

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL - PPEA
MESTRADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
MODALIDADE PROFISSIONAL**

**METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO SOLO
DA RESTINGA DE MASSAMBABA, LOCALIZADA NO MUNICÍPIO
DE ARRAIAL DO CABO/RJ, UTILIZANDO TÉCNICAS QUE
ATUAM NA REGIÃO VISÍVEL DO ESPECTRO
ELETROMAGNÉTICO**

THIAGO ALONSO MERICI

**CABO FRIO/RJ
2014**

THIAGO ALONSO MERICI

METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO SOLO DA
RESTINGA DE MASSAMBABA, LOCALIZADA NO MUNICÍPIO DE
ARRAIAL DO CABO/RJ, UTILIZANDO TÉCNICAS QUE ATUAM NA
REGIÃO VISÍVEL DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, na área de concentração Promoção do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, linha de pesquisa Desenvolvimento e Sustentabilidade. Orientador: Prof. *DSc.* Victor Barbosa Saraiva. Co-orientador: Prof. *DSc.* Alexandre Peixoto do Carmo.

CABO FRIO/RJ
2014

Dados de Catalogação na Publicação (CIP)

M561m Merici, Thiago Alonso.
Metodologias de identificação de bactérias do solo da restinga de Massambaba, localizada no município de Arraial do Cabo Frio/RJ, utilizando técnicas que atuam na região visível do espectro eletromagnético/ Thiago Alonso Merici. – Macaé, RJ, 2014.
79 f.: il. color.

Orientador: Victor Barbosa Saraiva.
Coorientador: Alexandre Peixoto do Carmo.

Dissertação (mestrado). – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Macaé, RJ, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Solos - Análise. 2. Bacteriologia agrícola.
3. Massambaba, Restinga de (RJ). I. Saraiva, Victor Barbosa, orient. II. Carmo, Alexandre Peixoto do, coorient. III. Título.

CDD 631.498153 20.ed.

Dissertação intitulada Metodologias de identificação de bactérias do solo da restinga de Massambaba, localizada no município de Arraial do Cabo/RJ, utilizando técnicas que atuam na região visível do espectro eletromagnético, elaborada por Thiago Alonso Merici e apresentada publicamente perante a Banca Examinadora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, na área concentração Promoção do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, linha de pesquisa Desenvolvimento e Sustentabilidade do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

Aprovado em 17 de novembro de 2014.

Banca examinadora:



Victor Barbosa Saraiva, Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica) / UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.



Daniel Gibaldi, Doutor em Ciências (Microbiologia e Imunologia) / UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro / Fundação Instituto Oswaldo Cruz.



Cristine Nunes Ferreira, Doutora em Física / CBPF - Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.



Alexandre Peixoto do Carmo, Doutor em Física / UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

À minha família

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos serão, neste momento, minha pequena demonstração de gratidão àqueles que de forma direta ou indireta me ajudaram a construir este trabalho.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo dom da vida e por permitir concluir mais esta etapa de meu crescimento intelectual e profissional.

À minha família, pela educação que me concedeu na formação do meu caráter, pela confiança e por sempre acreditarem no meu potencial.

À minha noiva e futura esposa Franciele, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelo suporte e compreensão nas minhas inúmeras viagens e pelo carinho e amor dedicados a mim durante esta jornada.

Ao meu orientador Victor Saraiva Barbosa, por ter aceitado o desafio de me orientar, por todo aprendizado, pela confiança depositada em mim e certeza de que tudo daria certo.

Ao meu co-orientador Alexandre Peixoto do Carmo, pelas contribuições diretas no trabalho, enriquecendo-o e garantindo o sucesso de uma metodologia inovadora.

Ao meu grande amigo e irmão Gessé Pereira, pelas contribuições no trabalho, mas principalmente pela amizade e companheirismo dedicados a mim nesta importante etapa da minha vida.

Ao meu amigo Cláudio Júnior por ser um grande incentivador e o responsável por eu ter seguido este caminho em uma das encruzilhadas da vida.

Agradeço a todos que compartilharam estes momentos, que acreditaram em mim e torceram pelo meu sucesso.

Muito obrigado!

“As convicções
são inimigas mais perigosas
da verdade que as mentiras”.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Por possuírem funções vitais na natureza, as bactérias são constantes objetos de estudo. Elas são aplicadas em áreas contaminadas para degradar poluentes, no processo de biorremediação, muito comum em regiões litorâneas que estão sempre sendo agredidas por consequência da exploração e transporte de petróleo, e na agricultura com a finalidade de melhorar a qualidade das técnicas de cultivo e dos produtos em vários aspectos. Algumas bactérias encontradas na restinga de Massambaba em Arraial do Cabo, RJ, possuem características relacionadas às suas cores que chamaram a atenção dos pesquisadores do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental, LEMAM. À luz dessa importância para o ambiente de uma maneira geral e das características cromáticas das colônias, esta dissertação apresenta dois artigos científicos que trazem propostas e metodologias para trabalhar, principalmente, na identificação dessas bactérias, utilizando técnicas e conceitos físicos relacionados à óptica, trabalhando na região visível do espectro eletromagnético. O primeiro artigo apresenta revisões sobre os principais processos de identificação de micro-organismos por espectroscopia e propõe a aplicação deste método na região do visível. Já o segundo artigo é experimental, e utiliza a manipulação das cores primárias verificadas em fotografias digitais de culturas de bactérias. As cores são transformadas matematicamente, transitando entre espaços de representação de cores sendo identificadas em cada um deles e representadas no cubo de cores e no diagrama de cromaticidade. Através da metodologia proposta no trabalho, foi possível verificar os comprimentos de onda predominante na cor de cada espécie, assim como identificá-las por suas localizações no diagrama de cromaticidade.

Palavras-chave: Identificação de Bactérias. Espectro Visível. Metodologia.

ABSTRACT

Due to possessing vital functions within nature, bacteria have been constant objects of study. They are applied into contaminated areas to degrade pollutants through the process of bioremediation much commonly in coastal regions that have always been attacked as the result of exploitation and transportation of oil, and in agriculture in order to improve the quality of the cultivation techniques and products in several aspects. Some bacteria found in Massambaba sandbank in Arraial do Cabo (RJ) possess characteristics related to their colors which have drawn the attention of the researchers from the Laboratory of Ecotoxicology and Environmental Microbiology. In the light of this importance to the environment in general, and the chromatic characteristics of the colonies, this dissertation presents two scientific papers that bring proposals and methodologies to work, primarily, on the identification of these bacteria, by using techniques and physical concepts related to the optics, working on the visible region of the electromagnetic spectrum. The first article presents reviews of the main processes of identification of micro-organisms by spectroscopy and proposes the application of this method on the visible region. The second article is experimental and uses the manipulation of the primary colors verified on digital photographs of cultures of bacteria. The colors are transformed mathematically – moving among spaces of representation of colors – being identified in each one of them and represented in the color cube and the diagram of chromaticity. Through the methodology proposed in this work, it was possible to verify the predominant wavelengths in the color of each species, as well as identifying them by their locations on the chromaticity diagram.

Key-words: Identification of Bacteria. Visible Spectrum. Methodology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação do espectro eletromagnético com destaque para a região do visível.....	20
Figura 2. Colônias de bactérias distintas em meio sólido de cultura	20
Figura 3. Transições de um elétron durante os processos de absorção e emissão	26
Figura 4. Esquema estrutural e funcional de um Espectrômetro de absorção na região do visível.....	28
Figura 5. Transição de nível eletrônico relacionado à energia absorvida pelo átomo	29
Figura 6. Gráfico representativo dos limites da linearidade da Lei de Lambert-Beer	31
Figura 7. Solução com precipitado de bactérias após passar por processo de centrifugação	35
Figura 8. Gráfico representativo da comparação entre as espécies 1 e 2.....	36
Figura 9. Gráfico representativo da comparação entre as espécies 1 e 2 normalizado.....	37
Figura 10. Gráfico comparativo de concentrações distintas dentro de uma mesma espécie	37
Figura 11. Gráfico comparativo normalizado de concentrações distintas dentro de uma mesma espécie	38
Figura 12. Bactérias do solo da restinga de Massambaba, Arraial do Cabo, R.J.....	44
Figura 13. Diagrama representativo do processo de visão.....	45
Figura 14. Esquema de absorção e reflexão de cores	46
Figura 15. Esquema de absorção e reflexão de cores	46

Figura 16.	
Esquema de absorção e reflexão de cores	47
Figura 17.	
Sensibilidade relativa dos cones nas faixas do vermelho, verde e azul.....	48
Figura 18.	
Sensibilidade relativa ao brilho com resposta máxima na faixa do verde.....	50
Figura 19.	
Síntese aditiva das cores primárias e subtrativa das cores secundárias.....	51
Figura 20.	
Espaço representativo de cores RGB	51
Figura 21.	
Valores dos tri-estímulos para as cores primarias no sistema CIE-RGB	53
Figura 22.	
Valores dos tri-estímulos para as cores primarias no sistema CIE-XYZ	53
Figura 23.	
Espaço CIE-XYZ abrangendo o espaço CIE-RGB	54
Figura 24.	
Sólido de cores formado por todas as cores visíveis do espectro	55
Figura 25.	
Diagramas de cromaticidade com sentido da saturação	56
Figura 26.	
Aplicativo de medição dos valores das cores primárias RGB.....	57
Figura 27.	
Software representativo do cubo de cores RGB	58
Figura 28.	
Imagem do diagrama de cromaticidade no software Color Calculator	59
Figura 29.	
Diagrama de determinação do comprimento de onda das cores monocromáticas dominantes	61
Figura 30.	
Dispersão comparativa das amostras do tipo A e tipo D no cubo de cores RGB.....	62
Figura 31.	
Representação das localizações de todas as espécies no cubo de cores RGB.....	63
Figura 32.	
Localização média de cada espécie e do ponto acromático no diagrama de cromaticidade ...	64

Figura 33.	
Comprimento de onda predominante em cada espécie	65
Figura 34.	
Faixa de variação de comprimentos de onda dominantes em cada espécie	66
Figura 35.	
Regiões de identificação de cada espécie no diagrama de cromaticidade.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	
Relação entre as cores e os comprimentos de onda da luz	21
Tabela 2.	
Espectro eletromagnético e suas interações.....	25
Tabela 3.	
Comprimentos de onda das cores primárias	52
Tabela 4.	
Coordenadas de cromaticidade nos sistema XYZ.....	54
Tabela 5.	
Médias dos valores RGB	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM – Atmosfera

CIE - Comissão Internacional de Iluminação

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

IFF - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense

LASER – *Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação*

LB - Luria-Bertani

LEMAM - Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental

MALDI – Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz

NaCl - Cloreto de Sódio

IR - Infra Vermelho

RGB – Vermelho, verde e Azul

RJ - Rio de Janeiro

RNA - Ácido Ribonucléico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PH - Potencial Hidrogeniônio

TOF – Tempo de Voo

UV - Ultra Violeta

VIS - Visível

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	16
2. ARTIGO 1: ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE ABSORÇÃO APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS	
2.1 Resumo	18
2.2 Abstract.....	18
2.3 Introdução.....	19
2.4 Aplicações na Agricultura e Biorremediação	22
2.5 Tipos de Espectroscopia	24
2.6 Espectroscopia no Infra Vermelho (IR).....	26
2.7 Espectroscopia no Visível (VIS)	27
2.8 Lei de Lambert – Beer	29
2.9 A Relevância do Método de Identificação de Bactérias por Espectroscopia	32
2.10 Metodologia.....	34
2.11 Resultados e Discussão.....	36
2.12 Conclusão	38
2.13 Referências Bibliográficas.....	39
3. ARTIGO 2: METODOLOGIA DE APLICAÇÃO E MANIPULAÇÃO DE CORES PRIMÁRIAS NA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS	
3.1 Resumo	42
3.2 Abstract.....	42
3.3 Introdução.....	43
3.4 Luz, Cor e Visão	44
3.5 Teoria do Tri-Estímulo	47
3.6 Colorimetria e Sistemas de Cores.....	49

3.7 Diagrama de Cromaticidade	55
3.8 Material e Metodologia	57
3.9 Resultados e Discussão.....	61
3.10 Conclusão	68
3.11 Referenciais Bibliográficas.....	69

1. APRESENTAÇÃO

As bactérias exercem um papel extremamente importante na natureza, atuando em processos como a fotossíntese, decomposição de matéria orgânica e até mesmo na regulação de funções orgânicas em plantas e animais. Com o aumento da preocupação com as questões ambientais, outras funções que podem ser exercidas por bactérias são percebidas e estudadas com o intuito de amenizar problemas de poluição e degradação do meio ambiente assim como melhorar a qualidade dos processos e produtos agrícolas. Em regiões litorâneas é bastante comum que solos e águas sejam contaminados em decorrência dos processos de exploração do petróleo. Existem muitos estudos que sugerem a aplicação de bactérias nessas áreas como estratégia de descontaminação, uma vez que algumas apresentam propriedades de degradação de componentes do petróleo. Este processo é chamado de biorremediação e pode ser aplicado em diversas situações visando à melhoria de áreas contaminadas por uma enorme gama de agentes poluidores (RIBEIRO, 1993).

Outra área onde se tem aplicado bactérias é na agricultura, visando o fortalecimento de plantas, a diminuição do uso de agrotóxicos e o controle de pragas. Desta forma, fica evidente a preocupação e a motivação que vem sendo empregada no estudo desses micro-organismos (AZEVEDO; ARAUJO; MACCHERONI, 2000).

A tecnologia mais eficiente e mais utilizada na identificação de bactérias é a Reação em Cadeia da Polimerase, PCR, capaz de identificar até mesmo linhagens diferentes dentro da mesma espécie (REIS JUNIOR *et al.*, 1998). No entanto, existe uma busca por técnicas acessíveis que possibilitem uma identificação preliminar com rapidez e baixo custo, contrapondo uma caracterização genotípica a uma caracterização fenotípica, que leva em consideração o padrão de cultivo dos micro-organismos e sua interação com o ambiente.

Como ferramenta para identificação de micro-organismos, é comum a aplicação de métodos espectroscópicos, sendo que a maioria destas aplicações acontece na faixa do infravermelho (DELWICHE; MASSIE, 1996; HANS, 2003; MIRALBES, 2004; ARGYRIA *et al.*, 2010). No entanto, algumas bactérias coletadas pela equipe do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental, LEMAM, apresentaram colorações bastante definidas, o que despertou o interesse de realizar trabalhos de identificação e caracterização das mesmas na região do visível. Sendo assim, este trabalho apresenta propostas de metodologias no desenvolvimento de técnicas que possibilitem trabalhar com estas bactérias explorando a região visível do espectro eletromagnético.

A primeira proposta consiste em uma metodologia que aborda espectroscopia óptica de absorção na região do visível. Com esta técnica pretende-se identificar as amostras de bactérias em uma solução salina de acordo com o espectro de absorbância das mesmas, além de realizar uma análise quantitativa estabelecida por padrões espectrofotométricos que relacionem a absorbância da amostra com as concentrações de bactérias presentes na mesma. Uma segunda proposta de trabalho sugere uma metodologia inovadora, estudando as bactérias em meio sólido de cultura, utilizando fotos digitais das mesmas e explorando suas características cromáticas baseado em um processo de formação das cores a partir das cores primárias, valendo-se de transformações matemáticas e mudanças de sistemas de representação de cores para criar um padrão de identificação fenotípica em regiões delimitadas em um diagrama de cromaticidade.

Este trabalho está dividido em três capítulos, sendo que o primeiro apresenta uma breve introdução sobre a importância das bactérias para o ambiente, justificando a necessidade de estudá-las continuamente e de desenvolver novas técnicas que aprimorem as aplicações das mesmas no exercício de funções ambientais na agricultura e biorremediação. O segundo capítulo é constituído do artigo científico intitulado *Espectroscopia óptica de absorção aplicada à identificação de bactérias*, apresentado como qualificação neste programa de mestrado. O mesmo trata-se de um estudo que revisa as principais técnicas de espectroscopia aplicadas na identificação de micro-organismos e tem como proposta uma metodologia de desenvolvimento de uma ferramenta que permita processos de identificação, caracterização e quantificação de bactérias utilizando espectroscopia de absorção na região visível do espectro eletromagnético. Já o capítulo três, refere-se ao artigo científico intitulado *Metodologia de aplicação e manipulação de cores primárias na identificação de bactérias*. Este, propõe uma metodologia inovadora que utiliza conceitos de formação e manipulação das cores primárias do espectro, aplicados à identificação de bactérias relacionando as cores captadas das colônias com a região que elas ocupam em um diagrama de cromaticidade.

2. Artigo 1

ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE ABSORÇÃO APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

2.1 RESUMO

Com o aumento da preocupação com questões ambientais, muitas funções que podem ser exercidas por bactérias são estudadas com o intuito de amenizar problemas de poluição e degradação do ambiente (biorremediação), além de melhorar a qualidade da agricultura. Regiões litorâneas são comumente contaminadas em decorrência dos processos de exploração do petróleo. Muitos estudos sugerem a aplicação de bactérias nessas áreas, como estratégia de descontaminação, uma vez que algumas apresentam propriedades de degradação de componentes do petróleo. Este artigo descreve algumas técnicas de espectroscopia que mostram ser possível a identificação e a quantificação destas bactérias. Contudo, não foi possível identificar as bactérias por este modelo, sendo possível apenas o processo de quantificação.

Palavras chave: Identificação de Bactérias. Espectroscopia. Padrão de Concentração.

2.2 ABSTRACT

With the increase in the concern about environmental issues, many functions that can be performed by bacteria are studied not only to mitigate pollution problems and degradation of the environment (bioremediation), but also to improve the quality of agriculture. Coastal regions have been commonly contaminated due to processes of oil exploration. Many studies suggest the application of bacteria into these areas as a strategy of decontamination since some of them present properties of degradation of oil components. This article describes some techniques of spectroscopy which show to be possible the identification and the quantification of these bacteria. Though, it was not possible to identify the bacteria by this model, being only possible the quantification process.

Key-words: Identification of Bacteria. Spectroscopy. Standard Concentration.

2.3 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a preocupação com a preservação do meio ambiente aumentou consideravelmente e, juntamente com esta sensibilização da população e da comunidade científica, o interesse na utilização de novas técnicas de conservação também aumentou expressivamente, principalmente no emprego de micro-organismos na agricultura e na biorremediação de áreas degradadas (PALLERONI *et al.*, 1973).

O uso de bactérias na agricultura visa reduzir a aplicação de agrotóxicos e produtos químicos no controle de pragas, além do melhoramento dos vegetais no que diz respeito à sua estrutura e resistência física (AZEVEDO; ARAUJO; MACCHERONI, 2000). Já a biorremediação, visa o tratamento de áreas contaminadas utilizando propriedades naturais de micro-organismos que podem degradar substâncias tóxicamente perigosas transformando-as em substâncias não tóxicas ou menos agressivas ao ambiente (RIBEIRO, 1993).

Para trabalhar com micro-organismos, além de estudá-los minuciosamente para saber de suas propriedades e de seus possíveis benefícios, torna-se necessário, em um primeiro momento, identificá-los, e este procedimento nem sempre é conseguido por processos simples. Nos últimos anos, técnicas moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase, PCR e sequenciamento de DNA vêm sendo bastante usadas em processos de identificação e caracterização de micro-organismos (REIS JUNIOR *et al.*, 1998). Essas tecnologias permitem identificar espécies de bactérias e até mesmo diferenciar linhagens dentro de uma mesma espécie. Contudo, o alto custo de tais técnicas e o tempo demandado para análise são fatores que dificultam a acessibilidade e o emprego das mesmas em muitos casos. Desta forma, evidencia-se então, a necessidade de se desenvolver novas técnicas para atuar na identificação de micro-organismos de forma mais rápida e barata que as técnicas convencionais, e que ao mesmo tempo mantenha um nível de eficácia satisfatório.

O espectro eletromagnético é o conjunto de ondas eletromagnéticas que foi dividido em diversas regiões de acordo com a frequência que compõe cada faixa desse espectro. A **Figura 1** representa o espectro eletromagnético assim como a denominação de cada faixa de radiação destacando a região do visível.

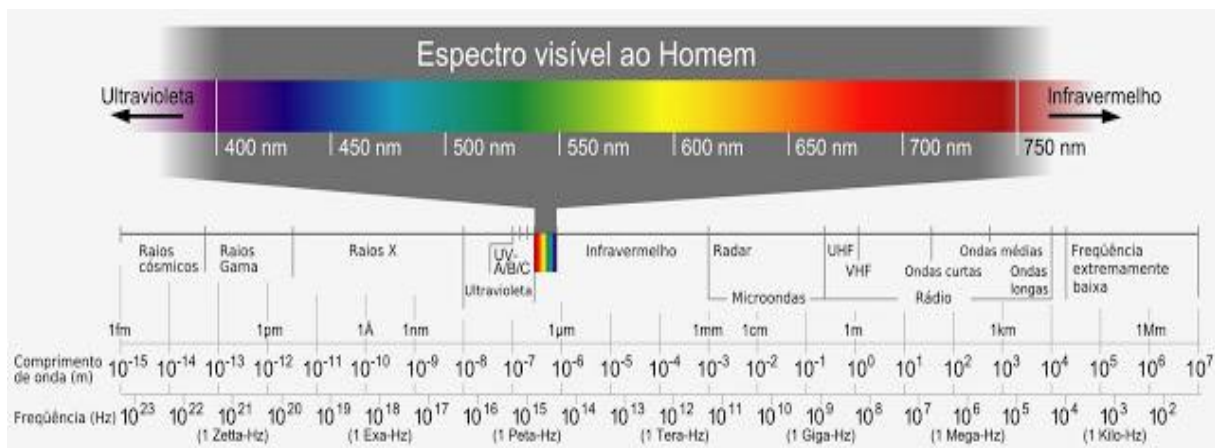


Figura 1: Representação do espectro eletromagnético com destaque para a região do visível¹.

Durante os trabalhos rotineiros de coleta de micro-organismos realizados pela equipe do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM), na restinga de Massambaba localizada em Arraial do Cabo/RJ, algumas colônias de bactérias isoladas chamaram a atenção por apresentarem colorações bastante definidas. Este fato alerta para a possibilidade de análise e identificação dessas bactérias por espectroscopia óptica de absorção na região do visível.

A Figura 2 mostra fotografias tiradas no LEMAM das colônias de bactérias em meio sólido.

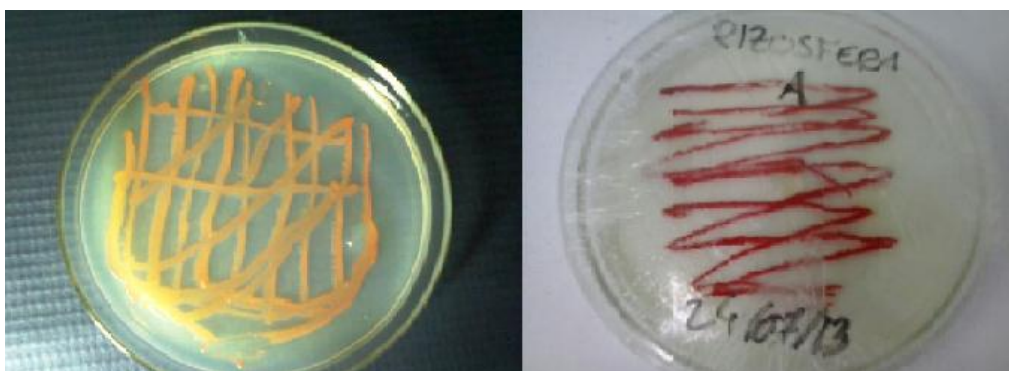


Figura 2: Colônias de bactérias distintas em meio sólido de cultura.

O termo visível refere-se à identificação das cores pelo olho humano, que possui uma sensibilidade diferente de outros animais e principalmente de equipamentos que são sensíveis a outros comprimentos de onda do espectro eletromagnético como, por exemplo, uma câmera

¹ Fonte: pion.sbfisica.org.br

de visão noturna que capta radiação no infravermelho, frequência que não é visível para o olho humano (COOPER, 1977).

As cores ocorrem nas substâncias devido ao processo de absorção e emissão de ondas eletromagnéticas em certos comprimentos de onda. As cores que enxergamos são, na verdade, as cores que a matéria não absorveu. Sendo assim a cor de uma substância é determinada pela luz que ela emite ou reflete, e não pela luz que ela absorve. Quando percebemos um corpo na cor azul, isto se deve ao fato deste corpo ter absorvido todos os comprimentos de onda nas faixas do amarelo e do vermelho, permitindo apenas a passagem ou a reflexão do azul, que é detectado pelo olho humano. A Tabela 1 mostra a relação das cores transmitidas e absorvidas por um corpo mediante a incidência de luz branca, os comprimentos de onda apresentados na tabela referem-se às cores transmitidas.

Tabela 1: Relação entre as cores e os comprimentos de onda da luz²

(nm)	cor transmitida	cor absorvida
400 – 435	violeta	verde-amarelado
435 – 480	azul	Amarelo
480 – 490	azul esverdeado	Laranja
490 – 500	verde azulado	Vermelho
500 – 560	verde	roxo (púrpura)
560 – 580	verde amarelado	Violeta
580 – 595	amarelo	Azul
595 – 610	laranja	azul esverdeado
610 – 750	vermelho	verde azulado

A luz é uma radiação eletromagnética e como qualquer onda eletromagnética ela é capaz de transportar energia sem necessitar de um meio material, se sustentando em suas propriedades elétricas e magnéticas, possuindo ao mesmo tempo características de onda e de partícula (GONÇALVES, 1996).

Espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria e a espectroscopia óptica estuda, especificamente, a interação da luz com a matéria. A maioria dos estudos espectroscópicos analisa os níveis de energia de átomos e moléculas, pois estes possuem a capacidade de absorver, transmitir e emitir quantidades de energias específicas quando interagem com a radiação eletromagnética, o que permite atribuir a cada material um

² Fonte: Cooper, T.G. (1977).

espectro único e exclusivo, fornecendo uma identidade a cada composto estudado (BALL, 2001).

Ao incidir sobre a matéria, a luz pode ser absorvida por seus átomos ou moléculas e estes podem ser excitados a maiores níveis energéticos. Para que este fenômeno ocorra, é necessário que a energia da onda eletromagnética, que depende do seu comprimento de onda ou de sua frequência, coincida com os níveis de energia dessas partículas. Este é um dos processos que ocorrem na interação da radiação com a matéria e é chamado de absorção. O processo de emissão ocorre quando as moléculas excitadas com alta energia pela radiação retornam a níveis mais baixos. Quando a radiação eletromagnética sofre desvios variados ao passar pelo material o processo em questão é denominado espalhamento. (SINGH *et al.*, 2006).

Técnicas de espectroscopia são amplamente usadas em experimentos de identificação de micro-organismos e compostos orgânicos, no entanto, poucos registros apresentam métodos de espectroscopia óptica na região do visível utilizada na identificação de micro-organismos vivos, mais especificamente no estudo de bactérias.

2.4 APLICAÇÕES NA AGRICULTURA E BIORREMEDIAÇÃO

Bactérias são micro-organismos unicelulares procariontes, sendo células mais simples, pois não possuem núcleo nem organelas membranosas no citoplasma, podendo ser encontradas em todos os ecossistemas da Terra na forma isolada ou em colônias e pertencem ao Reino Monera. São seres microscópicos com ordem de grandeza na faixa de micrometros ($1\mu\text{m} = 0,000001\text{ m}$) com variadas formas e funções (PELCZAR *et al.*, 1996). Na natureza, as bactérias se encontram em vários tipos de habitat, até mesmo nos locais mais inóspitos do planeta, onde não se encontram outras formas de vida. Elas possuem funções até mesmo no interior de outros seres vivos, como por exemplo, as bactérias que povoam a flora intestinal dos seres humanos.

Quanto à alimentação, as bactérias são classificadas em autotróficas, que são aquelas que possuem a capacidade de produzir o próprio alimento, e heterotróficas, caracterizadas por se alimentarem de substâncias produzidas por outros seres vivos, que por sua vez podem ser saprofágicas (atuam na decomposição) ou parasitas (normalmente causam doenças) (PELCZAR *et al.*, 1996).

As bactérias podem ainda ser caracterizadas quanto ao processo biológico de obtenção de energia em: aeróbicas e anaeróbicas. Dentre as funções exercidas pelas bactérias no meio ambiente, podem-se destacar várias, como na saúde, indústria de alimentos e farmacêutica, ecologia, agricultura e biorremediação. Na agricultura, as bactérias apresentam importantes funções que conferem proteção às plantas auxiliando na eliminação de pragas e na descontaminação do solo por pesticidas ou agrotóxicos, apresentando ainda outras importantes propriedades, como conferir maior resistência às plantas alterando suas propriedades fisiológicas e produzindo hormônios vegetais e outros compostos (AZEVEDO; ARAUJO; MACCHERONI, 2000). Uma grande mudança na agricultura, no âmbito da economia, aconteceu devido ao emprego de bactérias fixadoras de nitrogênio. Estas utilizam o nitrogênio presente na atmosfera, contribuindo para o crescimento e qualidade de várias espécies de vegetais (DOBEREINER *et al.*, 1970).

Considerando a importância das várias funções exercidas por bactérias no meio ambiente, as bactérias do solo, em especial as espécies do gênero *Pseudomonas*, são de extrema importância para a biorremediação e agricultura, por sua grande versatilidade nutricional e pela capacidade de proliferar em uma enorme gama de ecossistemas (PALLERONI *et al.*, 1973). As espécies *P. fluorescens* e *P. putida*, por exemplo, destacam-se por não serem patogênicas, além dos efeitos benéficos produzidos em plantas auxiliando no crescimento das mesmas e por agirem efetivamente na degradação do tolueno. (JI *et al.*, 2006).

Biorremediação é um processo de tratamento de solos ou ambientes contaminados através de micro-organismos que degradam ou transformam as substâncias contaminantes, de forma que estas deixem de oferecer ou diminuam os riscos ao meio ambiente e aos seres que o habitam (RIBEIRO, 1993). No caso de regiões contaminadas por resíduos do petróleo, a tecnologia de biorremediação é um método de restauração. Neste caso utiliza-se bactérias com a capacidade de biodegradar ou biotransformar substâncias como hidrocarbonetos do petróleo. A biodegradação ou biotransformação destes compostos é feita por grupos de micro-organismos vivos, cada qual exercendo sua função de maneira ordenada e sequencial, garantindo êxito no processo, que é um dos principais métodos de recuperação de ecossistemas contaminados (RIBEIRO, 1993).

Os micro-organismos são eficientes na biodegradação devido à abundância e diversidade de espécies, assim como a grande capacidade de adaptação às condições adversas dos ecossistemas. De fato, as populações de micro-organismos que degradam hidrocarbonetos do petróleo constituem menos que 1% da comunidade total de micróbios presentes no

ambiente, porém, em regiões contaminadas por hidrocarbonetos, esta quantidade aumenta para 10% da comunidade total (ALVES, 1998). No entanto, existe uma grande preocupação com possibilidades maléficas da utilização de micro-organismos, uma vez que a aplicação destes podem causar transformações imprevistas no ambiente, assim como desequilíbrio ecológico por seres estranhos ao meio.

2.5 TIPOS DE ESPECTROSCOPIA

Existem vários tipos e técnicas de espectroscopia e cada uma delas apresenta propriedades compatíveis com aplicações e amostras específicas. Os processos espectroscópicos consistem basicamente em incidir feixes de ondas eletromagnéticas com frequências variáveis sobre uma amostra a ser analisada. Essa amostra irá absorver energia em apenas alguns comprimentos de onda específicos e será caracterizada a partir do espectro de absorção ou transmissão construído para ela (HAMMES, 2005).

Algumas técnicas de espectroscopia se aplicam de maneira mais eficiente em condutores, pois precisam de elétrons livres ou não ligantes na superfície da amostra a ser analisada. A espectroscopia de absorção é uma técnica na qual compara-se a energia de um feixe de luz antes e depois da interação com uma amostra. A espectroscopia de fluorescência usa fótons de maior energia para excitar uma amostra, que depois emitem fótons de energia mais baixa (HOLLAS, 2004).

Outra técnica consiste em medir a relação entre a massa e a carga da molécula. Sendo assim, é necessário uma fonte de ionização ou emissor de ondas eletromagnéticas, um analisador ou separador de massas para discretizar os íons, um detector de íons e um programa para processar e representar graficamente os dados obtidos. Este processo diz respeito especificamente à espectroscopia de massa. É um método muito empregado para fins de identificação de micro-organismos, utilizando como fonte de radiação o laser (light amplification stimulated energy radiation). Como exemplo, tem-se o espectrômetro MALDI-TOF onde MALDI (Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization) faz referência ao uso de laser para dessorção e ionização utilizando um ácido orgânico como matriz e TOF (*Time of Flight*), é o tempo de voo da amostra ionizada até atingir o detector. Utiliza-se como método de análise a Transformada de Fourier, aplicada na função obtida. Este procedimento se dá com a amostra no estado gasoso (HOLLAS, 2004).

Teoricamente, a espectroscopia pode ser realizada por ondas eletromagnéticas de quaisquer comprimentos de onda e frequência, porém, deve-se atentar para o tipo de substância estudada. No estudo de micro-organismos, por exemplo, a escolha de um tipo equivocado de espectroscopia pode provocar alterações irreversíveis nas moléculas ou, em alguns casos, destruí-la, o que prejudicaria ou até mesmo impossibilitaria o estudo das mesmas. Técnicas que exigem que a substância analisada esteja no estado gasoso podem oferecer mais uma dificuldade no caso da análise de micro-organismos, uma vez que os resultados obtidos são dados em função das moléculas que constituem este indivíduo e não do mesmo em seu estado íntegro (HAMMES, 2005).

Ao interagir com a matéria, a radiação eletromagnética produz fenômenos ópticos como reflexão, refração, difração, dispersão, polarização, absorção e emissão. Estas interações dependem do comprimento de onda da radiação incidente na amostra (GONÇALVES, 1996).

As transições eletrônicas são situadas normalmente na região do ultravioleta ou visível e as transições vibracionais ocorrem na região do infravermelho (BALL, 2001). A Tabela 2 mostra algumas transições causadas pela interação da onda com a matéria. A transição que ocorre na região do visível é foco do presente estudo.

Tabela 2: Espectro eletromagnético e suas interações³

Radiação	Limites aproximados do comprimento de onda	Interações com a matéria
Raios γ	$\lambda < 1 \text{ \AA}$	Transições nucleares
Raios X	$1 \text{ \AA} < \lambda < 10 \text{ \AA}$ (1nm)	Transições eletrônicas da camada interna
Ultravioleta de vácuo	$1 \text{ nm} < \lambda < 200 \text{ nm}$	Transições eletrônicas da camada externa
Ultravioleta próximo	$200 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$	
Visível	$400 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$	
Infravermelho próximo	$800 \text{ nm} < \lambda < 2,5 \text{ }\mu\text{m}$	Vibrações moleculares
Infravermelho fundamental	$2,5 \text{ }\mu\text{m} < \lambda < 25 \text{ }\mu\text{m}$	
Infravermelho distante	$25 \text{ }\mu\text{m} < \lambda < 400 \text{ }\mu\text{m}$	Rotações moleculares
Microondas – radar	$400 \text{ }\mu\text{m} < \lambda < 25 \text{ cm}$	
Ondas de rádio	$\lambda < 25 \text{ cm}$	Orientações do spin

As interações mais estudadas nesse tipo de espectroscopia são a absorção e a emissão. No processo de absorção o elétron transita para um nível mais energético referente aos orbitais que podem ser ocupados por ele. Quando o elétron retorna a um nível inferior, ele

³ A tabela 2 e a figura 3 foram obtidas em: GONÇALVES, M. L. S. S., 1996.

libera essa energia e este processo é denominado emissão. Essas transições estão representadas na Figura 3.



Figura 3: Transições de um elétron durante os processos de absorção e emissão.

Os tipos de espectroscopia mais usados no estudo de micro-organismos estão na região do infravermelho, no entanto, a técnica proposta neste trabalho aborda a faixa do visível. Por este motivo estes métodos serão abordados de forma mais detalhada a seguir.

2.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IR)

A espectroscopia vibracional no infravermelho é bastante utilizada no estudo de moléculas orgânicas. É uma técnica eficiente que permite identificar e caracterizar estruturas moleculares (RIDDLE *et al.*, 1956) através da interação da radiação infravermelha com a matéria (HAMMES; NETLIBRARY, 2005). Muitas áreas adotam esta tecnologia como ferramenta para estudos analíticos, superando os métodos tradicionais em vários casos, principalmente por sua rapidez e simplicidade na manipulação das amostras e do equipamento (BLANCO; VILLARROYA, 2002). Outra característica desse método é que ele não é invasivo e se baseia no estudo das vibrações de moléculas após serem excitadas por uma radiação na faixa do infravermelho (CORDELLA *et al.*, 2002). Atualmente, esta é uma das técnicas analíticas de espectroscopia mais vantajosa por, supostamente, poder analisar a amostra em qualquer estado físico (STUART, 2004).

O espectro de uma amostra realizado no infravermelho fornece identidade específica à uma substância química ou biológica, uma vez que ao se obter espectros iguais para mais de uma substância, há uma grande probabilidade de que estas representem o mesmo composto (CORDELLA *et al.*, 2002).

Os dados obtidos através da espectroscopia de infravermelho não são simples de serem analisados e, para tanto, torna-se necessário recorrer à análises químicas e biológicas para auxiliar na interpretação dos dados, de forma a relacionar as propriedades dos materiais estudados com os espectros obtidos através deles (BRERETON, 2003).

Esta técnica de espectroscopia pode ser utilizada com diversas finalidades, mas observa-se amplamente sua aplicação na identificação de micro-organismos e compostos químicos atuantes na agricultura, seja pra melhorar a produção ou avaliar a qualidade dos produtos (DELWICHE; MASSIE, 1996; HANS, 2003; MIRALBES, 2004; ARGYRIA *et al.*, 2010). Em relação à sua aplicação em micro-organismos, esta técnica é usada principalmente para identificação de organismos unicelulares, bactérias e leveduras (HELM *et al.*, 1991; SANDT *et al.*, 2003; ERUKHIMOVITCH *et al.*, 2005; KUHM *et al.*, 2009).

2.7 ESPECTROSCOPIA NO VISÍVEL (VIS)

Métodos experimentais de espectroscopia são mais acessíveis no visível, região do espectro eletromagnético em que o olho pode ser usado como detector. Em 1665 Newton tinha começado seus famosos experimentos sobre a dispersão da luz branca em uma gama de cores utilizando um prisma de vidro triangular. No entanto, foi em cerca de 1860 que os alemães Bunsen e Gustav Kirchhoff desenvolveram o primeiro espectrômetro, onde a luz proveniente de uma fonte passava por um prisma antes de atingir uma amostra e ser projetada em uma tela (HOLLAS, 2004). Observando uma variedade de amostras pelo espectrômetro, Bunsen e Kirchhoff conseguiram observar características diferentes em seus padrões espectrais de acordo com o comprimento de onda da radiação incidente. Eles conseguiram detectar vários elementos através da espectroscopia na região do visível como o céσιο e o rubídio. Posteriormente Jansen e depois Ramsey detectaram espectroscopicamente o hélio, sendo que o primeiro o detectou no Sol e o segundo na Terra (MISTRY, 2009).

A técnica de espectroscopia na região do visível é classificada como uma das técnicas de espectroscopia eletrônica (LAMBERT *et al.*, 1998). Ela tem por base a absorção de luz visível pela amostra e a energia dessa radiação provoca excitação dos elétrons da mesma para orbitais de maiores energias. Para que ocorra a excitação do elétron, ou seja, para que ele passe do seu estado fundamental para um estado excitado, de acordo com a teoria de Bohr, é necessário que a energia da onda eletromagnética coincida com a diferença de energia entre

os níveis orbitais ocupados pelo elétron, de forma a fornecer um fóton exatamente com a mesma energia permitindo a transição eletrônica. Essa energia pode ser obtida diretamente pela frequência ν ou pelo comprimento de onda λ da radiação incidente, de acordo com a relação mostrada na equação 01.

$$E = h\nu = (hc)/\lambda \quad (\text{equação 01})$$

Onde:

c = velocidade da luz no vácuo

h = constante de Planck

ν = frequência da onda incidente na amostra

λ = comprimento de onda da onda incidente

A Figura 4 mostra o esquema de um espectrômetro de absorção em que um feixe de luz branca sofre dispersão através de um prisma e em seguida define-se um comprimento de onda específico para incidir na amostra.

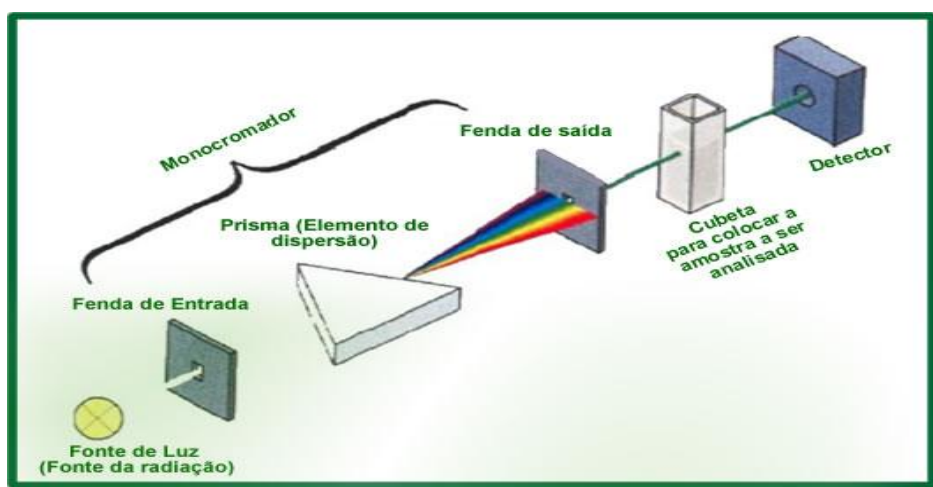


Figura 4: Esquema estrutural e funcional de um Espectrômetro de absorção na região do visível⁴.

Após a incidência do feixe sobre a amostra, analisa-se a luz recebida no detector. Se houver o processo de transição eletrônica nas moléculas da amostra, parte da energia da onda incidente será absorvida, como mostrado na figura 5 e assim é possível saber detalhes dos compostos analisados, estabelecendo padrões de absorbância específicos para cada amostra analisada.

⁴ As figuras 4 e 5 foram extraídas do sítio: <http://quimicandovp.wordpress.com>

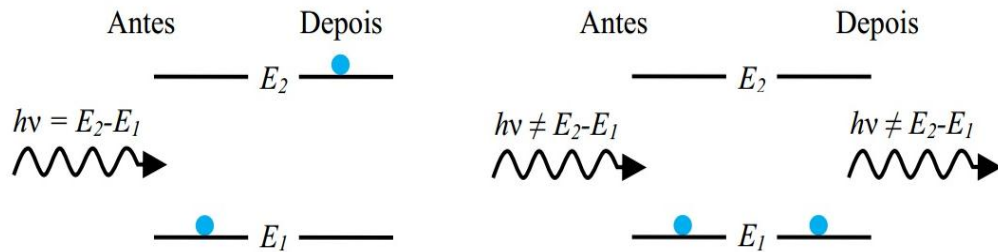


Figura 5: Transição de nível eletrônico relacionado à energia absorvida pelo átomo.

2.8 LEI DE LAMBERT-BEER

A luz incidente em uma amostra interage com a matéria sofrendo fenômenos ópticos de absorção, emissão, reflexão, transmissão e espalhamento. Sendo assim, podemos representar esta relação matematicamente da seguinte forma:

$$I_o = I_r + I_e + I_a + I_t \quad (\text{equação 02})$$

Onde:

I_o = Intensidade do feixe incidente

I_r = Intensidade do feixe refletido

I_e = Intensidade do feixe espalhado

I_a = Intensidade do feixe absorvido pelo meio

I_t = Intensidade do feixe transmitido

Os efeitos de reflexão e espalhamento podem ser minimizados experimentalmente. Os efeitos da reflexão podem ser minimizados no momento do experimento, tomando como referência para calibrar o aparelho uma cubeta contendo todos os elementos da solução estudada, exceto o elemento absorvedor (HOLLAS, 20004). Já os efeitos de espalhamento podem ser atenuados utilizando-se soluções homogêneas e transparentes. Assim, a equação 02 se reduz a:

$$I_o = I_a + I_t \quad (\text{equação 03})$$

A Lei de Lambert-Beer relaciona a intensidade da luz transmitida, a intensidade da luz incidente, a distância percorrida pela luz dentro da amostra e o coeficiente de absorção da substância.

$$I_t = I_o e^{-kd} \quad (\text{equação 04})$$

Onde:

k = coeficiente de absorção linear

d = distância percorrida pela luz dentro da amostra (largura da cubeta)

Convertendo e^k em 10^a , tem-se a seguinte equação:

$$I_t = I_o 10^{-ad} \quad (\text{equação 05})$$

Estudando a transmissão de luz em concentrações variadas de soluções coloridas, Beer chegou à conclusão que α é proporcional à concentração da solução. Assim:

$$\alpha = a \cdot c \quad (\text{equação 06})$$

Onde:

c = concentração do elemento absorvedor

a = absortividade, constante independente da concentração

Combinando as equações 05 e 06 obtém-se a relação seguinte, mais conhecida como Lei de Lambert-Beer:

$$I_t = I_o 10^{-acd} \quad (\text{equação 07})$$

A absorbância de uma amostra é medida experimentalmente e pode ser calculada pelo logaritmo da razão entre as intensidades das radiações incidente e transmitida, de acordo com a seguinte equação:

$$A = \log (I_t/I_o) \quad (\text{equação 08})$$

Onde:

A = absorvância

Assim:

$$A = acd$$

(equação 09)

Pode-se então determinar a concentração da solução e, conseqüentemente a quantidade de bactérias presentes na mesma pela equação 09. Nesta, pode-se perceber claramente que a relação entre a absorvância e a concentração é linear, no entanto, essa relação é válida apenas para baixas concentrações e caminhos ópticos pequenos dentro da amostra (FOWLES, 2012). Essas dimensões serão determinadas experimentalmente para o presente caso.

A Figura 6 mostra a relação de linearidade entre a absorvância e a concentração da amostra.



Figura 6: Gráfico representativo dos limites da linearidade da Lei de Lambert-Beer⁵.

⁵ Fonte: Cooper, T.G. (1977).

2.9 A RELEVÂNCIA DO MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR ESPECTROSCOPIA

Considerando as importantes e essenciais funções exercidas por bactérias, torna-se necessário o desenvolvimento e o emprego de técnicas para identificá-las e caracterizá-las com o objetivo de promover diagnósticos e tratamentos de doenças, estudos ecológicos e desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

Existem vários tipos e processos utilizados na identificação de bactérias, dentre os quais se podem citar os que levam em conta a morfologia celular, que consideram dimensões, forma, estrutura, mobilidade e agrupamento; análise bioquímica; fisiológica e, a principal e mais eficiente, análise genética, que é realizada através do estudo da sequência de genes específicos de cada espécie.

Levando em consideração a diversidade desses micro-organismos, faz-se necessário a utilização de diferentes métodos, de acordo com o objetivo do estudo ou a necessidade específica de cada caso. A identificação de bactérias por espectroscopia é um método bastante utilizado que permite uma primeira análise de culturas de bactérias com rapidez e baixo custo.

Os micro-organismos são analisados por meio do espectro de suas moléculas de DNA, RNA, proteínas, carboidratos, lipídios entre outras. Sendo assim, são obtidos espectros diferentes para cada tipo de amostra, pois estas apresentam combinações e quantidades específicas de moléculas em suas composições. A espectroscopia irá apresentar a composição química, e a partir daí pode-se identificar os micro-organismos.

As bactérias coletadas na restinga de Massambaba apresentam colorações bastante definidas e por este motivo será utilizada a espectroscopia óptica de absorção na tentativa de se observar variações consideráveis de absorbância e determinar um padrão específico para cada tipo de bactéria nessa faixa do espectro eletromagnético.

As bactérias seriam estudadas através de experimentos físicos – espectroscopia - e biológicos – cultivo das mesmas - com o objetivo de identificá-las, uma vez que estas podem possuir propriedades interessantes para o meio ambiente, como a aplicação na agricultura e na biorremediação, como frisado anteriormente.

As propriedades físicas e químicas das moléculas, assim como suas interações com o meio biológico que estão sujeitas, são determinadas por suas estruturas moleculares (SALA, 2008). Teoricamente, todas as moléculas, em qualquer estado físico podem ser estudadas por espectroscopia (HAMMES; NETLIBRARY, 2005).

Uma das propostas deste trabalho é mostrar a aplicação dos métodos de identificação e caracterização de micro-organismos que podem atuar na biorremediação de áreas contaminadas ou poluídas, seja pela ação do homem ou mesmo por alterações naturais e prejudiciais ao meio ambiente, ocorridas nas regiões litorâneas onde predominam as vegetações de restinga como pântanos, manguezais, brejos e áreas ribeirinhas, também chamadas de vegetação com influência marinha (VELOSO; RANGEL; LIMA, 1991). A rizosfera, que é a área ao redor das raízes, encontra-se sob influência imediata do sistema radicular. Ela é rica em nutrientes e, por este motivo, apresenta alta intensidade de atividade de micro-organismos (DOBBELAERE *et al.*, 2003). O Estado do Rio de Janeiro, por possuir um extenso litoral, apresenta, de forma predominante, a vegetação de restinga. Este tipo de vegetação está exemplificado em várias e grandes áreas como nas planícies de Macaé e Carapebus, nas dunas em Massambaba ou em braços de terra que avançam mar adentro como em Marambaia (ARAUJO; MACIEL, 1998). Torna-se, então, interessante o estudo da Microbiologia nessas regiões com a finalidade de promover o desenvolvimento regional, aplicando as técnicas de identificação e caracterização de micro-organismos por espectroscopia em amostras de solos, raízes ou águas litorâneas que sofrem influência direta ou indireta da ação destes micróbios.

O desenvolvimento da técnica de espectroscopia óptica na região do visível relacionada a micro-organismos abre um campo de estudos para aplicação em outras áreas. A região dos lagos, por exemplo, apresenta uma necessidade de manter o controle da qualidade de suas águas, pois estas são bastante exploradas em atividades relacionadas ao consumo humano, animal, agricultura, pesca, atividades de lazer e turismo. Este controle poderá futuramente ser obtido através de biorremediação com o auxílio da técnica de espectroscopia óptica. Desta forma, tem-se como objetivo principal deste estudo apresentar a técnica de espectroscopia óptica na identificação de micro-organismos, principalmente bactérias do solo com a finalidade de produzir tratamento, melhoria e desenvolvimento das condições ambientais atuais. Esta técnica permite criar um padrão espectrofotométrico para identificação e caracterização das bactérias, além da quantificação de sua concentração em uma amostra. Assim será criado um banco de dados referente às principais bactérias estudadas, caracterizando-as de acordo com suas estruturas, habitat e função desempenhada no meio para auxiliar em estudos futuros sobre o tema.

2.10 METODOLOGIA

A metodologia apresentada a seguir refere-se a um experimento realizado no laboratório LEMAM do Instituto Federal Fluminense, campus Cabo Frio, com a finalidade de analisar bactérias encontradas na restinga da região.

As bactérias estudadas foram coletadas na restinga de Massambaba no município de Arraial do Cabo/RJ. Todos os trabalhos que vão desde a coleta das bactérias até o cultivo e preparação das mesmas para os experimentos espectrofotométricos foram realizados pela equipe do LEMAM. Sendo assim, foram utilizados os materiais necessários para cultura de bactérias, vidrarias necessárias para armazenamento das colônias, centrífuga, aparelhos de esterilização, estufa e geladeira, além de microscópio e Câmara de Neubauer para contagem das bactérias. Já os experimentos espectrofotométricos foram realizados no laboratório de Física do IFF Campus Cabo Frio e para tanto serão utilizados um espectrofotômetro e um computador para processamento e análise dos dados obtidos.

Os métodos de coleta das bactérias não serão tratados aqui. Os procedimentos biológicos serão abordados resumidamente e apresentados apenas os protocolos dos meios de cultivo e armazenamento, uma vez que o foco do trabalho está no experimento de espectroscopia, após serem coletadas as bactérias foram cultivadas em meio sólido (Meio sólido: 1 litro de LB preparado; 20 gramas de ágar; colocar no agitador até homogeneizar completamente; autoclavar por 20 minutos a uma temperatura de 120 °C e uma pressão de 1 atm; armazenar na geladeira a uma temperatura de 4 °C. Meio líquido: 1 litro de água destilada; 25 gramas de LB; colocar no agitador até homogeneizar completamente; verificar o pH (ideal 7 ± 2); autoclavar por 20 minutos a uma temperatura de 120 °C e uma pressão de 1 atm; armazenar na geladeira a uma temperatura de 4 °C). Após crescimento, as bactérias foram separadas por espécie de acordo com suas características perceptíveis visualmente e colocadas novamente para crescer, permanecendo em meio sólido e armazenadas à baixas temperaturas para retardar seu crescimento. Como para realizar o experimento de espectroscopia, é necessário que as bactérias estejam em meio líquido, foi preparada uma solução de meio de cultura para que as bactérias passem a crescer em meio líquido. Após 24 horas na estufa, essa solução (meio de cultura e bactérias) foi centrifugada, produzindo um precipitado de bactérias bastante concentrado no fundo do recipiente que as contém, como mostrado na Figura 7.



Figura 7: Solução com precipitado de bactérias após passar por processo de centrifugação.

Essas bactérias foram resuspensas em solução salina 0,9% (9g de NaCl; avolumar para 1L com água destilada; homogeneizar; autoclavar) e uma alíquota foi retirada para fazer a contagem na Câmara de Neubauer e determinar a concentração da solução. A solução foi então levada para o espectrofotômetro para ser analisada.

O método utilizado para análise das amostras pela espectroscopia é relativamente simples e, conseqüentemente, não exige muita complexidade no que diz respeito aos aparelhos utilizados. O aparelho utilizado é o espectrofotômetro, um espectrômetro de absorção, que trabalha basicamente na região do visível (Vis), do infravermelho (IR) ao ultravioleta (UV), disponível no IFF- Campus Cabo Frio. Primeiramente é necessário ter uma referência para a absorbância do meio que abriga as bactérias. Faz-se então uma medida dessa grandeza utilizando-se apenas a solução salina 0,9% e o aparelho é “zerado” para este valor de absorbância, tendo este valor como referência para fazer a medida com a solução contendo as bactérias. Desta forma, o valor medido é a diferença entre a solução contendo as bactérias e a solução pura, o que fornece exatamente a absorbância das bactérias. Este procedimento será repetido em intervalos regulares do espectro na região do visível de forma que essa faixa seja toda varrida para que se possa determinar exatamente os picos de absorbância para cada tipo de bactéria, de forma que elas sejam associadas à seus gráficos espectrais e assim seja possível identificá-las. Após a fase de identificação será realizada uma segunda fase que consiste em variar a concentração de uma mesma bactéria na solução salina 0,9% e observar a diferença nos picos dos gráficos de absorbância apresentados por elas. Dessa forma, teremos

gráficos diferentes para uma mesma espécie de bactéria, de acordo com a concentração desta no meio. Relacionando os gráficos obtidos com as concentrações conhecidas, pela contagem na Câmara de Neubauer e confirmação pela Lei de Lambert-Beer, é possível estabelecer padrões quantitativos para cada espécie e, conhecendo-se o volume de uma solução contendo essas bactérias, determinar a quantidade de bactérias em uma amostra, de forma mais prática e rápida se comparada a outros métodos tradicionais.

2.11 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias analisadas foram denominadas, neste experimento, espécies 1 e 2. Em todos os testes a concentração inicial foi de 1×10^5 bactérias representada nos gráficos pela concentração [1,00] e a partir foram feitas diluições sucessivas dessas soluções. Ao realizar os processos de espectroscopia nas amostras, observou-se que os gráficos não apresentaram picos de absorbância bem definidos, impossibilitando a identificação das mesmas nessa faixa do espectro eletromagnético. A Figura 8 mostra a comparação entre duas espécies de bactérias. Nota-se que a diferença está apenas na escala de absorbância e não no formato da curva. No mesmo gráfico existe uma curva da espécie com maior absorbância, com a concentração sendo $\frac{1}{4}$ da primeira. Esta se aproxima consideravelmente da curva da outra espécie, mostrando que não existe diferença entre o gráfico de varredura das espécies e sim entre suas concentrações.

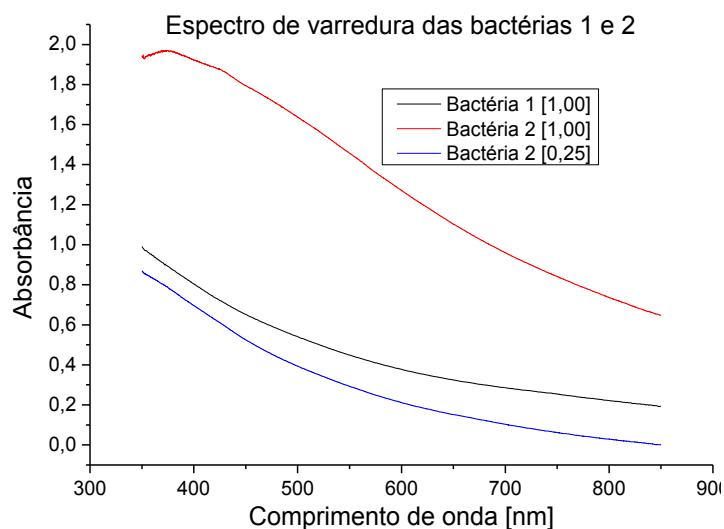


Figura 8: Gráfico representativo da comparação entre as espécies 1 e 2.

Para garantir a pertinência do resultado citado acima, construiu-se o gráfico normalizado das curvas anteriores, comprovando a proximidade das curvas e a impossibilidade de distinguir as espécies através das mesmas. Este gráfico está representado na Figura 9. Nele pode-se observar que os gráficos de mesma concentração de espécies distintas são praticamente coincidentes, o que pode ser atribuído ao fato de não apenas a quantidade de bactérias influenciar na absorbância, mas também o tamanho e formato dos indivíduos.

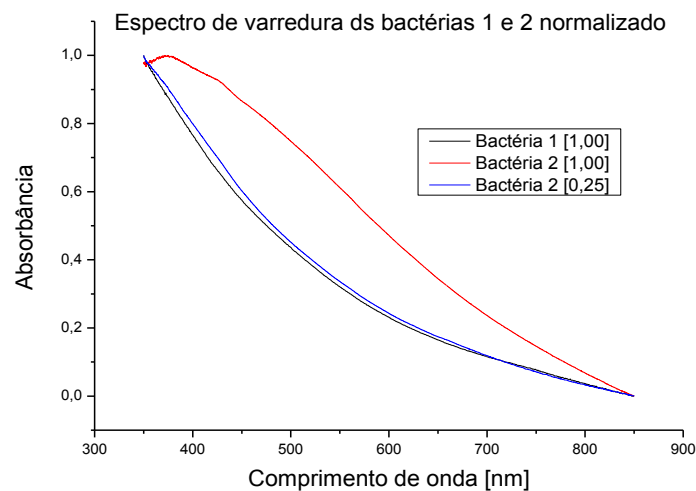


Figura 9: Gráfico representativo da comparação entre as espécies 1 e 2 normalizado.

As análises das amostras em soluções com concentrações distintas apresentaram resultados que permitiram diferenciar qualitativamente as concentrações de cada espécie. Como é sabido, a absorbância é proporcional à concentração da solução. A Figura 10 mostra as curvas de absorbância comparativa das concentrações.

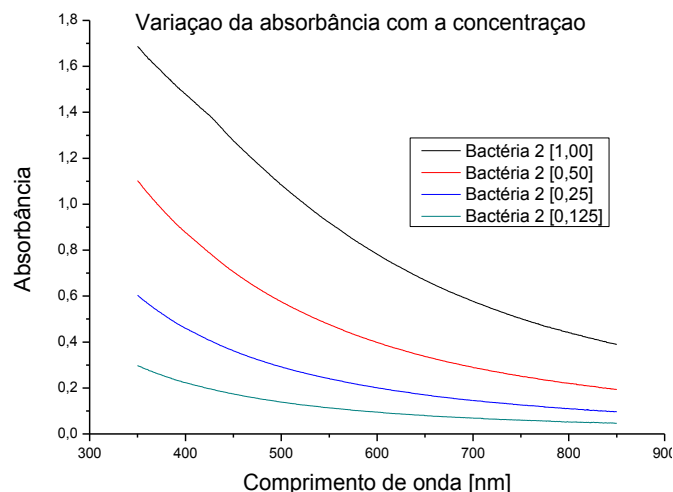


Figura 10: Gráfico comparativo de concentrações distintas dentro de uma mesma espécie.

Para comprovar a semelhança das curvas de uma mesma espécie, foram criadas as curvas normalizadas das concentrações, que evidenciam tal fato pela quase coincidência entre as curvas, mostradas na Figura 11.

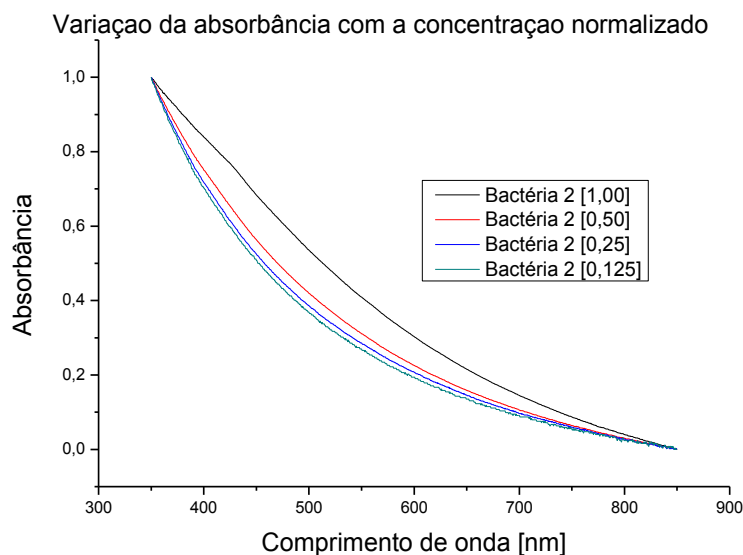


Figura 11: Gráfico comparativo normalizado de concentrações distintas dentro de uma mesma espécie.

A concentração inicial das soluções foram ajustadas para 1×10^5 , valendo-se da contagem feita na câmara de Neubauer. As variações dos pontos nas curvas correspondentes a comprimentos de ondas iguais obedecem a proporção de variação nas concentrações das amostras, como previsto e comprovado pela lei de Lambert-Beer. A concentração 1, fugiu da região de linearidade por estar com valor elevado.

2.12 CONCLUSÃO

A identificação e caracterização de bactérias por espectroscopia já ocupa uma posição de destaque na literatura especializada e se mostra muito eficiente para isto na região do infravermelho. Na região do visível, porém, os resultados não mostraram picos de absorbância bem definidos, impossibilitando a identificação das espécies por este processo. Contudo, esta técnica se mostrou bastante eficaz na finalidade de quantificação das bactérias, produzindo resultados que mostram a relação linear entre a absorbância da amostra e a concentração de bactérias contida na mesma. Os gráficos respondem à variação de concentrações de

indivíduos dentro de uma mesma espécie, no caso estudado: colônias de bactérias com a mesma cor. Essa variação de concentração pode ter ocorrido pela diluição da amostra ou pelo crescimento natural da população. Desta forma, pode-se associar os espectros com os valores das concentrações previamente determinados, uma vez que foi realizada uma contagem na Câmara de Neubauer e uma verificação pela Lei de Lambert-Beer da quantidade de bactérias e, assim, definir um padrão quantitativo para cada espécie estudada.

2.13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, D. S. D., MACIEL, N. C. Restingas fluminenses: biodiversidade e preservação. **Boletim FBCN**, v. 25, p. 27-51, 1998.

ARGYRIA, A. A. et al. Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. **Sensors and Actuators B: Chemical journal**, v.145, p. 146-154, 2010.

ALVES, S.B. **Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens**. Em Controle Microbiano de Insetos. ed. Alves, S.B, FEALQ, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L.; MACCHERONI JR, W. **Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos**. Em Controle Biológico, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L. Embrapa Meio ambiente, Vol. 3, 2000.

BALL, D.W. The basics of spectroscopy. **Spie press**, 2001.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**. John Wiley & Sons, 2003.

BLANCO, M.; VILLARROYA, I. N. I. R. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 240-250, 2002.

CORDELLA, C. et al. Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1751-1764, 2002.

COOPER, T.G. **The tools of Biochemistry**. Ed. Jonh W. and sons, N. York; adaptado Cristóvão, A. Espectroscopia de absorção. In: Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra, pg 1-7. 1977.

DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Amsterdam, v.22, n.2, 2003.

DELWICHE, S. R., MASSIE, D. R. Classification of wheat by visible and near-infrared reflectance from single kernels. **Cereal Chemistry**, v. 73, p. 399-405, 1996.

DOBEREINER, J., FRANCO, A.A., GUSMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, Vol.5, 1970.

ERUKHIMOVITCH, V. et al. FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 1105 - 1108, 2005.

FOWLES, Grant R. **Introduction to modern optics**. Courier Dover Publications, 2012.

GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções – análise quantitativa**. 2 ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, pp 1-10 e 17-19, 1996.

HAMMES, G. G., NETLIBRARY, I. **Spectroscopy for the biological sciences**. New York: Wiley Online Library, 2005.

HANS, B.P. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.82, p., 107-115, 2003.

HELM, D. et al. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared Spectroscopy. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 69-79, 1991.

HOLLAS. J. M., **Modern Spectroscopy**. Fourth Edition. Jonh Wiler & Sons, Ltd, 2004.

Jl, P. et al. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v.36, n.3, 2006.

KUHM, A.E. et al. Identification of *Yersinia enterocolitica* at the Species and Subspecies Levels by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5809-5813, 2009.

LAMBERT, J.B. et al. **Organic Structural Spectroscopy**. Prentice-Hall, New Jersey, USA, 226 – 239, 1998.

MIRALBES, C. Quality control in the milling industry using near-infrared transmittance spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 88, p. 621-628, 2004.

MISTRY, B.D. A Handbook of Spectroscopic Data. **Oxford Book Company**, 2009.

PALLERONI, N.J.et al. **Nucleic and homologies in the genus *Pseudomonas***. International Journal of Systematic Bacteriology, v.23, 1973.

PELCZAR, M.J.,CHAN ,E.C.S., KRIEG,N.R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996.

REIS JUNIOR, F. B. et al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. Disponível em: www.cpac.embrapa.br/download/278/t. Acesso em: 10 dez. 2012.

RIBEIRO, M. C. **Microbiologia prática: Roteiro e manual**. Editora Atheneu. Rio de Janeiro, 1993.

RIDDLE, J. W. et al. Bacterial identification by infrared spectrophotometry. **Journal of Bacteriology**, v. 72, n. 5, 1956.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no inflavermelho**. São Paulo: Unesp, 2008.

SANDT, C. et al. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 954-959, 2003.

SINGH, C. B. et al. Near-infrared spectroscopy: Applications in the grain industry. **The Canadian Society for Bioengineering**, n. 6-189, 2006.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. John Wiley & Sons, Ltd., Australia. 2004.

VELOSO, H.P., RANGEL Fo, A.L.R., LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, Rio de Janeiro. 1991.

3. Artigo 2

METODOLOGIA DE APLICAÇÃO E MANIPULAÇÃO DE CORES PRIMÁRIAS NA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

3.1 RESUMO

A luz é uma radiação eletromagnética que pode ser percebida visualmente através de cores quando esta interage com o meio. Alguns sistemas podem eliminar as características subjetivas de interpretação das cores, criando padrões de representação para as mesmas. Utilizando sistemas de representação de cores foi criada uma metodologia de identificação de bactérias baseada nas informações das cores apresentadas pelas colônias estudadas, em que as mesmas são representadas no cubo de cores RGB e no diagrama de cromaticidade. A identificação das bactérias se deu pela área que elas ocupam no diagrama, representada por uma região específica para cada espécie.

Palavras-chave: Identificação de Bactérias. Cores Primárias. Diagrama de Cromaticidade.

3.2 ABSTRACT

Light is electromagnetic radiation that may be perceived visually by color when it interacts with the environment. Some systems can eliminate the subjective interpretation of the characteristics of color, creating patterns of representation for that. Using color representation systems was created a methodology for identification of bacteria based on information from colors displayed by the colonies studied, in which they are represented in the RGB color cube and the chromaticity diagram. The identification of the bacteria is observed by the area they occupy in the diagram, represented by a specific region for each species.

Key-words: Identification of Bacteria. Primary Colors. Chromaticity Diagram.

3.3 INTRODUÇÃO

As cores podem ser percebidas de formas distintas por indivíduos diferentes. O termo cor é entendido como uma sensação captada pelo olho e conduzida até o cérebro através de impulsos nervosos. Assim como todos os sentidos, essa sensibilidade é subjetiva e apresenta variações entre os seres humanos (MEYER, 1998). De fato, a cor pode ser considerada uma dimensão adicional na identificação dos objetos, no entanto, ela não é uma propriedade que pertence aos materiais e sim um atributo perceptivo do indivíduo observador. As cores percebidas correspondem a uma resposta produzida no cérebro após a captação de luz do ambiente (BRINDLEY, 1953). Contudo, existem padrões que permitem definir uma cor independentemente das particularidades do observador. Através da colorimetria (ciência de medição de cores), é possível expressar quantitativamente uma cor. Por meio de transformações matemáticas atribui-se a cada cor um valor numérico, codificando a mesma e eliminando a subjetividade em sua percepção (CAVALCANTI, 2000). Diversos sistemas de medição de cores apareceram com a finalidade de solucionar a necessidade prática das indústrias de codificar e padronizar as cores (LOZANO, 1978). Em 1931, a Comissão Internacional de Iluminação, CIE, criou a codificação RGB (Red, Green, Blue, para o vermelho, o verde e o azul), que representa o espaço de todas as cores que podem ser obtidas através dessas três radiações de cores monocromáticas (JACK, 1994).

Sob essa ótica, este trabalho visa apresentar um método que utiliza o modelo de representação de cores CIE-RGB na identificação de bactérias cujas colônias apresentam colorações específicas e bastante definidas. A identificação será feita pela localização das cores, devidamente codificadas, observadas nas colônias em um diagrama de cromaticidade CIE-xyY. Para tornar possível este feito será necessário entender os conceitos relacionados às cores e à formação das mesmas nos objetos, assim como os fenômenos de absorção e reflexão relacionados às cores. Será preciso realizar transformações matemáticas como mudanças de coordenadas e ter um entendimento aprofundado dos sistemas e modelos que tentam codificar e representar as cores de maneira padronizada, minimizando ao máximo a subjetividade da interpretação das mesmas.

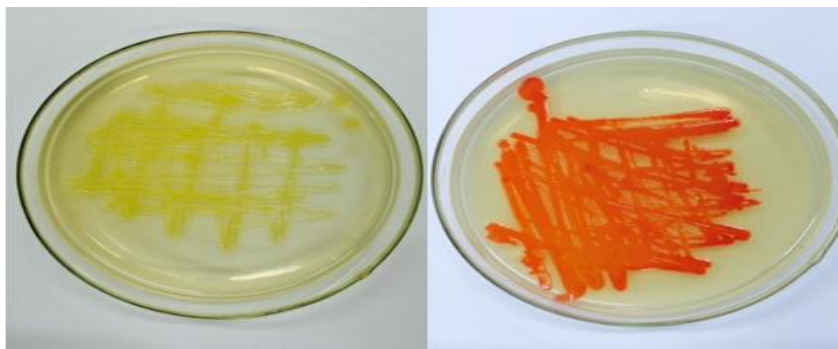


Figura 12 – Bactérias do solo da restinga de Massambaba, Arraial do Cabo, R.J.

A Figura 12 mostra algumas bactérias que serão estudadas, com a finalidade de justificar a escolha de uma metodologia inovadora, que busca trabalhar com microorganismos explorando suas cores, criando padrões de identificação que utilizem processos rápidos e eficazes para este fim.

3.4 LUZ, COR E VISÃO

A luz é uma radiação eletromagnética com comprimentos de onda compreendidos na região do visível. Nesta região do espectro, as radiações podem assumir diversas cores que vão desde o violeta até o vermelho (GARCIA JUNIOR, 2002). O fato de enxergarmos os objetos é possível graças à informação que nos chega através da luz. Esta é um fenômeno físico, mas a cor que observamos provém da interação da luz com o ambiente e, posteriormente, com o sistema visual, sendo, portanto, considerada um fenômeno psicofísico (GOMES; VELHO, 1998). O espectro de cores é produzido pelas ondas eletromagnéticas monocromáticas e pela mistura destas. Os limites entre as cores não podem ser estabelecido com exatidão, uma vez que a percepção de cada cor varia de um indivíduo para outro e depende, também, da forma como essa cor é interpretada no cérebro. Sendo assim, para entender e classificar as cores em modelos e padrões definidos torna-se necessário um estudo não apenas dos conceitos físicos envolvidos, mas também do sistema visual humano. Quando misturam-se luzes monocromáticas referente as cores vermelha, verde e azul, pode-se obter uma infinidade de outras cores e tonalidades, variando a proporção de cada uma. O olho humano possui células sensíveis à luz, que podem detectar quase toda essa variação de cores.

(GUYTON; HALL, 1997). A Figura 13 mostra a forma como uma cor é percebida quando a luz proveniente de um corpo luminoso (corpo que emite luz) ou iluminado (corpo que reflete a luz) atinge o observador. Assim, pode-se considerar que três componentes participam do processo de percepção visual, são eles: a fonte de luz, o objeto iluminado e o olho humano. Posteriormente as informações são interpretadas no cérebro.



Figura 13 – Diagrama representativo do processo de visão⁶.

Em consequência de tais fatos, a percepção da cor depende de fatores específicos que variam de acordo com o ambiente, neste caso a iluminação, e de fatores biológicos, como as características dos olhos e os processos envolvidos na condução da informação. Tudo isso torna a interpretação e a distinção das cores pelo olho humano um fenômeno particular e subjetivo.

Quando se faz referência à cor de um objeto, comumente considera-se que este objeto está sendo iluminado com luz branca. Esta é uma luz policromática, ou seja, é constituída pela superposição de todas as outras cores do espectro. Desta forma, quando um objeto é iluminado com luz branca, seja a luz solar ou até mesmo a luz de uma lâmpada comum, ele absorve algumas cores componentes dessa luz e reflete outras. A cor ou as cores que são refletidas pelo objeto são as cores que são percebidas visualmente pelo observador. A Figura 14 exemplifica este esquema de absorção e reflexão, e as cores que são percebidas em consequência de tal fato.

⁶ Figura retirada do site: <http://andre-godinho-cfq-8a.blogspot.com.br/2013/06/luz.html>

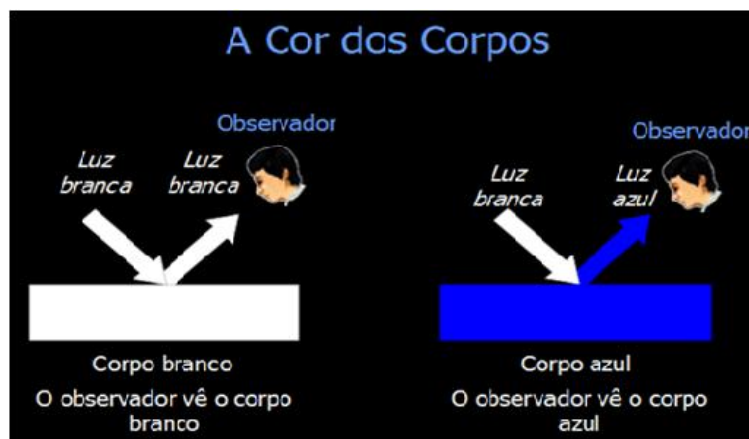


Figura 14 – Esquema de absorção e reflexão das cores⁷.

No entanto, quando algum objeto é iluminado com luz monocromática ou quando ele absorve todos os comprimentos de onda, como no caso de um corpo negro, nenhuma luz chega aos olhos do observador e, dessa forma, na ausência de luz, o objeto é visto sem nenhuma cor e é identificado pela cor preta. A Figura 15 mostra os casos citados acima.

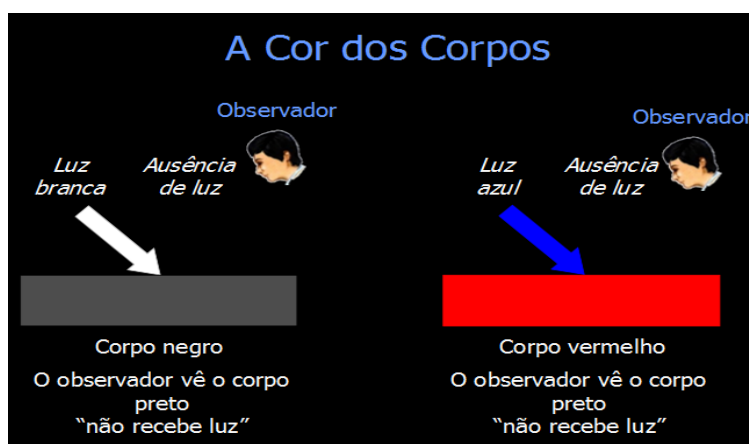


Figura 15 – Esquema de absorção e reflexão das cores.

Dessa forma fica evidente a subjetividade das cores percebidas quando observa-se algum objeto. Pela Figura 16 pode-se perceber que a cor de um objeto não depende apenas da sua natureza ou de sua composição, mas também da cor da luz com que ele é iluminado. A cor de um corpo para um observador é a cor que ele reflete, assim, um objeto visto na cor branca está refletindo todas as cores do espectro, não absorvendo nenhuma.

⁷ As figuras 14, 15, 16, 21 e 22 foram extraídas do site: <http://slideplayer.com.br/slide/1749165/>. Acessado em 10 out. 2014.

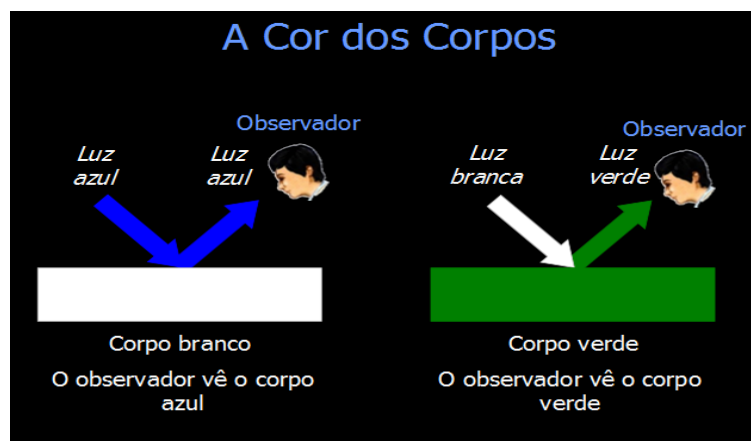


Figura 16 – Esquema de absorção e reflexão das cores.

3.5 TEORIA DO TRI-ESTÍMULO

A teoria tricromática, proposta no início do século XIX por Thomas Young, afirma que o olho humano possui receptores para o vermelho, o verde e o azul, que são três cores primárias. Todas as outras cores seriam formadas por um somatório dessas três cores em proporções variadas, considerando as especificidades do olho humano e a interpretação cerebral de cada cor. Uma pessoa que, por algum motivo, não tem a capacidade de enxergar uma dessas cores primárias, também não pode perceber as cores que as tem como componente (YOUNG, 1802). Posteriormente, Hermann von Helmholtz trabalhou na teoria de Young e afirmou que o cérebro humano pode realizar todas as matizes de cores do espectro visível a partir da síntese das três cores primárias (HELMHOLTZ, 1855). Essas ideias foram confirmadas por Maxwell que, em seus estudos, conseguiu comprovar que as três cores primárias podem produzir qualquer outra cor do espectro eletromagnético visível. Além disso, ele enriqueceu a teoria e a compreensão da visão em cores, explicando algumas deficiências que alguns indivíduos apresentam na percepção das cores. Deve-se ressaltar que esta teoria leva em conta principalmente os aspectos físicos da formação e da natureza das cores, não considerando fatores biológicos como o processamento da informação pelo cérebro que chega às células cromáticas dos olhos através da luz.

A teoria de que todas as cores podem ser formadas pelas cores primárias se relaciona com o fato de que os cones existentes na retina são sensíveis a essas três cores, representadas pelas letras R (red), G (green) e B (blue), que fazem referência, no inglês, às cores vermelho,

verde e azul, respectivamente (MAXWELL, 1855). Segundo Lopes (2003), o que permite interpretar comprimentos de ondas diferentes correspondendo a cores diferentes, é a diferença entre as respostas dos três tipos de cones. Esta interpretação é conhecida como teoria dos três estímulos. Esta teoria postula que qualquer cor (comprimento de onda) do espectro visível pode ser reproduzida através da adição dos resultados obtidos pelo estímulo dos três tipos de cones de forma diferente. A cor percebida depende unicamente da relação entre os três estímulos. Ainda segundo Lopes (2003), cones são células da retina que, como sugerido pelo nome, são aproximadamente cônicas, mais largas que os bastonetes e um pouco mais curtas. Eles são sensíveis à luz em apenas algumas faixas de comprimentos de onda. Na região do vermelho, observa-se os cones do tipo ρ , na faixa do verde cones do tipo γ e, no azul, cones do tipo β . Essa sensibilidade dos cones está representada na Figura 17, onde fica evidente que os cones são sensíveis a gama de cores e não a cores específicas, com comprimentos de onda bem definidos.

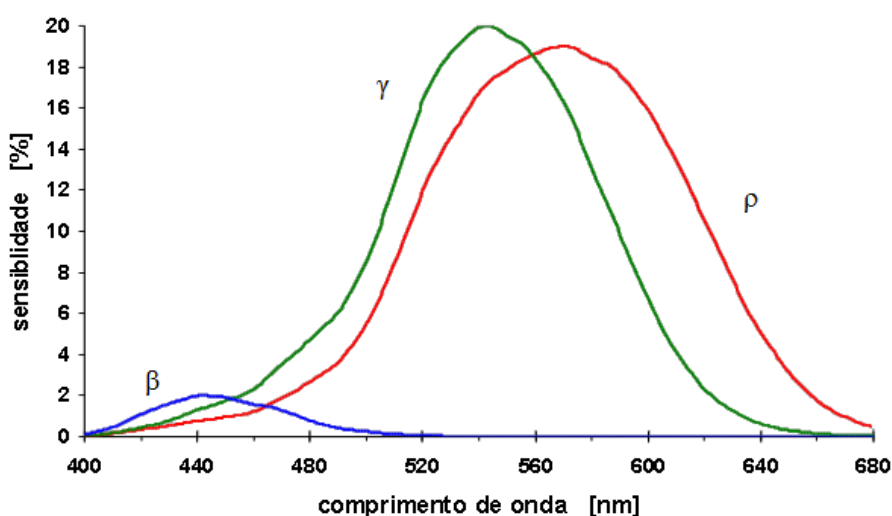


Figura 17 – Sensibilidade relativa dos cones nas faixas do vermelho, verde e azul.

Outra consequência da teoria dos três estímulos é a verificação de que da combinação de cores diferentes pode resultar uma cor única, como é o caso da cor “cião”. Essas cores são chamadas de metâmeras ou metâmero, que são duas cores espectralmente diferentes, mas que produzem a sensação de uma mesma cor (LOPES, 2003).

3.6 COLORIMETRIA E SISTEMAS DE CORES

Para trabalhar com as cores é necessário entendê-las e padronizá-las. Por este motivo, desenvolveram-se estudos com a finalidade de representar descrever e medir as cores. Segundo Gomes e Velho (1998), a colorimetria é a ciência que representa as cores com medidas físicas. No entanto, pelo fato das cores dos objetos dependerem da visão, da luz e de particularidades do indivíduo, elas tornam-se um atributo subjetivo e podem, de maneira geral, ser descritas por medidas perceptíveis.

As medidas físicas utilizam conceitos físicos teóricos para representar as cores, como o estudo da superposição das ondas monocromáticas do espectro, uma vez que este processo permite a obtenção das demais cores na região do visível (RESNICK; HALLIDAY; WALKER, 2010). Estes conceitos afirmam que a cor é definida pela frequência da luz, contudo, as faixas de cores são comumente representadas por seus comprimentos de onda. Em decorrência de tal fato, vários sistemas de medição surgiram baseados em estudos das cores primárias, com o intuito de padronizar a representação das cores, como o sistema CIE-RGB e o CIE-XYZ, que serão abordados mais adiante neste trabalho.

Já as medidas perceptíveis abordam aspectos genéricos relativos à cor estudada. A percepção da luz pelos olhos se dá pela luminância, saturação e tonalidade da cor. (GONZALEZ; WOODS, 2003). A luminância está diretamente relacionada com a quantidade de energia da luz percebida por um observador. Este conceito é popularmente conhecido como brilho da cor (GONZALEZ; WOODS, 2003). Para melhor entender o conceito de luminância, faz-se necessário uma abordagem física quantitativa. Quando uma luz monocromática com 1 watt de potência atinge o olho humano, a resposta que este apresenta para o brilho percebido não é constante quando varia-se o comprimento de onda. Como mostra a Figura 18, a resposta é máxima na faixa do verde, no comprimento de onda de 555 nm.

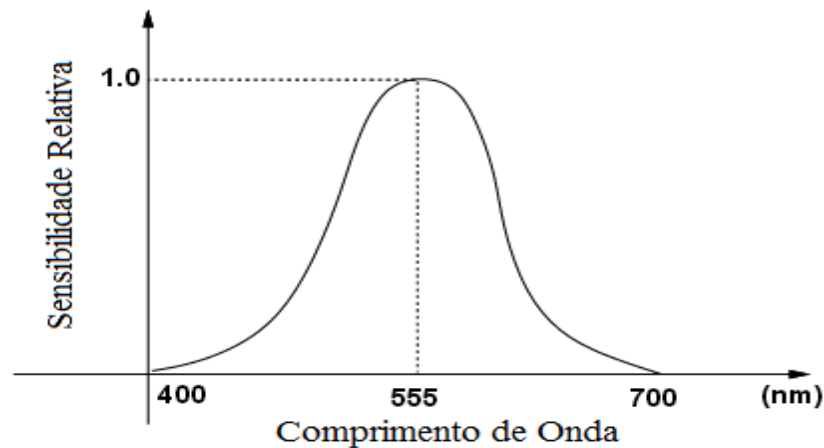


Figura 18 – Sensibilidade relativa ao brilho com resposta máxima na faixa do verde.

O grau de pureza da cor é medido pela saturação da mesma, que significa uma graduação entre a cor pura, monocromática e a luz branca, sendo que a saturação é máxima na luz monocromática e mínima na luz branca, onde na verdade ela pode ser considerada nula. É importante frisar que o brilho não possui definição uniforme na literatura, uma vez que este possui caráter subjetivo praticamente impossível de ser medido, no entanto, é consenso que ele está diretamente ligado ao conceito de luminância da imagem e este termo é utilizado para emissão e reflexão da luz em corpos luminosos ou iluminados (GOMES; VELHO, 1998). Já a tonalidade de uma cor é a grandeza que diferencia uma cor de outra ou a predominância de uma delas em uma cor indefinida, ou seja, a cor é identificada pela cor monocromática mais próxima a ela. Este processo acontece por meio de comparações com cores previamente conhecidas e bem definidas no espectro visível (GOMES; VELHO, 1998). Quando juntas, saturação e tonalidade formam a cromaticidade, grandeza que não depende do brilho e consequentemente é invariante a este.

Um dos modelos mais utilizados em representação de cores é provavelmente o espaço RGB. Este modelo é baseado no princípio de que vários efeitos cromáticos podem ser obtidos incidindo a luz branca em filtros vermelho, verde e azul, produzindo feixes de luz nas cores específicas e produzindo cores secundárias através da superposição das primeiras, como mostra a Figura 19.



Figura 19 – Síntese aditiva das cores primárias e subtrativa das cores secundárias⁸.

A luz branca é obtida na interseção das luzes projetadas pelos três círculos, sendo, segundo Souto (2000), uma composição entre as cores primárias, que são assim definidas por não ser possível reproduzi-las a partir de misturas de outras cores. Já as outras cores podem ser obtidas por combinações variáveis das cores primárias.

O espaço de cores RGB é normalmente representado por uma figura geométrica denominada cubo de cores. Este está representado na Figura 20.

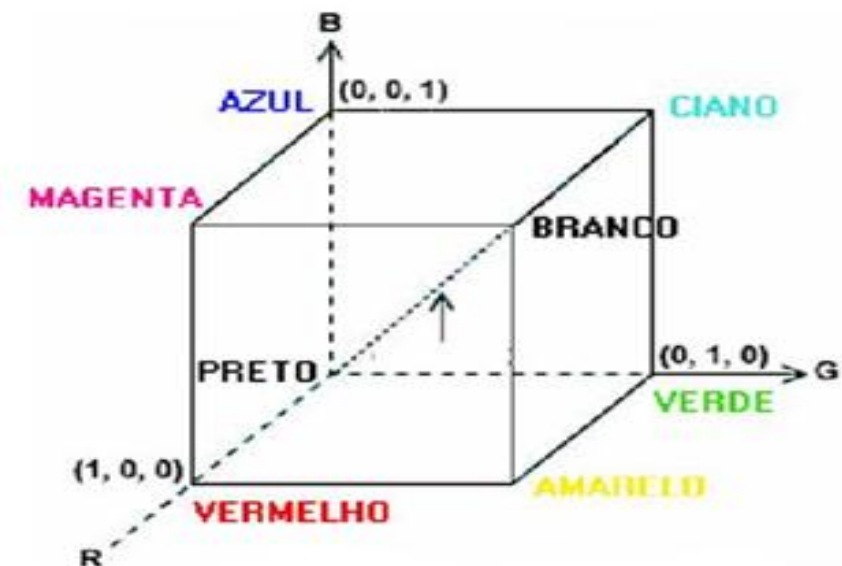


Figura 20 – Espaço representativo de cores RGB.

⁸ As Figuras 19 e 20 foram extraídas do site <http://www.ufrgs.br/engcart/PDASR/formcor.html>.

Representando o cubo das cores com suas arestas medindo uma unidade e posicionando-o da forma mostrada na Figura 20, temos a cor preta representada na origem e a cor branca está no vértice de coordenadas (1,1,1), as outras cores primárias se localizam nos vértices que estão sobre os eixos, enquanto os outros vértices abrigam as cores complementares de cada cor primária. Já no interior do cubo, cada ponto representa uma cor formada pela composição das três cores primárias, vermelho, verde e azul, com seus valores variando entre 0 e 1.

A diagonal principal do cubo, que liga o vértice que representa a cor preta ao vértice que representa a cor branca, representa os tons de cinza. Como qualquer ponto nesta diagonal está equidistante dos vértices sobre os eixos, pode-se concluir que esses tons de cinza são formados por quantidades iguais de todas as cores primárias.

Os comprimentos de onda definidos para o sistema RGB apresenta uma diferença em relação aos comprimentos de onda observados pelos cones humanos. Essa diferença, que sofreu variações ao longo dos anos, é maior para o vermelho, diminuindo para o verde e o azul respectivamente (LOPES, 2003), como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Comprimentos de onda das cores primárias

Cor	Comprimento de Onda RGB	Comprimento de Onda Cones
Vermelho	700 nm	570 nm
Verde	546 nm	535 nm
Azul	435,8 nm	445 nm

Devido a essa diferença, quando, por exemplo, em um monitor de computador, misturavam-se as três luzes emitidas por tubos de raios catódicos, a cor pretendida não correspondia à cor detectada pelo olho humano, tendo sido, por este motivo, necessário mudar as proporções das intensidades das cores primárias emitidas. No entanto, ao mudar essas proporções, pode-se assumir valores de tri-estímulos negativos para alguns comprimentos de onda, como mostra a Figura 21, o que impossibilita, neste sistema, a reprodução de todas as cores do espectro visível por computadores (LOPES, 2003).

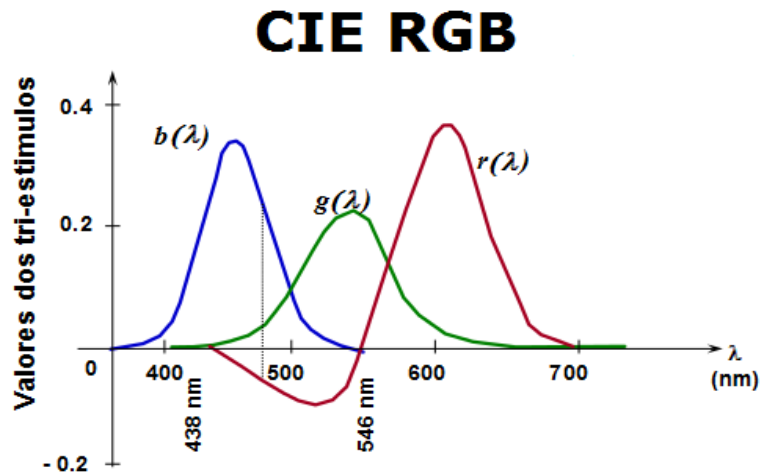


Figura 21 – Valores dos tri-estímulos para as cores primárias no sistema CIE-RGB.

Para corrigir este problema a CIE, em 1931, criou um novo modelo de representação de cores, chamado de espaço X, Y, Z, onde as cores primárias são virtuais, não correspondendo mais às cores visíveis, obtidas através de transformações onde todas as componentes produzem valores de tri-estímulos sempre positivos, tornando possível a reprodução de todos os comprimentos de onda do espectro visível (WRIGHT, 1941; WYSZECKI, STILES, 1982). Devido à incapacidade de reproduzir todas as cores visíveis utilizando o modelo CIE-RGB, foi criado o modelo CIE-XYZ, que foi definido de forma que as funções de ajuste de cor de suas cores primárias tivessem sempre valores positivos. As curvas de ajuste deste novo modelo estão expressas na Figura 22.

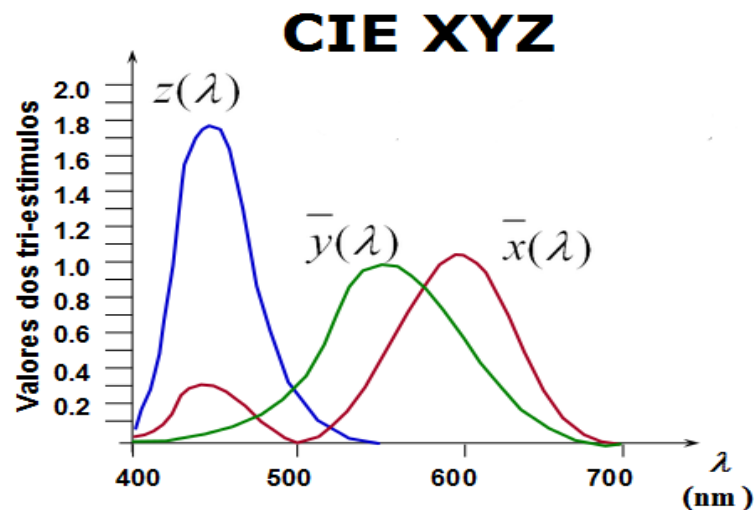


Figura 22 – Valores dos tri-estímulos para as cores primárias no sistema CIE-XYZ.

O sistema CIE-XYZ foi definido de forma que duas cores primárias, X e Z tivessem luminância nula. Assim apenas a componente Y tem influência da luminância. A reta XY é formada com o objetivo de se obter o maior número possível de cores espectrais, com algumas coordenadas de cromaticidade nula e a reta YZ é traçada de forma a minimizar a área do triângulo formado neste processo. As cores primárias X, Y e Z estão situadas nos vértices desse triângulo como mostrado na Figura 23. Nota-se que todas as cores do sistema RGB estão compreendidas no sistema XYZ.

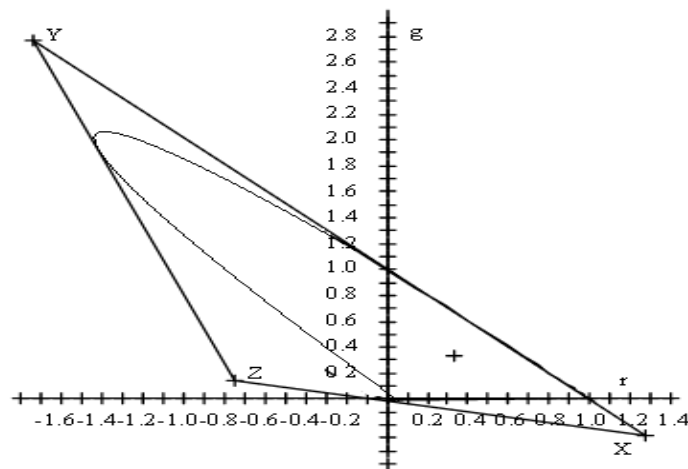


Figura 23 – Espaço CIE-XYZ abrangendo o espaço CIE-RGB.

As cores primárias deste novo sistema assumem então as coordenadas, em relação ao sistema RGB, apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Coordenadas de cromaticidade do sistema XYZ

<i>Cor</i>	<i>r</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
X	1,2750	-0,2778	0,0028
Y	-1,7393	2,7673	-0,0280
Z	-0,7431	0,1409	1,6022

De acordo com (LOPES, 2003), o espaço que contém todas as cores visíveis do espectro está localizado no octante onde os coeficientes das variáveis X, Y e Z são positivos, uma vez que neste sistema, os valores das funções de ajuste são intrinsecamente positivos. Este espaço está representado na Figura 24. Ele possui a forma de um cone com vértice na origem do espaço XYZ e uma secção reta, paralela ao plano $X + Y + Z = 1$ em forma de ferradura. Este sistema também define uma luz branca de referência, que corresponde à luz do sol emitida à temperatura de 6774 K e é chamada de iluminante C.

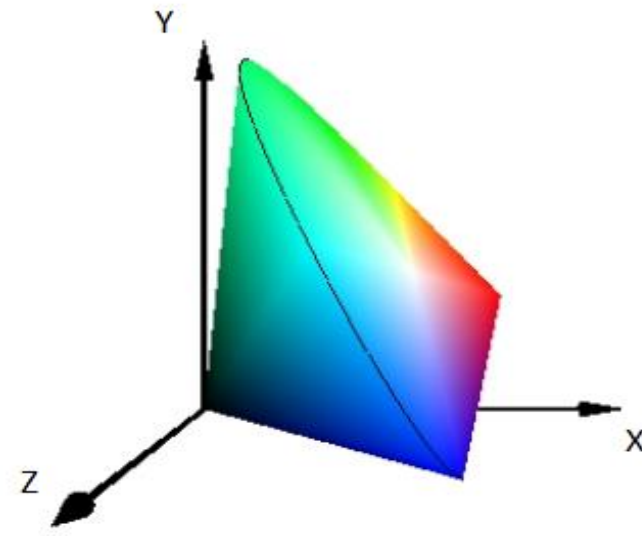


Figura 24 – Sólido de cores formado por todas as cores visíveis do espectro⁹.

3.7 DIAGRAMA DE CROMATICIDADE

O diagrama de cromaticidade é construído a partir do sistema CIE-xyY. Ele consiste na representação das cores criadas por uma luz ou mistura de luzes no plano xy, a fim de identificar uma cor por comparação aos padrões de cores já definidos. O diagrama ordena as cores, tentando organizá-las em um espaço uniforme, de acordo com nossa percepção e sensibilidade, no entanto, distâncias iguais no diagrama não correspondem a distâncias perceptuais iguais (FEITOSA-SANTANA, 2005; LEE, 2008). A Figura 25 apresenta diagramas de cromaticidade com todos os valores de cromaticidade para as cores visíveis.

⁹ Figura extraída de Lopes (2003).

Como a luminosidade não é considerada neste diagrama, cores com intensidades luminosas ou brilhos diferentes ocupam o mesmo ponto no gráfico se possuírem coordenadas de cromaticidade iguais.

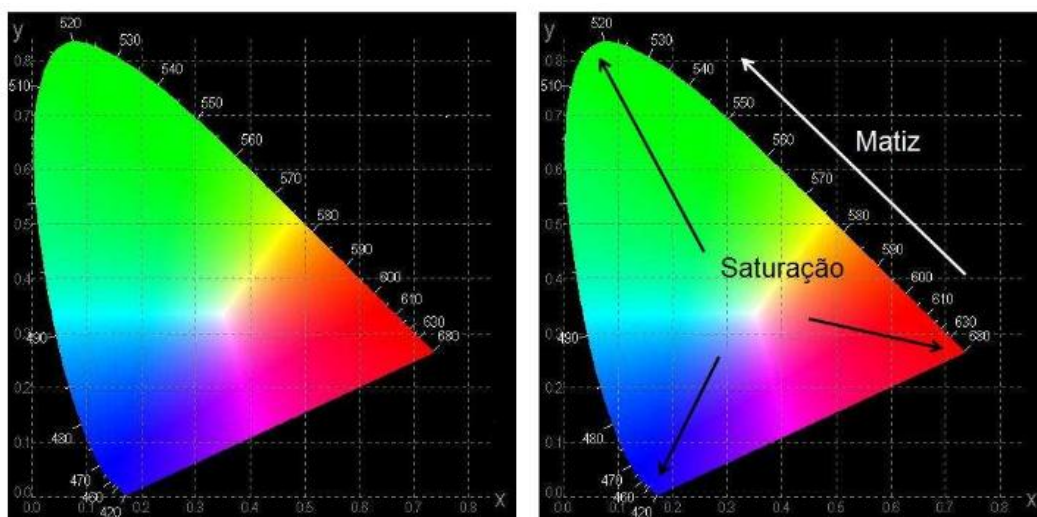


Figura 25 – (a) Diagrama de cromaticidade (b) Diagrama com sentido da saturação¹⁰.

Neste diagrama, as cores puras do espectro visível localizam-se nas bordas. Como já dito anteriormente, as cores puras apresentam máxima saturação. Sendo assim, pode-se definir o sentido de saturação no diagrama pelas setas representadas na figura 21b. Se as setas forem percorridas no sentido oposto, será encontrado o ponto de saturação mínima ou nula, que corresponde à luz branca. Este ponto se localiza, aproximadamente, sobre as coordenadas de valor $1/3$. Cores puras, como o magenta, que não se encontram no espectro visível, estão situadas na reta que forma a base do diagrama (LOPES, 2003). Uma propriedade muito relevante do diagrama de cromaticidade é a linearidade que ele apresenta. Sendo assim, de acordo com Lopes (2003), um segmento de reta que une dois pontos que representem duas cores quaisquer, contém todas as cores possíveis de se obter pela mistura dessas duas cores nas proporções necessárias para formar a cor desejada.

¹⁰ Figura retirada do sítio <http://www.dca.fee.unicamp.br>.

3.8 MATERIAL E METODOLOGIA

Para realização dos experimentos foram utilizados softwares e aplicativos gratuitos de fácil acesso, com o objetivo de tornar os experimentos viáveis e executáveis com simplicidade e rapidez garantindo resultados confiáveis. As fotografias foram tiradas com uma Câmera iSight de 8 megapixels de 1,5 μ m, abertura f/2.2 com lente de cristal de safira, filtro IV híbrido, sensor de retroiluminação, estabilizador de imagem e foco automático e, para identificação das cores, foi usado o aplicativo ColorHelper. Este aplicativo permite que a foto seja tirada através dele ou que a mesma seja recuperada da biblioteca de arquivos da câmera. Estando definida a imagem, pode-se selecionar pontos específicos da fotografia com um grau de precisão, fornecida pelo aplicativo, que varia em uma escala de 1 a 20, garantindo assim, que as cores analisadas foram exatamente do ponto pretendido no objeto. Neste experimento foi utilizada a menor escala, que permitiu analisar a menor região possível da figura. O aplicativo então fornece a composição da cor e da região selecionada em RGB, assim como a identificação dessa cor em hexadecimal. A Figura 26 exemplifica as funções citadas acima.

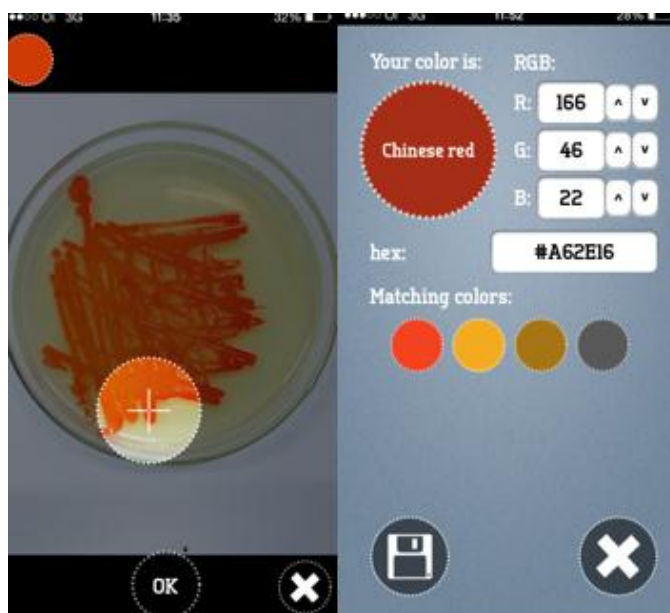


Figura 26 – Aplicativo de medição dos valores das cores primárias RGB.

Para a localização no cubo de cores, foi utilizado um software gratuito disponível online em www.uff.br, na página denominada “O Sistema RGB e o Cubo de Cores”. Neste programa basta fornecer os valores das componentes RGB e a cor estudada é posicionada no cubo. A Figura 27 dá um exemplo de algumas cores representadas no cubo.

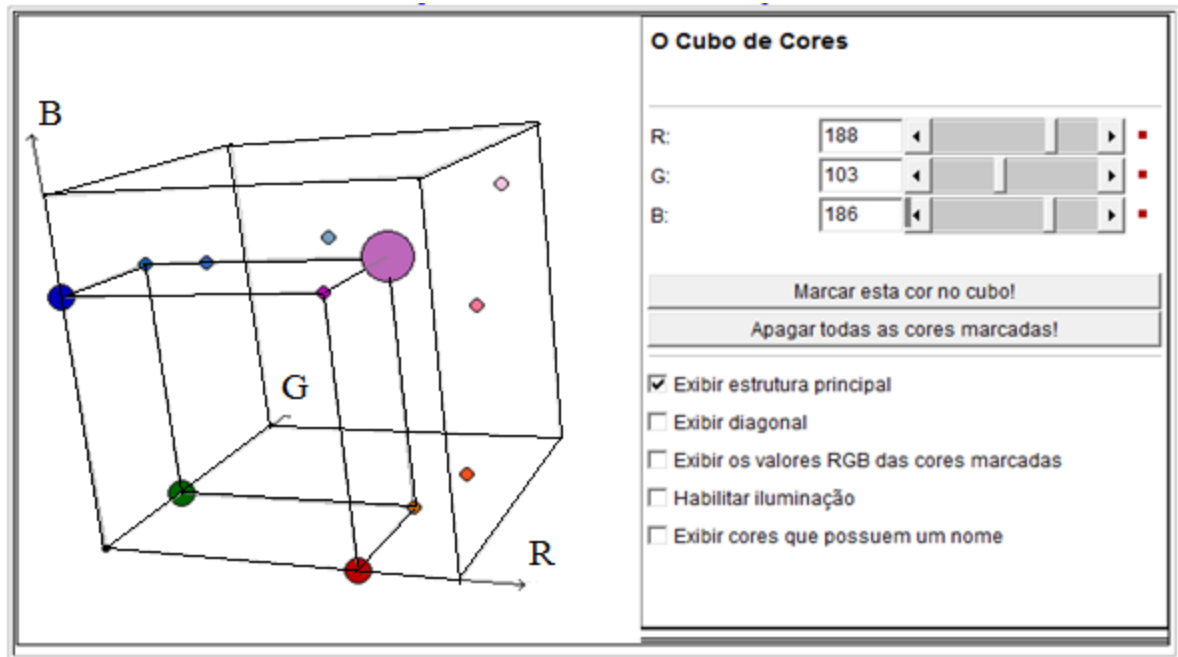


Figura 27 – Software representativo do cubo de cores RGB.

Já para a representação das cores no diagrama de cromaticidade, foi utilizado o software Color Calculator, desenvolvido pela empresa Radiant Imaging, disponível gratuitamente para download no site da empresa, no endereço <http://www.radiantzemax.com>. O programa fornece o diagrama de cromaticidade quando lhe são dadas as coordenadas x e y, obtidas das coordenadas de cromaticidade através dos processos de transformações já descritos. Após este passo, a cor desejada é identificada em pontos no diagrama mostrado na Figura 28.

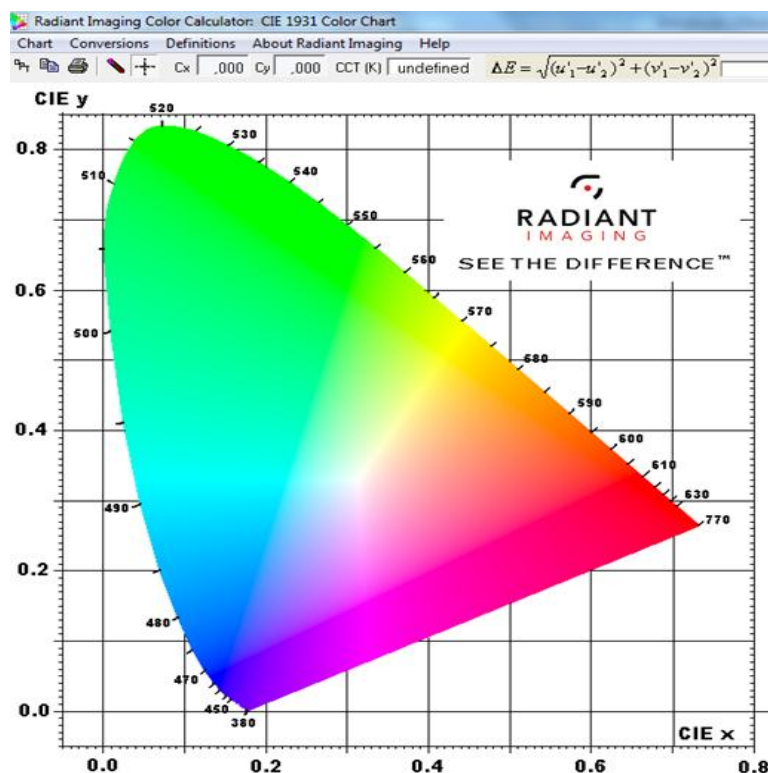


Figura 28 – Imagem do diagrama de cromaticidade no software Color Calculator.

Além de representar as cores no diagrama de cromaticidade CIE-xyY, o software também faz conversões de unidades de cromaticidade e representações em outros sistemas.

A metodologia foi estudada e proposta em conjunto pelos professores Doutores: Victor Saraiva Barbosa e Alexandre Peixoto do Carmo, e pelo mestrando Thiago Alonso Merici. O experimento é constituído de processos muito simples e é realizado em conjunto com a equipe do Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEMAM). As bactérias estudadas são bactérias do solo coletadas pela equipe do LEMAM. O foco deste trabalho está nos experimentos de identificação das mesmas através de processos físicos. Por este motivo, este trabalho não tratará dos métodos de coleta, apenas fará uma abordagem resumida dos protocolos dos meios de cultivo das bactérias.

O experimento se dá com as bactérias em meio sólido (1 litro de LB preparado; 20 gramas de ágar; colocar no agitador até homogeneizar completamente; autoclavar por 20 minutos a uma temperatura de 120°C e uma pressão de 1 atm e, armazenar na geladeira a uma temperatura de 4 °C). Elas são colocadas neste meio logo após serem coletadas e replicadas neste a partir daí. Após crescerem em meio sólido dentro de uma estufa, as bactérias são separadas de acordo com suas características visualmente perceptíveis sendo, dessa forma,

separadas por espécie. Após este processo elas são colocadas novamente para crescerem e, posteriormente, são mantidas à baixas temperaturas para diminuir a taxa de crescimento.

O tempo adotado para iniciar o experimento é de 24 horas, no que diz respeito ao período de crescimento das bactérias. Elas são levadas então para o laboratório de Física, onde são tiradas as fotografias, sempre no mesmo local e com o mesmo padrão de iluminação. A luz do sol e as luzes de lâmpadas comuns são consideradas luzes brancas e por este motivo são chamadas de iluminantes padrão. A distância entre a câmera e a placa também foi mantida constante nos experimentos e para esta foi estipulado o valor de 10 cm, ajustado experimentalmente para uma melhor captação da imagem.

O processo seguinte se deu através do aplicativo ColorHelper, que fornece a composição da cor em RGB do ponto escolhido. O procedimento foi realizado em cinco placas e em cada placa foram escolhidos cinco pontos para análise. Cada placa forneceu uma informação de cor para o experimento, uma vez que dos cinco pontos citados foi calculada uma média aritmética simples com o objetivo de aumentar a confiabilidade da cor e a pertinência desta à colônia estudada.

Uma das maneiras proposta para identificar um padrão que especifique as espécies quanto as suas cores foi a representação destas no cubo de cores RGB. Este primeiro procedimento é bastante simples, uma vez que a entrada de dados no programa é feita com os próprios valores em RGB. Foram então analisadas as posições das cores que representam cada espécie dentro do cubo, relacionando a proximidade dos pontos que representam espécies iguais e a distância destes com os que representam espécies diferentes, buscando conclusões lógicas para estes resultados.

Para a representação das cores no diagrama de cromaticidade, são necessários alguns procedimentos de conversões de sistemas. Estes foram descritos detalhadamente na revisão da literatura. As cores que, a princípio, estão no sistema CIE-RGB, são normalizadas e convertidas para o sistema CIE-XYZ. Após este procedimento, ainda é preciso fazer outra conversão: do sistema CIE-XYZ para o sistema CIE-xyY. As espécies são então representadas através das coordenadas de suas cores no plano xy e, como no processo anterior, são analisadas quanto as suas posições no diagrama, fornecendo informações quanto a especificação das espécies e identificando o comprimento de onda das cores monocromáticas predominantes em cada uma, como explica a Figura 29.

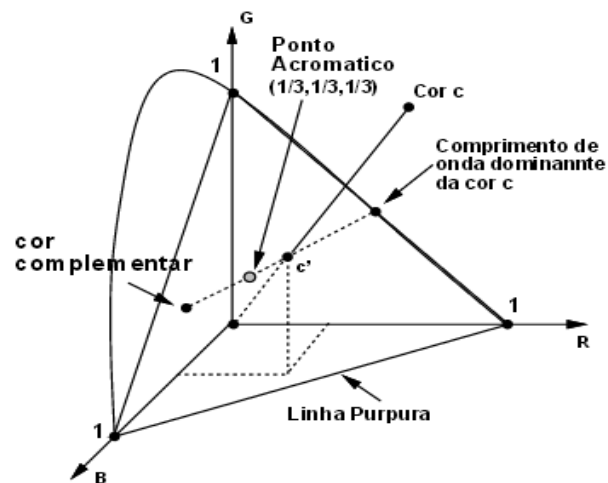


Figura 29 – Diagrama de determinação do comprimento de onda das cores monocromáticas.

Nesta figura esquemática, pode-se definir o comprimento de onda da cor dominante, traçando uma semi-reta partindo do ponto acromático e passando pela cor escolhida, no caso da figura, a cor *c*. A cor dominante pode ser entendida como uma cor pura do espectro, que produz a cor em questão ao ser misturada com a cor branca em proporções apropriadas.

3.9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram submetidas a este estudo quatro espécies distintas, que foram aqui representadas pelas letras A, B, C e D, com o objetivo de eliminar possíveis influências dos nomes de suas cores perceptuais, dando foco para as cores, obtidas pelo método apresentado.

A representação das cores no cubo de cores mostrou que todas as culturas obedecem a um padrão de localização, considerando pontos distintos dentro da mesma colônia ou mesmo comparando colônias diferentes. Como o experimento foi realizado formalmente em triplicata, os dados também são multiplicados por três. Sendo assim, além das comparações dentro de um processo experimental, realizou-se também análises comparativas entre um experimento e outro, o que possibilitou a comprovação e aumento da confiabilidade dos resultados.

Foram comparados 5 pontos selecionados aleatoriamente dentro de uma mesma placa. Este procedimento foi realizado com o intuito de comprovar que a cultura apresenta um

padrão de homogeneidade no que diz respeito à sua cor. Ele foi repetido igualmente para as outras culturas estudadas, com o mesmo objetivo, obtendo êxito em todos.

A análise da relação entre as placas foi realizada adotando cada placa como um ponto. Para isto extraiu-se a média dos 5 pontos selecionados em cada colônia e, novamente, observou-se a regularidade na região de localização dos pontos que representam bactérias de mesma espécie, uma vez que eles se encontram consideravelmente próximos, acontecendo inclusive a superposição de alguns deles.

A Figura 30 mostra a dispersão mínima, encontradas nas amostras do tipo A, e máxima, encontradas nas amostras do tipo D, evidenciando que ambas ocupam localizações bem definidas no cubo de cores.

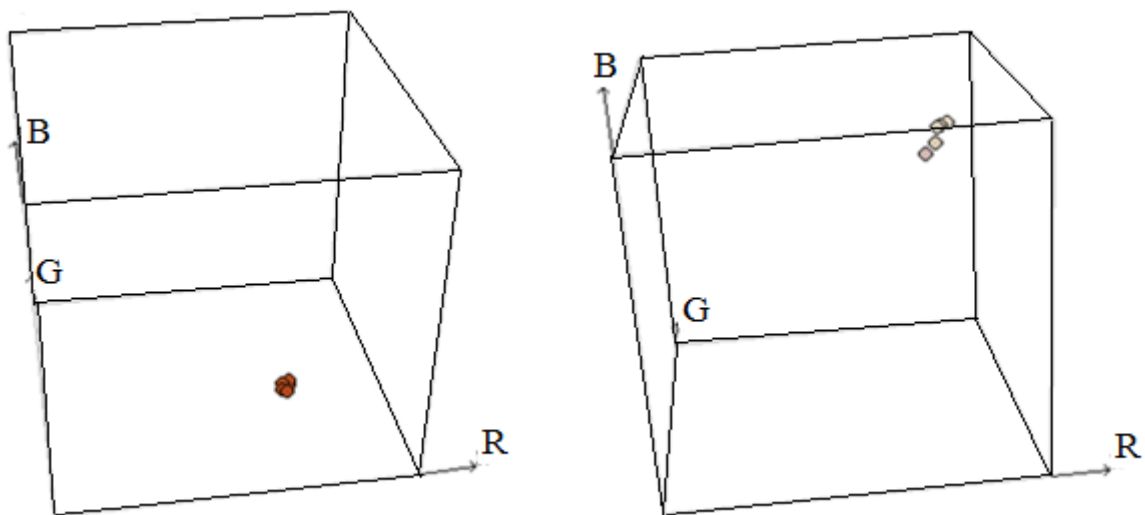


Figura 30 – Dispersão comparativa das amostras do tipo A e tipo D no cubo de cores RGB.

Para comprovar a possibilidade de identificação destas bactérias a partir de suas cores, além de mostrar que as mesmas obedecem a um padrão entre si, é importante demonstrar que elas também se diferenciam e se distanciam na representação no cubo de cores, o que habilita a continuação do processo, com a intenção de representá-las no diagrama de cromaticidade onde elas poderão ser identificadas de acordo com a área correspondente a cada espécie. A Figura 31 mostra a representação de todas as placas no cubo de cores em duas posições distintas e evidencia que cada tipo de bactéria ocupa uma região específica e única do espaço em questão.

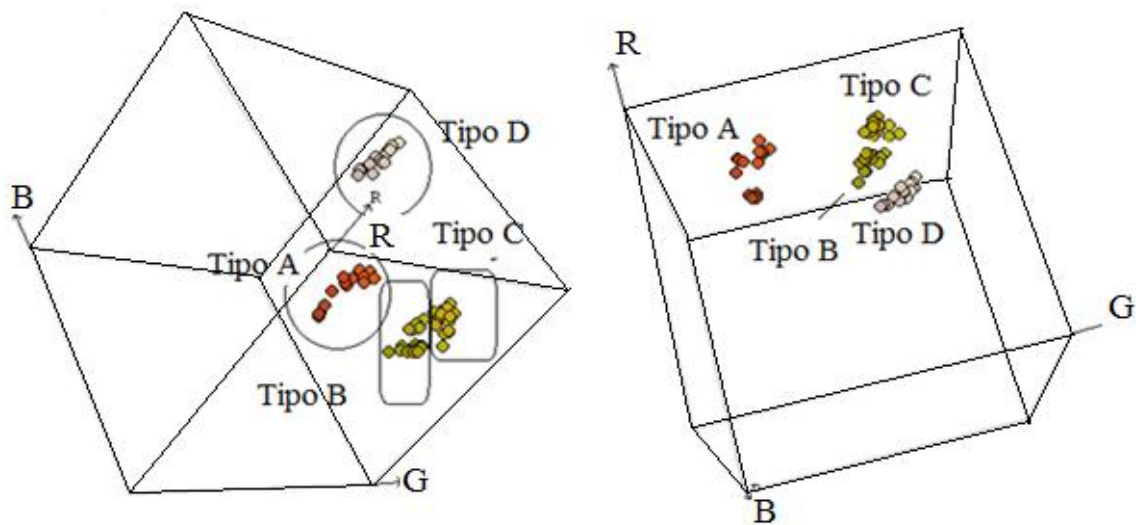


Figura 31 – Representação das localizações de todas as espécies no cubo de cores RGB.

As colônias do tipo B e do tipo C, praticamente não podem ser distinguidas visualmente, nota-se claramente que elas possuem uma proximidade considerável no cubo. No entanto, se a perspectiva de visualização for alterada, uma vez que o cubo pode ser girado em torno de suas três dimensões, a separação entre elas pode ser mais claramente percebida, comprovando a distinção de regiões ocupadas por elas no espaço de cores.

O processo de identificação foi realizado no diagrama de cromaticidade CIE-xyY. Todos os valores medidos em RGB foram convertidos para os sistemas de cores necessários, conforme descrito anteriormente neste artigo. Primeiramente, foram comparadas as informações dos três experimentos, para comprovar que os dados referentes à mesma espécie de bactéria se limitam a uma região de localização no diagrama, além de relacionarem entre si no que diz respeito à distância entre eles, o que foi verificado.

Para localizar as bactérias no diagrama de cromaticidade, foram calculadas as médias de todos os valores medidos (experimento realizado em triplicata onde foram analisados 5 pontos de cada placa em 5 placas de cada uma das 4 espécies estudadas, totalizando 300 pontos) para cada espécie com seus respectivos erros, mostrados na Tabela 5, de forma a transformá-los em um único ponto a ser representado no gráfico.

Tabela 5 – Médias dos valores RGB

Espécie	R	G	B	ΔR	ΔG	ΔB
A	197	80	32	19	15	8
B	171	163	14	9	10	3
C	197	174	13	9	9	3
D	217	201	185	10	14	9

Estes pontos revelaram-se em localizações distintas e independentes no diagrama, além do ponto acromático, como mostra a Figura 32.

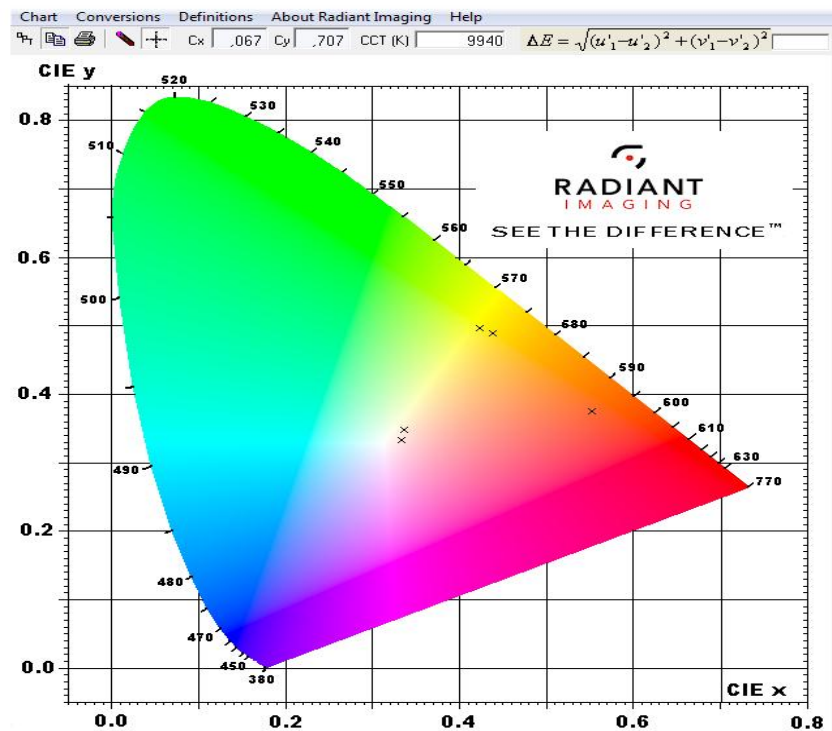


Figura 32 – Localização média de cada espécie e do ponto acromático no diagrama de cromaticidade.

Uma forma de demonstrar a especificidade de cada espécie é aplicar o método que define o comprimento de onda predominante em uma cor específica no diagrama. Para isso, conforme teoria já apresentada, basta traçar uma semi-reta iniciando no ponto acromático

passando pelo ponto escolhido. O ponto de intercepção da mesma com a escala graduada de comprimentos de onda define o valor do comprimento de onda dominante na formação da cor em questão. A Figura 33 mostra que cada espécie é formada por uma cor específica e diferente das demais.

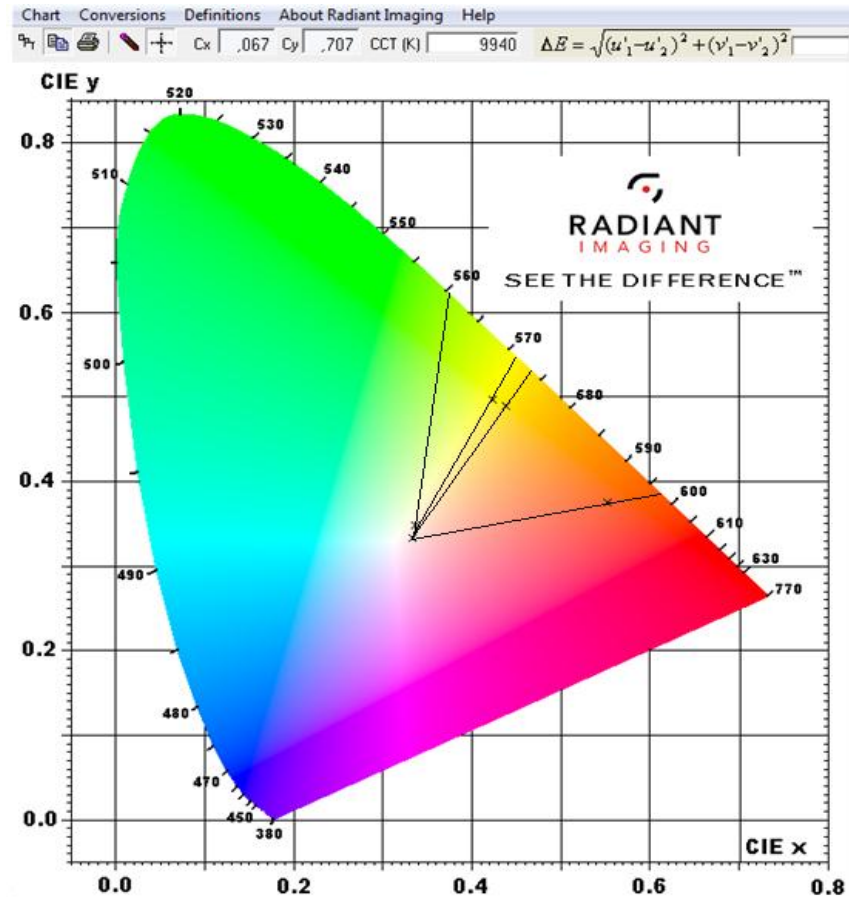


Figura 33 – Comprimento de onda predominante em cada espécie.

Com o objetivo de melhorar a confiança da informação acima, considerou-se o erro determinado pelo desvio padrão de todas as medias realizadas. Ao adotar o valor médio somado ao seu respectivo erro e o mesmo valor subtraído de seu respectivo erro, a informação de cada espécie deixa de ser representada por um ponto para se tornar um intervalo. A Figura 34 explicita os intervalos que compreendem os comprimentos de onda referentes à formação da cor de cada espécie.

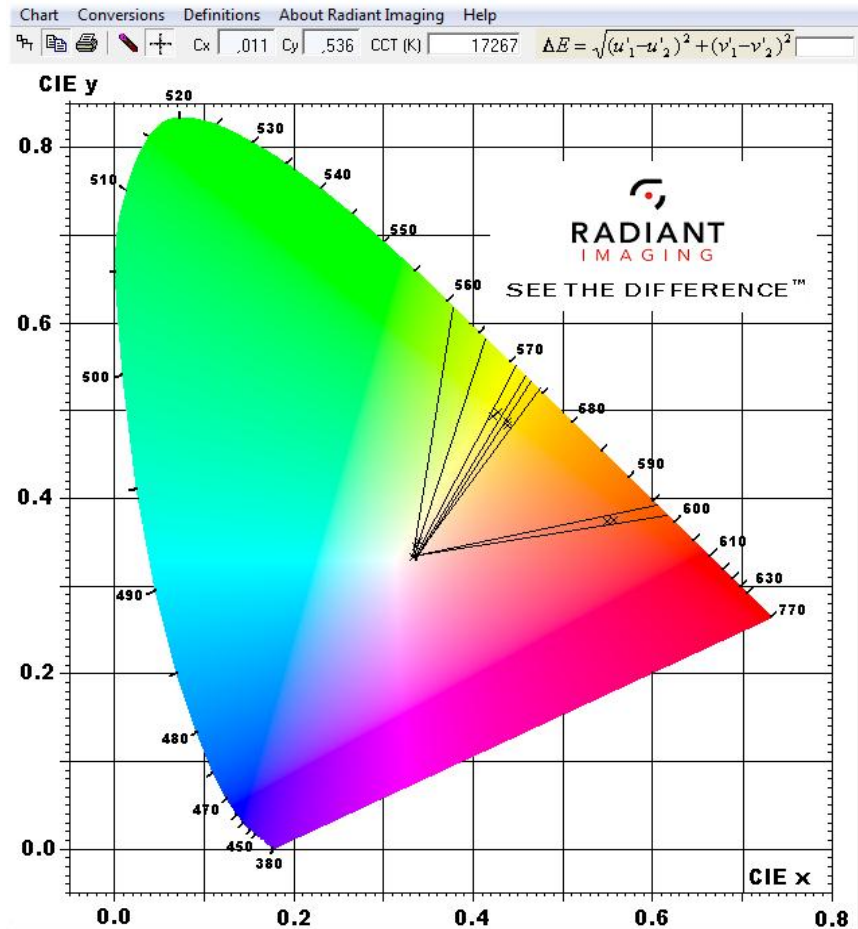


Figura 34 – Faixa de variação de comprimentos de onda dominantes de cada espécie.

É interessante notar que os intervalos não se sobrepõem, não existindo, dessa forma, interseção entre eles. Essa informação representa, com uma considerável margem de confiabilidade que, em nenhuma hipótese, as espécies estudadas podem ser representadas pela mesma cor. No entanto, pela amplitude da faixa de identificação, ainda não se pode afirmar que todas as bactérias dentro da mesma faixa são da mesma espécie, uma vez pretende-se generalizar os resultados deste estudo para aplicações em um número mais abrangente de espécies.

Para então, restringir a região do diagrama a uma espécie única, possibilitando a identificação da mesma, construiu-se a área de abrangência de cada tipo de bactéria no diagrama de cromaticidade. Esta área foi obtida utilizando-se os valores dos erros máximos e mínimos de x e y retirados do desvio padrão de todas as medidas realizadas neste

experimento, fazendo, destes pontos, coordenadas do plano que, conseqüentemente, resultam em um retângulo, como pode ser observado na Figura 35.

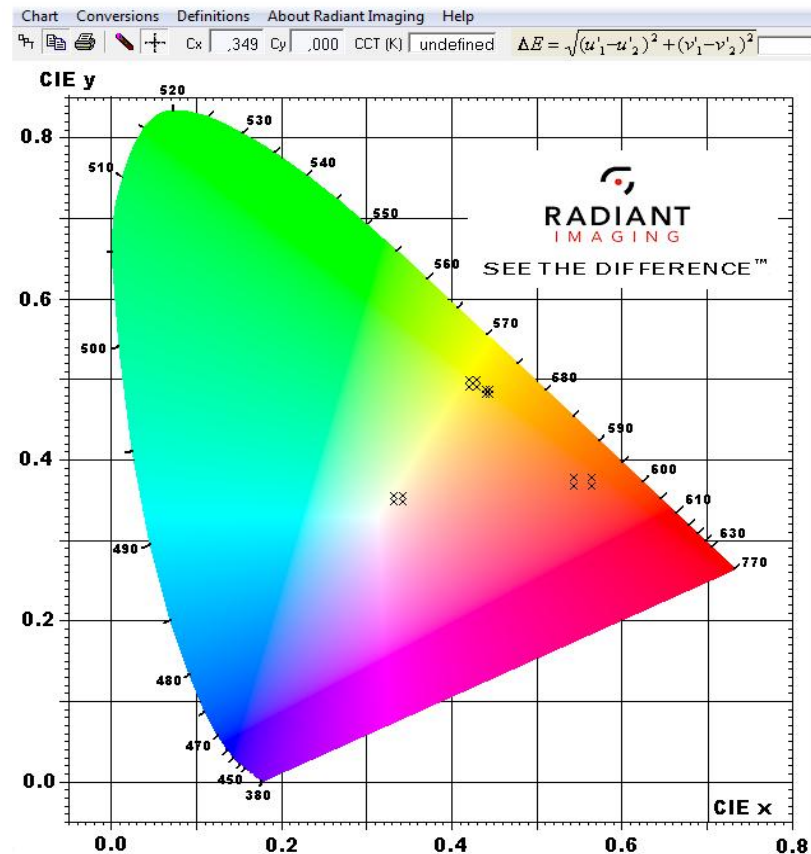


Figura 35 – Regiões de identificação de cada espécie no diagrama de cromaticidade.

Baseado na quantidade de medições realizadas e na repetição dos experimentos, pode-se considerar que cada região delimitada pelos pontos no diagrama acima representam tipos diferentes de bactérias, uma vez que todas as medidas com seus respectivos erros se encontram nas áreas de abrangência relacionadas a cada espécie estudada.

Sendo assim, ao submeter uma bactéria desconhecida a estes procedimentos e, tendo como resultado a localização dos dados que a representam no interior de alguma dessas regiões delimitadas no diagrama de cromaticidade, pode-se, com enorme margem de confiabilidade, afirmar que a mesma pertence à espécie correspondente a esta área, o que caracteriza estes processos como uma metodologia e um padrão fenotípico de identificação de bactérias. Contudo, é importante ressaltar que as especificidades do meio onde as bactérias

foram coletadas podem alterar fenotipicamente suas características se comparadas as de outras regiões, influenciando nos resultados do experimento.

3.10 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia inovadora para identificação de bactérias do solo, utilizando técnicas na área da colorimetria, o que permitiu explorar características particulares relacionadas às cores das espécies coletadas na restinga de Massambaba, em Arraial do Cabo, Rio de Janeiro.

Foram feitas conversões de sistemas de cores com finalidade de representar cada espécie em uma área definida no diagrama de cromaticidade. Ficou demonstrado que cada cor correspondente a uma espécie estava contida em uma faixa de comprimentos de onda específica e totalmente distinta das demais, o que significa que cada cor resultante do experimento possui uma cor espectral predominante única.

O objetivo principal, de identificação, foi obtido através da determinação de uma área específica para cada espécie no diagrama de cromaticidade. Esta área foi calculada maximizando os erros, uma vez que estes foram obtidos pelo desvio padrão de todas as medidas realizadas no experimento, garantindo que todos os pontos, mesmo com o maior desvio possível no resultado, se encontrarão dentro de sua respectiva região.

A região que corresponde a cada bactéria no diagrama de cromaticidade é considerada muito pequena em relação ao espaço de cores, conferindo uma particularidade aos pontos que se encontram dentro da mesma, validando o método de identificação, uma vez que se pode afirmar que todas as espécies abrangidas por áreas específicas são de uma mesma espécie. É importante ressaltar que a eficiência destes resultados se aplicam apenas as bactérias do solo da restinga de Massambaba em Arraial do cabo, fazendo-se necessário realizar mais experimentos para futuras generalizações.

3.11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRINDLEY, G.S. The effects on colour vision of adaptation to very bright lights. **Journal of Physiology**, v. 50, p. 122-132, 1953.

CAVALCANTI, P. R. **Introdução à computação gráfica**. Rio de Janeiro, [s. n.]: 2000. Disponível em: <file:///C:/Users/aluno/Desktop/ementas/6-%20apostila.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2014.

DINÂMICA para aprendizado do sensoriamento remoto. **Centro Estadual de Pesquisas em Sensoriamento Remoto e Meteorologia**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, [s.d.]. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/engcart/PDASR/formcor.html>. Acesso em: 20 set. 2014.

GARCIA JUNIOR, E. **Luminotécnica**. 2. ed. São Paulo: Érica, 2002.

GODINHO, A. Luz. **Blog de Físico-química do André**. Lisboa, 7 jun. 2013. Disponível em: <http://andre-godinho-cfq-8a.blogspot.com.br/2013/06/luz.html>. Acesso em: 29 set. 2014.

GOMES, J. VELHO, L. **Computação gráfica: imagem**. Rio de Janeiro: IMPA, 1998.

GONZALES, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento de imagens digitais**. São Paulo: Edgard Blucher, 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 1997.

HELMHOLTZ, H. L. Über die zusammensetzung von spectralfarben. **Annalen der Physik**, 94:1-28, 1855.

HOFFMAN, G. **CIE color space**. Disponível em: <http://www.fhoemden.de/~hoffmann/ciexyz29082000.pdf>. Acesso em: 01 out. 2014.

JACK, R.; MACDONALD, L.; FREEMAN, K. **Computer generated color: a practical guide to presentation and display**. New York: John Wiley & Sons, 1994.

LEE, B.B. The evolution of concepts of color vision. **Neurociências**, v. 4, p. 209-223, 2008.

LOPES, J. M. B. **Cor e luz**. Lisboa, maio 2003. Disponível em: <http://disciplinas.ist.utl.pt/leic-cg/textos/livro/Cor.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2014.

LOSANO, R. D. **El color y su medición**. Bueno Aires: Editorial Américalee, 1978.

MAXWELL, J. C. Experiments on colour as perceived by the eye, with remarks on colour blindness. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**, 21:275-298, 1855.

MEYER, B.; ZOLLINGER, H.R. **Colorimetria**. [s.l.]: Clariant, 1998.

NOVAKOVSKY, S. V. Colour tele vision: a theory of colour reproduction. **MIR Publishers**, Moscow, 1975.

RESNICK, R.; HALLIDAY, D., WALKER, J. **Fundamentos de física: ótica e física moderna**. vol. 4. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2010.

RUSS, J. C. **The image processing handbook**. 3.ed. Raleigh, North Carolina: CRC Press LLC, 1999.

SMITH, T.; GUILD, J. The C.I.E. colorimetric standards and their use. **Transactions of the Optical Society**, 33(3):73-134, 1931.

SOUTO, R. P. **Segmentação de imagem multiespectral utilizando-se o atributo matiz**. São José dos Campos: INPE, 2000. Disponível em: <http://www.obt.inpe.br/pgsere/Souto-R-P-2000/publicacao.pdf>. Acesso em: 01 out. 2014.

WRIGHT, W.D. The sensitivity of the eye to small colour differences. **Proceedures of Physical Society (London)**, v. 53, 1941.

WYSZECKI, G.; STILES, W.S. **Color Science: Concepts and methods, quantitative data and formulae**. John Wiley & Sons, New York, 1982.

YOUNG, T. The bakerian lecture: on the theory of light and colours. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 92:12-49, 1802.