possíveis explicações são a degradação da colônia ou a sobreposição de duas colônias.

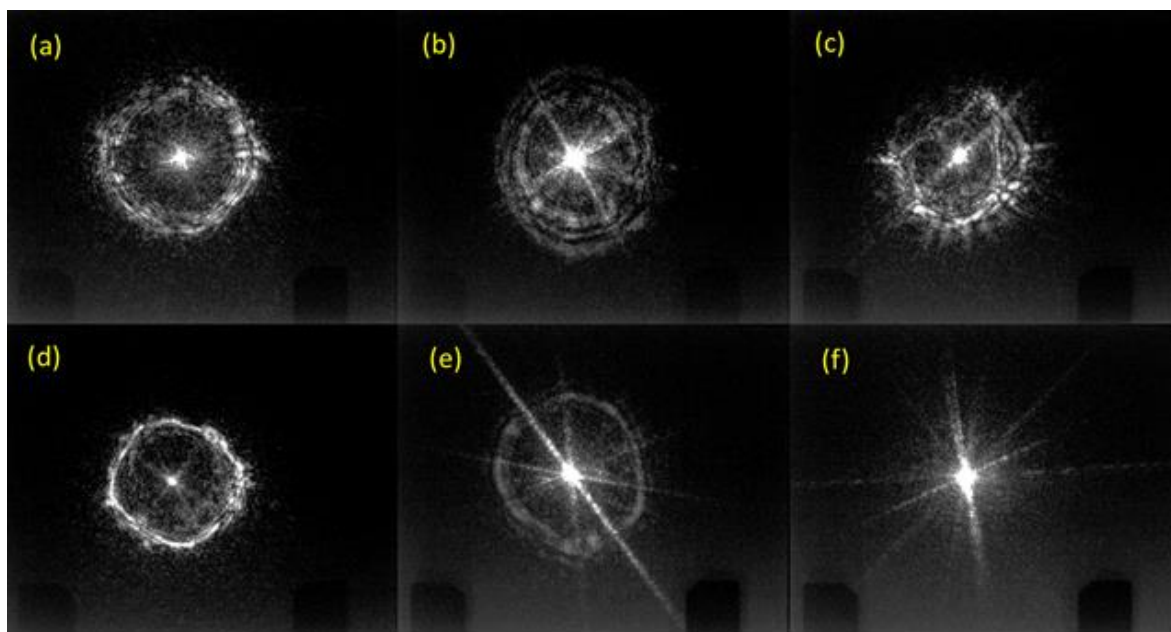
A imagem gerada do meio de cultivo (Figura 38(f)) revelou um centro brilhante intenso e raias de luzes radiais. Esse efeito pode ser explicado ao considerar que o meio de cultivo semissólido pode absorver ou refratar a luz. Ainda, ao advertir que o cultivo adquirido havia sido armazenado por 21 dias, é comum que culturas armazenadas por longo período em geladeira possam sofrer desidratação, apresentando certo grau de ressecamento e formação de estriações que podem causar distorções adicionais do feixe laser.

É relevante mencionar que as colônias foram analisadas mortas, e não vivas. Essas colônias podem apresentar maior quantidade de material excretado acumulado no centro em relação a colônias vivas. Além disso, devido ao envelhecimento do cultivo, é provável que as colônias possuam células degradadas. A degradação das colônias pelo envelhecimento altera a textura, a densidade, a altura do centro e a forma das colônias, individualmente.

Há uma tendência de células bacterianas mais distantes do centro, ou posicionadas nas bordas se desfazerem mais rapidamente em relação ao núcleo da colônia. As alterações das características morfológicas irão fornecer resultados

alterados no processo de espalhamento e difração do Laser, podendo modificar os efeitos de anéis circunscritos, raios radiais ou salpicos. Portanto, as diferenças das imagens não devem necessariamente, serem vinculadas às diferentes espécies de BRS. Devendo-se para fins analíticos admitir o viés da pesquisa microbiológica que precisará padronizar além do tempo de cultivo, verificar o impacto da posição das colônias na placa de Petri e uniformidade do meio de cultivo, assim como o tempo após a morte das colônias por exposição à atmosfera com oxigênio.

Figura 38 - Padrões de difração obtidos com a iluminação individual de 5 colônias de bactérias redutoras de sulfato e do meio de cultivo.



Fonte: (DA SILVA, DE SENNA, *et al.*, 2016)

As colônias são circulares, mas apresentam tamanhos diferentes; os padrões de difração mostrados em (a), (c) e (e) correspondem a colônias com diâmetro de ~1mm enquanto (b) e (d) correspondem a colônias menores, com menos de 0,5mm. Nossos resultados mostram que as colônias de bactéria produzem padrões de difração cuja imagem é significativamente diferente da imagem obtida quando o laser passa por uma região sem colônia de bactéria (f). Além disso, os diferentes padrões de difração obtidos sugerem que as colônias medidas sejam de diferentes espécies ou cepas bacterianas, sendo este um perfil comum em culturas de amostra de campo.

Os ajustes de entrada de luz no processo de captura da imagem pela câmera CMOS foram necessários para melhorar a qualidade da imagem formada na escala de cinza, especialmente nas colônias com diâmetros em torno de 0,5 cm. Neste

âmbito, a luz que excede ao limite da colônia não acrescentou informações características do padrão de imagem. No entanto, em colônias de diâmetro reduzido o excesso de luminosidade exterior à colônia provocou maior brilho do centro da imagem ou mesmo impossibilitou a visualização dos anéis. Limitando, a entrada de luz na câmera foi possível reduzir o elevado brilho na imagem, viabilizando a visualização de anéis.

Embora o controle de entrada de luz na câmera tenha favorecido a menor saturação de luz pela câmera CMOS, este procedimento não superou a interferência gerada pelo diâmetro do LASER. Ao menos duas explicações podem estar relacionadas a essa observação. A primeira deve-se ao diâmetro do LASER estimado em 4 mm, no mínimo quatro vezes superior ao diâmetro das colônias, o que dificultou a avaliação de características de difração em colônias menores de 0,5 cm; a segunda seria o efeito da divergência da luz difratada que é muito maior do que a do feixe não difratado. Sendo assim, o impacto do disco central pode ser limitado a distâncias longas o suficiente.

Neste sentido, outra dificuldade enfrentada, foi evitar a sobreposição de sinal gerada entre colônias próximas. Durante a etapa de seleção ao considerar o efeito de sobreposição da imagem, somente cinco colônias formaram diagramas individualmente ou não sobrepostos. Pois, considerando o diâmetro máximo da colônia em torno de 1mm, ao menos três milímetros do LASER foram excedentes à colônia. Conseqüentemente, as colônias deveriam estar distantes entre si em mais de três milímetros. Como o cultivo de BRS geralmente formam conglomerados ou colônias muito próximas (menor que um 1mm de distância), a seleção foi prejudicada. Restringindo-se às cinco colônias mais isoladas.

As imagens geradas pela incidência do Laser sobre as colônias não foram proporcionais aos seus diâmetros. De tal maneira que, colônias menores poderiam gerar imagens maiores que as colônias de maior diâmetro. Isso ocorre porque as colônias menores têm um raio de curvatura menor e, portanto, uma divergência maior. É como se funcionassem como uma lente de distância focal menor. Em algumas situações o tamanho superava os limites do anteparo. Ao aproximar o anteparo da placa de Petri a imagem foi reduzida, sendo este um meio adotado durante a leitura para regulação do tamanho das imagens ao tamanho do anteparo.

O processo de leitura por colônia teve um tempo mínimo estimado de três minutos e máximo de cinco minutos por colônia. O aumento do tempo deve-se especialmente à fase de localização e centralização, das colônias pelo LASER. Essas etapas, uma vez realizadas manualmente, tornaram o processo mais lento. Ainda, o fato da placa de Petri estar posicionada verticalmente ao eixo do caminho ótico, a ação da gravidade promovia a descida da placa no suporte. Necessitando repetir a etapa de centralização. Contudo, a etapa de captura das imagens pela câmera CMOS, através do comando manual por software foi estimada em torno de 0,5 minuto.

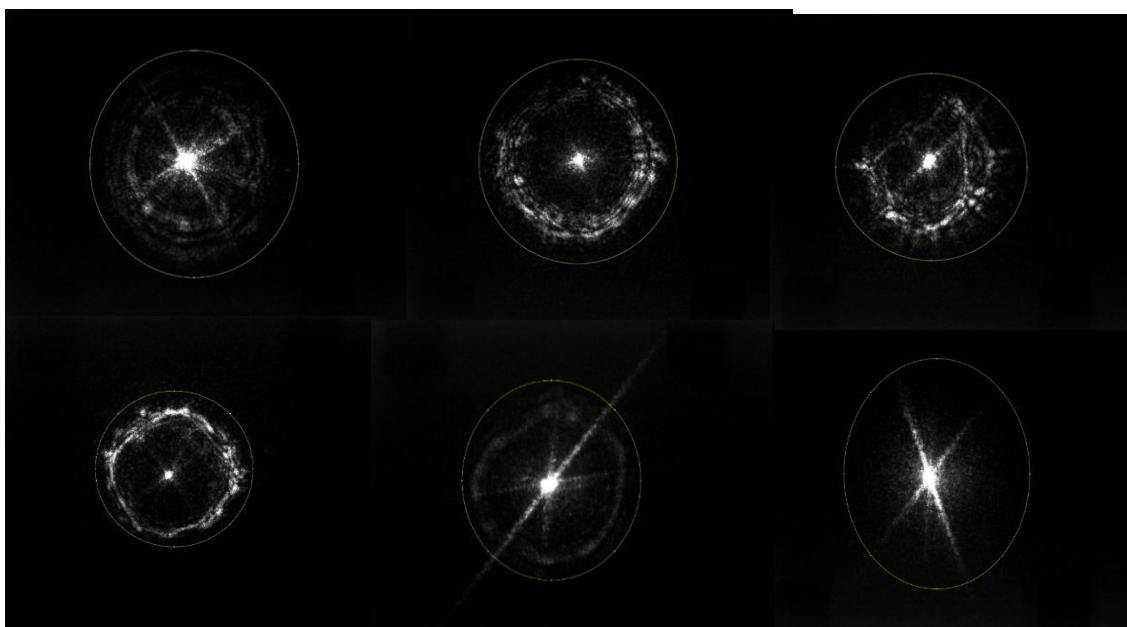
4.8 PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS (PDI)

4.8.1 Análise computacional com Image J

4.8.1.1 Segmentação

A figura 39 apresentam a segmentação das ROIs dos padrões de difração de uma imagem representante de cada colônia de BRS, (1280X1024, 8-bits), salvos em arquivo tiff. As ROIs foram posteriormente analisadas pelo comando *Mesh* do software Image J, sem qualquer filtro.

Figura 39 – Segmentação das ROIs dos padrões de difração de uma imagem representante de cada colônia de BRS (1280x1024, 8 bits) salvos em arquivos tiff

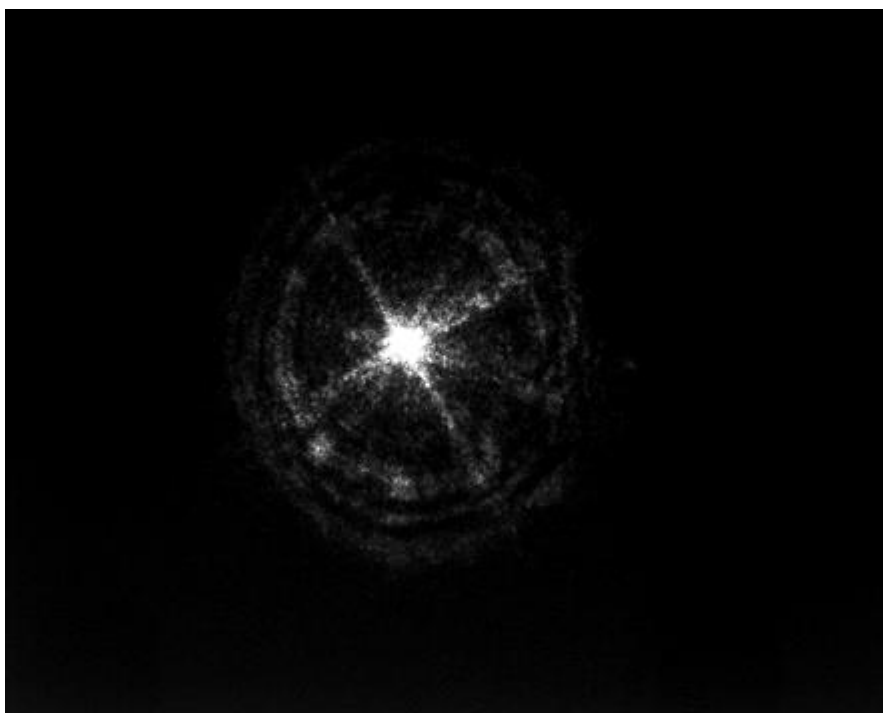


Fonte: proprio autor (2016)

As imagens a seguir apresentam as etapas de segmentação das ROIs dos padrões de difração das colônias I, II, III, IV, V e do meio de cultivo com uso do software ImageJ. Inicialmente a figura (40) apresenta a imagem do padrão de difração capturada pela câmera CMOS e sem processamento, em seguida a figura

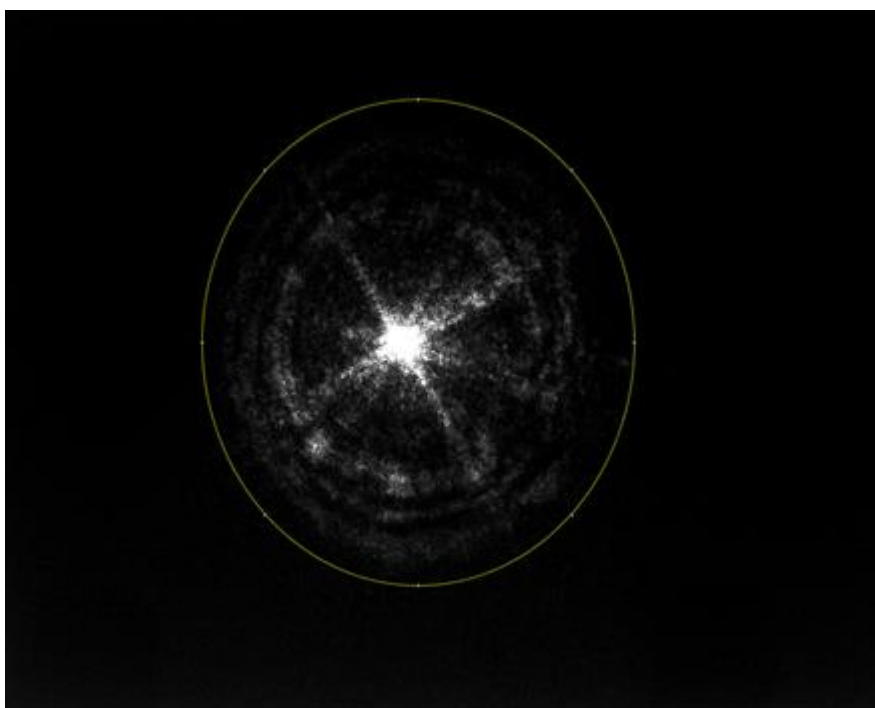
(41) apresenta a delimitação da ROI, para posterior processamento de equalização e normalização da imagem figura (42). A partir de então, foi possível visualizar as regiões que não representavam os padrões de difração provenientes das colônias. Procedeu-se, assim, a subtração das ROIs figura (43) para gerarem novas imagens individuais (1280 x1024) constituídas unicamente pelas regiões de interesse de cada padrão de difração. Observa-se uma nova imagem mais limpa, com menos ruídos, e nítida. Para as colônias II, III, IV, V e do meio de cultivo, são apresentadas somente as ROIs finais, equalizadas, normalizadas e subtraídas, respectivamente figuras (44 a 49).

Figura 40 – Padrão de difração da colônia I com 1280x1024 pixels



Fonte: O autor (2017).

Figura 41 – Delimitação da ROI A do padrão de difração da colônia I com 1280x1024 pixels.



Fonte: o autor (2017).

Figura 42 – ROI B : processo de equalização e normalização do ROI A com 1280x1024 pixels.

Fonte: o autor (2017).

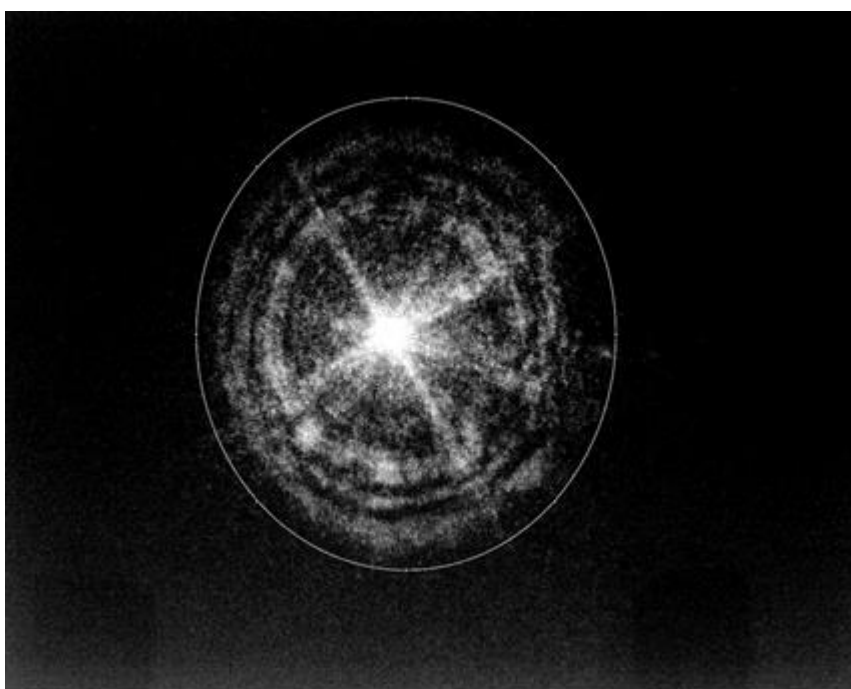
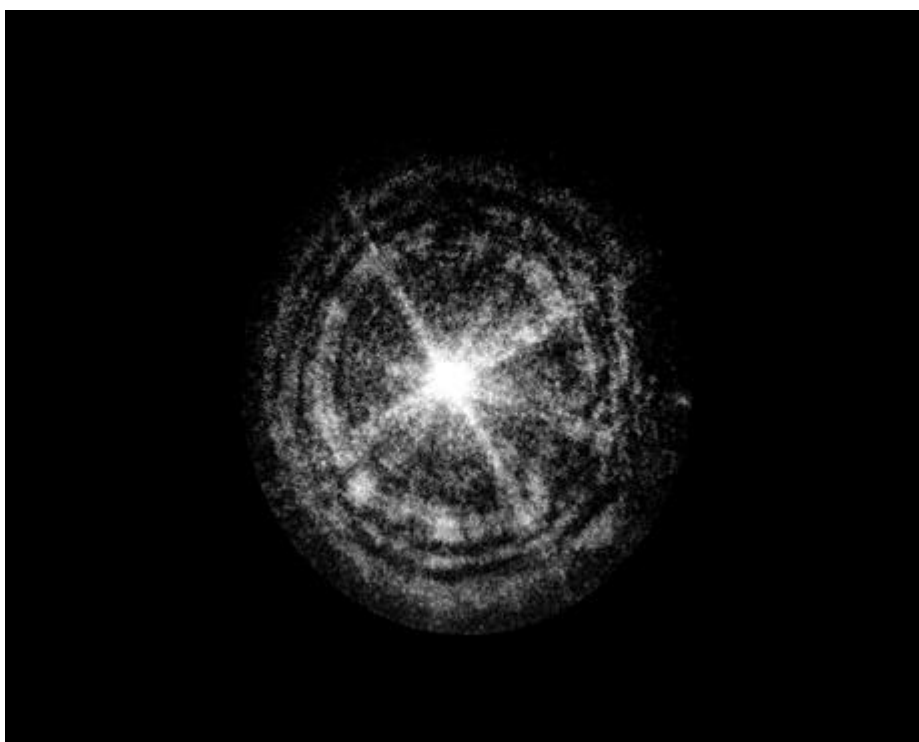


Figura 43 - Região de recorte da ROI B



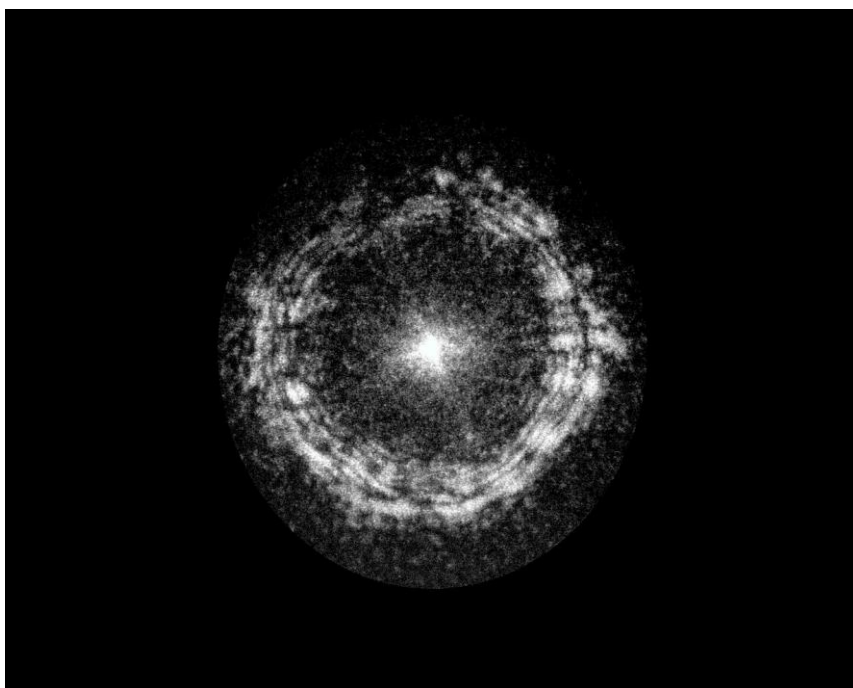
Fonte: O autor (2017)

Figura 44 – ROI C: ROI B equalizado, normalizado da Fig. 42 com subtração da região fora da ROI (Figura 43) com 1280x1024 pixels.



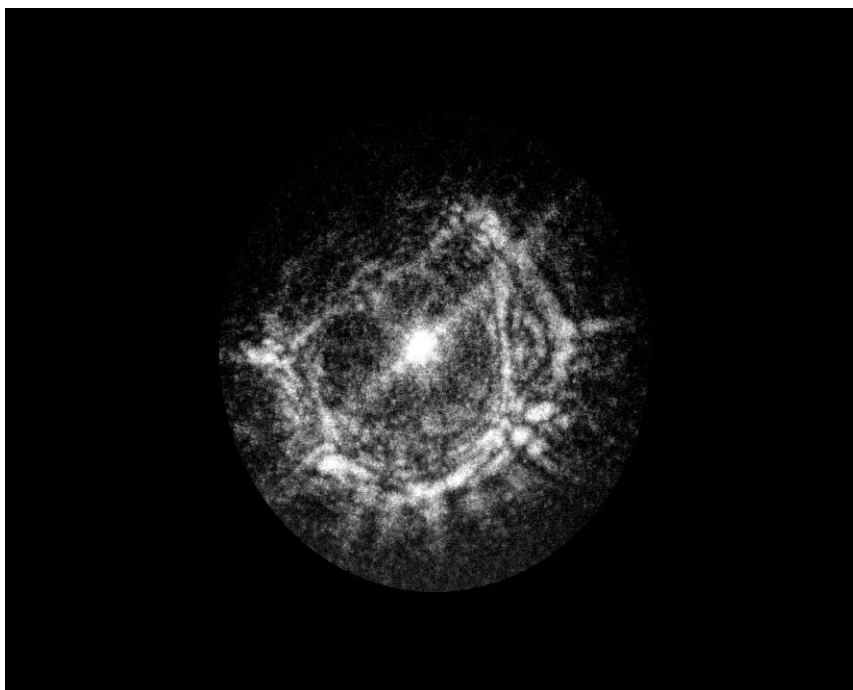
Fonte: O autor (2017)

Figura 45 – ROI D: padrão de difração da colônia II equalizado, normalizado e subtraído com 1280x1024 pixels.



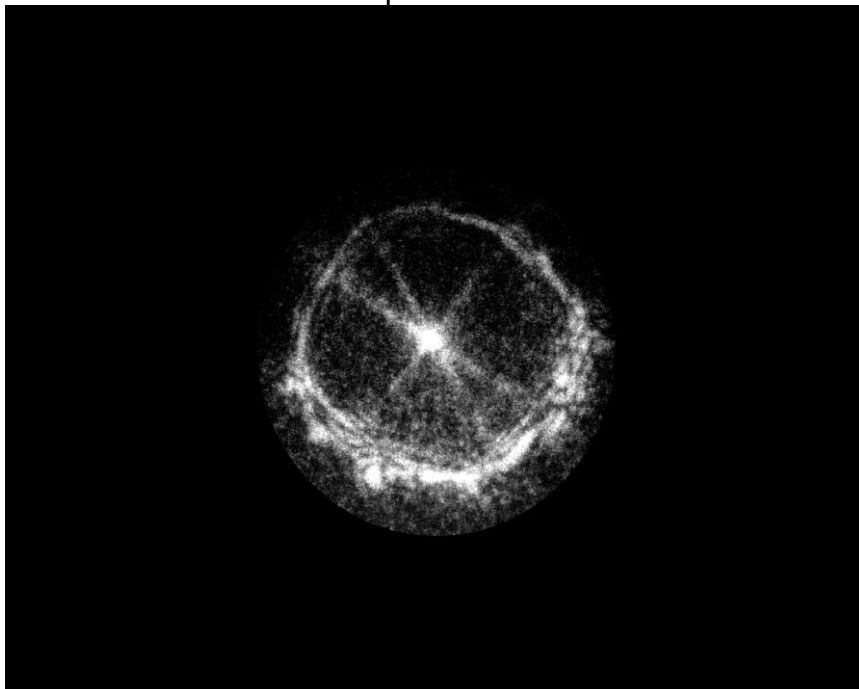
Fonte: O autor (2017)

Figura 46 – ROI E: padrão de difração da colônia III equalizado, normalizado e subtraído com 1280x1024 pixels.



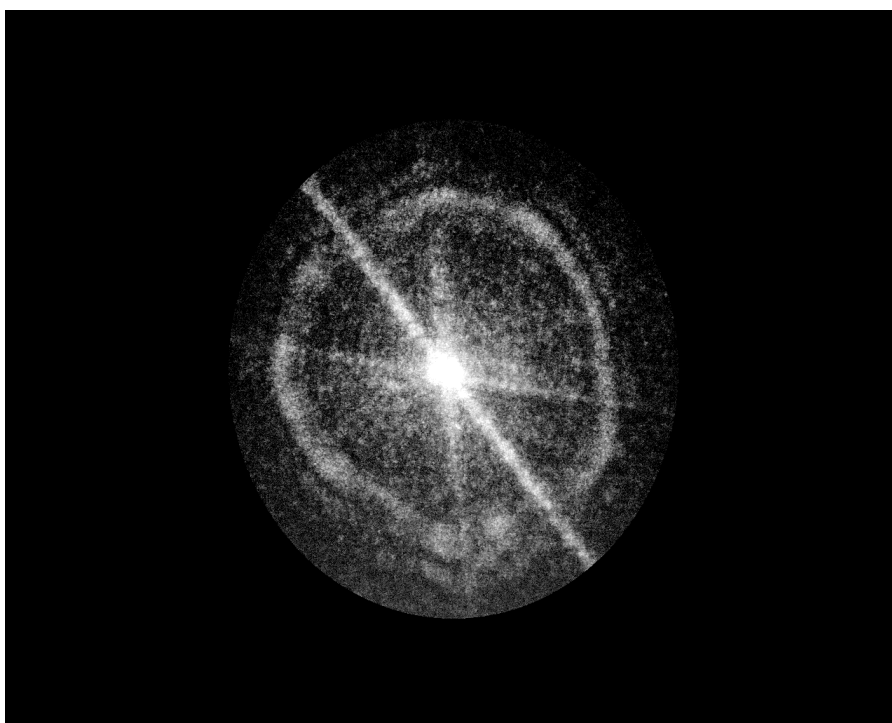
Fonte: O autor (2017)

Figura 47 – ROI F: padrão de difração da colônia IV equalizado, normalizado e subtraído com 1280x1024 pixels.



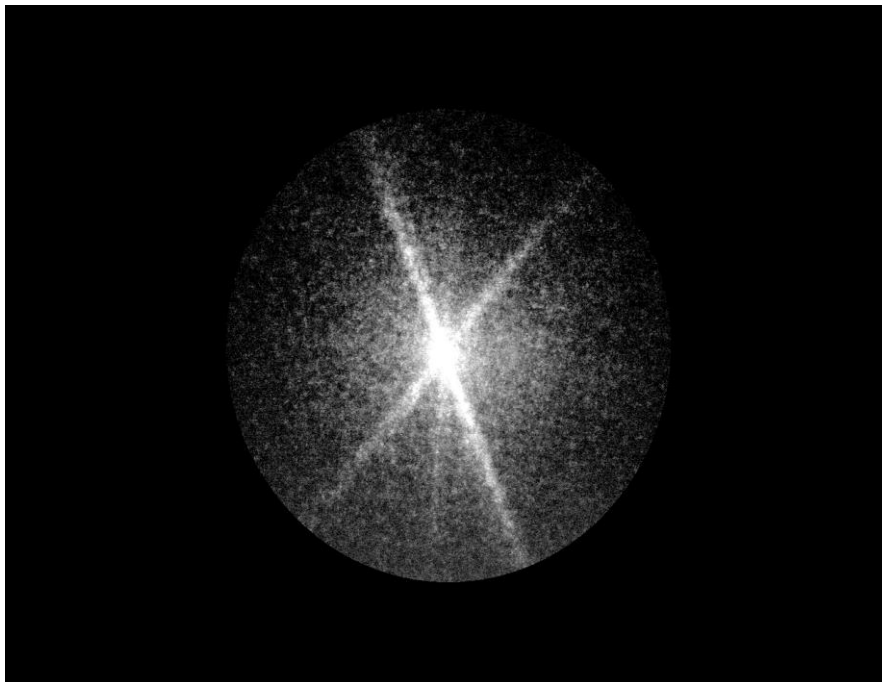
Fonte: O autor (2017)

Figura 48 - ROI G: padrão de difração da colônia V equalizado, normalizado e subtraído com 1280x1024 pixels.



Fonte: O autor (2017)

Figura 49 – ROI H: padrão de difração do meio de cultivo equalizado, normalizado e subtraído com 1280x1024 pixels.



Fonte: O autor (2017)

4.8.1.2 Histogramas

Os histogramas dos padrões de difração apresentaram uma distribuição concentrados no lado inferior (escuro) da escala de intensidades, sugerindo baixo contraste das imagens. Segundo Gonzalez e Woods, 2010, a distribuição dos pixels de uma imagem ocupando uniformemente todos os intervalos de níveis de intensidade terá alto contraste e maior variedade dos tons na escala do cinza. A melhor distribuição resulta em maiores detalhes de nível de cinza. Portanto, as imagens capturadas dos diagramas de difração que tiveram seus contrastes automaticamente ajustados por meio do software fornecido pela Thorlabs, indicando a necessidade de passarem por um processamento de equalização de histogramas.

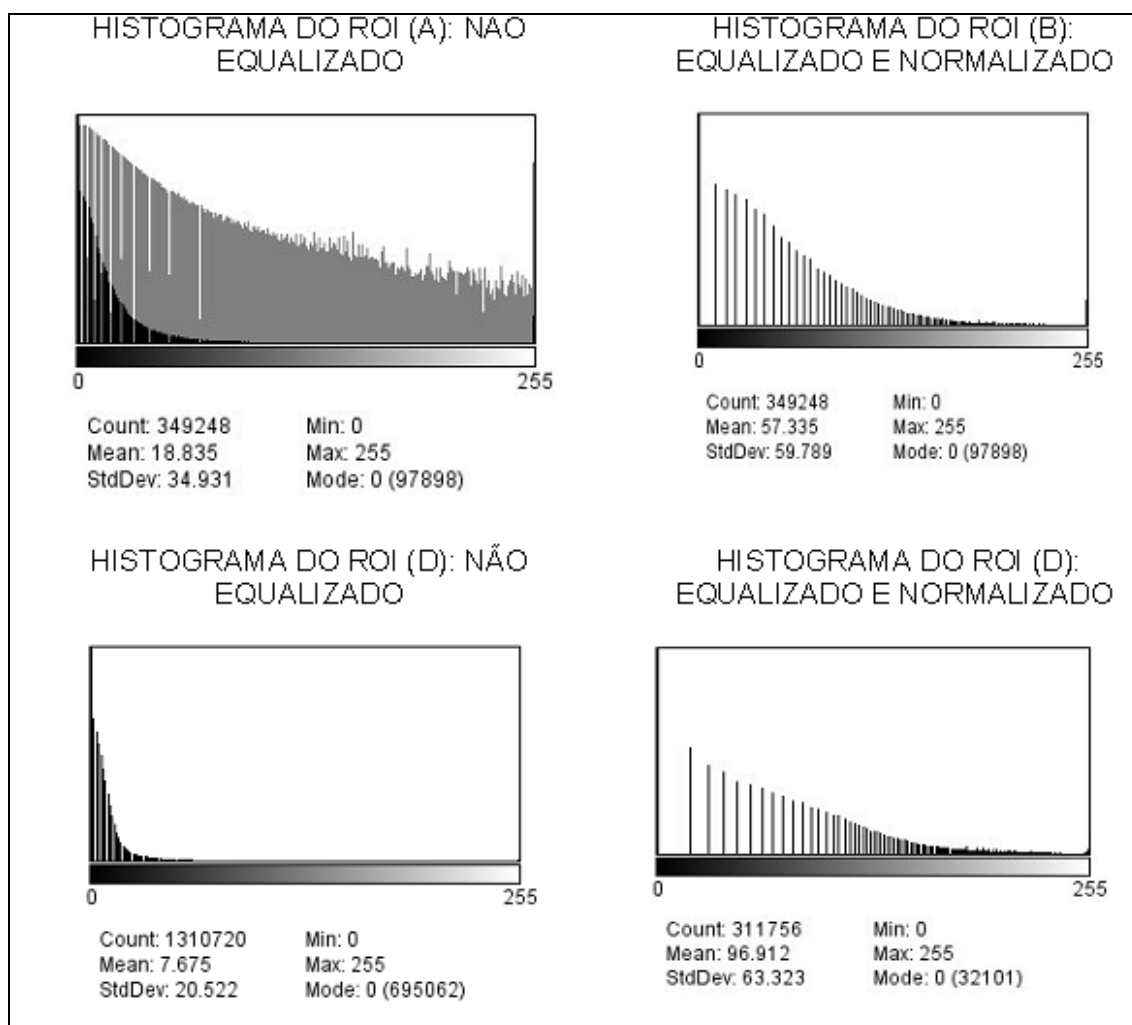
A equalização do histograma do ROI (A) da colônia I, nomeado de ROI (B), apresentou melhor distribuição das intensidades na escala do cinza. Observa-se na ROI (B) da figura (50), maior contraste da imagem. A melhora da qualidade da imagem é percebida ao ser possível visualizar a olho nu os sinais de ruídos e a

imagem equivalente ao suporte do anteparo. Nessa etapa, foi possível obter a lista de intensidades. Ver no Quadro (6) que apresenta os picos de mais baixa intensidades em níveis zero ou branco e os de mais altas intensidades foram aproximadas ao negro ou tom escuro. Na primeira coluna são apresentados os valores de intensidades (r_k), onde r_k é o k -ésimo valor de intensidade e na segunda coluna, estão os números de pixels da imagem (n_k) com intensidade (r_k).

A partir de então foi possível segmentar melhor a ROI (B) subtraindo as regiões que não são de interesse, apresentada na figura (43).

O resultado da subtração das regiões que não foram de interesse foi uma imagem mais limpa e melhor segmentada, apresentada na ROI C (fig.44) Os resultados dos histogramas normalizados e equalizados foram plotados antes da subtração dos ROIs (figuras 50,51 e 52).

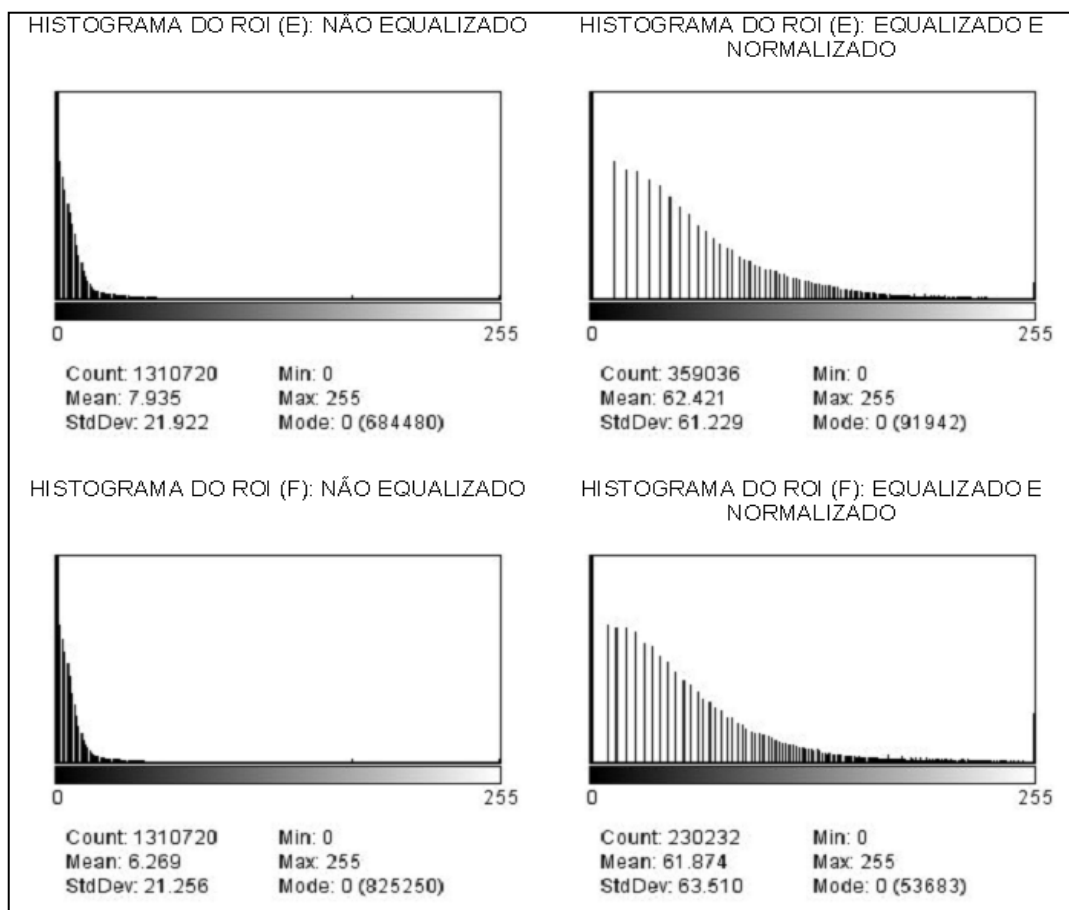
Figura 50 – Análise de Contraste de imagem de padrões de difração



Fonte: O autor (2017).

A e B são referentes às regiões de interesse dos padrões de difração da colônia I.
 D refere-se ao ROI do padrão de difração proveniente da colônia II.

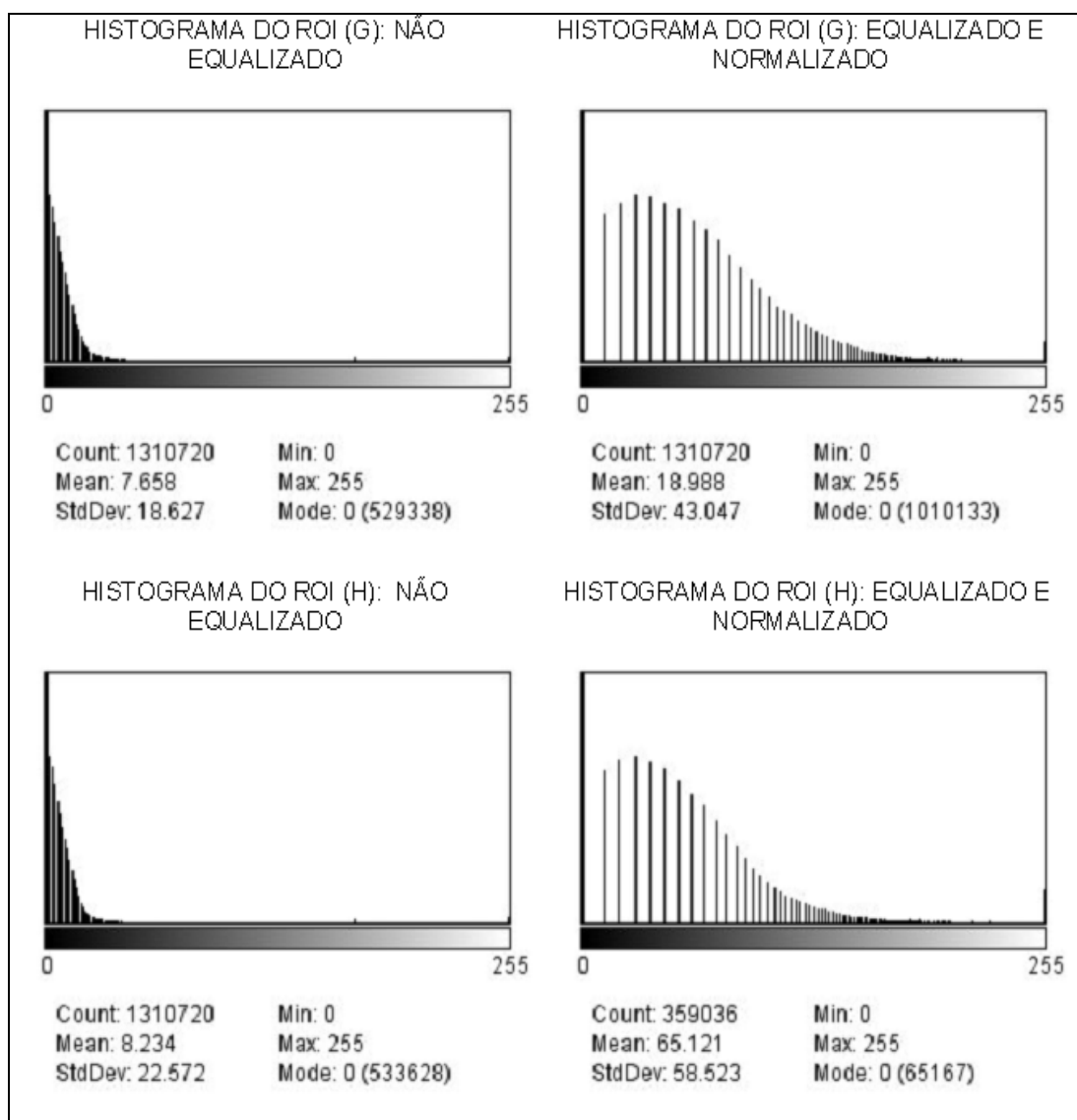
Figura 51 - Análise de Contraste de imagem de padrões de difração



Fonte: O autor (2017).

Referem-se às ROIs dos padrões de difração representantes das colônias III e IV respectivamente.

Figura 52 – Análise de Contraste de imagem de padrões de difração



Fonte: O autor (2017).

G e H referem-se às ROIs dos padrões de difração representantes das colônias IV e meio de cultivo.

Quadro 6 – distribuição de intensidades e valores dos histogramas antes (a) e após (b) Equalização da ROI A (colônia I)

Valor (r_k) Contagem (n_k) (A)		Valor (r_k) Contagem (n_k) (B)	
0	97898	0	97898
1	15974	1	0
2	0	2	0
3	15423	3	0
4	14936	4	0
5	46	5	0
6	14246	6	0
7	13212	7	0
8	12549	8	0
9	7	9	0
10	11411	10	0
11	10016	11	15974
12	9478	12	0
13	23	13	0
14	8506	14	0
15	7991	15	0
16	7530	16	0
17	6527	17	0
18	4	18	15423
19	6143	19	0
20	5625	20	0
21	5235	21	0
22	4836	22	0
23	4405	23	0
24	41	24	14936
25	4124	25	0
26	3831	26	0
27	3398	27	0
28	3139	28	46
29	2961	29	0
30	2776	30	0
31	3	31	14246
32	2616	32	0
33	2373	33	0
		34	0
		35	0
		36	0
		37	13212
		38	0

34	2230	39	0
35	2147	40	0
36	1912	41	0
37	1862	42	0
38	1703	43	12549
39	1541	44	0
40	24	45	0
41	1491	46	7
42	1435	47	0
43	1373	48	0
44	1231	49	11411
45	1232	50	0
46	1126	51	0
47	1025	52	0
48	1011	53	0
49	947	54	10016
50	792	55	0
51	20	56	0
52	826	57	0
53	833	58	0
54	787	59	9478
55	735	60	0
56	750	61	0
57	672	62	23
58	639	63	0
59	646	64	8506
60	555	65	0
61	571	66	0
62	484	67	0
63	472	68	0
64	510	69	7991
65	482	70	0
66	433	71	0
67	442	72	0
68	3	73	7530
69	433	74	0
70	369	75	0
71	332	76	0
72	387	77	0
73	342	78	6527
		79	0
		80	4
		81	0
		82	6143
		83	0
		84	0

74	324	85	0
75	328	86	5625
76	261	87	0
77	335	88	0
78	288	89	0
79	292	90	5235
80	298	91	0
81	225	92	0
82	248	93	0
83	274	94	4836
84	254	95	0
85	266	96	0
86	207	97	4405
87	240	98	0
88	201	99	41
89	222	100	0
90	223	101	4124
91	196	102	0
92	166	103	0
93	209	104	3831
94	178	105	0
95	217	106	0
96	152	107	3398
97	141	108	0
98	173	109	0
99	178	110	3139
100	149	111	0
101	171	112	0
102	135	113	2961
103	145	114	0
104	154	115	0
105	130	116	2776
106	163	117	3
107	126	118	2616
108	115	119	0
109	138	120	0
110	115	121	2373
111	126	122	0
112	102	123	0
113	90	124	2230
		125	0
		126	2147
		127	0
		128	1912
		129	0
		130	0

114	127	131	1862
115	97	132	0
116	107	133	1703
117	125	134	0
118	85	135	1541
119	109	136	24
120	94	137	1491
121	83	138	0
122	123	139	1435
123	75	140	0
124	78	141	1373
125	123	142	0
126	84	143	1231
127	106	144	0
128	76	145	1232
129	65	146	1126
130	88	147	0
131	74	148	1025
132	134	149	0
133	86	150	1011
134	60	151	947
135	105	152	0
136	67	153	792
137	69	154	20
138	88	155	826
139	56	156	833
140	60	157	0
141	106	158	787
142	67	159	735
143	89	160	750
144	80	161	0
145	61	162	672
146	105	163	639
147	55	164	0
148	50	165	646
149	115	166	555
150	56	167	571
151	92	168	484
152	44	169	472
153	38	170	510
		171	0
		172	482
		173	433
		174	445
		175	433
		176	369

154	140	177	332
155	49	178	387
156	45	179	342
157	77	180	324
158	44	181	328
159	79	182	261
160	47	183	335
161	49	184	580
162	67	185	298
163	43	186	225
164	46	187	248
165	44	188	274
166	41	189	520
167	43	190	207
168	38	191	240
169	29	192	201
170	60	193	445
171	76	194	196
172	36	195	375
173	37	196	178
174	29	197	217
175	33	198	293
176	36	199	173
177	36	200	327
178	20	201	171
179	28	202	280
180	26	203	284
181	32	204	163
182	28	205	241
183	25	206	253
184	70	207	126
185	32	208	192
186	26	209	224
187	19	210	232
188	19	211	194
189	23	212	177
190	20	213	198
191	22	214	201
192	27	215	190
193	17	216	141
		217	162
		218	220
		219	165
		220	224
		221	116
		222	173

194	20	223	169
195	30	224	221
196	32	225	165
197	53	226	148
198	24	227	222
199	20	228	94
200	16	229	121
201	28	230	175
202	15	231	156
203	28	232	128
204	19	233	127
205	18	234	149
206	17	235	98
207	22	236	110
208	39	237	85
209	29	238	128
210	25	239	103
211	24	240	94
212	9	241	109
213	24	242	79
214	22	243	82
215	22	244	115
216	21	245	79
217	23	246	94
218	28	247	102
219	25	248	92
220	13	249	55
221	26	250	88
222	22	251	67
223	16	252	75
224	14	253	82
225	28	254	0
226	17	255	2976
227	4		
228	29		
229	12		
230	16		
231	9		
232	11		
233	7		

234	16
235	12
236	11
237	32
238	17
239	9
240	8
241	13
242	17
243	20
244	15
245	9
246	25
247	14
248	12
249	21
250	8
251	18
252	9
253	14
254	12
255	2976

Fonte: O autor (2017)

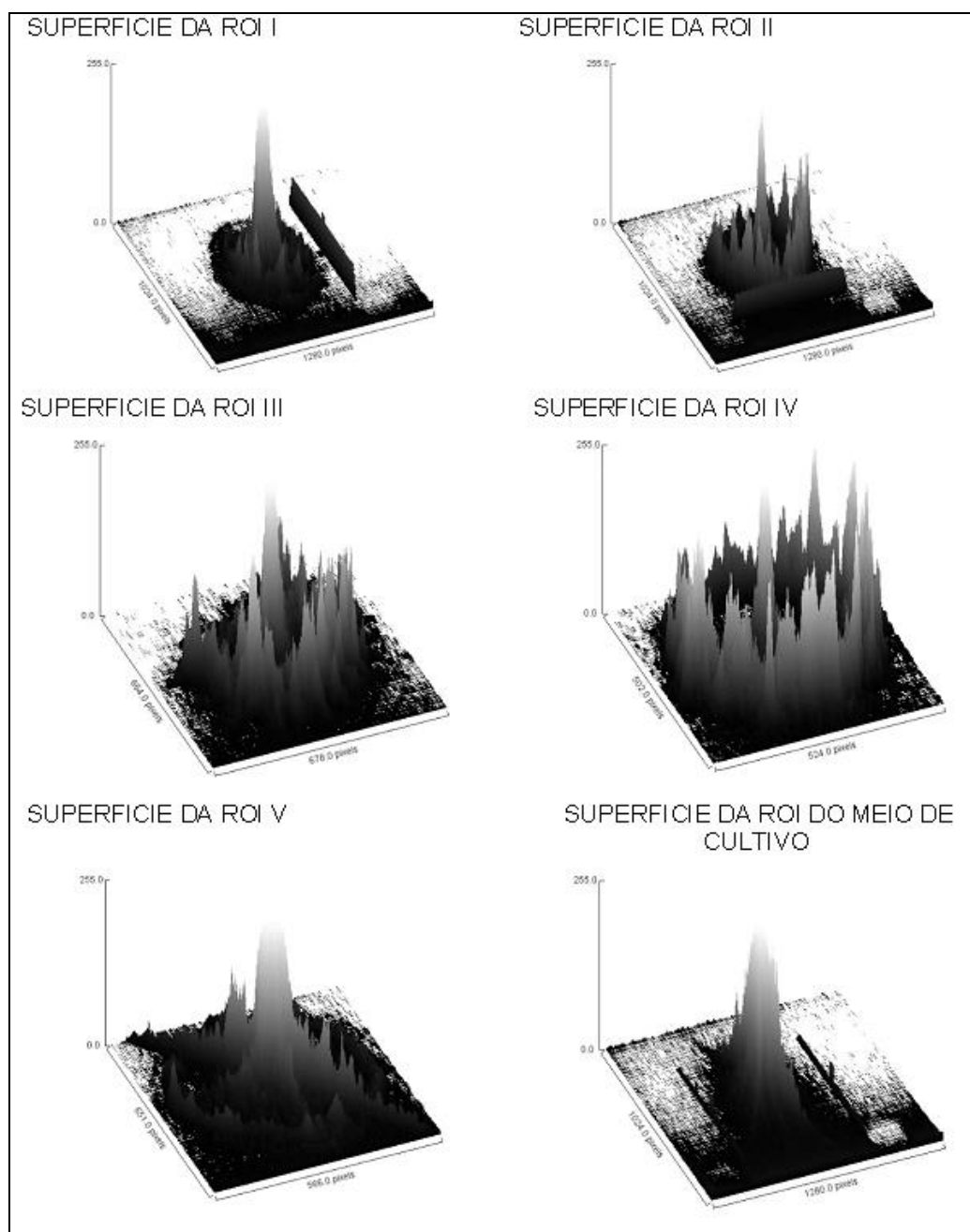
4.8.1.3 Análises de superfície

As ROIs dos padrões de difração e incluído o meio de cultivo, foram processadas e plotadas segundo a Análise 3D aplicando algoritmo Fire Mesh, Software Imaje J_ Plugin: Interactive 3D Surface Plot. A regiões de menor intensidade estão na escala entre 0 e 60, sendo que 0-20 referente ao meio de cultivo. A partir de 60 observa-se alguns sinais de relevância.

As análises de superfície dos gráficos na escala de cinza apresentaram um comportamento padrão de maior concentração de picos com maior altura nos centros das imagens. Observa-se uma irradiação de picos a partir do centro

formando como se fosse uma coluna ou barreira de picos, especialmente nos gráficos I, III, V e VI. Possivelmente esses picos no centro em barreira estão relacionados ao speckle observado mais fortemente nos diagramas de difração das colônias I,III,V e do meio de cultivo.

Figura 53 – Análises de superfícies dos padrões de difração de BRS



Fonte: O autor (2016)

Os resultados de superfície Fire Mesh demonstraram semelhanças no perfil entre as colônias III, IV e V representadas pelos seus respectivos ROIs, III, IV e V. Apresentados nas figuras 54-58. Comparativamente com as análises provenientes das colônias I e II, as colônias III, IV e V apresentaram maior espalhamento da luz laser que pode ser, assim, interpretado devido ao maior número de picos de intensidades. Ainda, pode-se observar que há grande porção de intensidade de sinal no centro de cada figura de superfície plotada.

Outra observação importante refere-se a figura (59), que apresenta o resultado da análise Mesh para a imagem capturada da incidência do Laser diretamente no meio de cultivo, ou seja, sem a presença de colônia bacteriana. Nessa análise, é visível uma quantidade significativa de sinal, comparativamente semelhante com os perfis de intensidades encontradas nas análises Mesh das ROIs dos padrões de difração das colônias, no entanto com maior concentração no centro. Entretanto, não é observado, picos de alta e média intensidades nas bordas. Uma explicação seria o possível espalhamento da luz incidida pelo meio de cultivo semissólido e devido à maior intensidade de luz no centro do Feixe Laser. Portanto, alturas até 60 ou zona azul estão relacionadas ao espalhamento do meio de cultivo que estariam no centro e nas bordas dos gráficos.

Nas análises de malha ou Mesh, a altura no gráfico representa a quantidade de iluminação ou luminância da imagem. Na análise Fire Mesh, as cores escuras ou frias indicam as intensidades mais baixas, de menor altura no gráfico. Enquanto as cores mais quentes são as de maior intensidade. Nessa aplicação, todos os pixels estão conectados nas direções x e y.

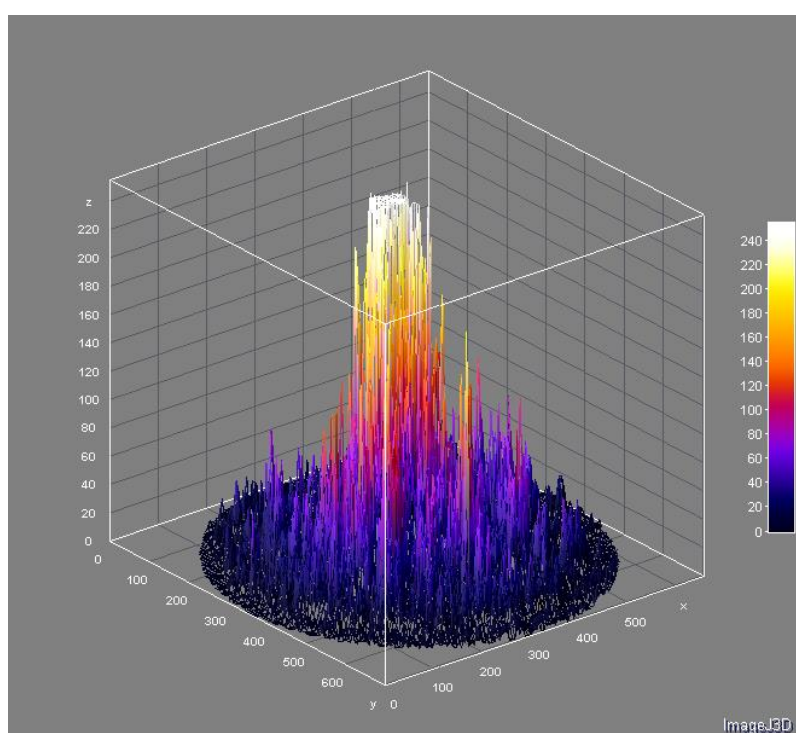
Todas as análises Mesh foram aplicadas às regiões circulares definidas dentro de um círculo ou região de interesse (ROI), definidas na etapa de segmentação, descrita anteriormente. As regiões fora das ROIs não foram analisadas pelo Mesh.

Observa-se que exceto no gráfico da figura (55), há maior concentração de picos no centro da imagem e apresentam maior quantidade de picos de alturas entre 180 a 220 pixels, se comparados com as bordas das imagens plotadas.

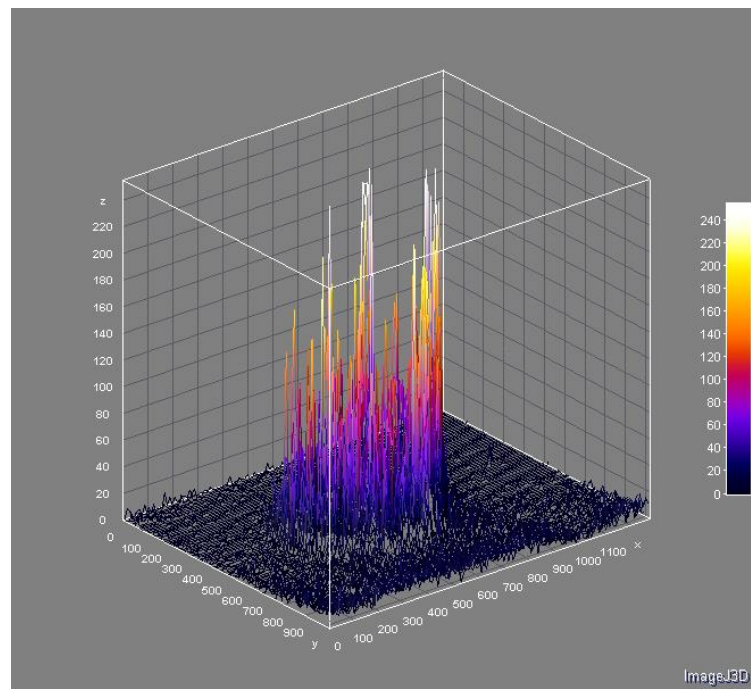
A figura (57) que corresponde a colônia quatro foi a que apresentou maior quantidade de picos nas bordas e maior quantidade de picos com alturas entre 180 a 220.

Todas as imagens correspondentes às colônias apresentaram picos nas bordas. No entanto, as imagens correspondentes às colônias dois, três, quatro e cinco apresentaram maiores semelhanças entre si. Contendo picos maior concentração de picos nas regiões do amarelo, laranja e vermelho e violeta nas bordas. Nesses gráficos os picos do centro também são reduzidos.

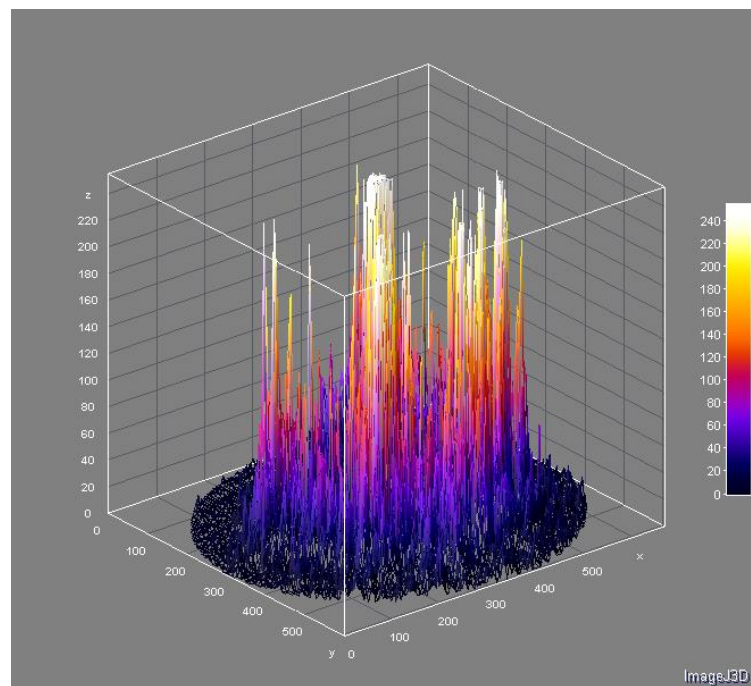
Figura 54 - Análise 3D MESH da ROI I



Fonte: O autor (2016)

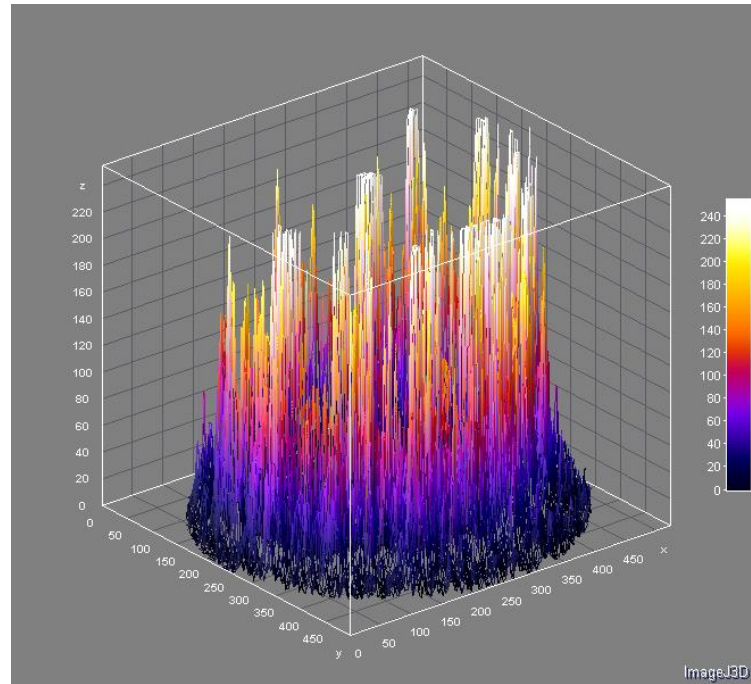
Figura 55 - Análise 3D MESH da ROI II

Fonte: O autor (2016).

Figura 56 – Análise 3D MESH da ROI III

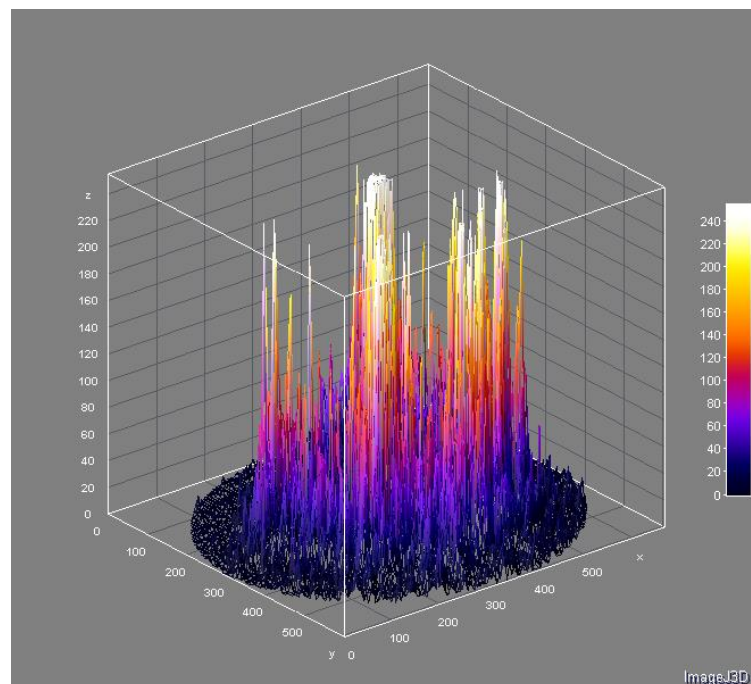
Fonte: O autor (2016).

Figura 57 - Análise 3D MESH da ROI IV



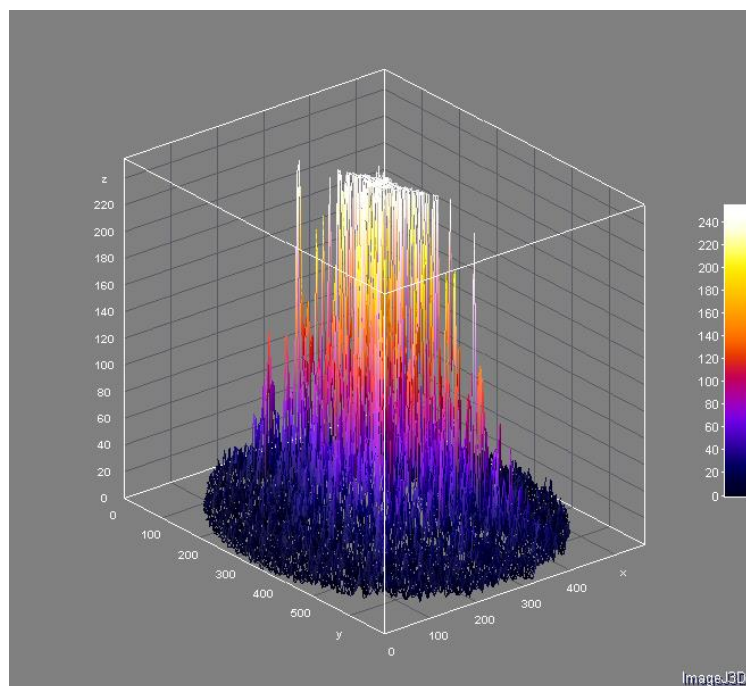
Fonte: O autor (2016).

Figura 58 - Análise 3D MESH da ROI V



Fonte: O autor (2016).

Figura 59 - Análise 3D MESH da ROI do meio de cultivo

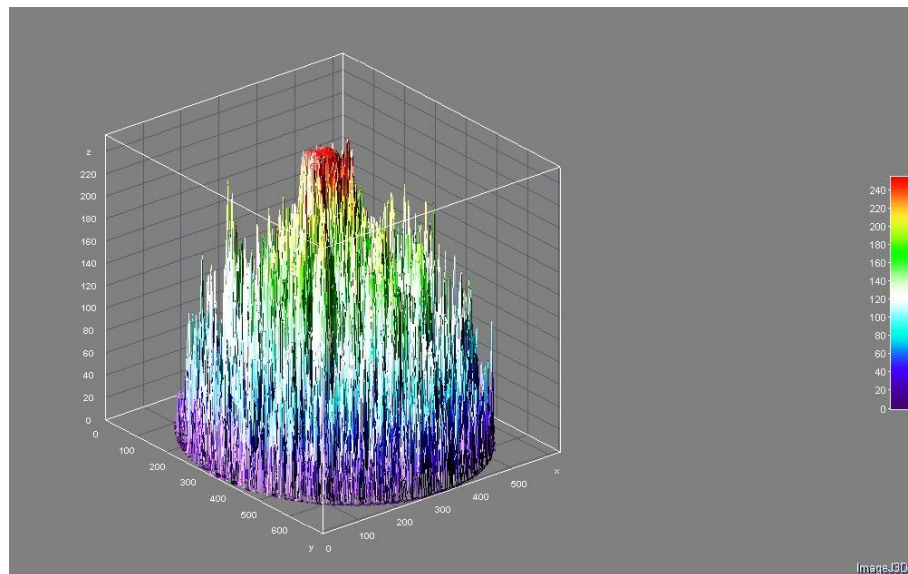


Fonte: O autor (2016).

O resultado encontrado com a aplicação da análise Mesh 3D da ROI (C) com aplicação de filtro *Thermal Lut* apresentou um mapa de calor dos picos gerados pela difração da luz modulados pela colônia um. Na figura (ANÁLISE 3D MESH DA ROI (C)) é possível encontrar picos na faixa de 0-240 compondo o diagrama de difração da colônia um. Ao aplicar o filtro “*Smoothing*” ou suavização até o aparecimento dos anéis na projeção superior do gráfico 3D, foi possível selecionar uma faixa de 0 a 40 dos picos que estão relacionados com maiores detalhes da imagem para todas as imagens representativas dos padrões de difração das colônias I, II, III, IV e V, identificadas nos plots como ROIs C,D,E,F e G, respectivamente.

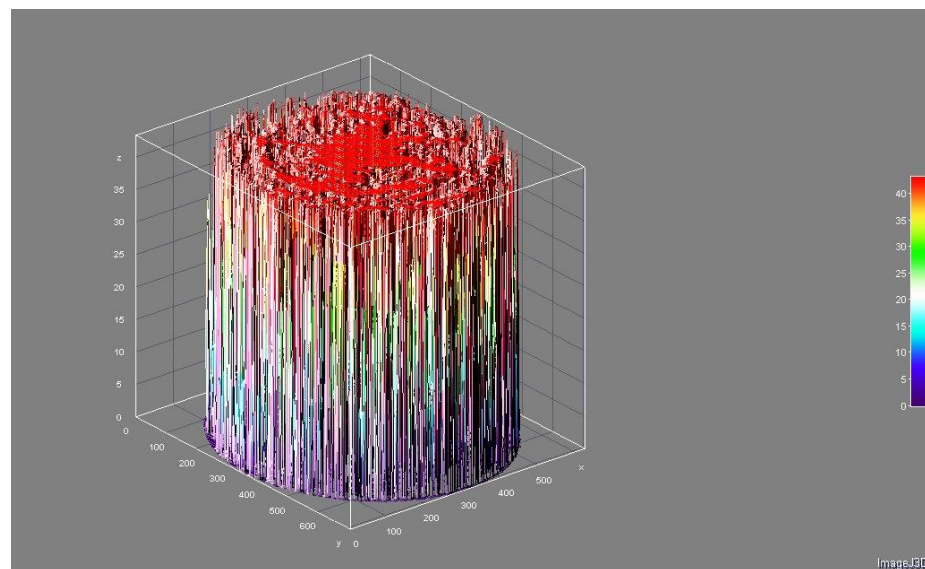
O resultado da aplicação do Mesh *Thermal Lut* sobre a imagem da ROI do meio de cultivo não apresentou evidências de anéis concêntricos ao aplicar o filtro de intensidades de calor na faixa de 0 a 40, havendo uma diferenciação das análises Mesh *Thermal Lut* relacionadas as colônias.

Figura 60 - Análise 3D MESH *Thermal Lut* da ROI (C)



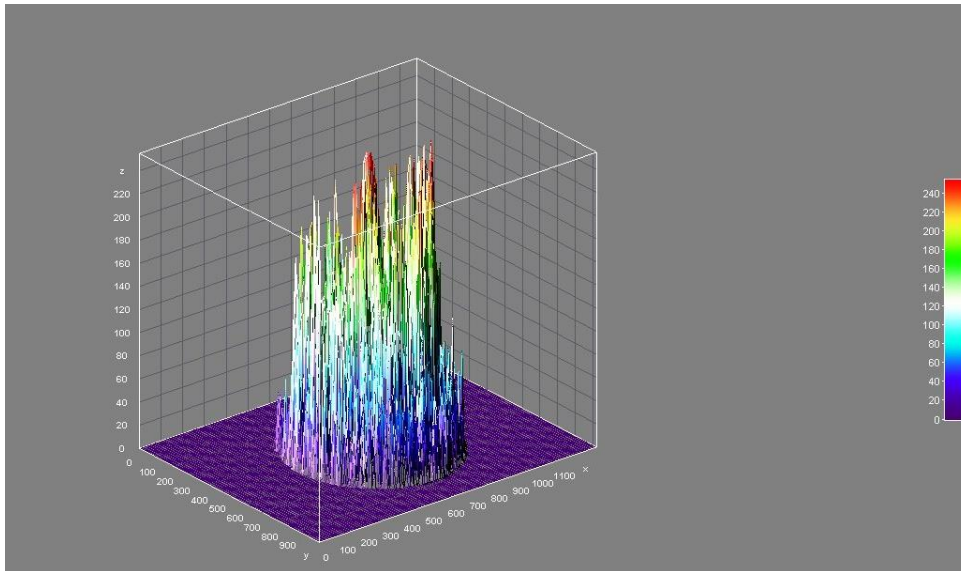
Fonte: o autor (2017)

Figura 61 - Principais picos formadores dos anéis análise 3d mesh *thermal lut* da ROI (c)



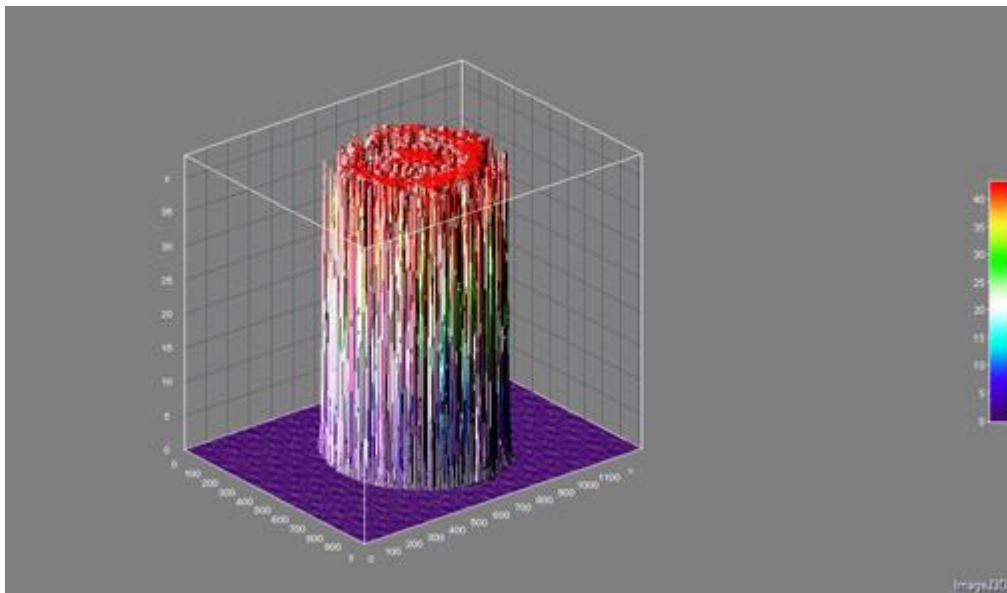
Fonte: o autor (2017)

Figura 62 - Análise 3D MESH *Thermal Lutda ROI* (D)



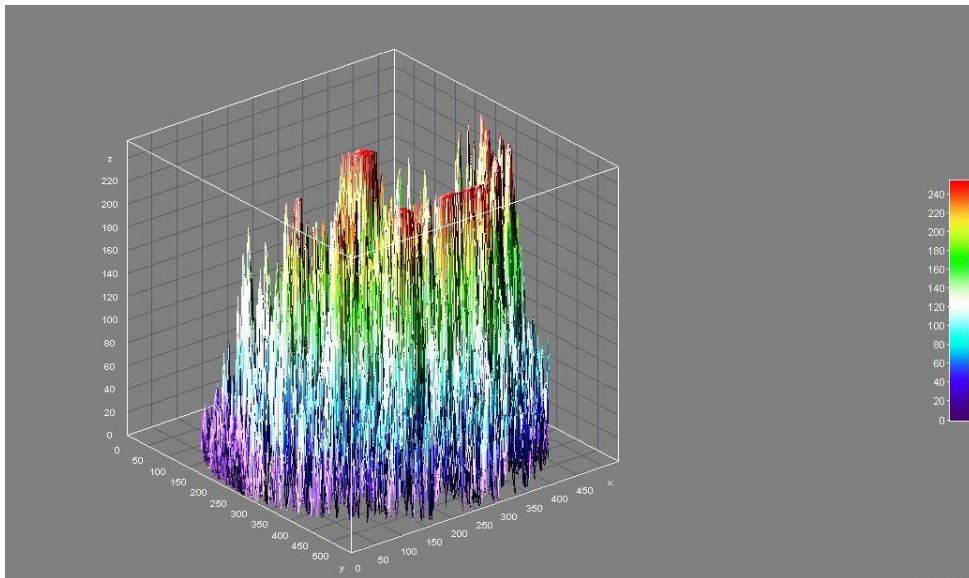
Fonte: O autor (2017)

Figura 63 - Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH *Thermal Lut da ROI* (D)



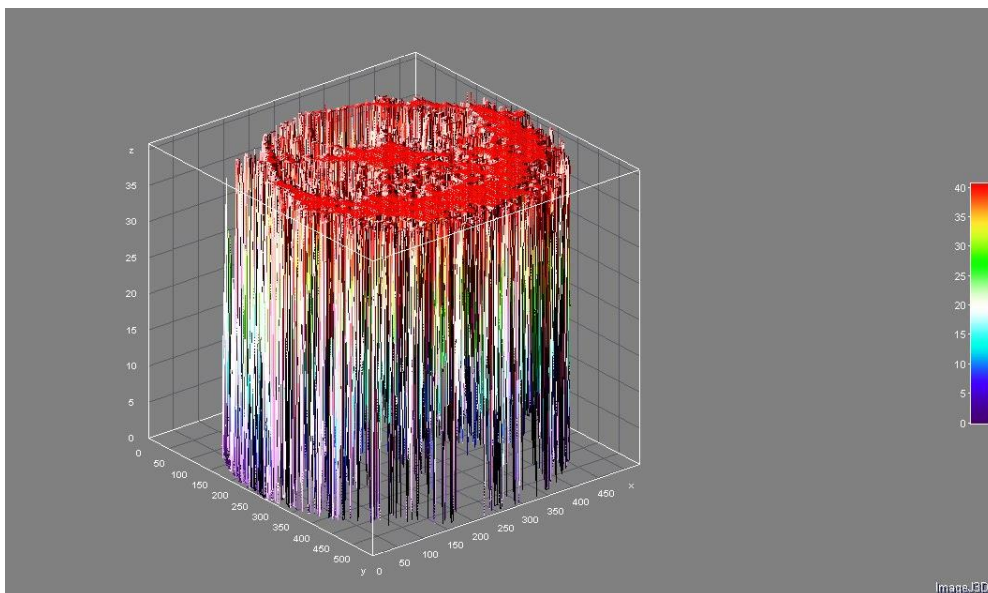
Fonte: O autor (2017)

Figura 64 - Análise 3D MESH *Thermal Lut* da ROI (E)



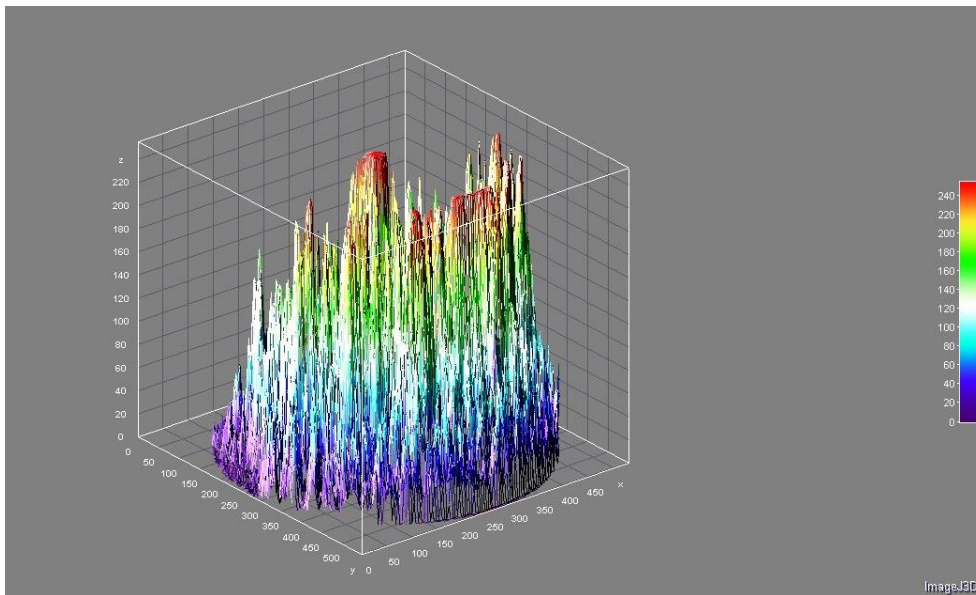
Fonte: O autor (2017)

Figura 65 - Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH *Thermal Lut* da ROI (E)



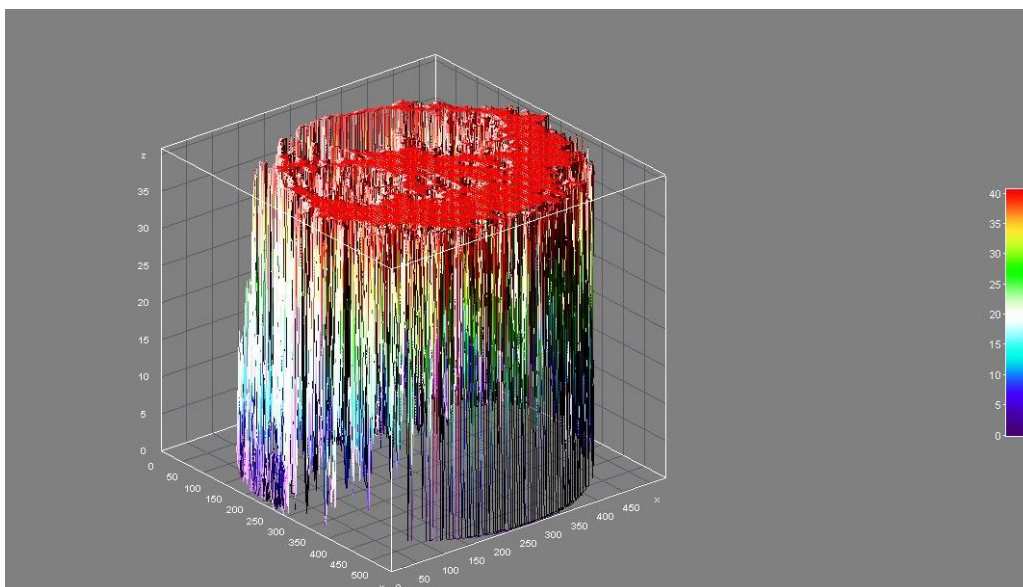
Fonte: O autor (2017)

Figura 66 - Análise 3D MESH *Thermal Lut* da ROI (F)



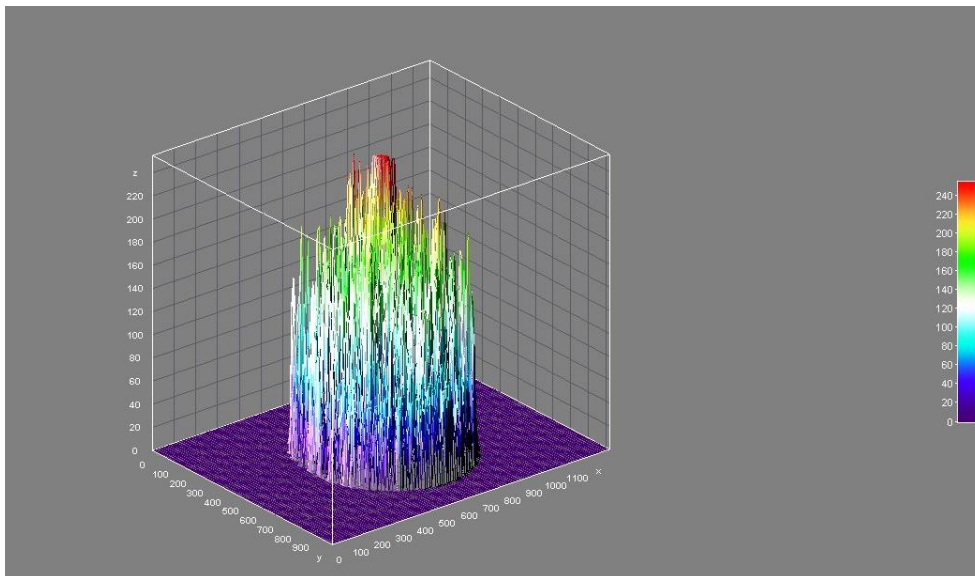
Fonte: O autor (2017)

Figura 67 - Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH *Thermal Lut* da ROI (F)



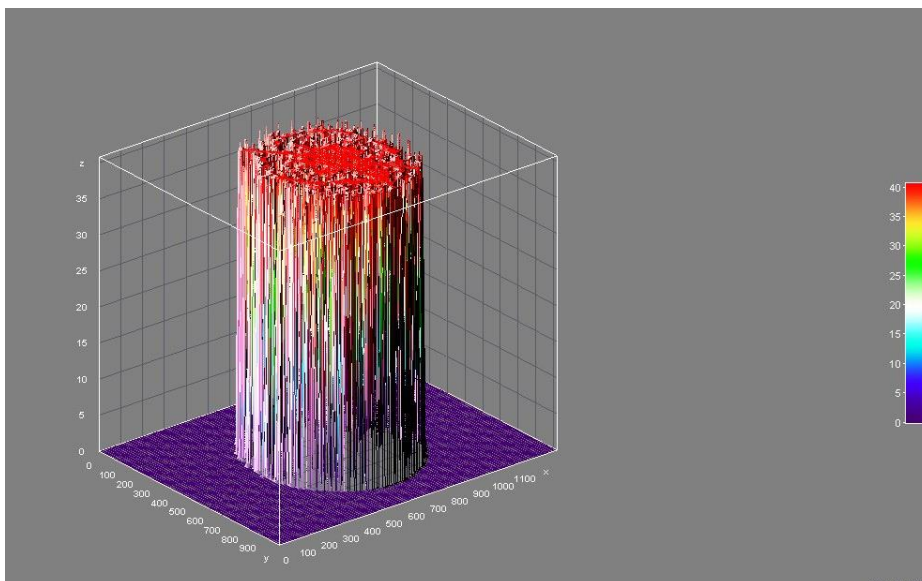
Fonte: O autor (2017)

Figura 68 - Análise 3D MESH *Thermal Lut* da ROI (G)



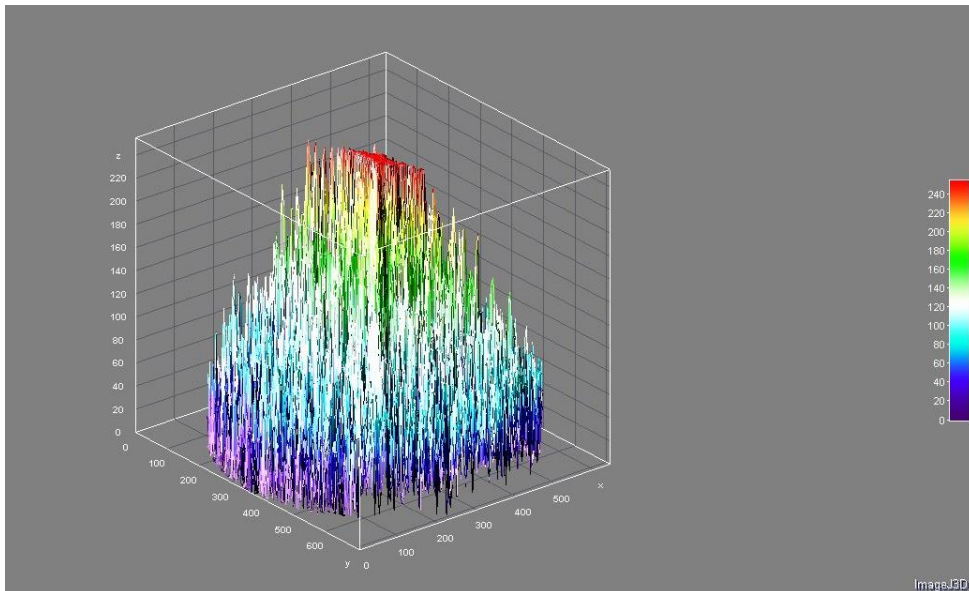
Fonte: O autor (2017)

Figura 69 - Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH *Thermal Lut* da ROI (G)



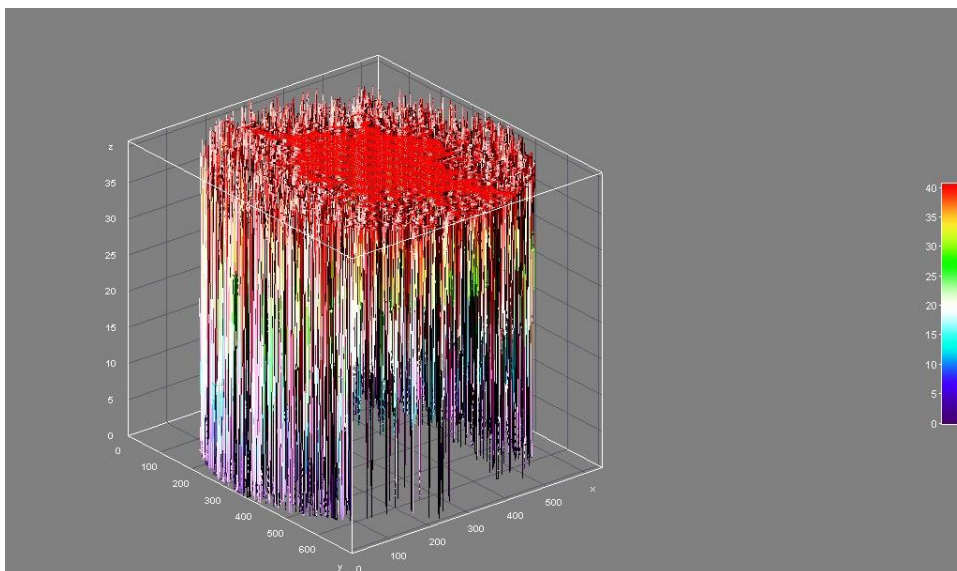
Fonte: O autor (2017)

Figura 70 - Análise 3D MESH *Thermal Lut* da ROI do meio de cultivo



Fonte: O autor (2017)

Figura 71 - Principais picos formadores dos anéis análise 3D MESH *Thermal Lut* da ROI do meio de cultivo



Fonte: O autor (2017)

4.8.2 Descrição das imagens

A análise realizada no quadro 07 considerou o cálculo do ponto central do centroide da região de interesse da imagem, avaliando o parâmetro da amplitude.

As imagens realinhadas apresentaram diferenças significativas com a rotação, devido as limitações do aparato experimental, onde a rotação era feita com o reposicionamento manual da placa, ocasionado deslocamentos verticais e horizontais além da rotação. O resultado quanto à invariância à rotação distingue-se daquele obtido por Tahmasbi (2011), uma vez que esta não foi realizada computacionalmente. Os efeitos de rotação da Placa de Petri diferenciam-se daqueles obtidos pela rotação da região de interesse de uma mesma imagem por recursos computacionais digitais que será discutido na próxima seção. Contudo, esse resultado não implica na descaracterização da invariância à rotação inerente aos polinômios de Zernike. Ver figuras 73-81.

Os resultados provenientes da análise do quadro (7) com polinômios de repetição diferentes zero ($m \neq 0$), apresentaram valores de amplitude mais baixos em comparação com àqueles de repetições maiores que zero.

Os valores de maior amplitude foram encontrados entre os polinômios de repetição zero ($m=0$). Dentre estes, observa-se um acréscimo na amplitude com o aumento da ordem. Exceto o polinômio de ordem zero que apresentou maior amplitude quando comparado com o polinômio de ordem dois. O resultado de maior amplitude encontra-se com aplicação do polinômio de $n=14$ e $m = 0$.

Entre os valores de amplitude com repetição diferentes de zero ($m \neq 0$), houve um decréscimo de amplitude com o aumento da ordem. Dentre os quais, o polinômio de ordem, $n=3$ e repetição $m = 3$, apresentou maior amplitude enquanto que o polinômio de ordem, $n=15$ e repetição $m = 15$, apresentou menor amplitude. A explicação é que o aumento da ordem pode elevar o ruído do sinal na análise das bordas.

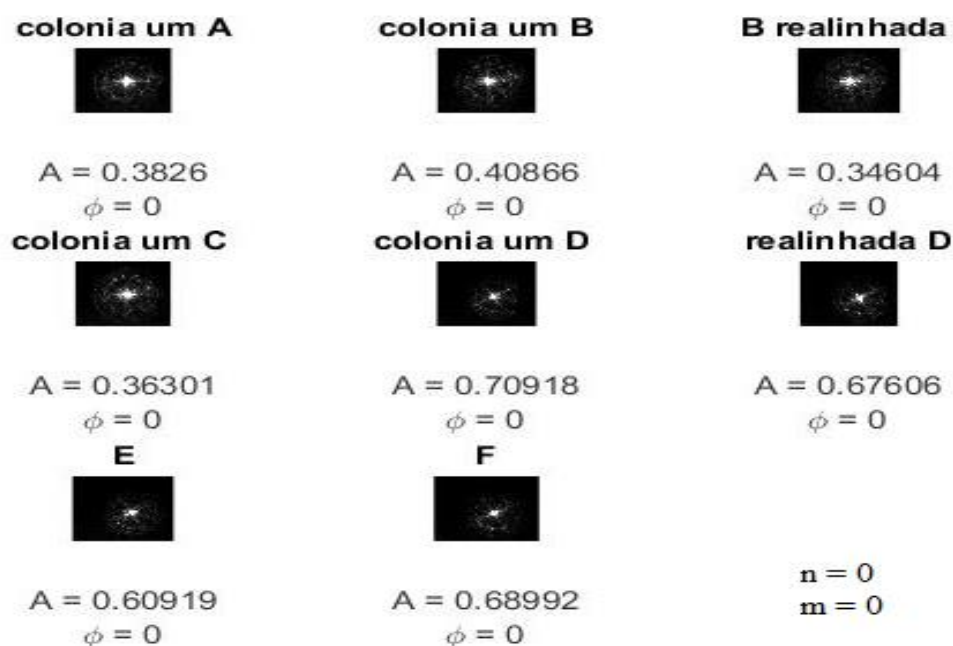
Em geral, o maior valor de amplitude encontrado para a análise da imagem considerou a ordem $n = 14$ e $m = 0$, enquanto que o de menor amplitude avaliou o polinômio de ordem 15 e $m=15$.

Os resultados apresentaram-se coerentes com os polinômios de Zernike. Os polinômios de repetição zero avaliam melhor o centro em detrimento das bordas. Por outro lado, os polinômios selecionados de repetição diferente de zero avaliam melhor as bordas. Portanto, os resultados expressaram valores mais elevados e mais baixos de amplitude para as análises polinomiais de ênfase no centro e nas bordas, respectivamente.

Como consequência, as distorções do sinal da imagem estão concentradas mais no centro da imagem. Uma possível justificativa é que no centro da imagem há maior concentração da luz do Laser, devido ao maior obstáculo fornecido pelo centro da colônia. Os centros de colônias mortas possuem maior quantidade de células e excretados celulares em relação às suas extremidades.

Analisando os resultados de fase e os momentos de Zernike normalizados de cada polinômio ($Z_{n,m}$) aplicado à imagem da colônia um, obtém-se as respectivas posições da maior amplitude de cada imagem individualmente processada.

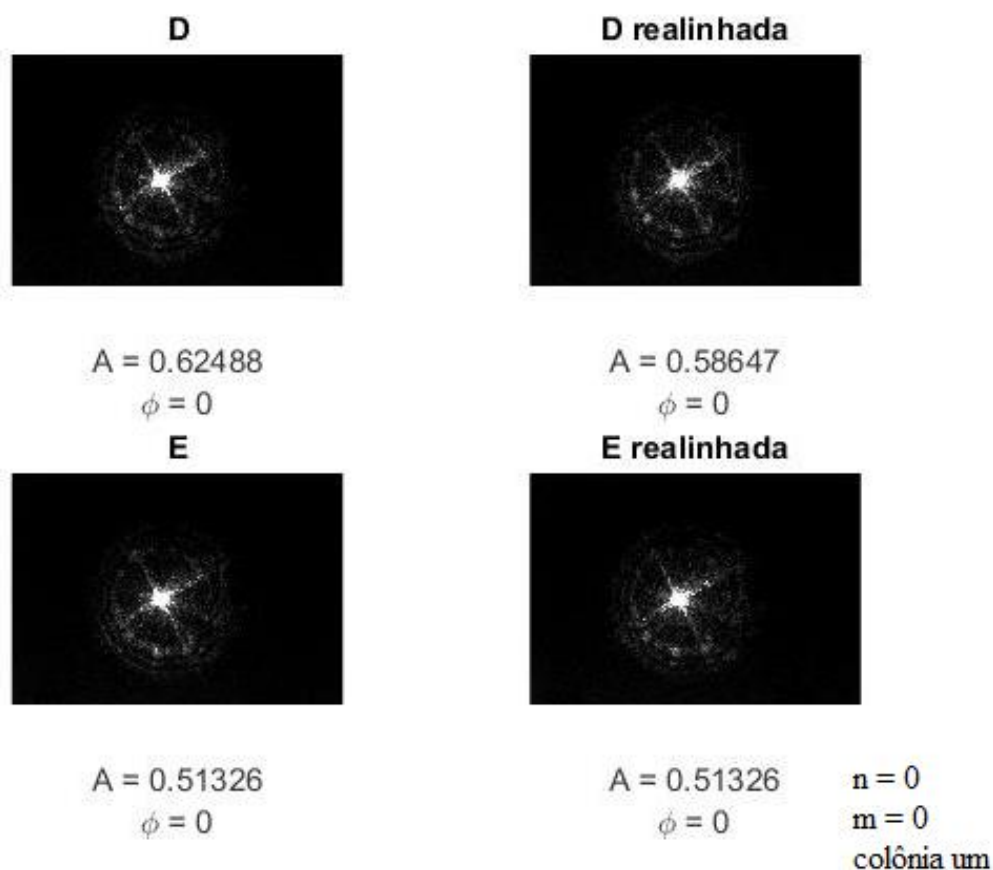
Figura 72 - Análise de invariância à rotação e momentos de ZERNIKE do diagrama de difração



Fonte: O autor (2016)

Comparação da aplicação do algoritmo computacional dos polinômios de Zernike para o cálculo da fase e amplitude de cada imagem de diagrama de difração, considerando a ordem zero e a frequência zero (primeiro polinômio de Zernike). As imagens capturadas são referentes aos diagramas de difração obtidos pela interação do LASER com a colônia I cultivado de BRS. As letras representam as sequências das imagens fotografadas, o termo “realinhada” trata do movimento de giro da placa de Petri em torno do centro da colônia, alterando o ângulo de rotação, seguido de realinhamento manual para centramento da colônia com o laser. Onde o valor A, calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal.

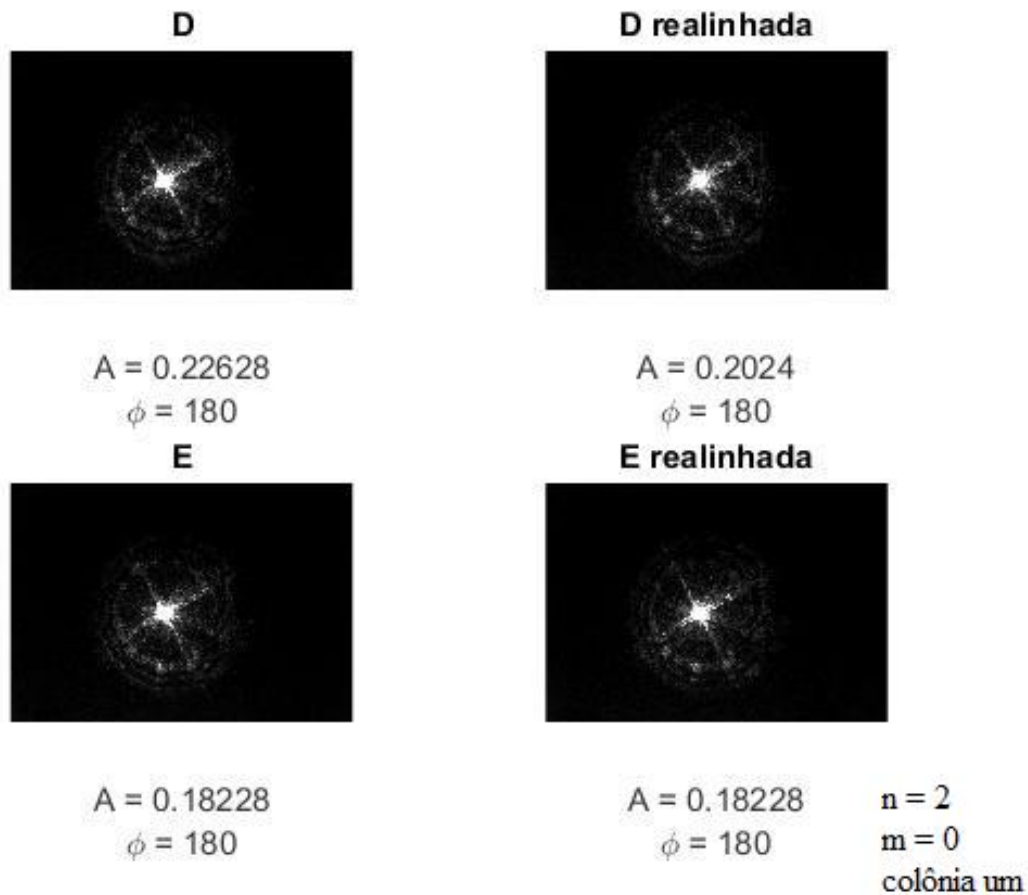
Figura 73 - Cálculos dos momentos de ZERNIKE



Fonte: O autor (2016).

Comparação da análise dos diagramas de quatro imagens capturadas da colônia um. Onde o valor A, calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal do momento de Zernike (n, m), onde a ordem é n = 0 e a repetição é m = 0.

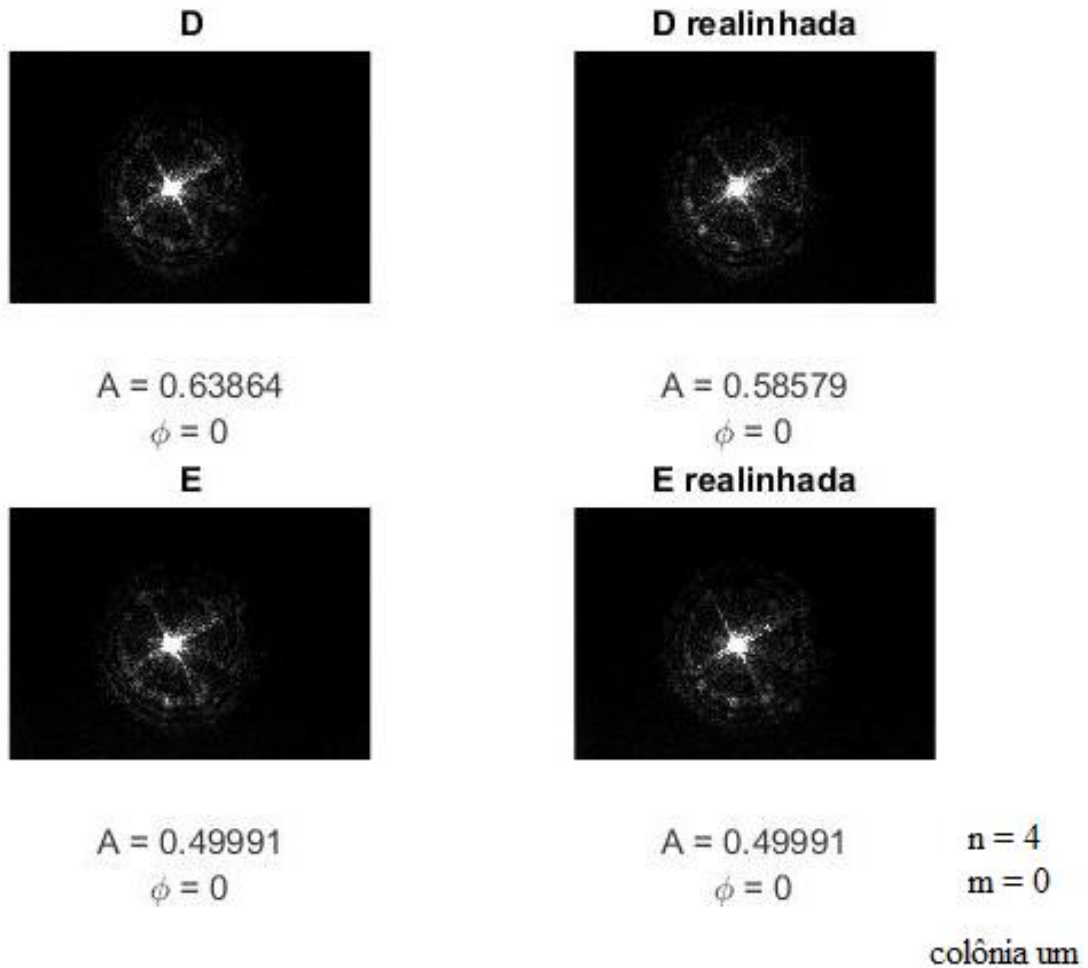
Figura 74 - Cálculos dos momentos de ZERNIKE



Fonte: O autor (2016).

Comparação da análise dos diagramas de quatro imagens capturadas da colônia um. Onde o valor A, calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal do momento de Zernike (n,m), onde a ordem é n = 2 e a repetição é m = 0.

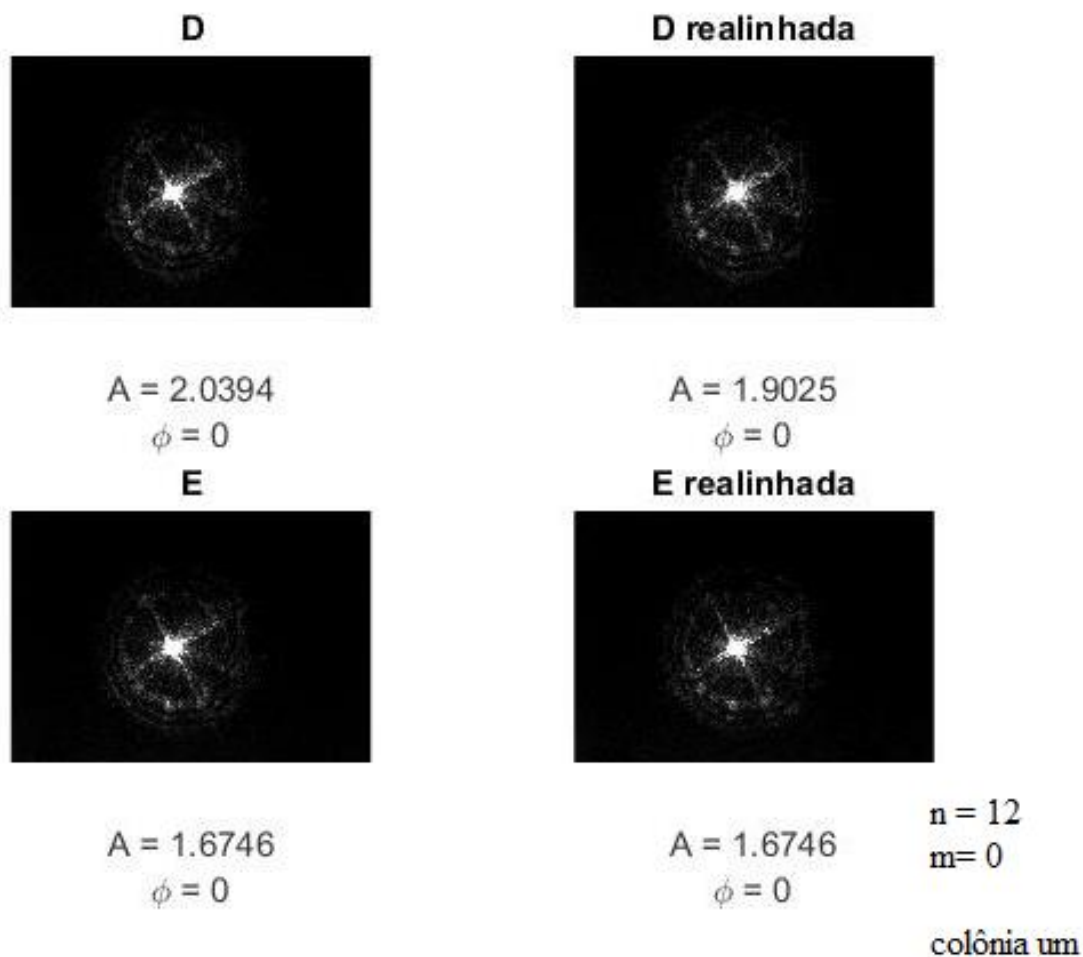
Figura 75 - Cálculos dos momentos de ZERNIKE



Fonte: O autor (2016)

Comparação da análise dos diagramas de quatro imagens capturadas da colônia um Onde o valor A, calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal do momento de Zernike (n,m), onde a ordem é n = 4 e a repetição é m = 0.

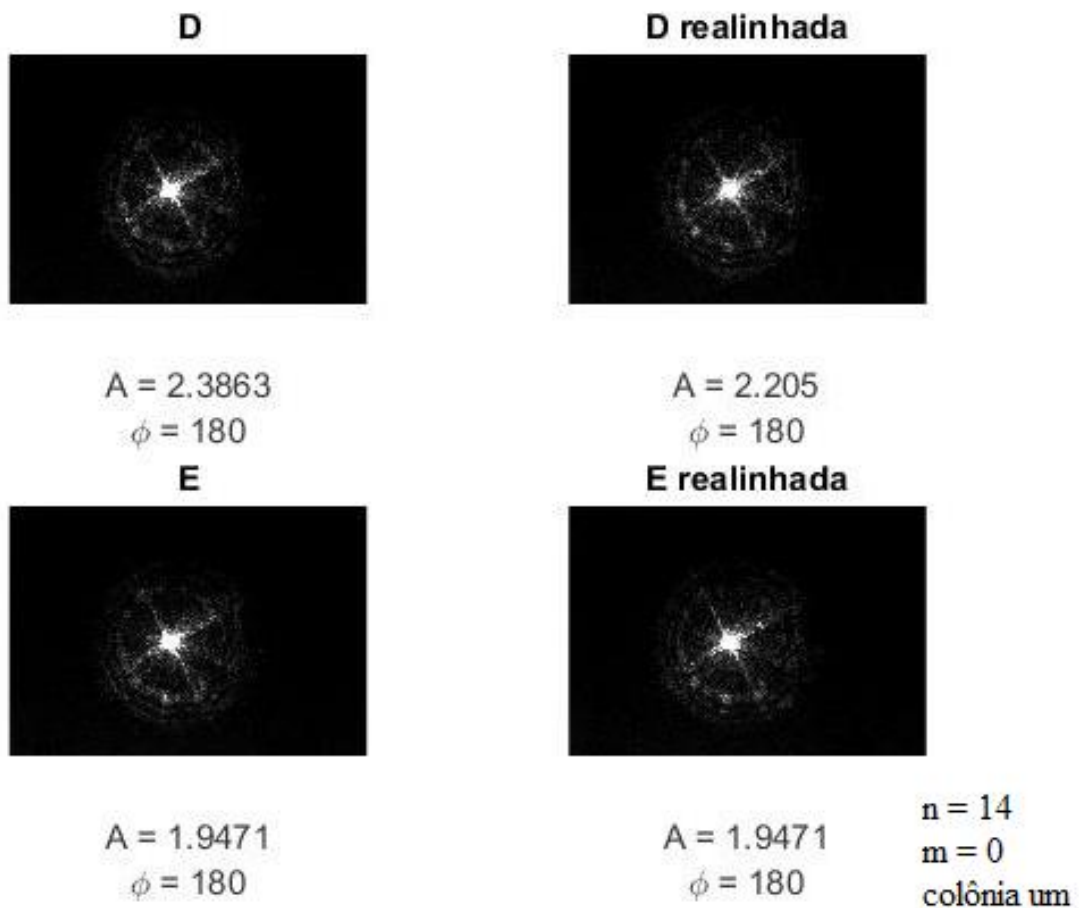
Figura 76 - Cálculos dos momentos de ZERNIKE



Fonte: O autor (2016)

Comparação da análise dos diagramas de quatro imagens capturadas da colônia um. Onde o valor A, calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal do momento de Zernike (n,m), onde a ordem é n = 12 e a repetição é m = 0

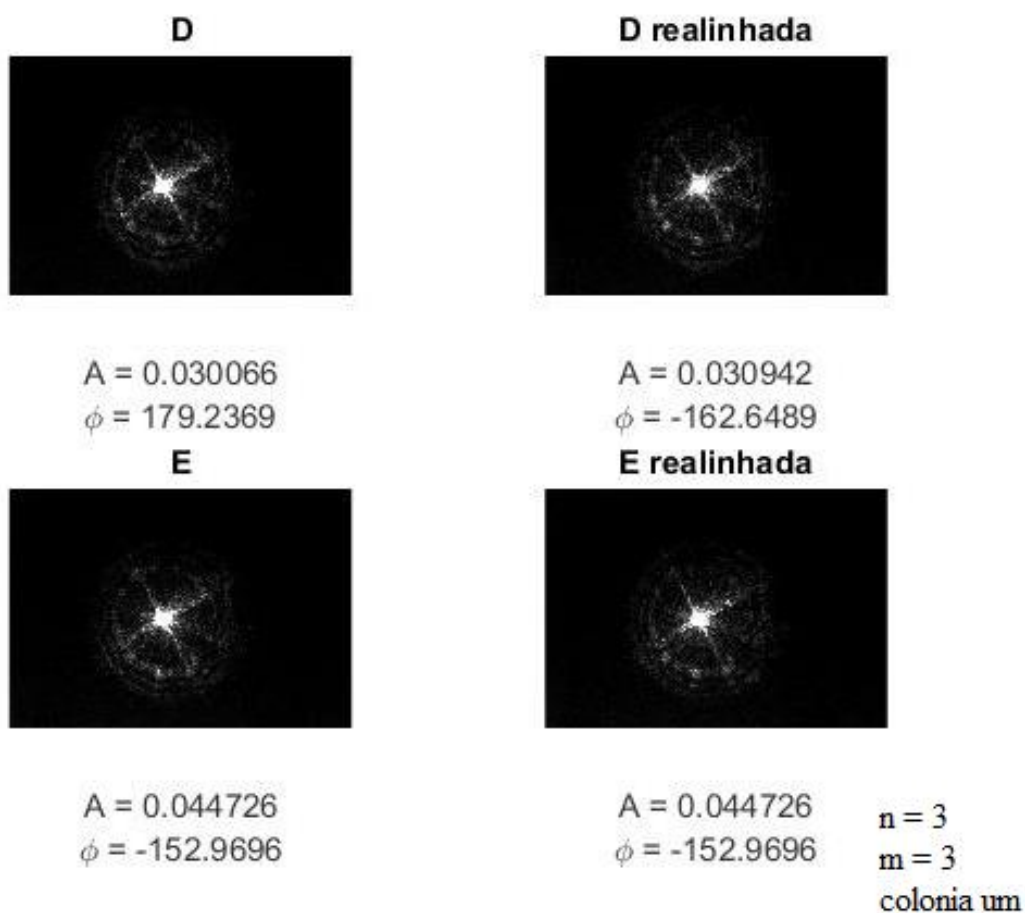
Figura 77- Cálculos dos momentos de ZERNIKE



Fonte: O autor (2016)

Figura (38) Comparação da análise dos diagramas de quatro imagens capturadas da colônia um. Onde o valor A, calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal do momento de Zernike (n, m), onde a ordem é n = 14 e a repetição é m = 0.

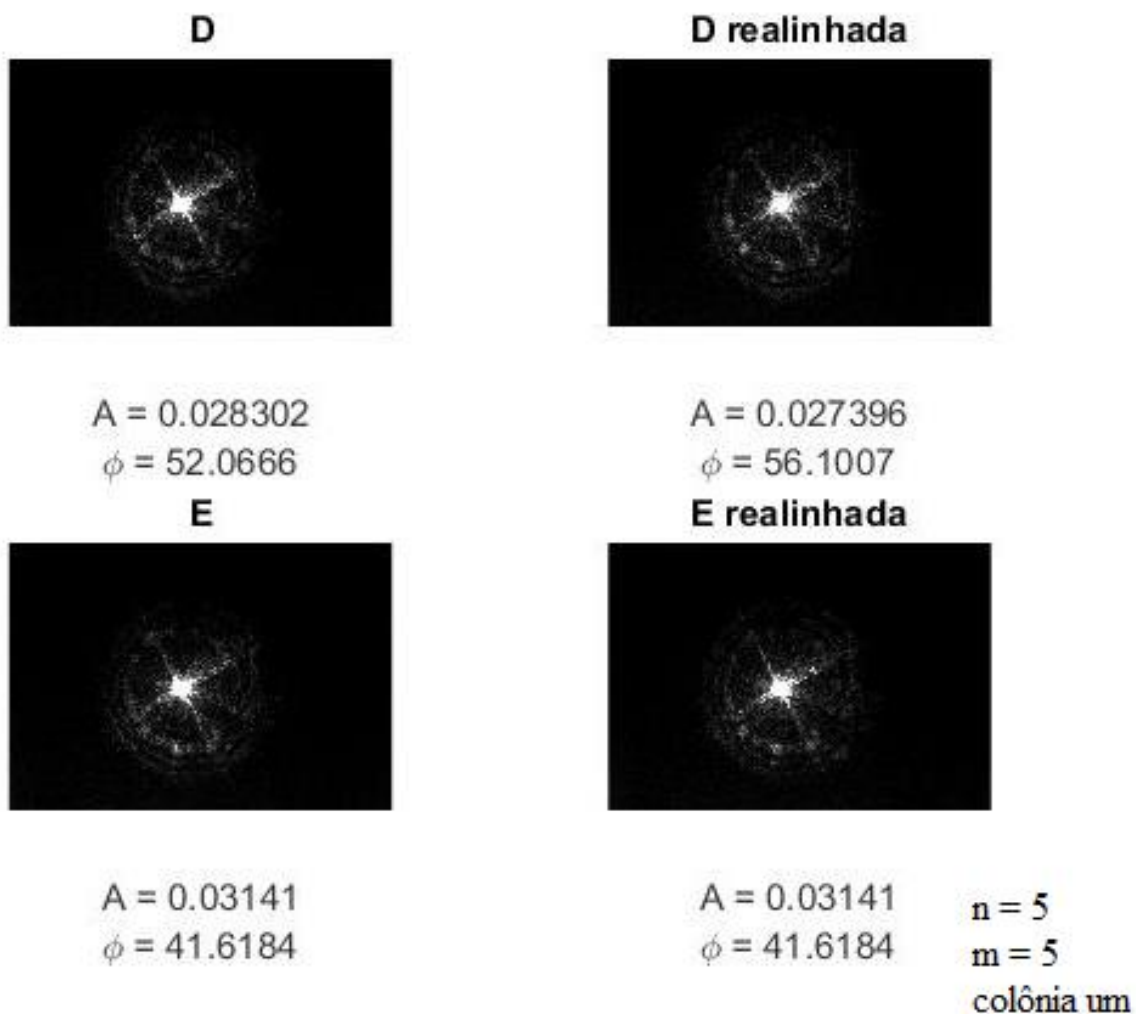
Figura 78 - Cálculos dos momentos de ZERNIKE



Fonte: O autor (2016)

Comparação da análise dos diagramas de quatro imagens capturadas da colônia um. Onde o valor A , calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal do momento de Zernike (n, m), onde a ordem é $n = 3$ e a repetição é $m = 3$.

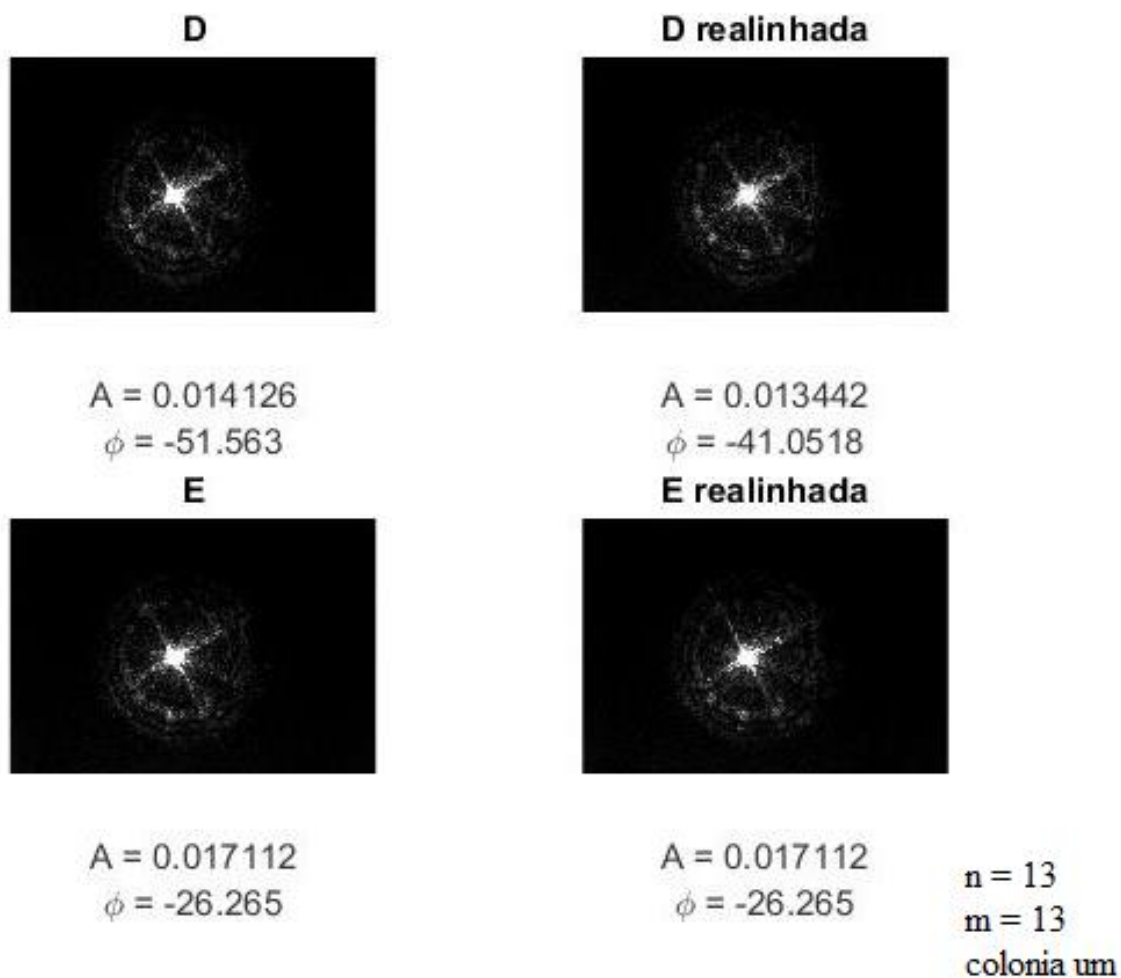
Figura 79 - Cálculos dos momentos de ZERNIKE



Fonte: O autor (2016)

Comparação da análise dos diagramas de quatro imagens capturadas da colônia um. Onde o valor A, calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal do momento de Zernike (n,m), onde a ordem é n = 5 e a repetição é m = 5.

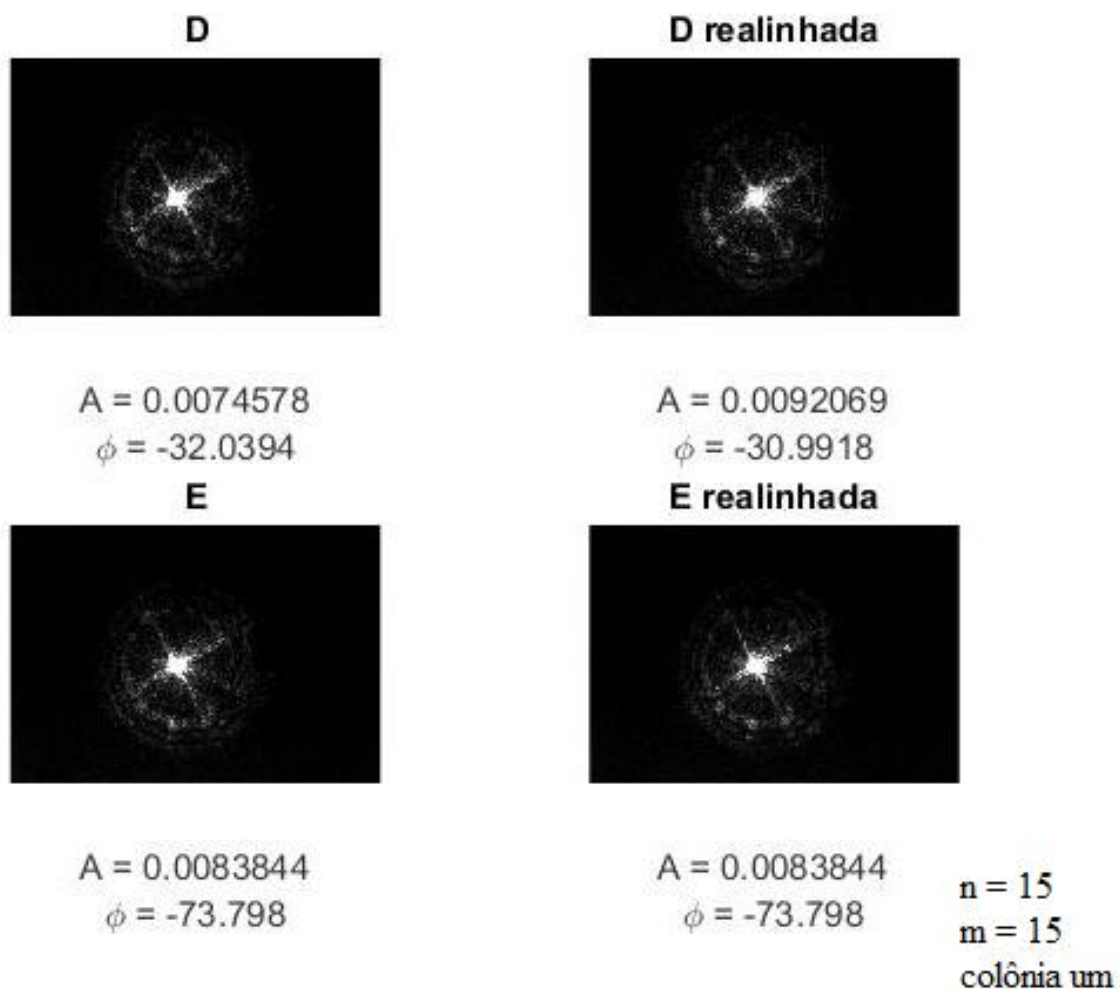
Figura 80 - Cálculos dos momentos de ZERNIKE



Fonte: O autor (2016)

Comparação da análise dos diagramas de quatro imagens capturadas da colônia um. Onde o valor A , calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal do momento de Zernike (n,m), onde a ordem é $n = 13$ e a repetição é $m = 13$.

Figura 81 - Cálculos dos momentos de ZERNIKE



Fonte: O autor (2016)

Comparação da análise dos diagramas de quatro imagens capturadas da colônia um. Onde o valor A, calcula a amplitude do momento (TAHMASBI, 2013) e ϕ representa a fase do momento relacionada ao ângulo azimutal do momento no momento de Zernike (n,m), onde a ordem é n = 15 e a repetição é m = 15.

Quadro 7 - Resultados do PDI aplicados a colônia um.

n	m	Z	Z _n	Dimensão da imagem	A	Φ
0	0	98065	0.6249	447x447	0,62488	0
2	0	-1.1837e+04	-0.2263	447x447	0,22628	180
4	0	2.0045e+04	0.6386	447x447	0.6386	0
3	3	-1.1795e+03 + 1.5709i.	-0.0301 + 0.0004i	447x447	0.0301	179.2369
5	5	4.5507e+02 + 5.8386i	0.0174 + 0.0223i	447x447	0.0283	52.0666
12	0	2.4619e+04	2.0394	447x447	2.0394	0
14	0	-2.4966e+04	-2.3863	447x447	2.3863	180
13	13	9.8438e+01 - 1.2403i	0.0088 - 0.0111i	447x447	0.0141	-51.5630
15	15	62.0069 - 38.8056i	0.0063 - 0.0040i	447x447	0.0075	-32.0394

Fonte: Próprio Autor (2017)

Polinômios de Zernike de menor ordem (azul) e de maior ordem (lilás). Os polinômios com repetição zero avaliam melhor o centro, enquanto os de repetição diferente de zero, consideram as bordas. As variáveis são representadas como: n (ordem), m (repetição), Z(momento de Zernike), Z_n (momento de Zernike normalizado), A o módulo amplitude) do polnômio normalizado e Φ afase.

4.8.2.1 Rotação

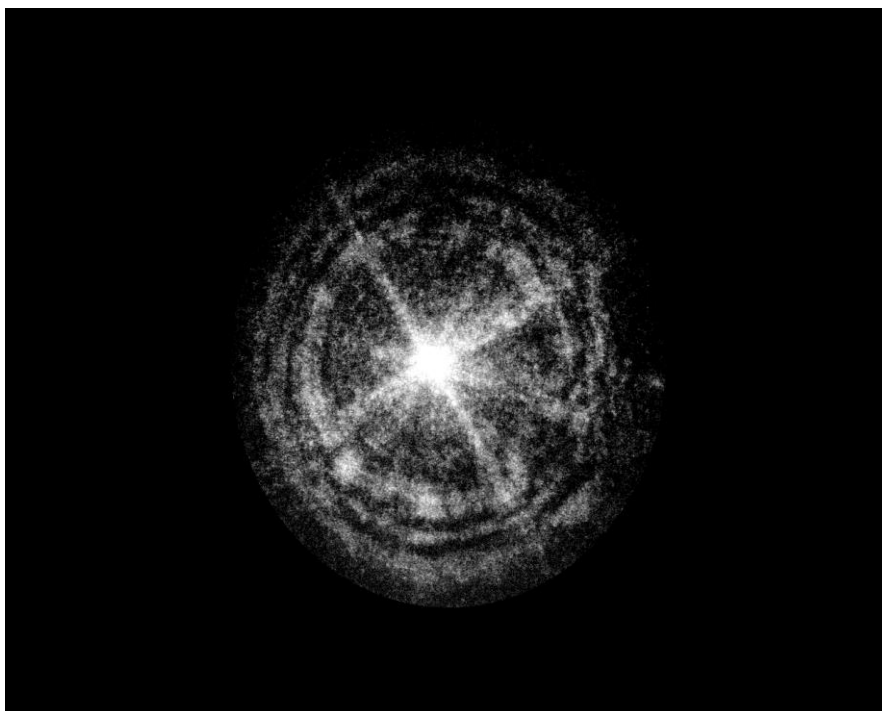
O resultado do teste de rotação da ROI C (figuras 82-83) a 90 graus à direita em torno do centroide apresentou o resultado esperado com insignificância na variação da amplitude A do polinômio de Zernike. O resultado de amplitude para o diagrama de difração da colônia um sem processamento de equalização e sem segmentação realizada pelo Image J, apresentou um resultado de A= 0, 49991, para n = 4 e m = 0. A mesma imagem após processo de equalização e segmentação pelo

Image J, após descrita pelos polinômios de Zernike, nas mesmas condições de ordem e frequência, apresentou amplitude de 1,1781. Portanto, foi observado um importante aumento na amplitude de Zernike em aproximadamente 100% em relação ao ROI não equalizada e com segmentação não realizada através do Image J.

A análise de rotação das ROIs (figuras 87-91) sem processo equalização e as ROIs após equalização apresentam diferenças insignificantes tanto entre as imagens (1280x1024), 8-bits, não rotacionadas quanto àquelas rotacionadas. Em ROI (A), (1280x1024), 8-bits, tem-se o padrão de difração segmentado pelo Image J e não equalizado. As ROIs rotacionadas relacionadas aos padrões de difração das cinco colônias foram rotacionadas nomeadas como ROI (C), ROI (D), ROI (E), ROI (F), ROI (G), respectivamente às colônias I, II, III, IV e V, apresentadas nas figuras (87-91) como imagens (1280x1024), 8-bits, arquivos em Bitmap (BMP). Os resultados demonstram que não houve variação de amplitude significativa após a rotação das ROIs. Confirmando a invariância dos polinômios de Zernike quando realizados computacionalmente.

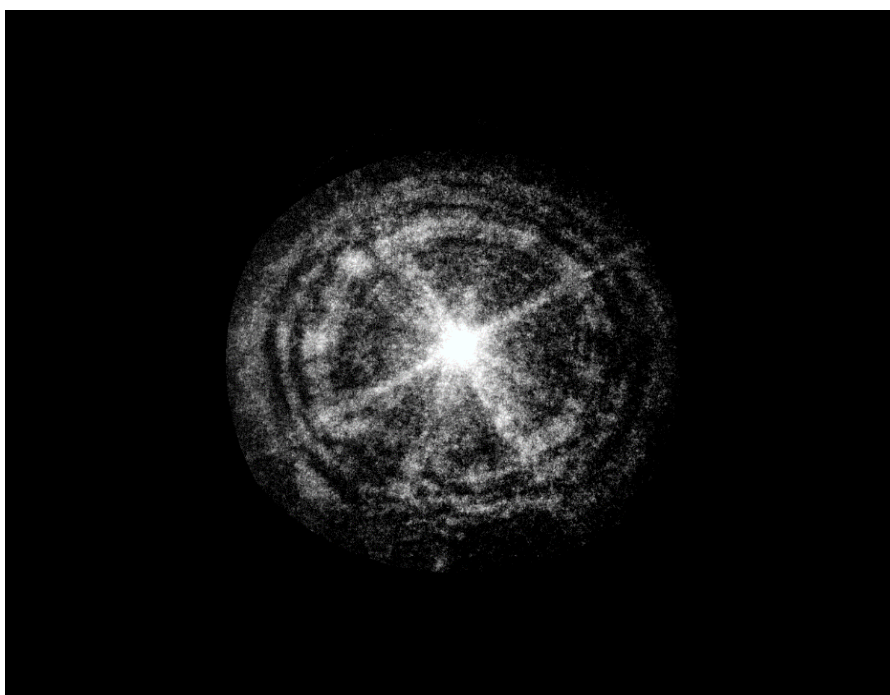
Outra análise foi da intervenção do processamento de aumento da qualidade da imagem pelo contraste sobre os resultados de amplitude encontrados da aplicação dos polinômios de Zernike. Nesse sentido, o processo de equalização e normalização não afetaram significativamente as amplitudes entre as ROIs segmentadas pelo Image J.

Figura 82 - ROI (C)

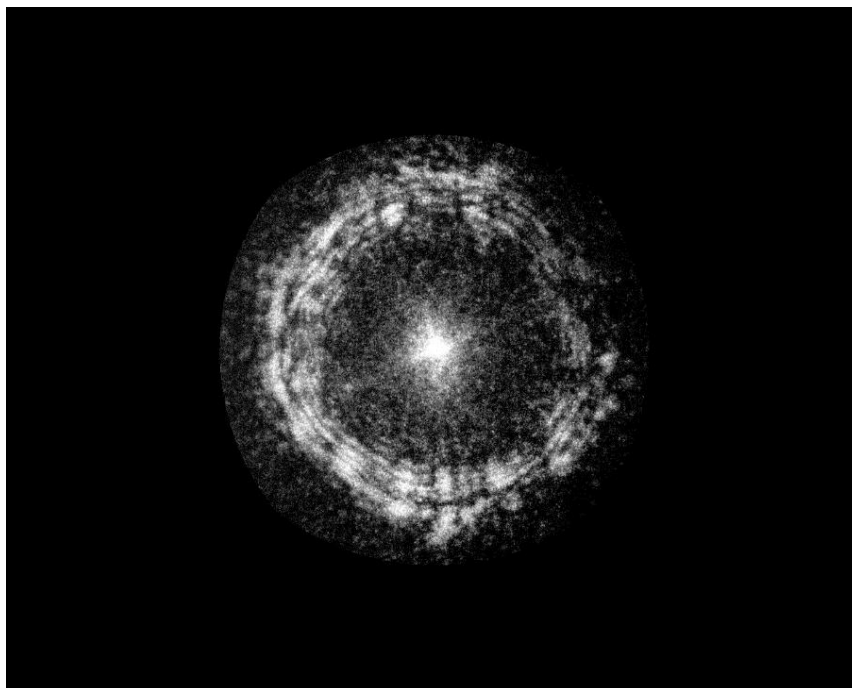


Fonte: O autor (2017).

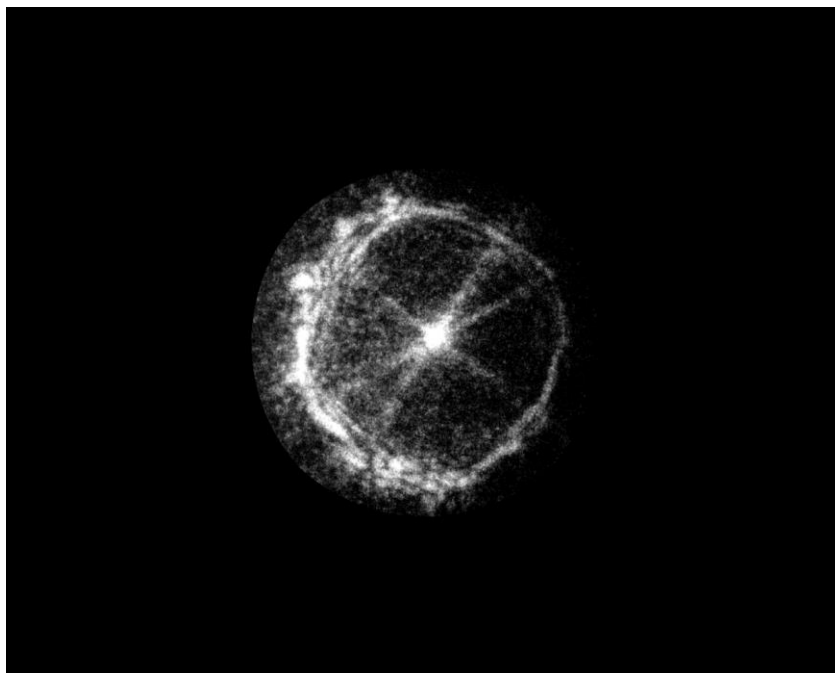
Figura 83 - ROI (C) rotacionada 90°



Fonte: O autor (2017).

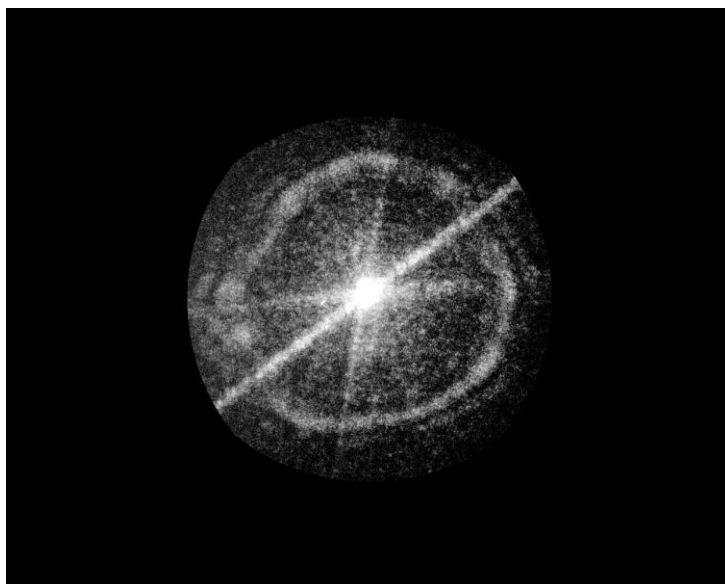
Figura 84 - ROI (D)

Fonte: O autor (2017).

Figura 85 - ROI (E)

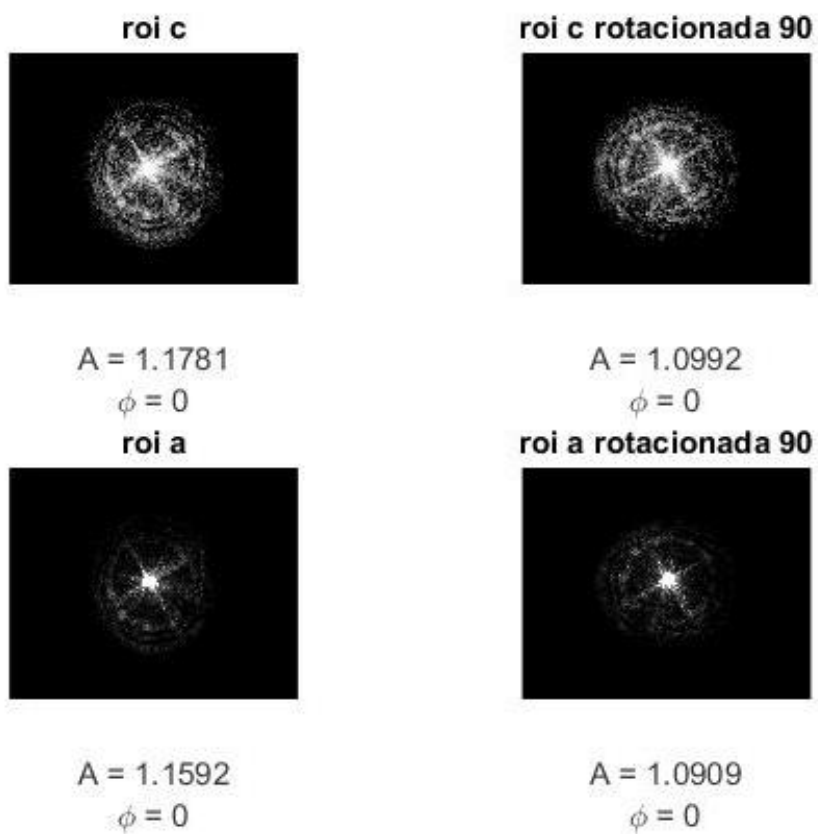
Fonte: O autor (2017).

Figura 86 - ROI (G)



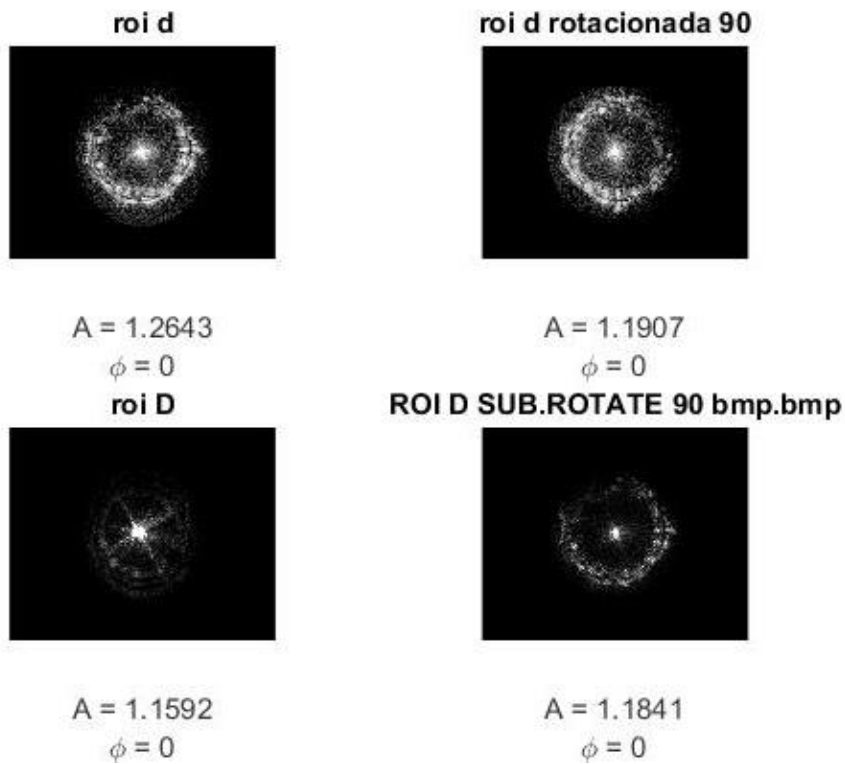
Fonte: O autor (2017).

Figura 87 - ROI C (COL I) teste de invariância à rotação 1280X1024



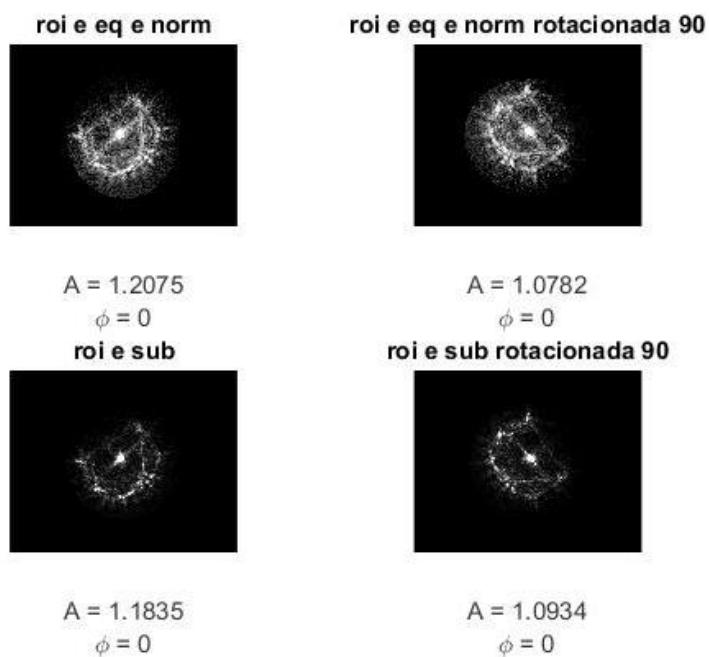
Fonte: O autor (2017).

Figura 88 - ROI D (COL II) teste de invariância à rotação 1280X1024



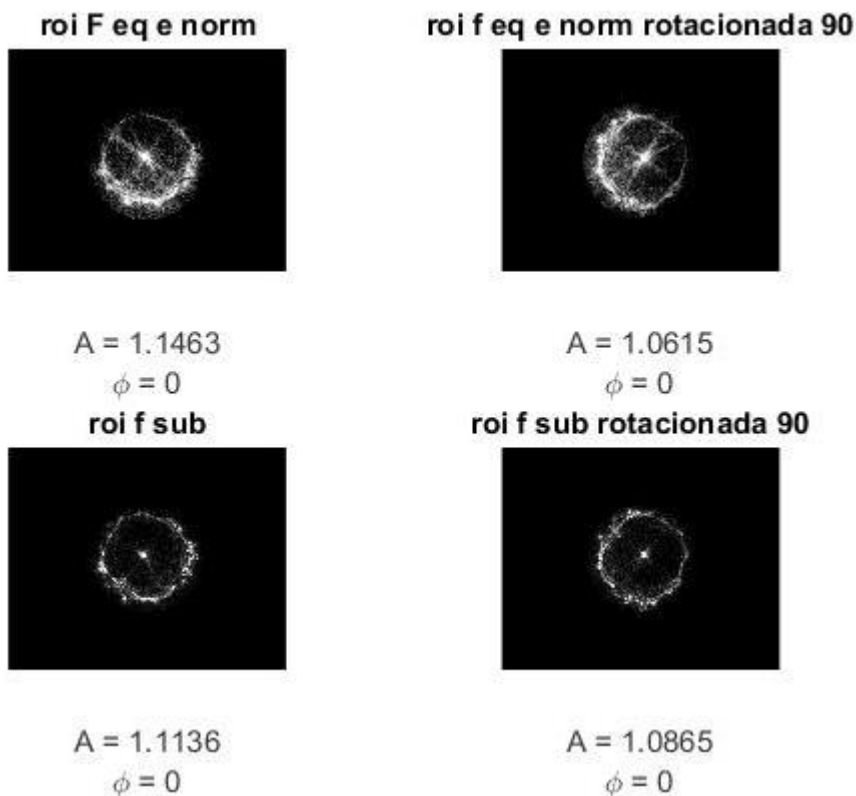
Fonte: O autor (2017).

Figura 89 - ROI E (COL III) teste de invariância à rotação 1280X1024



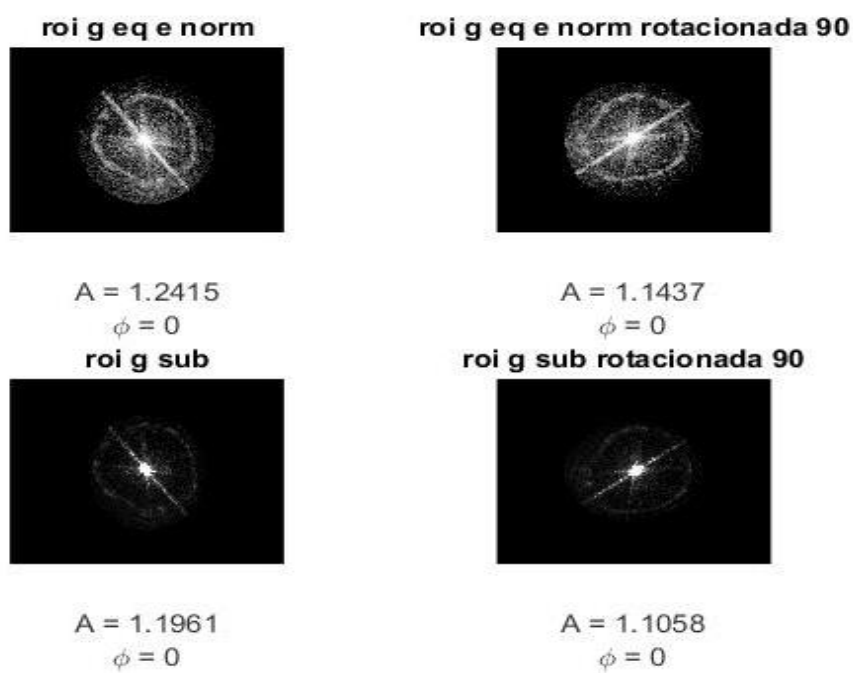
Fonte: O autor (2017).

Figura 90 - ROI F (COL IV) teste de invariância à rotação 1280X1024



Fonte: O autor (2017).

Figura 91 - ROI G (COL V) teste de invariância à rotação 1280X1024



Fonte: O autor (2017).

5. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que é possível gerar o efeito modulador de fase e amplitude a partir da iluminação individual de colônias de bactérias redutoras de sulfato por um laser. Os padrões de difração provenientes das colônias de BRS são gerados, sendo possível aplicar diferentes métodos de processamento digital de imagens para descrição e análise dos padrões de difração. No entanto, a viabilidade do sistema óptico para o reconhecimento de padrões em visão computacional, somente poderá ser conclusiva com a continuação deste trabalho inicial, com implementação de controle das variáveis do sistema óptico, do sistema microbiológico e àqueles relacionados à modelagem computacional para reconhecimentos de padrões a partir de imagens.

A continuidade da pesquisa necessitará de uma equipe multiprofissional especializada nas áreas de conhecimento envolvidos nesse projeto científico. A comunicação e integração entre os profissionais é primordial para o rigor científico ao qual está condicionado esse trabalho.

A pesquisa envolvida nesse trabalho apresentou importantes contribuições no que dizem respeito à Pesquisa, Desenvolvimento e Tecnologia. Muito por iniciar o desenvolvimento de um protótipo para rápida identificação de espécies bacterianas com custos adequados ao Mercado Consumidor Brasileiro.

Especialmente para Indústria de Petróleo e Gás este trabalho inédito confirma a possibilidade de aplicar a metodologia de identificação de espécies bacterianas a partir de *fingerprints* gerados pela modulação de fase e amplitude de colônias em meios de cultivo sólidos de amostras de águas de produção em poços petrolíferos, em destaque as BRS. Nesse contexto, uma vez validado o método em segundo momento poderá determinar redução apreciável do tempo e custos analíticos.

Tecnicamente, o trabalho contribui para identificar as áreas de melhoramento necessárias para a evolução do equipamento e as importantes considerações sobre a biofísica de acordo com o perfil de cultivo de BRS. Além disso, identifica a necessidade de adaptação do modelo computacional de tal maneira que se possa reconhecer espécies bacterianas cultivadas em cultivo mistos e heterogêneos de difícil isolamento. Outro aspecto prático foi a confirmação da utilização do cultivo Postgate para o método analítico proposto. O Postgate é o meio necessário para

cultivo de BRS e da maioria das espécies provenientes do Petróleo. As características do meio de cultivo poderiam interferir, como foi demonstrado nos experimentos dessa pesquisa, inviabilizando a aplicação da metodologia. Ressalta-se que o uso do meio Postgate para identificação por espalhamento elástico da luz em meio sólido foi testado pela primeira vez nesse trabalho de Pesquisa.

A pesquisa envolvida nessa dissertação de mestrado apresenta impactos importantes para o Desenvolvimento Tecnológico na área da Bioengenharia no Brasil. O sistema proposto baseado em modelos anteriores já disponibilizados no Mercado Internacional pode estar adaptado à realidade Brasileira. Às necessidades do consumidor no Brasil, como da identificação de espécies bacterianas epidemiológicas no Brasil ou àquelas determinadas pelas Agências Nacionais de Regulação como de monitoramento obrigatório.

A confirmação da viabilidade do método para análise de BRS implicará em aperfeiçoamento do método visando sua aplicação na Indústria de Petróleo e Gás, assim como para toda a Indústria que necessite de monitoramento desse tipo de bactérias, a exemplo do monitoramento de efluentes. O novo método para análise de BRS poderá em sua evolução, garantir redução de tempo de 28 dias para no máximo 24h. Redução de custos e adequação para o controle industrial devido à rapidez e praticidade.

A importância para a Indústria de Petróleo e Gás irá se refletir em eficácia na prevenção e controle de BRS, melhor controle da corrosão e seus impactos ambientais, ocupacionais e operacionais, ocasionados por CIM; redução de contaminantes de águas devido à maior especificidade dos Biocidas aplicados em tempo hábil uma vez que haverá eficiência dos resultados microbiológicos e inibição da proliferação de micro-organismos mais resistentes relacionados ao uso indiscriminados de Biocidas na Indústria.

A continuidade dessa pesquisa é fundamental para propor um instrumento de medição em tempo real, livre de marcadores, baixo custo operacional e computacional, capaz de medir com boa exatidão e precisão bactérias presentes no petróleo e águas de produção, especialmente as BRS.

As contribuições acadêmicas são fundantes dessa pesquisa já que integram diversas áreas de conhecimento e, portanto, demanda uma equipe multidisciplinar nas áreas da tecnologia, física, microbiologia, engenharia de materiais, saúde, computacionais, dentre outras relacionadas à implementação do projeto.

Diante das projeções desse projeto de Pesquisa que integra um projeto mais amplo de desenvolvimento de um biossensor óptico de rápida identificação e livre de marcadores para culturas microbiológicas sólidas e semissólidas, é importante afirmar as possíveis evoluções.

No âmbito da Física Óptica e instrumental, o modelo poderá evoluir para a redução de ruídos provenientes do sistema, menor tamanho físico do equipamento, automatização do sistema e integração com redes, demandando diversas pesquisas futuras. A sugestão que parte da conclusão do estudo de revisão incrementada nessa dissertação é a aproximação do sistema óptico em desenvolvimento nesse trabalho, àquele proposto no modelo de Minoni, Signoroni e Nassini (2015) em detrimento ao modelo de Banada (2007), Bae (2008) e Buzalewicz (2014) ao qual foi baseado o sistema óptico do biossensor utilizado.

No âmbito da Modelagem Computacional, a sugestão é realizar testes comparativos futuros com outros modelos matemáticos para análise de imagens visando maior eficiência e baixo custo computacional. Alguns algoritmos computacionais como o proposto por Genuer, Gal, *et al.* (2016) podem ser testados. Uma proposta é a pesquisa do método com uso de análise fractal e algoritmos de evolução genética.

As análises *Mesh Thermal Lut* fornecem informações importantes que sugerem estar relacionadas com a determinação de um padrão de imagem baseado no mapa de calor. Esses resultados podem indicar um novo caminho de pesquisa para análise dos padrões de difração considerando seus mapas de calor para reconhecimento de padrões de imagens, desde que sejam cultivadas as cepas padrões de espécies conhecidas de bactérias.

No campo da microbiologia e biofísica, muito trabalho pode ser realizado para avaliar e medir as colônias bacterianas de tal maneira que avalie melhor as características morfológicas e possibilite estudos de simulação para aprimoramento tecnológico. Assim também, o uso de cultivos puros de BRS para estudos futuros de validação do método.

REFERÊNCIAS

ABBAS, S. The Non-Organic Theory of the Genesis of Petroleum., Dept. of Physics,Utkal University Bhubaneswar and Institute of Physics Bhubaneswar ,India, 1996. Disponivel em: <<http://arxiv.org/pdf/physics/9610011.pdf> >. Acesso em: 28 mar. 2015.

ABDELHASEIB, M. et al. Fiber optic and light scattering sensors: Complimentary approaches to rapid detection of Salmonella enterica in food samples., 61, 2016. 135-145.

ABDULINA, D. et al. Test-systems for monitoring of corrosion-relevant sulfate-reducing bacteria using real-time PCR assay. **Biotechnologia Acta**, v. 9, n. 1, 2016.

AKOVA, F. et al. A machine-learning approach to detecting unknown bacterial serovars., 2010. 289-301.

ALMEIDA, P. F. et al. Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters., 2006. 183-195.

ARIMA, Y. et al. **Biosensors and biodetection**. [S.l.]: Human Press, 2009.

BAE, E. et al. Biophysical modeling of forward scattering from bacterial colonies using scalar diffraction theory. **Applied optics**, v. 46, n. 17, p. 3639-3648, 2007.

BAE, E. et al. Analysis of time-resolved scattering from macroscale bacterial colonies. **Journal of biomedical optics**., 13, n. 1, 2008. 014010-014010-8.

BAE, E. et al. System automation for a bacterial colony detection and identification instrument via forward scattering. **Measurement Science and Technology**, West Lafayette,Indiana, USA, 20, 12 November 2008. 015802.

BAE, E. et al. Prediction of the light scattering patterns from bacteria colonies by a time-resolved reaction-diffusion model and the scalar diffraction theory. **International Society for Optics and Photonics**, 2009. 73150A-73150A-7.

BAE, E. et al. System automation for a bacterial colony detection and identification instrument via forward scattering. **Measurement Science and Technology**, 2009. 015802-015811.

BAE, E. et al. Modeling light propagation through bacterial colonies and its correlation with forward scattering patterns. **Journal of biomedical optics**, v. 15, n. 4, 2010. 045001-045001-11.

BAE, E. et al. Label-free identification of bacterial microcolonies via elastic scattering, 2011. 637-644.

BAE, E. et al. Development of a microbial high-throughput screening instrument based on elastic light scatter patterns. **Review of Scientific Instruments**, 83, n. 4, 2012. 044304.

BAE, E. et al. Investigation of the presence of rod-shaped bacteria on food surface via elastic light scattering. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, p. 344-352, 2012.

BAE, E. et al. Portable bacterial identification system based on elastic light scatter patterns. **Journal of biological engineering**, 6, 2012. 1-11. Disponivel em: <<http://www.jbioleng.org/content/6/1/12>>.

BAE, E. et al. Development of a microbial high-throughput screening instrument based on elastic light scatter patterns., 2012a. 044-304.

BAE, E. et al. Portable bacterial identification system based on elastic light scatter patterns., 6, 2012b. 1.

BAE, E. et al. Current status and future prospects of using advanced computer-based methods to study bacterial colonial morphology., 2015. 1-12.

BAI, N. et al. Development of a real-time system of monitoring bacterial colony growth and registering the forward-scattering pattern. In: SPIE Defense, Security, and Sensing. **In: SPIE Defense, Security, and Sensing. International Society for Optics and Photonics**, 2009. 73150Z-73150Z-8.

BAI, N. et al. Morphology Characterization of Bacterial Colonies for Predicting Forward Scattering Patterns. **In: Optical Sensors. Optical Society of America**, 2010. STuC4.

BANADA, P. P. . G. S. et al. Optical forward-scattering for detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 8, p. 1664-1671, 2007.

BANADA, P. P. et al. Optical forward-scattering for detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species.. **Biosensors and Bioelectronics**, 8, 2007. 1664-1671.

BANADA, P. P. et al. Label-free detection of multiple bacterial pathogens using light-scattering sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 24, n. 6, 2009. 1685-1692. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/bios>.

BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. (). Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems., Cambridge University Press, 2007.

BARTON, L. L.; HAMILTON, W. A. **Sulphate-reducing Bacteria**. [S.l.]: Cambridge University Press, 2007. ISBN 9780511541490.

BAYRAKTAR, B. et al. Feature extraction from light-scatter patterns of Listeria colonies for identification and classification., 2006. 034006-034006-8.

BHUNIA, A. K. et al. Light Scattering, Fiber Optic-And Cell-Based Sensors For Sensitive Detection OF Foodborne Pathogens. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, 15, n. 2, 2007. 121-145.

BHUNIA, A. K.; HIRLEMAN, E. D.; ROBINSON, J. P. Optical forward scattering for colony. **Site da Engineering Purdue University**, 02 novembro 2005. Disponível em: <<https://engineering.purdue.edu/AOLAB/Projects/CFSE%20Light%20scattering%20project%202005.pdf>>. Acesso em: 06 maio 2016. Center for Food Safety and Engineering, Purdue University.

BIGIO, I. J.; MOURANT, J. R. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. **Physics in medicine and biology**, 42, n. 5, 1997. 803.

BOHREN, C. F.; GILRA, D. P. Extinction by a spherical particle in an absorbing medium. **Journal of Colloid and Interface Science**, 72, 1979. 215-221.

BREUKER, A.; STADLER, S.; SCHIPPERS, A. Microbial community analysis of deeply buried marine sediments of the New Jersey shallow shelf (IODP Expedition 313). **FEMS microbiology ecology**, 85, n. 3, 2013. 578-592.

BUZALEWICZ, I.; WIELICZO, A.; PODBIELSKA, H. Influence of various growth conditions on Fresnel diffraction patterns of bacteria colonies examined in the optical system with converging spherical wave illumination. **Optics express**, 19, n. 22, 2011,2014. 21768-21785 , 935-946.

CANCINO-FAURE, B. et al. Detection and quantification of viable and nonviable trypanosoma cruzi parasites by a propidium monoazide real-time polymerase chain reaction assay. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1282-1289, 2016.

CARVALHO, A. S.; CEDRAZ, V. D. A.; DOS SANTOS, W. F. Detecção e Caracterização de Microorganismos Sulfetogênicos no Solo do IFBaiano Campus Catu: Diagnóstico Preliminar. **V CONNEPI**, 2010.

CHIN, W.-C.; CHEN, C.-S.; HILERMAN, E. D. **Application of light scattering patterns to determine differentiation status of stem cells and stem cell colonies**. WO2013/138513A1, 19 setembro 2013.

CHRISTENSEN, B.; TORSVIK, T.; LIEN, T. Immunomagnetically captured thermophilic sulfate-reducing bacteria from North Sea oil field waters. **Applied and environmental microbiology.**, 4, 1992. 1244-1248.

CHRISTENSEN, D. A.; N. HERRON, J. Optical System Design for Biosensors Based on CCD. In: RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. **Biosensors and biodetection**. [S.I.]: Humana Press, 2009.

DA SILVA, T. L. R. et al. Estudo da viabilidade do método via Elastic Light Scattering para identificação das bactérias redutoras de sulfato presentes em águas de produção. **IBP1353_16. Trabalho Técnico seja publicado nos Anais da Rio Oil & Gas Expo and Conference 2016.**, Rio de Janeiro, p. 1-7, out. 2016. Disponível em:

<http://www99.ibp.org.br/events/2016/riooil2016/pdfs/riooil2016_1353_201605311718instrucoes_formato.pdf>.

DA SILVA, T. R.; DA SILVA, V. L.; SENNA, V. Estudo da viabilidade do método via Elastic Light Scattering para identificação das bactérias redutoras de sulfato presentes em água de produção. **Workshop de Gestão, Tecnologia Industrial e Modelagem Computacional.**, v. 1, n. 1, 2015.

DAY, J. R. CCD Camera Detection of HIV Infection. In: RASOOLY, A.; HEROLD, E. **Biosensors and biodetection**. [S.I.]: Human Press, 2009.

DE JESUS, E. B. et al. Inhibition of Microbial Sulfate Reduction by Molybdate. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, 9, n. 3, 2015.

DEC, W. et al. The effect of sulphate-reducing bacteria biofilm on passivity and development of pitting on 2205 duplex stainless steel. **Electrochimica Acta**, 212, 2016. 225-236. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468616315481>>. Acesso em: 14 ago. 2006.

DING, X.; LIU, F.; YU, X. Surface Plasmon Resonance Biosensor for Biomolecular. In: RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. **Biosensors and biodetection**. [S.l.]: Human Press, 2009.

DOBRETISOV, S.; WILLIAMS, D. N.; THOMASON, J. C. **Biofouling methods**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2014.

FANG, Y. Label-Free Biosensors for Cell Biology. **International Journal of Electrochemistry**, september 2011. 1-16. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/258402541>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

FARIA, D. D.; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman.. **Química Nova**, 20, 1997. 319-323.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, 8, n. 9, 2010. 623-633. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n9/pdf/nrmicro2415.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

FREITAS, C. M. et al. Acidentes de trabalho em plataformas de petróleo da Bacia de Campos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, Brasil, 17, n. 1, 2001. 117-30.

FU, Q.; SOL, W. **Light Scattering and Absorption by Spherical Particles**. Tenth ARM Science Team Meeting Proceedings. San Antonio, Texas: [s.n.]. 2000. p. 13-17.

GENTIL, V. **Corrosão**. 5.^a ed. Rio de Janeiro: LTC :P, v. 353, 2007.

GENUER, V. et al. Optical elastic scattering for early label-free identification of clinical pathogens. **Proc. SPIE 9698, Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic and Surgical Guidance Systems XIV**, 07 abr. 2016. 96980A. Disponível em: <<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=2501704>>. Acesso em: 28 Março 2016.

GITTEL, A. et al. Identity and abundance of active sulfate-reducing bacteria in deep tidal flat sediments determined by directed cultivation and CARD-FISH analysis. , 10(10), 2. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2645-2658, 2008.

GOLDEN, J. P.; SAPSFORD, K. E. Fluoroimmunoassays Using the NRL Array Biosensor. In: RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. **Biosensors and biodetection**. [S.l.]: Human Press, 2009.

GONZAGA, S. D. F. R. et al. Knowledge on diabetes mellitus in the self care process. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 1, p. 72-6, 2008.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento Digital de Imagens**. 3.^a ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Síntese dos principais acidentes atendidos pela CETESB. **Site da Companhia Ambiental do Estado de São paulo (CETESB): Emergências Químicas**, 2016. Disponível em: <<http://emergenciasquimicas.cetesb.sp.gov.br/tipos-de-acidentes/dutos/principais-acidentes/>>. Acesso em: 18 jul. 2015.

GROPOSO, C. et al. **Avaliação de Técnicas Expedidas de Quantificação de bactérias redutoras de sulfato em sistemas de injeção, produção e armazenamento de petróleo**. Petrobrás. Rio de Janeiro. 2014.

GROYSMAN, A.; STREET, D. **Corrosion in systems for storage and transportation of petroleum products and biofuels**. [S.l.]: Corros, NACE International, 2015.

GUO, S. **Optical scattering for bacteria colony detection and characterization**. IN: Purdue University, School of Mechanical Engineering, 2004.

HARDING, S. E. Applications of Light Scattering in Microbiology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, United Kingdom, 1986. 489-509. Department of Applied Biochemistry and Food Science, University of Nottingham.

HASEGAWA, R. et al. Identification of crude-oil components and microorganisms that cause souring under anaerobic conditions. **Applied microbiology and biotechnology**, 98, n. 4, 2014. p. 1853-1861.

HERGERDT, W.; WRIEDT, T. The Mie Theory Basics and Applications. **Springer**, 2012. XIV, 259.

HERGERT, W.; WRIEDT, T. **Present developments and Interdisciplinary aspects of light scattering**. Bremen: Martin Luther University Halle-Wittenberg. 2008.

HUFF, K. et al. Light-scattering sensor for real-time identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* colonies on solid agar plate. **Microbial biotechnology**, 5, n. 5, 2012. 607-620.

HWANG, S.-K.; KIM, W.-Y. A novel approach to the fast computation of Zernike moments. **Pattern Recognition**, 39, n. 11, March 2006. 2065-2076.

IUPAC. Sobre biosensors: Gold Book. **Compendium of Chemical Terminology**, Oxford (1997), 24 fev. 1992. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org>>. Acesso em: 23 ago. 2016.

J, M.; HUKINS, D. W. L.; P., E. Application of Mie theory and cubic splines to the representation of light scattering patterns from bacteria in the logarithmic growth phase. **Physics in Medicine and Biology**, 24, n. 2, 1979. 408.

JANKOV, M. . M. M. . S. P. . C. W. . & S. T. Frentes de ondas (wavefronts) e limites da visão humana Parte 1: fundamentos. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, 65, 2002. 679-84.

JAVAHERDASHTI, R. Impact of sulphate-reducing bacteria on the performance of engineering materials. **Applied microbiology and biotechnology**, 91, n. 6, 2011. 1507-1517.

JR. JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. [S.l.]: Artmed, 2007.

KAKSOMEN, A. The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed reactors treating acidic metal-and sulfate-containing wastewater. **Tampere University of Technology**, 2004.

KALLMEYER, J. et al. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109, 2012. 16213-16216.

KAPOOR, R. CCD Based Fiber-Optic Spectrometer Detection. In: RASOOLY , A.; HEROLD , K. E. **Biosensors and biodetection**. [S.l.]: Human Press, 2009.

KARUNAKARAN, C.; BHARGAVA, K.; BENJAMIN, R. **Biosensors and Bioelectronics**. [S.l.]: Elsevier, 2015.

KATZ, A. et al. Bacteria size determination by elastic light scattering. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, 9, March/April 2003. 277-287.

KHOTANZAD, A.; HONG, Y. H.. Invariant image recognition by Zernike moments. **IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence**., v. 12, n. 5, p. 489-497, 1990. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/55109/>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

KIM, H. et al. Development of an integrated optical analyzer for characterization of growth dynamics of bacterial colonies. **Journal of biophotonics**, v. 6, n. 11-12, p. 929-937, 2013.

KIM, H. et al. Laser-induced speckle scatter patterns in Bacillus colonies. **Frontiers in microbiology**, 5, October 2014. Artigo 537 1-9. Disponível em: <www.frontiersin.org>.

KOSTOV, Y. et al. A Simple Portable Electroluminescence. In: RASOOLY, A.; HEROLD, E. **Biosensors and biodetection**. [S.l.]: Human Press, 2009.

KOSTOV, Y. et al. A Simple Portable Electroluminescence Illumination-Based CCD Detector. **Biosensors and Biodetection**, p. 259-272, 2009.

LIENGEN, T. et al. **Understanding biocorrosion: Fundamentals and applications**. [S.l.]: Elsevier, 2014.

LLOYD, K. G. et al. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. **Nature**, 496, n. 7444, 2013. 215-218.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARANGON, D. Os danos da corrosão. **Macaé Offshore**, 2001. Disponível em: <<http://www.macaeeoffshore.com.br/revista/internas.asp?acao=noticia1&edicao=12>>. Acesso em: 04 abr. 2015.

MARCOUX, P. R. et al. Optical forward-scattering for identification of bacteria within microcolonies. **Applied microbiology and biotechnology**, 98, n. 5, 2014. p. 2243-2254.

MBADINGA, S. M. E. A. Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 1-13, 2011.

MINONI, U.; SIGNORONI, A.; NASSINI, G. On the application of optical forward-scattering to bacterial identification in an automated clinical analysis perspective.. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, , p. 536-543, 2015.

MOISSAN, H.; CURIE, M.; GRIGNARD, V. . L. . J. M. Prêmio Nobel de química para Xves Chauvin, um intelectual da indústria. **França Flash 45**, p. 12-13, jan fev marc 2006. Disponível em: <<http://www.cendotec.org.br/francaflash/ff45.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2015.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química orgânica**. Tradução de Manuel Alves Silva. 11^a. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

MUNDY, W. C.; ROUX, J. A.; SMITH, A. M. M. Scattering by spheres in an absorbing medium. **Journal Optcal Society of Americal (JOSA)**, 64, 1974. 1593-1597.

MURARI, K. et al. A CMOS in-pixel CTIA high-sensitivity fluorescence imager. **IEEE transactions on biomedical circuits and systems**, v. 5, n. 5, p. 449-458, 2011. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/5738700/>>. Acesso em: 15 abr. 2017.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología médica**. , 2015. [S.I.]: Elsevier Brasil, 2015.

NAGEL, T.; EHRENTREICH-FÖRSTER, E.; BIER, F. F. Label-Free Serodiagnosis on a Grating Coupler. In: RASOOLY, A.; HEROLD, E. **Biosensors and biodetection**. [S.I.]: Human Press, 2009.

NARAYANASWAMY, R.; S. WOLFBEIS, O. **Chemical Sensors and Biosensors: Methods and Applications**. 1^a. ed. [S.I.]: © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004.

NIKOLELIS, D. P.; NIKOLELI, G.-P. Biosensors for Security and Bioterrorism Applications. **Advanced Sciences and Technologies for Security Applications**, 2016.

OLLIVIER, B. E. A. **Petroleum microbiology**. [S.I.]: ASM Press, 2005.

OUTI PRIHA, M. N. M. B. A. L. J. S. A. K. R. J. Application of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography for Monitoring Sulfate-Reducing Bacteria in Oil Fields. **Appl Environ Microbiol.**, p. 79(17): 5186–5196. doi: 10.1128/AEM.01015-13 PMID:PMC3753974, Setembro 2013.

PAPAVINASAM, S. **Corrosion control in the oil and gas industry**. [S.I.]: Elsevier, 2013.

PENNA, M. D. O. **NOÇÕES DE BACTÉRIAS EM PRODUÇÃO DE PETRÓLEO**. PETROBRÁS. Rio de Janeiro, p. 15-115. 2014.

PETROBRÁS/CENPES/PDEDS/BTA. **REGRAS E PLANILHAS PARA O CÁLCULO DO NÚMERO**. PETROBRÁS. Rio de Janeiro, p. 1-4. 2008.

PGT. Geologia do Petróleo. **Petroleum Geoscience Technology**, 2013. Disponível em: <https://albertowj.files.wordpress.com/2010/03/geologia_do_petroleo.pdf>.

PHILLIPS, D. B. et al. Surface imaging using holographic optical tweezers. **Nanotechnology**, v. 22., n. 28, p. 285503, 2011.

POPOOLA, L. T. et al. Corrosion problems during oil and gas production and its mitigation. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2013.

POSTGATE, J. R. Recent advances in the study of the sulfate-reducing bacteria.. **Bacteriological reviews**, 24, n. 4, 1965. 425.

RAJWA, B. et al. Discovering the unknown: Detection of emerging pathogens using a label-free light-scattering system. **Cytometry Part A**, 77, n. 12, 2010. 1103-1112.

RASHID, N. Quora. **Site da Quora**, 2015. Disponível em: <<https://www.quora.com/Why-is-the-camera-lens-circular-but-the-image-sensor-is-rectangle-in-shape>>. Acesso em: 17 maio 2017.

RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. **Biosensors and biodetection**. [S.l.]: Humana Press, 2009.

ROBINSON, J. et al. A distributed national network for label-free rapid identification of emerging pathogens. In: **SPIE Defesa, Segurança e Sensing. Sociedade Internacional de Óptica e Fotônica**, 2011a. 80180C-80180C-6.

ROBINSON, J. P. et al. **SYSTEM AND METHOD OF ORGANISM IDENTIFICATION**. US 2008/0310692 A1, 18 Dezembro 2008.

ROBINSON, J. P. et al. Using scattering to identify bacterial pathogens. **Optics and Photonics News**, 22, n. 10, 2011b. 20-27.

ROBINSON, J. P. et al. **System and method of organism identification**. US 8,787,633 B2, 22 julho 2014.

SANTOS, D. J. et al. Evaluation of the fluorescence in situ hybridization technique for detection of eubacteria and sulfate-reducing bacteria from samples of water in oil fields. **CHEMICAL ENGINEERING**, Evaluation of the fluorescence in situ hybridization technique for detection of eubacteria and sulfate-reducing bacteria from samples of water in oil fields., v. 20, 2010.

SASTRI, V. S. **Challenges in Corrosion: Costs, Causes, Consequences, and Control**. . [S.l.]: John Wiley & Sons, 2015.

SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J. F. Simple Luminescence Detector for Capillary. In: RASOOLY, A.; HEROLD, KEITH E.

Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols. [S.l.]: Humana Press, v. 503, 2009.

SEQUIN, C. Purdue innovation provides 'fingerprint' to identify foodborne pathogens, moves closer to production. **Site da:** Purdue University, 2016. Disponível em: <<https://www.purdue.edu/newsroom/releases/2016/Q1/purdue-innovation-provides-fingerprint-to-identify-foodborne-pathogens,-moves-closer-to-production.html>>. Acesso em: 05 ago. 2016.

SHENG, X.; TING, Y.-P.; PEHKONEN, S. O. The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. **Corrosion Science**, v. 49, n. 5, p. 2159-2176, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010938X06003684>>.

SHERRY, A. et al. Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing. **International Biodeterioration & Biodegradation**, NW Calgary, Canada, 2013. 105-113. Disponível em: <journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod>.

SINGH, A. K. et al. Laser optical sensor, a label-free on-plate Salmonella enterica colony detection tool. **MBio**, v. 5, n. 1, p. e01019-13, 2014.

SLOBODKIN, A. I.; SLOBODKINA, G. B. Thermophilic prokaryotes from deep subterranean habitats. **Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 169-183, May 2014.

SOBRE o software: ImageJ Image Processing and Analysis in Java. **ImageJ**. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

SPICHIGER-KELLER, U. E. **Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications.** [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008.

TAHMASBI, A. Zernike Moments. **MathWorks**, 2013. Disponível em: <<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/38900-zernike-moments?focused=3847221&tab=function>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

TAHMASBI, A.; FATEMEH, S.; SOUKOUHI, S. B. Classification of benign and malignant masses based on Zernike moments. **Computers in Biology and Medicine**, Iran, v. 41, p. 726-735, 14 June 2011.

TANG, Y. et al. Light scattering sensor for direct identification of colonies of Escherichia coli serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157. **PLoS one**, China, v. 9, n. 8, p. 15, August 2014. ISSN doi:10.1371/journal.pone.0105272.

TEAGUE, M. R. Image analysis via the general theory of moments. **JOSA**, 70, n. 8, 1980. 920-930.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de engenharia de petróleo.** [S.l.]: Interciência, 2001.

TIAN, Q. et al. Selective detection of viable seed-borne *Acidovorax citrulli* by real-time PCR with propidium monoazide.. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

TISSOT, B. P.; WELTE, D. H. **Petroleum formation and occurrence.**[S.l.]: [s.n.], 2013,1984.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10.^a. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** [S.l.]: Atheneu, 2004.

TURNER, A.; KAUBE, I.; WILSON, G. **Biossensores fundamentos e aplicações.**Oxford: Oxford University Press, 1987.

VIGNERON, A. et al. Complementary microorganisms in highly corrosive biofilms from an offshore oil production facility. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 8, p. 2545-2554, 2016.

VOLLHARDT, C. P. K.; SCHORE, N. E. **Qímica orgânica: estrutura e função.** Tradução de Ricardo Bicca De Alencastro; Flavia Martins Da Silva, *et al.* 4.^a. ed. Porto Alegre: Bookman, 2004.

VON F, Z. Beugungstheorie des schneidenver-fahrens und seiner verbesserten form, der phasenkontrastmethode. **Physica**, 1, n. 7-12, 1934. 689-704.

WALKER, R. G. **The Scattering of Light by Small Particles.** University of Wisconsin. Madison, Wisconsin 53706, p. 1-12. 1954.

WANG, J. et al. Highly sensitive multipoint real-time kinetic detection of Surface Plasmon bioanalytes with custom CMOS cameras. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 157-164, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009403/?tool=pubmed>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

WANG, W.; MOTTERSHEAD, J. E.; MARES, C. Mode-shape recognition and finite element model updating using the Zernike moment descriptor. **Mechanical systems and signal processing**, 23, n. 7, 2009. 2088-2112.

WANG, Z.-L. **Elastic and inelastic scattering in electron diffraction and imaging. a.** Atlanta, Georgia: Springer Science & Business Media, 1995,2013.

WYATT, P. J. Differential light scattering: a physical method for identifying living bacterial cells. **Applied optics**, 7, 1968. 1879-1896.

XU, D.; LI, Y.; GU, T. Mechanistic modeling of biocorrosion caused by biofilms of sulfate reducing bacteria and acid producing bacteria. **Bioelectrochemistry**, v. 110, p. 52-58, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539416300366>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

XU, R. Light scattering: a review of particle characterization applications.. **Particuology**, v. 18, p. 11-21, 2015.

YOON, J.-Y. **Introduction to biosensors: from electric circuits to immunosensors**. 2^a. ed. Tucson: Springer, 2013,2016.

ZERNIKE, F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. **Physica**, 9, n. 7, 1942. 686-698.

ZHANG, F. et al. Impact of an indigenous microbial enhanced oil recovery field trial on microbial community structure in a high pour-point oil reservoir. **Applied microbiology and biotechnology**, 95, n. 3, 2012. 811-821.

APÊNDICE A - Algoritmo computacional para cálculo dos momentos de Zernike do padrão de difração da colônia um modificado do algoritmo de Amir Tahmasbi (toolboxes, Matlab)

```

function [ Z,A,Phi ] = Zernikmoment(p,n,m) %colonia um
%UNTITLED Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here
% Funcao de calculo dos polinomios de Zernike (n,m),polinomio radial,funções de
% base, momentos para r=1. Adquiridos do algoritmos de Amir Tahmasbi
n = ; m = 0 ;
disp('-----');
disp(['Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)']);
%-----
% row 1
p = rgb2gray(imread('D.bmp'));
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);
N = size(p,1);
x = 1:N; y = x;
[X,Y] = meshgrid(x,y);
R = sqrt((2.*X-N-1).^2+(2.*Y-N-1).^2)/N;
Theta = atan2((N-1-2.*Y+2),(2.*X-N+1-2));
R = (R<=1).*R;
Rad = radialpoly(R,n,m);
Product = p(x,y).*Rad.*exp(-1i*m*Theta);
Zz = sum(Product(:));
cnt = nnz(R)+1;
Z = (n+1)*Zz/cnt;

```

```

function [ Z,A,Phi ] = Zernikmoment(p,n,m) colonia um
%UNTITLED Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here
% Funcao de calculo dos polinomios de Zernike (n,m),polinomio
radial,funções de
% base, momentos para r=1. Adquiridos do algoritmos de Amir Tahmasbi
n = ; m = ;
disp('-----');
disp(['Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = '
num2str(m)']);
%-----
% row 1
p = rgb2gray(imread('D.bmp'));
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title('D');
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);
NA = size(p,1);
xA = 1:NA; yA = xA;
[XA,YA] = meshgrid(xA,yA);
RA = sqrt((2.*XA-NA-1).^2+(2.*YA-NA-1).^2)/NA;
ThetaA = atan2((NA-1-2.*YA+2),(2.*XA-NA+1-2));
RA = (RA<=1).*RA;
RadA = radialpoly(RA,n,m);

```

```

ProductA = p(xA,yA).*RadA.*exp(-1i*m*ThetaA);
ZzA = sum(ProductA(:));
cntA = nnz(RA)+1;
ZA = (n+1)*ZzA/cntA;
AA = abs(ZA);
PhiA = angle(ZA)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('D realinhada.bmp'));
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title('D realinhada');
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);
NB = size(p,1);
xB = 1:NB; yB = xB;
[XB,YB] = meshgrid(xB,yB);
RB = sqrt((2.*XB-NB-1).^2+(2.*YB-NB-1).^2)/NB;
ThetaB = atan2((NB-1-2.*YB+2),(2.*XB-NB+1-2));
RB = (RB<=1).*RB;
RadB = radialpoly(RB,n,m);
ProductB = p(xB,yB).*RadB.*exp(-1i*m*ThetaB);
ZzB = sum(ProductB(:));
cntB = nnz(RB)+1;
ZB = (n+1)*ZzB/cntB;
AB = abs(ZB);
PhiB = angle(ZB)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('E.bmp'));
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('E');
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);
NC = size(p,1);
xC = 1:NC; yC = xC;
[XC,YC] = meshgrid(xC,yC);
RC = sqrt((2.*XC-NC-1).^2+(2.*YC-NC-1).^2)/NC;
ThetaC = atan2((NC-1-2.*YC+2),(2.*XC-NC+1-2));
RC = (RC<=1).*RC;
RadC = radialpoly(RC,n,m);
ProductC = p(xC,yC).*RadC.*exp(-1i*m*ThetaC);
ZzC = sum(ProductC(:));
cntC = nnz(RC)+1;
ZC = (n+1)*ZzC/cntC;
AC = abs(ZC);
PhiC = angle(ZC)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('E realinhada.bmp'));
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title('E realinhada');
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);

```

```
ND = size(p,1);
xD = 1:ND; yD = xD;
[XD,YD] = meshgrid(xD,yD);
RD = sqrt((2.*XD-ND-1).^2+(2.*YD-ND-1).^2)/ND;
ThetaD = atan2((ND-1-2.*YD+2),(2.*XD-ND+1-2));
RD = (RD<=1).*RD;
RadD = radialpoly(RD,n,m);
ProductD = p(xD,yD).*RadD.*exp(-1i*m*ThetaD);
ZzD = sum(ProductD(:));
cntD = nnz(RD)+1;
ZD = (n+1)*ZzD/cntD;
AD = abs(ZD);
PhiD = angle(ZD)*180/pi;
```

APÊNDICE B - Algoritmo para análise de invariância à rotação dos polinômios de Zernike aplicados às imagens modificado do algoritmo por Amir Tahmasbi (toolboxes, Matlab)

```

clc; clear all; close all;

n = 4; m = 0;           % Define the order and the repetition of the moment

disp('-----');
disp(['Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = '
num2str(m) ]);
%-----
% row 1
p = imread('ROI 5 EQ E NORM.bmp');
figure(1); subplot(2,2,1); imshow(p);
title('roi g eq e norm');
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);      % Call Zernikemoment fuction
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);

p = imread('ROI 5 EQ E NORM ROTATE 90.bmp');
figure(1); subplot(2,2,2); imshow(p);
title('roi g eq e norm rotacionada 90');
p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);      % Call Zernikemoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);

p = imread('ROI G SUB.bmp');
figure(1); subplot(2,2,3); imshow(p);
title('roi g sub');
p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);      % Call Zernikemoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);

p = imread('ROI G SUB ROTATE 90.bmp');
figure(1); subplot(2,2,4); imshow(p);
title('roi g sub rotacionada 90');
p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);      % Call Zernikemoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);

```


APÊNDICE C - Algoritmo de análise rotação das ROIS da Colônia um referente ao quadro ()

```

clc; clear all; close all;

n = 4; m = 0;           % Define the order and the repetition of the moment

disp('-----');
disp(['Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = '
num2str(m)']);
%-----
% row 1
p = imread('ROI C.bmp');
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title('roi c');
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);      % Call Zernikemoment fuction
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]});

p = imread('ROI C ROTATE 90.bmp');
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title('roi c rotacionada 90');
p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);      % Call Zernikemoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]});

p = imread('e_col_um SUB.bmp');
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('roi a');
p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);      % Call Zernikemoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]});

p = imread('e_col_um SUB1 rotate.bmp');
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title('roi a rotacionada 90');
p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);      % Call Zernikemoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]});

```

APÊNDICE D - Algoritmo computacional para análise da invariância à rotação e cálculo das amplitudes dos momentos de Zernike apresentado em quadro comparativo entre os padrões de difração das cinco colônias.

MATLAB Command WindowPage 1

```

p n=0;m=0;
p disp('-----');
  disp(['Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)];
  -----
  Calculating Zernike moments ..., n = 0, m = 0
p p = rgb2gray(imread('um_umseg.png'));
p figure(1);subplot(3,3,1);imshow(p);
p title('colonia um A');
p p = logical(not(p));
p tic
  [~, AOH, PhiOH] =
Zernikmoment(p,n,m); >> Elapsed_time =
toc;
  xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
p p = rgb2gray(imread('um_doisseg.bmp'));
p figure(1);subplot(3,3,2);imshow(p);
p title('colonia um B');
p p = logical(not(p));
  [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
p xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
p p = rgb2gray(imread('um_doisreal.bmp'));
p figure(1);subplot(3,3,3);imshow(p);
p title('B realinhada ');
p p = logical(not(p));
  [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
>> p = rgb2gray(imread('um_tres.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,4);imshow(p);
>> title('colonia um C ');
>> p = logical(not(p));
  [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
>> p = rgb2gray(imread('um_quatro.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,5);imshow(p);
>> title('colonia um D ');
>> p = logical(not(p));
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
>> p = rgb2gray(imread('um_quatreal.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,6);imshow(p);
>> title('realinhada D');
>> p = logical(not(p));
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});

```

```
>> p = rgb2gray(imread('um_seis.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,7);imshow(p);
>> title('E');
>> p = logical(not(p));
```

MATLAB Command WindowPage 2

```
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}); p =
rgb2gray(imread('um_seis.bmp'));
[~, AOH, PhiOH] =
Zernikmoment(p,n,m); Error using .*
Integers can only be combined with integers of the same class, or scalar doubles.
```

```
Error in Zernikmoment (line 47)
Product = p(x,y).*Rad.*exp(-1i*m*Theta);
```

```
>>
>> xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
>> p = rgb2gray(imread('um_sete.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,7);imshow(p);
>> p = rgb2gray(imread('um_seis.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,7);imshow(p);
>> title('E');
>> p = logical(not(p));
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
>> p = rgb2gray(imread('um_sete.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,7);imshow(p)
>>
>> p = rgb2gray(imread('um_seis.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,7);imshow(p);
>> p = rgb2gray(imread('um_umseg.png'));
>> figure(1);subplot(3,3,1);imshow(p);
>> title('colonia um A');
>> p = logical(not(p));
>> tic
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> Elapsed_time = toc;
>> xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
>> p = rgb2gray(imread('um_doisseg.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,2);imshow(p);
>> title('colonia um B');
>> p = logical(not(p));
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
>> p = rgb2gray(imread('um_doisreal.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,3);imshow(p);
>> title('B realinhada ');
>> p = logical(not(p));
>> tic
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> Elapsed_time = toc;
>> xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)});
```

```
>> p = rgb2gray(imread('um_tres.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,4);imshow(p);
>> title('colonia um C');
```

MATLAB Command WindowPage 3

```
>> p = logical(not(p));
>> tic
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> Elapsed_time = toc;
>> xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);
>> p = rgb2gray(imread('um_quatro.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,5);imshow(p);
>> title('colonia um D ');
>> p = logical(not(p));
>> tic
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> Elapsed_time = toc;
>> xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);
>> p = rgb2gray(imread('um_quatroreal.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,6);imshow(p);
>> title('realinhada D');
>> p = logical(not(p));
>> tic
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> Elapsed_time = toc;
>> xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);
>> p = rgb2gray(imread('um_cinco.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,7);imshow(p);
>> title('E');
>> p = logical(not(p));
>> tic
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> Elapsed_time = toc;
>> xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);
>> p = rgb2gray(imread('um_seis.bmp'));
>> figure(1);subplot(3,3,8);imshow(p);
>> title('F');
>> p = logical(not(p));
>> tic
>> [~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
>> Elapsed_time = toc;
>> xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);
```

MATLAB Command Window Page 1

```

>> n = 0; m = 0;
>> disp( '-----' );
disp([' Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)];
-----
Calculating Zernike moments ..., n = 0, m = 0
>> p = rgb2gray(imread('D.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title('D' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel([' 'A = ' num2str(AOH)]; [' \phi = ' num2str(PhiOH)]);
NA = size(p,1);
xA = 1:NA; yA = xA;
[XA,YA] = meshgrid(xA,yA);
RA = sqrt((2.*XA-NA-1).^2+(2.*YA-NA-1).^2)/NA; ThetaA = atan2((NA-1-2.*YA+2),(2.*XA-NA+1-2));
RA = (RA<=1).*RA;
RadA = radialpoly(RA,n,m);
ProductA = p(xA,yA).*RadA.*exp(-1i*m*ThetaA);
ZzA = sum(ProductA(:));
cntA = nnz(RA)+1;
ZA = (n+1)*ZzA/cntA;
AA = abs(ZA);
PhiA = angle(ZA)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('D realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title('D realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel([' 'A = ' num2str(AOH)]; [' \phi = ' num2str(PhiOH)]);
NB = size(p,1);
xB = 1:NB; yB = xB;
[XB,YB] = meshgrid(xB,yB);
RB = sqrt((2.*XB-NB-1).^2+(2.*YB-NB-1).^2)/NB; ThetaB = atan2((NB-1-2.*YB+2),(2.*XB-NB+1-2));
RB = (RB<=1).*RB;
RadB = radialpoly(RB,n,m);
ProductB = p(xB,yB).*RadB.*exp(-1i*m*ThetaB);
ZzB = sum(ProductB(:));
cntB = nnz(RB)+1;
ZB = (n+1)*ZzB/cntB;
AB = abs(ZB);
PhiB = angle(ZB)*180/pi;

```

```

p = rgb2gray(imread('E.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('E' );
p = logical(not(p));
tic

```

MATLAB Command Window Page 1

```

>> n = 4; m = 0;
>> disp('-----');
disp(['Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)]);
-----
Calculating Zernike moments ..., n = 4, m = 0
>> p = rgb2gray(imread('D.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title('D' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['phi = ' num2str(PhiOH)]);
NA = size(p,1);
xA = 1:NA; yA = xA;
[XA,YA] = meshgrid(xA,yA);
RA = sqrt((2.*XA-NA-1).^2+(2.*YA-NA-1).^2)/NA; ThetaA = atan2((NA-1-2.*YA+2),(2.*XA-NA+1-2));
RA = (RA<=1).*RA;
RadA = radialpoly(RA,n,m);
ProductA = p(xA,yA).*RadA.*exp(-1i*m*ThetaA);
ZzA = sum(ProductA(:));
cntA = nnz(RA)+1;
ZA = (n+1)*ZzA/cntA;
AA = abs(ZA);
PhiA = angle(ZA)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('D realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title('D realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['phi = ' num2str(PhiOH)]);
NB = size(p,1);
xB = 1:NB; yB = xB;
[XB,YB] = meshgrid(xB,yB);
RB = sqrt((2.*XB-NB-1).^2+(2.*YB-NB-1).^2)/NB; ThetaB = atan2((NB-1-2.*YB+2),(2.*XB-NB+1-2));
RB = (RB<=1).*RB;
RadB = radialpoly(RB,n,m);
ProductB = p(xB,yB).*RadB.*exp(-1i*m*ThetaB);

```

```

ZzB = sum(ProductB(:));
cntB = nnz(RB)+1;
ZB = (n+1)*ZzB/cntB;
AB = abs(ZB);
PhiB = angle(ZB)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('E.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('E' );
p = logical(not(p));
tic

```

MATLAB Command Window Page 2

```

[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NC = size(p,1);
xC = 1:NC; yC = xC;
[XC,YC] = meshgrid(xC,yC);
RC = sqrt((2.*XC-NC-1).^2+(2.*YC-NC-1).^2)/NC; ThetaC = atan2((NC-1-2.*YC+2),(2.*XC-NC+1-2));
RC = (RC<=1).*RC;
RadC = radialpoly(RC,n,m);
ProductC = p(xC,yC).*RadC.*exp(-1i*m*ThetaC);
ZzC = sum(ProductC(:));
cntC = nnz(RC)+1;
ZC = (n+1)*ZzC/cntC;
AC = abs(ZC);
PhiC = angle(ZC)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('E realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title('E realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
ND = size(p,1);
xD = 1:ND; yD = xD;
[XD,YD] = meshgrid(xD,yD);
RD = sqrt((2.*XD-ND-1).^2+(2.*YD-ND-1).^2)/ND; ThetaD = atan2((ND-1-2.*YD+2),(2.*XD-ND+1-2));
RD = (RD<=1).*RD;
RadD = radialpoly(RD,n,m);
ProductD = p(xD,yD).*RadD.*exp(-1i*m*ThetaD);
ZzD = sum(ProductD(:));
cntD = nnz(RD)+1;
ZD = (n+1)*ZzD/cntD;

```

```

AD = abs(ZD);
PhiD = angle(ZD)*180/pi;
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 0 m 0.mat' )
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 2 m 0.mat' )
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 3 m 3.mat' )
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 5 m 5.mat' )
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 12 m 0.mat' )
>>

```

MATLAB Command Window Page 1

```

>> n = 4; m = 0;
>> disp( '-----' );
disp([' Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)];
-----
Calculating Zernike moments ..., n = 4, m = 0
>> p = rgb2gray(imread( 'D.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title( 'D' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({' 'A = ' num2str(AOH); [ '\phi = ' num2str(PhiOH)]});
NA = size(p,1);
xA = 1:NA; yA = xA;
[XA,YA] = meshgrid(xA,yA);
RA = sqrt((2.*XA-NA-1).^2+(2.*YA-NA-1).^2)/NA; ThetaA = atan2((NA-1-2.*YA+2),(2.*XA-NA+1-2));
RA = (RA<=1).*RA;
RadA = radialpoly(RA,n,m);
ProductA = p(xA,yA).*RadA.*exp(-1i*m*ThetaA);
ZzA = sum(ProductA(:));
cntA = nnz(RA)+1;
ZA = (n+1)*ZzA/cntA;
AA = abs(ZA);
PhiA = angle(ZA)*180/pi;

p = rgb2gray(imread( 'D realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title( 'D realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({' 'A = ' num2str(AOH); [ '\phi = ' num2str(PhiOH)]});
NB = size(p,1);
xB = 1:NB; yB = xB;
[XB,YB] = meshgrid(xB,yB);
RB = sqrt((2.*XB-NB-1).^2+(2.*YB-NB-

```



```

1).^2)/NB; ThetaB = atan2((NB-1-
2.*YB+2),(2.*XB-NB+1-2));
RB = (RB<=1).*RB;
RadB = radialpoly(RB,n,m);
ProductB = p(xB,yB).*RadB.*exp(-1i*m*ThetaB);
ZzB = sum(ProductB(:));
cntB = nnz(RB)+1;
ZB = (n+1)*ZzB/cntB;
AB = abs(ZB);
PhiB = angle(ZB)*180/pi;

```

```

p = rgb2gray(imread('E.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('E' );
p = logical(not(p));
tic

```

MATLAB Command Window Page 2

```

[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NC = size(p,1);
xC = 1:NC; yC = xC;
[XC,YC] = meshgrid(xC,yC);
RC = sqrt((2.*XC-NC-1).^2+(2.*YC-NC-
1).^2)/NC; ThetaC = atan2((NC-1-
2.*YC+2),(2.*XC-NC+1-2));
RC = (RC<=1).*RC;
RadC = radialpoly(RC,n,m);
ProductC = p(xC,yC).*RadC.*exp(-1i*m*ThetaC);
ZzC = sum(ProductC(:));
cntC = nnz(RC)+1;
ZC = (n+1)*ZzC/cntC;
AC = abs(ZC);
PhiC = angle(ZC)*180/pi;

```

```

p = rgb2gray(imread('E realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title('E realinhada' );
p = logical(not(p));
tic

```

```

[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
ND = size(p,1);
xD = 1:ND; yD = xD;
[XD,YD] = meshgrid(xD,yD);
RD = sqrt((2.*XD-ND-1).^2+(2.*YD-ND-

```

```

1).^2)/ND;   ThetaD   =   atan2((ND-1-
2.*YD+2),(2.*XD-ND+1-2));
RD = (RD<=1).*RD;
RadD = radialpoly(RD,n,m);
ProductD = p(xD,yD).*RadD.*exp(-1i*m*ThetaD);
ZzD = sum(ProductD(:));
cntD = nnz(RD)+1;
ZD = (n+1)*ZzD/cntD;
AD = abs(ZD);
PhiD = angle(ZD)*180/pi;
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 0 m 0.mat' )
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 2 m 0.mat' )
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 3 m 3.mat' )
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 5 m 5.mat' )
>> load( 'workspace quadro comparativo col um n 12 m 0.mat' )
>>

```

MATLAB Command Window Page 2

```

[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NC = size(p,1);
xC = 1:NC; yC = xC;
[XC,YC] = meshgrid(xC,yC);
RC = sqrt((2.*XC-NC-1).^2+(2.*YC-NC-1).^2)/NC;   ThetaC   =   atan2((NC-1-
2.*YC+2),(2.*XC-NC+1-2));
RC = (RC<=1).*RC;
RadC = radialpoly(RC,n,m);
ProductC = p(xC,yC).*RadC.*exp(-1i*m*ThetaC);
ZzC = sum(ProductC(:));
cntC = nnz(RC)+1;
ZC = (n+1)*ZzC/cntC;
AC = abs(ZC);
PhiC = angle(ZC)*180/pi;

p = rgb2gray(imread( 'E realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title( 'E realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['phi = ' num2str(PhiOH)}]);
ND = size(p,1);
xD = 1:ND; yD = xD;
[XD,YD] = meshgrid(xD,yD);
RD = sqrt((2.*XD-ND-1).^2+(2.*YD-ND-1).^2)/ND;   ThetaD   =   atan2((ND-1-
2.*YD+2),(2.*XD-ND+1-2));
RD = (RD<=1).*RD;
RadD = radialpoly(RD,n,m);

```

```

ProductD = p(xD,yD).*RadD.*exp(-1i*m*ThetaD);
ZzD = sum(ProductD(:));
cntD = nnz(RD)+1;
ZD = (n+1)*ZzD/cntD;
AD = abs(ZD);
PhiD = angle(ZD)*180/pi;
>>

```

MATLAB Command Window Page 1

```

>> n = 14; m = 0;
>> disp( '-----' );
disp([' Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)]);
-----

Calculating Zernike moments ..., n = 14, m = 0
>> p = rgb2gray(imread( 'D.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title( 'D' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({' 'A = ' num2str(AOH)}; [ '\phi = ' num2str(PhiOH)]});
NA = size(p,1);
xA = 1:NA; yA = xA;
[XA,YA] = meshgrid(xA,yA);
RA = sqrt((2.*XA-NA-1).^2+(2.*YA-NA-1).^2)/NA; ThetaA = atan2((NA-1-2.*YA+2),(2.*XA-NA+1-2));
RA = (RA<=1).*RA;
RadA = radialpoly(RA,n,m);
ProductA = p(xA,yA).*RadA.*exp(-1i*m*ThetaA);
ZzA = sum(ProductA(:));
cntA = nnz(RA)+1;
ZA = (n+1)*ZzA/cntA;
AA = abs(ZA);
PhiA = angle(ZA)*180/pi;

p = rgb2gray(imread( 'D realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title( 'D realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({' 'A = ' num2str(AOH)}; [ '\phi = ' num2str(PhiOH)]});
NB = size(p,1);
xB = 1:NB; yB = xB;
[XB,YB] = meshgrid(xB,yB);
RB = sqrt((2.*XB-NB-1).^2+(2.*YB-NB-1).^2)/NB; ThetaB = atan2((NB-1-2.*YB+2),(2.*XB-NB+1-2));
RB = (RB<=1).*RB;

```

```

RadB = radialpoly(RB,n,m);
ProductB = p(xB,yB).*RadB.*exp(-1i*m*ThetaB);
ZzB = sum(ProductB(:));
cntB = nnz(RB)+1;
ZB = (n+1)*ZzB/cntB;
AB = abs(ZB);
PhiB = angle(ZB)*180/pi;

```

```

p = rgb2gray(imread('E.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('E' );
p = logical(not(p));
tic

```

MATLAB Command Window Page 2

```

[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NC = size(p,1);
xC = 1:NC; yC = xC;
[XC,YC] = meshgrid(xC,yC);
RC = sqrt((2.*XC-NC-1).^2+(2.*YC-NC-1).^2)/NC; ThetaC = atan2((NC-1-2.*YC+2),(2.*XC-NC+1-2));
RC = (RC<=1).*RC;
RadC = radialpoly(RC,n,m);
ProductC = p(xC,yC).*RadC.*exp(-1i*m*ThetaC);
ZzC = sum(ProductC(:));
cntC = nnz(RC)+1;
ZC = (n+1)*ZzC/cntC;
AC = abs(ZC);
PhiC = angle(ZC)*180/pi;

```

```

p = rgb2gray(imread('E realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title('E realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
ND = size(p,1);
xD = 1:ND; yD = xD;
[XD,YD] = meshgrid(xD,yD);
RD = sqrt((2.*XD-ND-1).^2+(2.*YD-ND-1).^2)/ND; ThetaD = atan2((ND-1-2.*YD+2),(2.*XD-ND+1-2));
RD = (RD<=1).*RD;
RadD = radialpoly(RD,n,m);
ProductD = p(xD,yD).*RadD.*exp(-1i*m*ThetaD);
ZzD = sum(ProductD(:));
cntD = nnz(RD)+1;

```

```
ZD = (n+1)*ZzD/cntD;
AD = abs(ZD);
PhiD = angle(ZD)*180/pi;
>>
```

MATLAB Command Window Page 1

```
>> n = 15; m = 15;
>> disp( '-----');
disp([' Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)];
-----
Calculating Zernike moments ..., n = 15, m = 15
>> p = rgb2gray(imread( 'D.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title( 'D' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({' 'A = ' num2str(AOH); [ 'phi = ' num2str(PhiOH)]});
NA = size(p,1);
xA = 1:NA; yA = xA;
[XA,YA] = meshgrid(xA,yA);
RA = sqrt((2.*XA-NA-1).^2+(2.*YA-NA-1).^2)/NA; ThetaA = atan2((NA-1-2.*YA+2),(2.*XA-NA+1-2));
RA = (RA<=1).*RA;
RadA = radialpoly(RA,n,m);
ProductA = p(xA,yA).*RadA.*exp(-1i*m*ThetaA);
ZzA = sum(ProductA(:));
cntA = nnz(RA)+1;
ZA = (n+1)*ZzA/cntA;
AA = abs(ZA);
PhiA = angle(ZA)*180/pi;

p = rgb2gray(imread( 'D realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title( 'D realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({' 'A = ' num2str(AOH); [ 'phi = ' num2str(PhiOH)]});
NB = size(p,1);
xB = 1:NB; yB = xB;
[XB,YB] = meshgrid(xB,yB);
RB = sqrt((2.*XB-NB-1).^2+(2.*YB-NB-1).^2)/NB; ThetaB = atan2((NB-1-2.*YB+2),(2.*XB-NB+1-2));
RB = (RB<=1).*RB;
RadB = radialpoly(RB,n,m);
ProductB = p(xB,yB).*RadB.*exp(-1i*m*ThetaB);
```

```
ZzB = sum(ProductB(:));
cntB = nnz(RB)+1;
ZB = (n+1)*ZzB/cntB;
AB = abs(ZB);
PhiB = angle(ZB)*180/pi;
```

```
p = rgb2gray(imread('E.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('E' );
p = logical(not(p));
tic
```

MATLAB Command Window Page 2

```
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NC = size(p,1);
xC = 1:NC; yC = xC;
[XC,YC] = meshgrid(xC,yC);
RC = sqrt((2.*XC-NC-1).^2+(2.*YC-NC-1).^2)/NC; ThetaC = atan2((NC-1-2.*YC+2),(2.*XC-NC+1-2));
RC = (RC<=1).*RC;
RadC = radialpoly(RC,n,m);
ProductC = p(xC,yC).*RadC.*exp(-1i*m*ThetaC);
ZzC = sum(ProductC(:));
cntC = nnz(RC)+1;
ZC = (n+1)*ZzC/cntC;
AC = abs(ZC);
PhiC = angle(ZC)*180/pi;
```

```
p = rgb2gray(imread('E realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title('E realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
ND = size(p,1);
xD = 1:ND; yD = xD;
[XD,YD] = meshgrid(xD,yD);
RD = sqrt((2.*XD-ND-1).^2+(2.*YD-ND-1).^2)/ND; ThetaD = atan2((ND-1-2.*YD+2),(2.*XD-ND+1-2));
RD = (RD<=1).*RD;
RadD = radialpoly(RD,n,m);
ProductD = p(xD,yD).*RadD.*exp(-1i*m*ThetaD);
ZzD = sum(ProductD(:));
cntD = nnz(RD)+1;
ZD = (n+1)*ZzD/cntD;
AD = abs(ZD);
```

```
PhiD = angle(ZD)*180/pi;
>>
```

MATLAB Command Window Page 1

```
>> n = 2; m = 0;
>> disp( '-----' );
disp([ 'Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)]);
-----
Calculating Zernike moments ..., n = 2, m = 0
>> p = rgb2gray(imread( 'D.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title( 'D' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel([ 'A = ' num2str(AOH)]; [ '\phi = ' num2str(PhiOH)]);
NA = size(p,1);
xA = 1:NA; yA = xA;
[XA,YA] = meshgrid(xA,yA);
RA = sqrt((2.*XA-NA-1).^2+(2.*YA-NA-1).^2)/NA; ThetaA = atan2((NA-1-2.*YA+2),(2.*XA-NA+1-2));
RA = (RA<=1).*RA;
RadA = radialpoly(RA,n,m);
ProductA = p(xA,yA).*RadA.*exp(-1i*m*ThetaA);
ZzA = sum(ProductA(:));
cntA = nnz(RA)+1;
ZA = (n+1)*ZzA/cntA;
AA = abs(ZA);
PhiA = angle(ZA)*180/pi;

p = rgb2gray(imread( 'D realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title( 'D realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel([ 'A = ' num2str(AOH)]; [ '\phi = ' num2str(PhiOH)]);
NB = size(p,1);
xB = 1:NB; yB = xB;
[XB,YB] = meshgrid(xB,yB);
RB = sqrt((2.*XB-NB-1).^2+(2.*YB-NB-1).^2)/NB; ThetaB = atan2((NB-1-2.*YB+2),(2.*XB-NB+1-2));
RB = (RB<=1).*RB;
RadB = radialpoly(RB,n,m);
ProductB = p(xB,yB).*RadB.*exp(-1i*m*ThetaB);
ZzB = sum(ProductB(:));
```

```

cntB = nnz(RB)+1;
ZB = (n+1)*ZzB/cntB;
AB = abs(ZB);
PhiB = angle(ZB)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('E.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('E' );
p = logical(not(p));
tic

```

MATLAB Command Window Page 2

```

[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NC = size(p,1);
xC = 1:NC; yC = xC;
[XC,YC] = meshgrid(xC,yC);
RC = sqrt((2.*XC-NC-1).^2+(2.*YC-NC-1).^2)/NC; ThetaC = atan2((NC-1-2.*YC+2),(2.*XC-NC+1-2));
RC = (RC<=1).*RC;
RadC = radialpoly(RC,n,m);
ProductC = p(xC,yC).*RadC.*exp(-1i*m*ThetaC);
ZzC = sum(ProductC(:));
cntC = nnz(RC)+1;
ZC = (n+1)*ZzC/cntC;
AC = abs(ZC);
PhiC = angle(ZC)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('E realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title('E realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
ND = size(p,1);
xD = 1:ND; yD = xD;
[XD,YD] = meshgrid(xD,yD);
RD = sqrt((2.*XD-ND-1).^2+(2.*YD-ND-1).^2)/ND; ThetaD = atan2((ND-1-2.*YD+2),(2.*XD-ND+1-2));
RD = (RD<=1).*RD;
RadD = radialpoly(RD,n,m);
ProductD = p(xD,yD).*RadD.*exp(-1i*m*ThetaD);
ZzD = sum(ProductD(:));
cntD = nnz(RD)+1;
ZD = (n+1)*ZzD/cntD;
AD = abs(ZD);
PhiD = angle(ZD)*180/pi;
>>

```


MATLAB Command Window Page 1

```

>> n = 3; m = 3 ;
>> disp( '-----' );
disp([' Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)];
-----
Calculating Zernike moments ..., n = 3, m = 3
>> p = rgb2gray(imread( 'D.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title( 'D' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel([' 'A = ' num2str(AOH)]; [ '\phi = ' num2str(PhiOH)]);
NA = size(p,1);
xA = 1:NA; yA = xA;
[XA,YA] = meshgrid(xA,yA);
RA = sqrt((2.*XA-NA-1).^2+(2.*YA-NA-1).^2)/NA; ThetaA = atan2((NA-1-2.*YA+2),(2.*XA-NA+1-2));
RA = (RA<=1).*RA;
RadA = radialpoly(RA,n,m);
ProductA = p(xA,yA).*RadA.*exp(-1i*m*ThetaA);
ZzA = sum(ProductA(:));
cntA = nnz(RA)+1;
ZA = (n+1)*ZzA/cntA;
AA = abs(ZA);
PhiA = angle(ZA)*180/pi;

p = rgb2gray(imread( 'D realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title( 'D realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel([' 'A = ' num2str(AOH)]; [ '\phi = ' num2str(PhiOH)]);
NB = size(p,1);
xB = 1:NB; yB = xB;
[XB,YB] = meshgrid(xB,yB);
RB = sqrt((2.*XB-NB-1).^2+(2.*YB-NB-1).^2)/NB; ThetaB = atan2((NB-1-2.*YB+2),(2.*XB-NB+1-2));
RB = (RB<=1).*RB;
RadB = radialpoly(RB,n,m);
ProductB = p(xB,yB).*RadB.*exp(-1i*m*ThetaB);
ZzB = sum(ProductB(:));
cntB = nnz(RB)+1;
ZB = (n+1)*ZzB/cntB;
AB = abs(ZB);
PhiB = angle(ZB)*180/pi;

```

```

p = rgb2gray(imread('E.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('E' );
p = logical(not(p));
tic

```

MATLAB Command Window Page 2

```

[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NC = size(p,1);
xC = 1:NC; yC = xC;
[XC,YC] = meshgrid(xC,yC);
RC = sqrt((2.*XC-NC-1).^2+(2.*YC-NC-1).^2)/NC; ThetaC = atan2((NC-1-2.*YC+2),(2.*XC-NC+1-2));
RC = (RC<=1).*RC;
RadC = radialpoly(RC,n,m);
ProductC = p(xC,yC).*RadC.*exp(-1i*m*ThetaC);
ZzC = sum(ProductC(:));
cntC = nnz(RC)+1;
ZC = (n+1)*ZzC/cntC;
AC = abs(ZC);
PhiC = angle(ZC)*180/pi;

```

```

p = rgb2gray(imread('E realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title('E realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
ND = size(p,1);
xD = 1:ND; yD = xD;
[XD,YD] = meshgrid(xD,yD);
RD = sqrt((2.*XD-ND-1).^2+(2.*YD-ND-1).^2)/ND; ThetaD = atan2((ND-1-2.*YD+2),(2.*XD-ND+1-2));
RD = (RD<=1).*RD;
RadD = radialpoly(RD,n,m);
ProductD = p(xD,yD).*RadD.*exp(-1i*m*ThetaD);
ZzD = sum(ProductD(:));
cntD = nnz(RD)+1;
ZD = (n+1)*ZzD/cntD;
AD = abs(ZD);
PhiD = angle(ZD)*180/pi;
>>

```

MATLAB Command Window Page 1

```

>> n = 5; m = 5;
>> disp('-----');

```

```

disp([' Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = ' num2str(m)]);
-----
Calculating Zernike moments ..., n = 5, m = 5
>> p = rgb2gray(imread('D.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,1);imshow(p);
title('D' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NA = size(p,1);
xA = 1:NA; yA = xA;
[XA,YA] = meshgrid(xA,yA);
RA = sqrt((2.*XA-NA-1).^2+(2.*YA-NA-1).^2)/NA; ThetaA = atan2((NA-1-2.*YA+2),(2.*XA-NA+1-2));
RA = (RA<=1).*RA;
RadA = radialpoly(RA,n,m);
ProductA = p(xA,yA).*RadA.*exp(-1i*m*ThetaA);
ZzA = sum(ProductA(:));
cntA = nnz(RA)+1;
ZA = (n+1)*ZzA/cntA;
AA = abs(ZA);
PhiA = angle(ZA)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('D realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,2);imshow(p);
title('D realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NB = size(p,1);
xB = 1:NB; yB = xB;
[XB,YB] = meshgrid(xB,yB);
RB = sqrt((2.*XB-NB-1).^2+(2.*YB-NB-1).^2)/NB; ThetaB = atan2((NB-1-2.*YB+2),(2.*XB-NB+1-2));
RB = (RB<=1).*RB;
RadB = radialpoly(RB,n,m);
ProductB = p(xB,yB).*RadB.*exp(-1i*m*ThetaB);
ZzB = sum(ProductB(:));
cntB = nnz(RB)+1;
ZB = (n+1)*ZzB/cntB;
AB = abs(ZB);
PhiB = angle(ZB)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('E.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,3);imshow(p);
title('E' );
p = logical(not(p));
tic

```

MATLAB Command Window Page 2

```

[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
NC = size(p,1);
xC = 1:NC; yC = xC;
[XC,YC] = meshgrid(xC,yC);
RC = sqrt((2.*XC-NC-1).^2+(2.*YC-NC-1).^2)/NC; ThetaC = atan2((NC-1-2.*YC+2),(2.*XC-NC+1-2));
RC = (RC<=1).*RC;
RadC = radialpoly(RC,n,m);
ProductC = p(xC,yC).*RadC.*exp(-1i*m*ThetaC);
ZzC = sum(ProductC(:));
cntC = nnz(RC)+1;
ZC = (n+1)*ZzC/cntC;
AC = abs(ZC);
PhiC = angle(ZC)*180/pi;

p = rgb2gray(imread('E realinhada.bmp' ));
figure(1);subplot(2,2,4);imshow(p);
title('E realinhada' );
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);
Elapsed_time = toc;
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)}]);
ND = size(p,1);
xD = 1:ND; yD = xD;
[XD,YD] = meshgrid(xD,yD);
RD = sqrt((2.*XD-ND-1).^2+(2.*YD-ND-1).^2)/ND; ThetaD = atan2((ND-1-2.*YD+2),(2.*XD-ND+1-2));
RD = (RD<=1).*RD;
RadD = radialpoly(RD,n,m);
ProductD = p(xD,yD).*RadD.*exp(-1i*m*ThetaD);
ZzD = sum(ProductD(:));
cntD = nnz(RD)+1;
ZD = (n+1)*ZzD/cntD;
AD = abs(ZD);
PhiD = angle(ZD)*180/pi;
>>

```

APÊNDICE E - Quadros comparativos da análise de Zernike nos diagramas de difração para a colônia um em software Matlab sem etapas de processamento de imagens

colonia um A



$$A = 0.3826$$

$$\phi = 0$$

colonia um B



$$A = 0.40866$$

$$\phi = 0$$

B realinhada



$$A = 0.34604$$

$$\phi = 0$$

colonia um C



$$A = 0.36301$$

$$\phi = 0$$

colonia um D



$$A = 0.70918$$

$$\phi = 0$$

realinhada D



$$A = 0.67606$$

$$\phi = 0$$

E



$$A = 0.60919$$

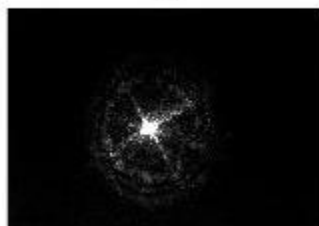
$$\phi = 0$$

F



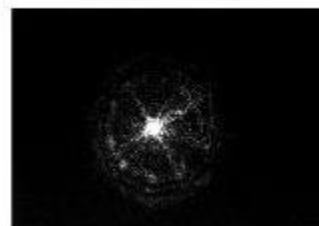
$$A = 0.68992$$

$$\phi = 0$$

D

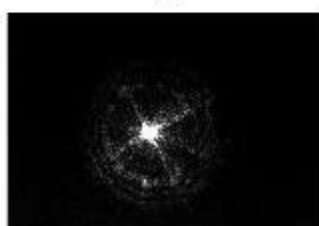
$$A = 0.008171$$

$$\phi = 157.3039$$

D realinhada

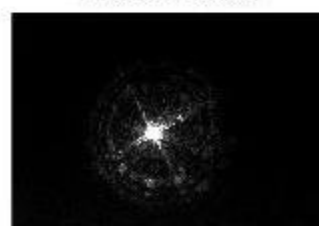
$$A = 0.0044458$$

$$\phi = 157.8153$$

E

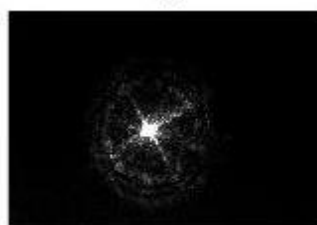
$$A = 0.0056845$$

$$\phi = 168.6805$$

E realinhada

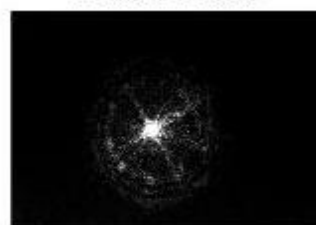
$$A = 0.0056845$$

$$\phi = 168.6805$$

D

$$A = 0.0074578$$

$$\phi = -32.0394$$

D realinhada

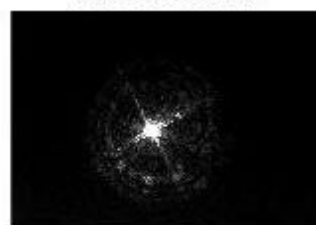
$$A = 0.0092069$$

$$\phi = -30.9918$$

E

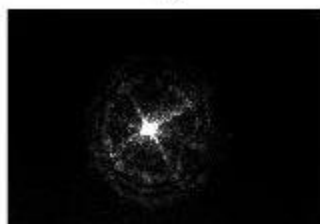
$$A = 0.0083844$$

$$\phi = -73.798$$

E realinhada

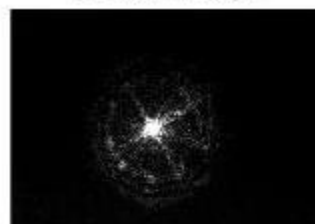
$$A = 0.0083844$$

$$\phi = -73.798$$

D

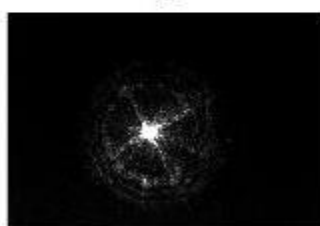
$$A = 2.3863$$

$$\phi = 180$$

D realinhada

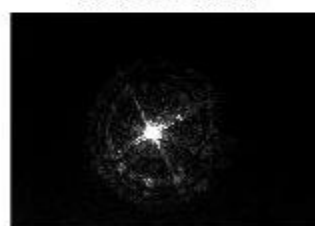
$$A = 2.205$$

$$\phi = 180$$

E

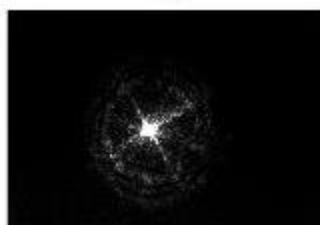
$$A = 1.9471$$

$$\phi = 180$$

E realinhada

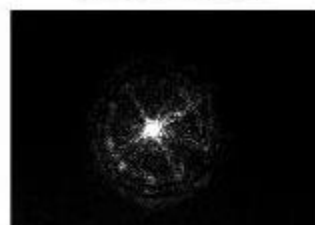
$$A = 1.9471$$

$$\phi = 180$$

D

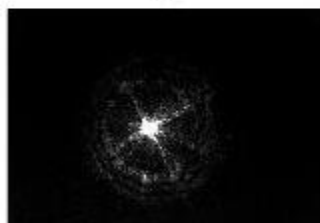
$$A = 0.014126$$

$$\phi = -51.563$$

D realinhada

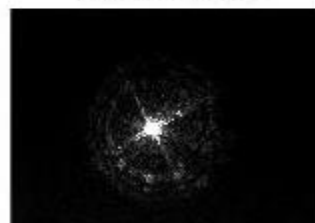
$$A = 0.013442$$

$$\phi = -41.0518$$

E

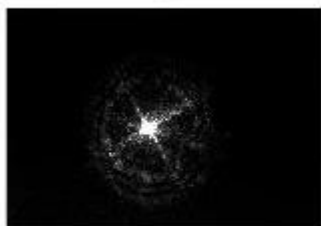
$$A = 0.017112$$

$$\phi = -26.265$$

E realinhada

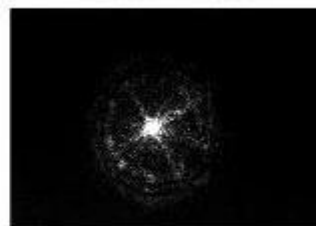
$$A = 0.017112$$

$$\phi = -26.265$$

D

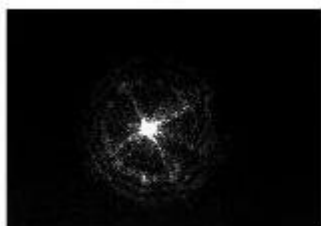
$$A = 2.0394$$

$$\phi = 0$$

D realinhada

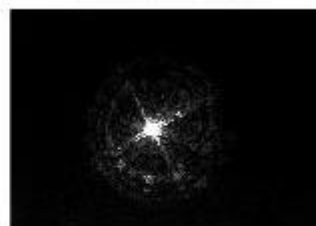
$$A = 1.9025$$

$$\phi = 0$$

E

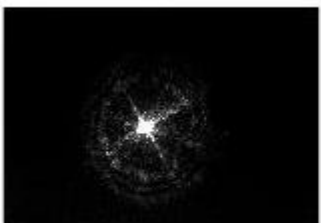
$$A = 1.6746$$

$$\phi = 0$$

E realinhada

$$A = 1.6746$$

$$\phi = 0$$

D

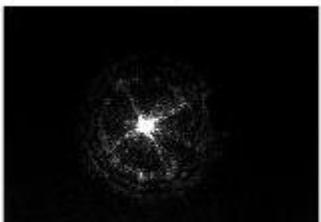
$$A = 0.028302$$

$$\phi = 52.0666$$

D realinhada

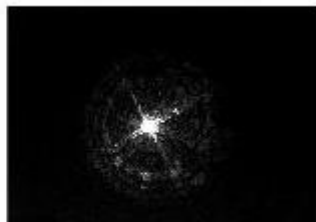
$$A = 0.027396$$

$$\phi = 56.1007$$

E

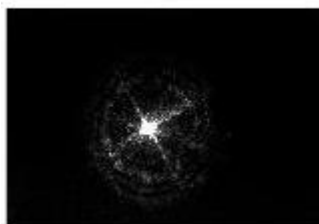
$$A = 0.03141$$

$$\phi = 41.6184$$

E realinhada

$$A = 0.03141$$

$$\phi = 41.6184$$

D

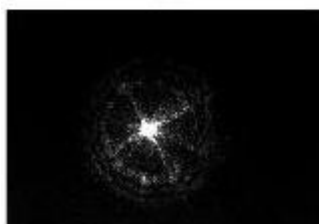
$$A = 0.63864$$

$$\phi = 0$$

D realinhada

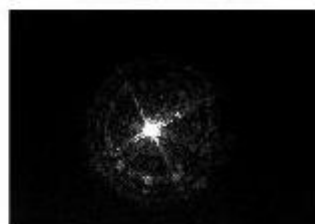
$$A = 0.58579$$

$$\phi = 0$$

E

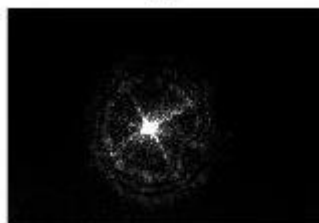
$$A = 0.49991$$

$$\phi = 0$$

E realinhada

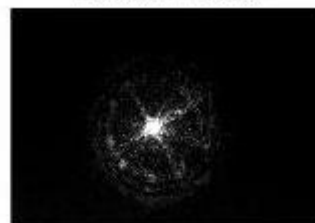
$$A = 0.49991$$

$$\phi = 0$$

D

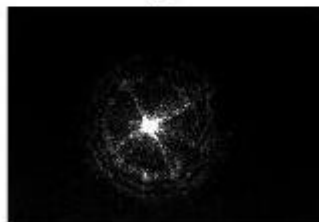
$$A = 0.63864$$

$$\phi = 0$$

D realinhada

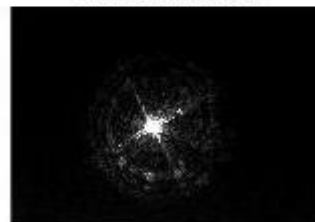
$$A = 0.58579$$

$$\phi = 0$$

E

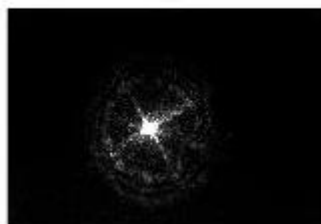
$$A = 0.49991$$

$$\phi = 0$$

E realinhada

$$A = 0.49991$$

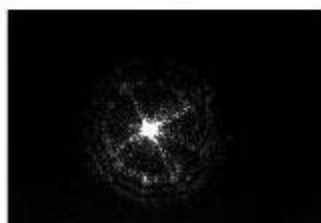
$$\phi = 0$$

D

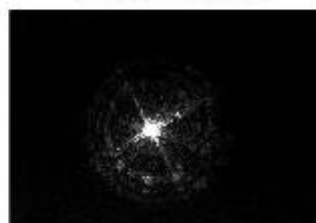
$$A = 0.030066$$
$$\phi = 179.2369$$

D realinhada

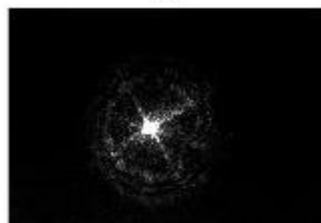
$$A = 0.030942$$
$$\phi = -162.6489$$

E

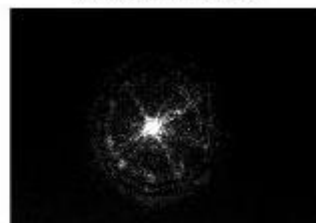
$$A = 0.044726$$
$$\phi = -152.9696$$

E realinhada

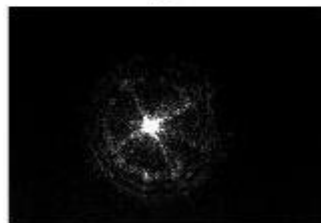
$$A = 0.044726$$
$$\phi = -152.9696$$

D

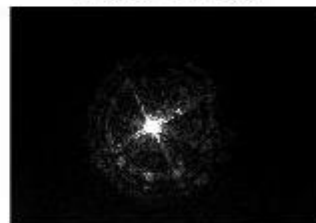
$$A = 0.22628$$
$$\phi = 180$$

D realinhada

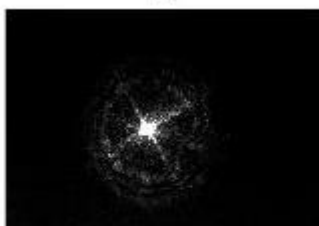
$$A = 0.2024$$
$$\phi = 180$$

E

$$A = 0.18228$$
$$\phi = 180$$

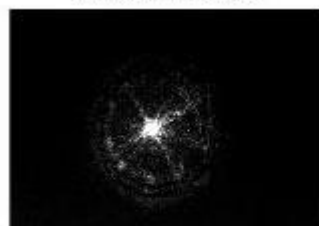
E realinhada

$$A = 0.18228$$
$$\phi = 180$$

D

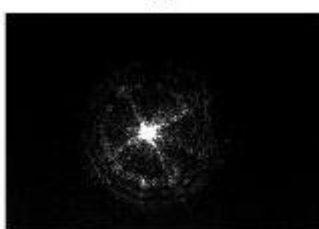
$$A = 0.0074578$$

$$\phi = -32.0394$$

D realinhada

$$A = 0.0092069$$

$$\phi = -30.9918$$

E

$$A = 0.0083844$$

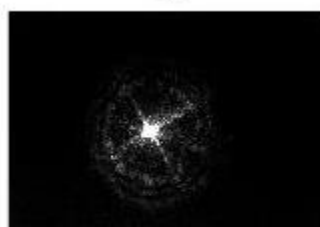
$$\phi = -73.798$$

E realinhada

$$A = 0.0083844$$

$$\phi = -73.798$$

$n = 15$
 $m = 15$
 colônia um

D

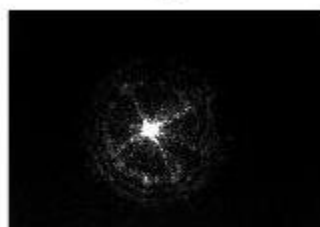
$$A = 2.3863$$

$$\phi = 180$$

D realinhada

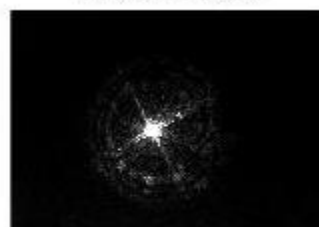
$$A = 2.205$$

$$\phi = 180$$

E

$$A = 1.9471$$

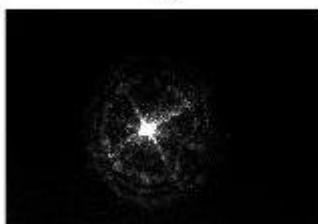
$$\phi = 180$$

E realinhada

$$A = 1.9471$$

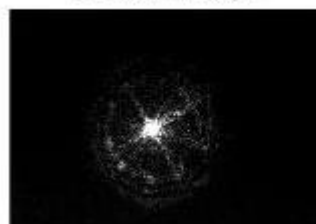
$$\phi = 180$$

$n = 14$
 $m = 0$
 colônia um

D

$$A = 0.014126$$

$$\phi = -51.563$$

D realinhada

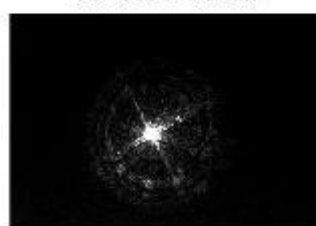
$$A = 0.013442$$

$$\phi = -41.0518$$

E

$$A = 0.017112$$

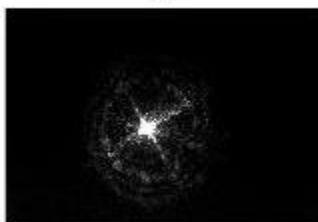
$$\phi = -26.265$$

E realinhada

$$A = 0.017112$$

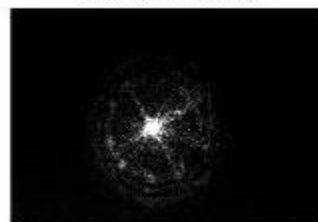
$$\phi = -26.265$$

$n = 13$
 $m = 13$
 colônia um

D

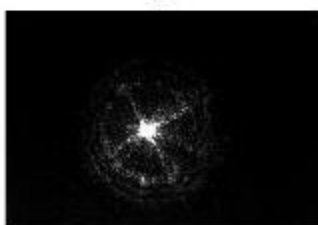
$$A = 2.0394$$

$$\phi = 0$$

D realinhada

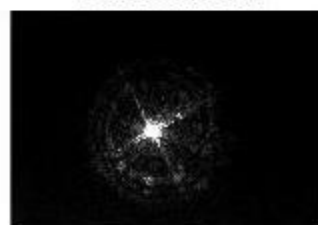
$$A = 1.9025$$

$$\phi = 0$$

E

$$A = 1.6746$$

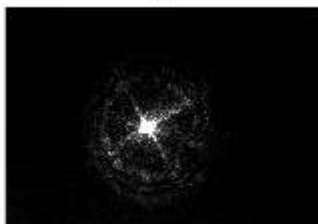
$$\phi = 0$$

E realinhada

$$A = 1.6746$$

$$\phi = 0$$

$n = 12$
 $m = 0$
 colônia um

D

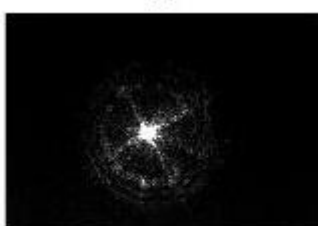
$$A = 0.028302$$

$$\phi = 52.0666$$

D realinhada

$$A = 0.027396$$

$$\phi = 56.1007$$

E

$$A = 0.03141$$

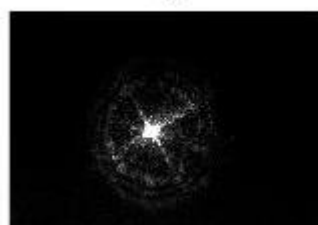
$$\phi = 41.6184$$

E realinhada

$$A = 0.03141$$

$$\phi = 41.6184$$

$n = 5$
 $m = 5$
colônia um

D

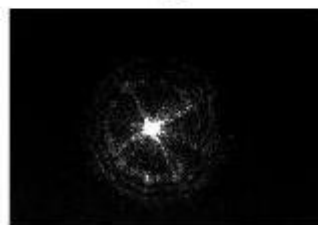
$$A = 0.63864$$

$$\phi = 0$$

D realinhada

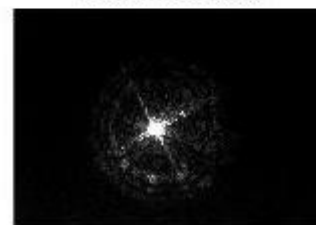
$$A = 0.58579$$

$$\phi = 0$$

E

$$A = 0.49991$$

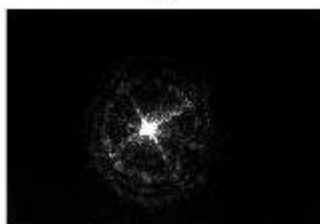
$$\phi = 0$$

E realinhada

$$A = 0.49991$$

$$\phi = 0$$

$n = 4$
 $m = 0$
colônia um

D

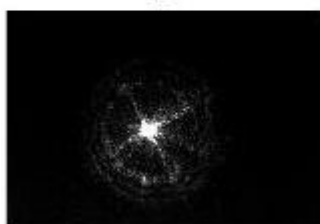
$$A = 0.030066$$

$$\phi = 179.2369$$

D realinhada

$$A = 0.030942$$

$$\phi = -162.6489$$

E

$$A = 0.044726$$

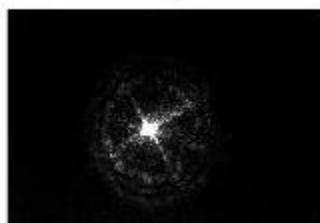
$$\phi = -152.9696$$

E realinhada

$$A = 0.044726$$

$$\phi = -152.9696$$

$n = 3$
 $m = 3$
 colônia um

D

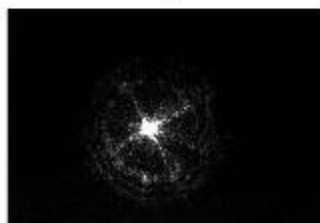
$$A = 0.22628$$

$$\phi = 180$$

D realinhada

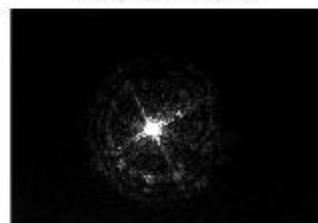
$$A = 0.2024$$

$$\phi = 180$$

E

$$A = 0.18228$$

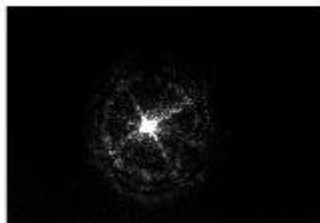
$$\phi = 180$$

E realinhada

$$A = 0.18228$$

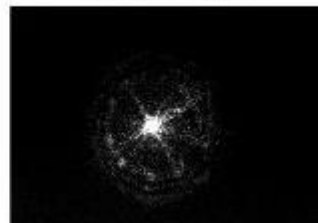
$$\phi = 180$$

$n = 2$
 $m = 0$
 colônia um

D

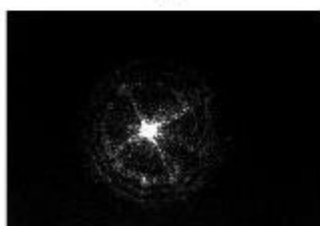
$$A = 0.62488$$

$$\phi = 0$$

D realinhada

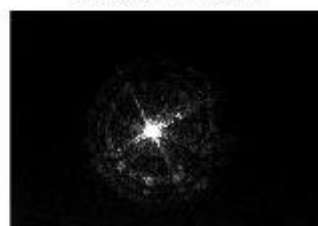
$$A = 0.58647$$

$$\phi = 0$$

E

$$A = 0.51326$$

$$\phi = 0$$

E realinhada

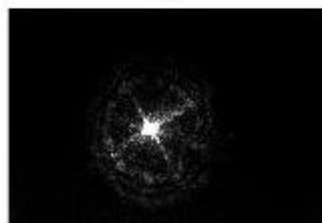
$$A = 0.51326$$

$$\phi = 0$$

$$n = 0$$

$$m = 0$$

colônia um

D

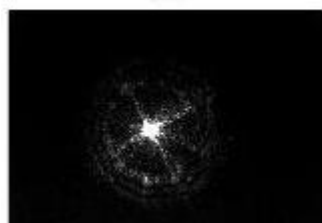
$$A = 0.22628$$

$$\phi = 180$$

D realinhada

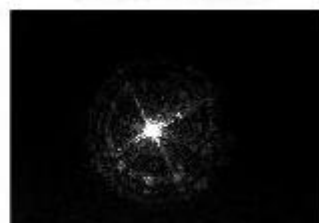
$$A = 0.2024$$

$$\phi = 180$$

E

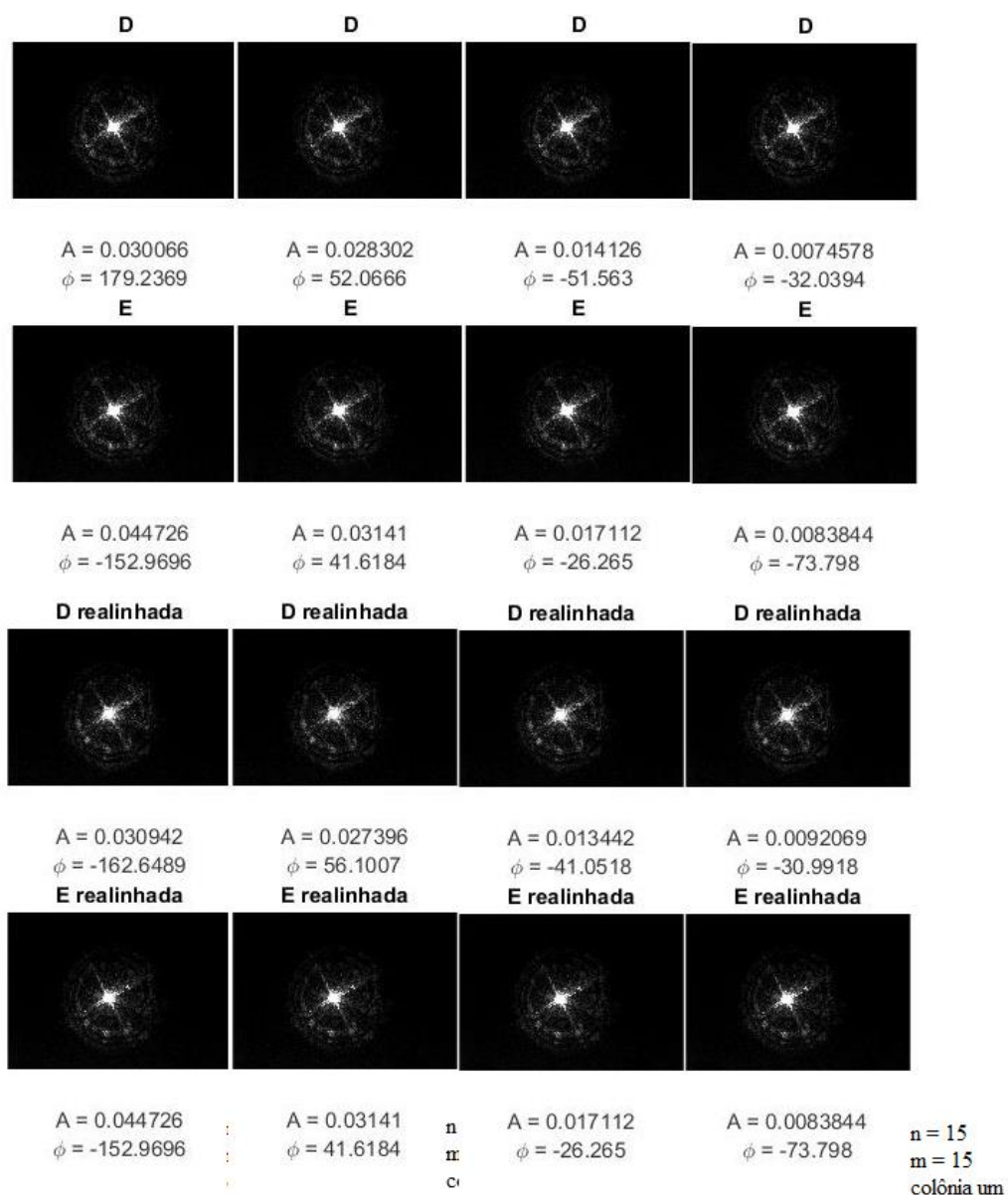
$$A = 0.18228$$

$$\phi = 180$$

E realinhada

$$A = 0.18228$$

$$\phi = 180$$



ANEXO A - Algoritmo computacional para cálculo dos polinômios radiais de Zernike em imagens por Amir Tahmasbi (toolboxes, Matlab)

```

function rad = radialpoly(r,n,m)
% -----
% Copyright C 2014 Amir Tahmasbi
% Texas A&M University
% amir.tahmasbi@tamu.edu
% http://people.tamu.edu/~amir.tahmasbi/index.html
%
% License Agreement: To acknowledge the use of the code please cite the
%                     following papers:
%
% [1] A. Tahmasbi, F. Saki, S. B. Shokouhi,
%     Classification of Benign and Malignant Masses Based on Zernike
%     Moments,
%     Comput. Biol. Med., vol. 41, no. 8, pp. 726-735, 2011.
%
% [2] F. Saki, A. Tahmasbi, H. Soltanian-Zadeh, S. B. Shokouhi,
%     Fast opposite weight learning rules with application in breast cancer
%     diagnosis, Comput. Biol. Med., vol. 43, no. 1, pp. 32-41, 2013.
%
% -----
% Function to compute Zernike Polynomials:
%
% f = radialpoly(r,n,m)
% where
%   r = radius
%   n = the order of Zernike polynomial
%   m = the repetition of Zernike moment

rad = zeros(size(r)); % Initalization
for s = 0:(n-abs(m))/2
    c = (-1)^s*factorial(n-s)/(factorial(s)*factorial((n+abs(m))/2-s)*...
        factorial((n-abs(m))/2-s));
    rad = rad + c*r.^(n-2*s);
end

```

ANEXO B - Algoritmo computacional do toolbox matlab para cálculo da função de Zernike aplicada como descritores de imagens

```

A FUNÇÃO FOI CONSTRUÍDA POR AMIR TAHMASBI
function [Z, A, Phi] = Zernikmoment(p,n,m)
% -----
% Copyright C 2014 Amir Tahmasbi
% Texas A&M University
% amir.tahmasbi@tamu.edu
% http://people.tamu.edu/~amir.tahmasbi/index.html
% License Agreement: To acknowledge the use of the code please cite the
% following papers:
%
% [1] A. Tahmasbi, F. Saki, S. B. Shokouhi,
% Classification of Benign and Malignant Masses Based on Zernike
Moments,
% Comput. Biol. Med., vol. 41, no. 8, pp. 726-735, 2011.
%
% [2] F. Saki, A. Tahmasbi, H. Soltanian-Zadeh, S. B. Shokouhi,
% Fast opposite weight learning rules with application in breast cancer
diagnosis, Comput. Biol. Med., vol. 43, no. 1, pp. 32-41, 2013.
% -----
% Function to find the Zernike moments for an N x N binary ROI
% [Z, A, Phi] = Zernikmoment(p,n,m)
% where
% p = input image N x N matrix (N should be an even number)
% n = The order of Zernike moment (scalar)
% m = The repetition number of Zernike moment (scalar)
% and
% Z = Complex Zernike moment
% A = Amplitude of the moment
% Phi = phase (angle) of the mement (in degrees)
% Example:
% 1- calculate the Zernike moment (n,m) for an oval shape,
% 2- rotate the oval shape around its centeroid,
% 3- calculate the Zernike moment (n,m) again,
% 4- the amplitude of the moment (A) should be the same for both images
% 5- the phase (Phi) should be equal to the angle of rotation

N = size(p,1);
x = 1:N; y = x;
[X,Y] = meshgrid(x,y);
R = sqrt((2.*X-N-1).^2+(2.*Y-N-1).^2)/N;
Theta = atan2((N-1-2.*Y+2),(2.*X-N+1-2));
R = (R<=1).*R;
Rad = radialpoly(R,n,m); % get the radial polynomial

Product = p(x,y).*Rad.*exp(-1i*m*Theta);
Z = sum(Product(:)); % calculate the moments

cnt = nnz(R)+1; % count the number of pixels inside the unit
circle
Z = (n+1)*Z/cnt; % normalize the amplitude of moments
A = abs(Z); % calculate the amplitude of the moment
Phi = angle(Z)*180/pi; % calculate the phase of the mement (in
degrees)

```

ANEXO C - Cálculo dos momentos de Zernike e análise da invariância à rotação por Amir Tahmasbi (toolboxes, Matlab)

```

% -----
% Copyright C 2014 Amir Tahmasbi
% Texas A&M University
% amir.tahmasbi@tamu.edu
% http://people.tamu.edu/~amir.tahmasbi/index.html
%
% License Agreement: To acknowledge the use of the code please cite the
%                     following papers:
%
% [1] A. Tahmasbi, F. Saki, S. B. Shokouhi,
%      Classification of Benign and Malignant Masses Based on Zernike
%      Moments,
%      Comput. Biol. Med., vol. 41, no. 8, pp. 726-735, 2011.
%
% [2] F. Saki, A. Tahmasbi, H. Soltanian-Zadeh, S. B. Shokouhi,
%      Fast opposite weight learning rules with application in breast cancer
%      diagnosis, Comput. Biol. Med., vol. 43, no. 1, pp. 32-41, 2013.
%
% -----
% A demo of how to use the Zernike moment function.
%
% Example:
% 1- calculate the Zernike moment (n,m) for an oval shape,
% 2- rotate the oval shape around its centroid,
% 3- calculate the Zernike moment (n,m) again,
% 4- the amplitude of the moment (A) should be the same for both images
% 5- the phase (Phi) should be equal to the angle of rotation

clc; clear all; close all;

n = 4; m = 2;           % Define the order and the repetition of the moment

disp('-----');
disp(['Calculating Zernike moments ..., n = ' num2str(n) ', m = '
num2str(m) ]);

%-----
% row 1
p = rgb2gray(imread('Oval_H.png'));
%%
%
% %
figure(1); subplot(2,3,1); imshow(p);
title('Horizontal oval');
p = logical(not(p));
tic
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);      % Call Zernikemoment fuction
Elapsed_time = toc;
xlabel(['A = ' num2str(AOH)]; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]);

p = rgb2gray(imread('Oval_45.png'));
figure(1); subplot(2,3,2); imshow(p);
title('-45 degree oval');

```

```

p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);           % Call Zernikmoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]});

p = rgb2gray(imread('Oval_V.png'));
figure(1);subplot(2,3,3);imshow(p);
title('Vertical oval');
p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);           % Call Zernikmoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]});

%-----
% row 2
p = rgb2gray(imread('shape_0.png'));
figure(1);subplot(2,3,4);imshow(p);
title('Horizontal shape');
p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);           % Call Zernikmoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]});

p = rgb2gray(imread('shape_90.png'));
figure(1);subplot(2,3,5);imshow(p);
title('Vertical shape');
p = logical(not(p));
[~, AOV, PhiOV] = Zernikmoment(p,n,m);           % Call Zernikmoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOV)}; ['\phi = ' num2str(PhiOV)]});

p = rgb2gray(imread('Rectangular_H.png'));
figure(1);subplot(2,3,6);imshow(p);
title('Horizontal Rectangle');
p = logical(not(p));
[~, AOH, PhiOH] = Zernikmoment(p,n,m);           % Call Zernikmoment fuction
xlabel({'A = ' num2str(AOH)}; ['\phi = ' num2str(PhiOH)]});

%-----
% show the elapsed time
disp('Calculation is complete. ');
disp(['The elapsed time per image is ' num2str(Elapsed_time) '
seconds']);

```

ANEXO D - Quadro comparativo do Cálculo dos momentos de Zernike e análise da invariância à rotação por Amir Tahmasbi (toolboxes, Matlab)

Horizontal oval



$$A = 0.092942$$

$$\phi = -179.9203$$

Horizontal shape



$$A = 0.068855$$

$$\phi = 110.4494$$

-45 degree oval



$$A = 0.090255$$

$$\phi = -89.9049$$

Vertical shape



$$A = 0.068855$$

$$\phi = -69.5506$$

Vertical oval



$$A = 0.092942$$

$$\phi = 0.079697$$

Horizontal Rectangle



$$A = 0.14797$$

$$\phi = -179.9266$$