

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA E ELETRÔNICA  
CURSO DE ENGENHARIA ELÉTRICA

Yasmim de Souza

**PROCESSAMENTO DE IMAGEM APLICADO À  
DETECÇÃO E CONTAGEM CELULAR**

Florianópolis

2020

Yasmim de Souza

**PROCESSAMENTO DE IMAGEM APLICADO À  
DETECÇÃO E CONTAGEM CELULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Elétrica

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr.<sup>a</sup> Eng.  
Coorientador: Guilherme Brasil Pintarelli, Me. Eng.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Souza, Yasmin

PROCESSAMENTO DE IMAGEM APLICADO À DETECÇÃO E CONTAGEM  
CELULAR / Yasmin de Souza ; orientadora, Prof.<sup>a</sup> Daniela  
Ota Hisayasu Suzuki, Dr.<sup>a</sup> Eng. , coorientador, Guilherme  
Brasil Pintarelli, Me. Eng. , 2020.

43 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico,  
Graduação em Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. Processamento digital de  
imagens. 3. Identificação de células . I. , Prof.<sup>a</sup> Daniela  
Ota Hisayasu Suzuki, Dr.<sup>a</sup> Eng.. II. , Guilherme Brasil  
Pintarelli, Me. Eng.. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Engenharia Elétrica. IV. Título.

## Yasmim de Souza

### PROCESSAMENTO DE IMAGEM APLICADO À DETECÇÃO E CONTAGEM CELULAR

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Engenharia Elétrica” e aceito, em sua forma final, pelo Curso de Graduação em Engenharia Elétrica.

Florianópolis, 10 de dezembro de 2020.



Documento assinado digitalmente  
Jean Vianeí Leite  
Data: 23/12/2020 08:46:27-0300  
CPF: 003.474.909-80

---

Prof. Jean Vianeí Leite, Dr.  
Coordenador do Curso de Graduação em Engenharia Elétrica

#### Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente  
Daniela Ota Hisayasu Suzuki  
Data: 08/12/2020 10:09:17-0300  
CPF: 928.397.389-53

---

Profa. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr. (UFSC)  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente  
Guilherme Brasil Pintarelli  
Data: 10/12/2020 13:35:43-0300  
CPF: 084.523.129-46

---

Eng. Guilherme Brasil Pintarelli, Me. EE  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente  
Marcio Jose Rossi  
Data: 22/12/2020 14:15:07-0300  
CPF: 585.395.309-53

---

Prof. Márcio José Rossi, Dr. EQ. (UFSC)  
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente  
Raul Guedert  
Data: 10/12/2020 13:11:23-0300  
CPF: 075.905.509-22

---

Eng. Eletrônico Raul Guedert, Me. (UFSC)  
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente  
MAURICIO MARTINS TAQUES  
Data: 10/12/2020 13:31:32-0300  
CPF: 661.317.239-15

---

Prof. Maurício Martins Taques, Me. EE. (IFSC)  
Instituto Federal de Santa Catarina-câmpus Joinville

Este trabalho é dedicado aos meus pais Suedi e Sebastião, à minha irmã Greice, ao Rudinei Faccin e a todos que me apoiaram durante a graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus e aos meus familiares, principalmente a minha mãe, Suedi de Freitas Souza, que apesar de todas as dificuldades, sempre me incentivou a lutar por todos os meus sonhos, inclusive o maior deles, de cursar engenharia elétrica.

Agradeço também à professora Daniela O. H. Suzuki e ao engenheiro Guilherme Pintarelli pela oportunidade de fazer a pesquisa para a execução desse trabalho e por todo apoio que me deram ao longo desse trajeto. Além disso, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina que com seus excelentes professores, me proporcionaram uma satisfatória conclusão de curso e saio com a certeza de que pude aproveitar ao máximo toda sapiência por eles transmitida e que levarei para vida.

Encerro meu ciclo nesta instituição com a asserção de que o estudo é a principal fonte de energia para seguirmos nosso caminho e enfrentarmos os obstáculos da vida, pois é através dele que alcançamos nossos objetivos profissionais.

Se você quiser descobrir os segredos do Universo, pense em termos de energia, frequência e vibração (TESLA, 1894).

## RESUMO

A densidade celular é um parâmetro importante em exames de sangue e em bioprocessos industriais. No caso de leveduras, a contagem é importante para verificar se o microrganismo teve sucesso em sua proliferação ou se foi inativado. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um exemplo de microrganismo eucariota unicelular utilizada em bioprocessos para produção de produtos fermentados. Durante a fermentação, uma determinada carga microbiológica - densidade celular - é necessária. Em contrapartida, para a segurança alimentícia ou tempo de prateleira, no envase pode ser necessário remoção ou inativação da carga microbiológica. A câmara de Neubauer é um instrumento utilizado na observação de amostras através de um microscópio. Ela possui uma disposição de linhas que formam um volume padrão que é essencial para a contabilização das células presentes em uma determinada amostra, fazendo com que os resultados obtidos sejam mais precisos. A contagem celular com a câmara de Neubauer é realizada em laboratórios e pequenas indústrias. O processamento de imagem pode aprimorar o uso das técnicas existentes, principalmente por aumentar a confiabilidade e redução do tempo da análise. Nesse trabalho foi desenvolvida técnicas de processamento de imagem para contagem de leveduras a partir de fotografias obtidas durante a utilização da câmara de Neubauer. O resultado foi um *software* para contagem com precisão aproximada de 92,4% e que permite a contagem de 5 amostras por segundo.

**Palavras-chave:** Câmara de Neubauer. Processamento de Imagem.

## ABSTRACT

Cell density is an important parameter in blood tests and industrial bioprocesses. In the case of yeasts, counting is important to check whether the microorganism has been successful in its proliferation or whether it has been inactivated. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an example of a single-celled eukaryotic microorganism used in bioprocesses for the production of fermented products. During fermentation a certain microbiological load, that is, cell density, is accepted. On the other hand, for food security or shelf life, it may be necessary to remove the microbiological load in the filling. The Neubauer chamber is an instrument used in observing its users with a microscope. It has an arrangement of lines that form a standard volume that is essential for counting the cells present in a given sample. This makes the results obtained with ours accurate. Cell counting with the Neubauer chamber is performed in laboratories and small industries. Image processing can improve the use of existing techniques, mainly by increasing reliability and reducing analysis time. In this work, an image processing technician was developed for counting yeasts from Neubauer chamber photographs. The result is a counting software with a precision of approximately 92,4% and that allows a count of 5 seconds.

**Keywords:** Neubauer's Chamber. Image processing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Morfologia de uma célula durante seu ciclo de replicação.....	20
Figura 2.2 - Câmara de Neubauer. Imagem capturada no laboratório do Instituto de Engenharia Biomédica da UFSC. ....	22
Figura 2.3: Subdivisões da câmara de Neubauer.....	23
Figura 3.1 - Arquitetura do fluxo de implementação dos métodos utilizados para detecção de células. ....	25
Figura 4.1 – (a) Imagem sem processamento de uma amostra da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na câmara de Neubauer. (b) Imagem após execução da função para remoção do efeito olho de peixe causado pelo microscópio. (c) Imagem depois da conversão da escala RGB para escala cinza. (d) Imagem após a execução do <i>threshold</i> adaptativo. (e) Imagem após a execução da função de dilatação. (f) Imagem após remoção de pequenos objetos. (g) Imagem somente com a região de interesse. (h) Imagem com identificação das células.....	30
Figura 4.2 - Histograma da frequência dos tamanhos dos raios das células. ....	33
Figura 4.3 - Cor média nas células. ....	33

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 4.1 - Comparação entre métodos de contagem das células. ....	32
Tabela 4.2 - Comparação entre métodos do tempo de contagem das células. ....	32

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	OBJETIVO .....	14
1.2	ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO.....	14
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>15</b>
2.1	PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS .....	15
<b>2.1.1</b>	<b>O pré-processamento.....</b>	<b>15</b>
2.1.1.1	<i>Conversão para escala cinza.....</i>	<i>16</i>
2.1.1.2	<i>Calibração da imagem .....</i>	<i>16</i>
2.1.1.3	<i>Limiarização.....</i>	<i>16</i>
<b>2.1.2</b>	<b>O realce .....</b>	<b>17</b>
2.1.2.1	<i>Dilatação .....</i>	<i>17</i>
2.1.2.2	<i>Filtragem de pequenos objetos.....</i>	<i>18</i>
<b>2.1.3</b>	<b>A classificação .....</b>	<b>18</b>
2.1.3.1	<i>Detecção de contornos .....</i>	<i>18</i>
2.1.3.2	<i>Detecção de área de interesse .....</i>	<i>19</i>
2.1.3.3	<i>Detecção de círculos.....</i>	<i>19</i>
2.2	AS LEVEDURAS .....	20
<b>2.2.1</b>	<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Câmara de Neubauer e contagem celular .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
3.1	Conversão para escala cinza .....	26
3.2	Eliminação do efeito olho de peixe .....	26
3.3	Limiarização ( <i>Thresholding</i> ) .....	26
3.4	Dilatação.....	26
3.5	Remoção de pequenos objetos.....	27

3.6	Detecção de área de interesse .....	27
3.7	Detecção de células.....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>
	<b>APÊNDICE A – Imagens utilizadas para comparação de contagem manual e automatizada.....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O processamento digital de imagens é compatível com ampla gama de aplicações. Existem aplicações cotidianas, como desbloqueio de dispositivos por fotografia e contagem de automóveis em rodovias, e aplicações científicas e industriais, como reconhecimento de padrões de falhas. Geralmente essa técnica é embarcada em sistemas para aprimoramento de processos, uma vez que ela pode acelerar ou aumentar a confiabilidade de determinadas operações. Na área de instrumentação eletrônica é comum recorrer ao processamento automático da imagem para os estudos que necessitam uma maior confiabilidade de resultados (PEDRINI; SCHWARTZ, 2007). Por exemplo, para a contagem de células e mensuração de seus parâmetros.

A mensuração de parâmetros geométricos de células e suas quantidades são utilizadas para avaliar o estado de microrganismos ou de pessoas (no caso de hemograma). Uma técnica robusta para mensurar parâmetros celulares é a citometria de fluxo, mas exige equipamentos de alto custo, e, portanto, é empregada prioritariamente em saúde humana e em pesquisa científica de fármacos. A técnica mais difundida e acessível para mensurar densidade celular é a câmara de Neubauer (BASTIDAS, 2011). Essa câmara requer microscópio para ser observada por um usuário, possibilitando contagens manuais. Apesar de ser amplamente utilizada, a câmara de Neubauer possui algumas limitações, por exemplo a contagem manual pode introduzir erros, pois mesmo uma pequena amostra pode possuir uma grande quantidade de células, e, além disso, causar exaustão e desconforto no usuário. A contagem computacional pode diminuir a probabilidade de erros (aumentando a exatidão e precisão dos resultados obtidos) e aprimorar o conforto do usuário (diminuindo o tempo de uso do microscópio).

Nesse estudo será utilizado suspensões de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para o projeto do sistema de processamento de imagens. A principal característica dessas células é a fermentação intensa, por isso ela é utilizada em processos industriais, tais como, produção de pão, cerveja, álcool combustível, entre outros (TEIXEIRA, 2015). As imagens das células foram tiradas utilizando uma câmara de Neubauer e foi desenvolvido um *software* para processamento de imagens das leveduras com objetivo de detectar e contar as células automaticamente. O processamento desenvolvido foi modular com etapas (funções) bem definidas, contendo pré-processamento que eliminaram as imperfeições e uma etapa de detecção do padrão celular (círculos).

Este trabalho foi motivado pelo seu potencial de aplicação, podendo ser aplicado em empresas e laboratórios de universidades que pesquisem com leveduras, conseguindo trazer mais conforto e agilidade aos usuários. Além disso, essa área de estudo de processamento de imagens é cada vez mais solicitada no currículo de engenheiros e em novas tecnologias.

## 1.1 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um software para detectar e contar leveduras localizadas numa câmara de Neubauer. Foram utilizadas fotografias do quadrado central da câmara.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Desenvolver funções e programa em linguagem *Python*;
- Corrigir a distorção das lentes do microscópio;
- Processar imagens da câmara de Neubauer para reconhecer padrões circulares.

## 1.2 ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho está dividido em 5 capítulos. Na introdução (capítulo 1), é apresentada uma visão geral sobre o trabalho.

No desenvolvimento (capítulo 2) são apresentados os aspectos gerais e terminologias em processamento de imagem, vida celular e contagem, e as técnicas necessárias para contagem de células através de processamento de imagens.

Na metodologia (capítulo 3) são mostrados os detalhes sobre a linguagem de programação utilizada bem como as funções e bibliotecas empregadas no programa.

Nos resultados e discussão (capítulo 4), aborda-se os resultados alcançados durante todo o período de estudo, mostrando o passo a passo das transformações de imagens assim como as dificuldades encontradas ao longo da programação. Por fim, a conclusão (capítulo 5) apresenta as ponderações sobre o trabalho e como ele pode ser aproveitado para a realização de trabalhos futuros.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS

O processamento de imagem é um artifício para possibilitar operações em uma determinada imagem com o intuito de aprimorá-la ou até mesmo extrair informações de interesse do usuário (QUINTANILHA, 1990). Essa ferramenta é composta de técnicas (*i.e.*, funções) de processamento de sinais, onde o sinal de entrada é uma imagem e o sinal de saída pode ser a própria imagem melhorada ou outros recursos associados a ela como número de objetos, escala de cores, entre outros.

Para realizar o processamento de imagem, é necessário que o programa obtenha ou receba uma imagem digital. Geralmente aplica-se em série as etapas de: pré-processamento (etapa 1), realce (etapa 2) e classificação da imagem (etapa 3). Observa-se que essas três etapas podem conter outras sub etapas. A seguir, serão abordados esses três grupos de técnicas de processamento de imagem digital e sub etapas relevantes para este trabalho.

#### 2.1.1 O pré-processamento

Os procedimentos realizados no pré-processamento da imagem têm como propósito reduzir ruídos, corrigir distorções, entre outros, com a finalidade de melhorar o desempenho dos algoritmos computacionais que serão utilizados nas etapas posteriores (RÉZIO; SCHWARTZ; PEDRINI, 2016). O pré-processamento resulta em uma imagem que contém características que possibilitam um melhor aproveitamento dos recursos existentes. Com isso, possibilita-se a correção de imperfeições e melhoramento de características de interesse presentes na imagem que está sendo tratada. Um exemplo de pré-processamento são as correções geométricas, como a distorção de lentes ou correção de perspectiva, correções no histograma da imagem (*e.g.* equalização do histograma) e redução de ruídos. O resultado do pré-processamento geralmente é uma imagem sem distorções, em escala de cinza com contraste bem distribuído e sem ruídos (AL-AMEEN, 2018).

### 2.1.1.1 Conversão para escala cinza

Convertendo uma imagem colorida para a escala cinza ocorre a segmentação dos pixels, tornando a realização de funções de processamento mais eficiente. Na prática uma imagem colorida requer pelo menos três vezes mais poder computacional (se as três cores, vermelho, verde e azul forem processadas).

Matematicamente, a imagem monocromática é descrita por uma função que representa, nas suas coordenadas espaciais, a intensidade de brilho presente em determinado ponto da imagem. Essa proporção de luminosidade é o que caracteriza os níveis de cinza de uma figura (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999) .

### 2.1.1.2 Calibração da imagem

Essa técnica pode minimizar o efeito olho de peixe causado por uma lente, dependendo da parametrização realizada pode-se chegar à eliminação por completo desse efeito. Corrigindo essa distorção, torna-se possível a identificação do tamanho real do objeto, sem as alterações causadas pelo instrumento que foi utilizado para registrar a imagem. Além disso, os próprios objetos ficam com o formato real, sem efeitos indesejados no momento de uma detecção automatizada (LAPOLLI, 2012). Logo, esta técnica faz com que a imagem não tenha efeitos externos causados pela lente fotográfica, possibilitando uma boa identificação dos objetos presentes numa imagem.

### 2.1.1.3 Limiarização

Esse processo também conhecido como *thresholding* ou binarização, é realizado geralmente após converter uma imagem para a escala de cinza. Visa segmentar a imagem, através de um limiar, em pixels pretos ou brancos (OTSU, 1996). O valor do limiar escolhido é o ponto de referência para realizar a conversão dos pixels. Se o valor do pixel estiver abaixo ou acima do limiar, ele será convertido em preto ('1') ou branco ('0'), de acordo com o projeto implementado (PEDRINI; SCHWARTZ, 2007). Nesse caso, uma imagem pode ser limiarizada de acordo com a necessidade do objeto que se deseja discriminar. Essa técnica pode ser

segmentada por dois grupos, sendo eles os pixels com escala de cinza abaixo do limiar e os pixels com escala de cinza acima do limiar.

### 2.1.2 O realce

A técnica de realce usa transformações dos níveis da imagem (geralmente em escala de cinza) com a intenção de melhorar a sua qualidade. A técnica de realce pode tratar os pixels de maneira individual e/ou espacial (RÉZIO; SCHWARTZ; PEDRINI, 2016). Desse modo, a qualidade da imagem tratada é expandida, abrindo horizontes para melhorias e possibilitando maiores níveis de aperfeiçoamento das técnicas de processamento digital. São exemplos de técnica de realce os filtros de média e operações aritméticas (*e.g.* multiplicação e derivadas). O resultado do realce geralmente são imagens com contornos de interesse bem definidos.

#### 2.1.2.1 Dilatação

Essa técnica tem como finalidade expandir uma imagem. A dilatação expande (dilata) os pixels a fim de ligar pontos que antes não eram interligados devido à falta de resolução ou até mesmo devido à algum processamento digital realizado anteriormente. É muito utilizada para aumentar partículas, preencher lacunas ou até mesmo conectar componentes próximos de uma imagem. Para fazer com que a dilatação ocorra de maneira eficiente, faz-se necessário que seja escolhido um conjunto de pixels que serão dilatados em torno do pixel central. A programação realizada deve percorrer o conjunto de pixels escolhido e substituir esses valores pelo valor do pixel central (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999). Portanto, a dilatação é realizada através da escolha de um elemento estruturante<sup>1</sup> que percorre todos os pixels da imagem, unindo pontos semelhantes a ele. Fazendo o procedimento descrito acima, é possível eliminar imperfeições em uma imagem, expandindo o tamanho dos objetos, reparando intrusões e quebras.

---

<sup>1</sup> Um elemento estruturante é um conjunto de coordenadas de pixels que através de uma comparação com a imagem real, possibilita uma transformação morfológica.

### 2.1.2.2 Filtragem de pequenos objetos

O princípio da filtragem ou remoção de pequenos objetos é fazer com que a diferença entre os pixels vizinhos seja amenizada a fim de eliminar possíveis imperfeições (ruídos) presentes na imagem original (SANCHES *et al.*, 2015). Para realizar a suavização de um pixel é utilizado um filtro que faz a média com os valores dos pixels vizinhos. Essa técnica, porém, apresenta uma desvantagem em alguns casos, pois pode danificar objetos que seriam de interesse. Assim sendo, essa técnica ajuda na suavização de pequenos detalhes de uma imagem. Quanto maior o nível de ruído, maior deverá ser o nível de filtro utilizado para tratamento dessas imperfeições.

### 2.1.3 A classificação

A classificação é um procedimento que possibilita a extração de informações da imagem, facilitando reconhecimento de padrões e objetos semelhantes. Na primeira etapa dessa técnica são fornecidas estatísticas que são utilizadas para distinguir as diferentes classes da imagem (*e.g.* áreas que possuem características semelhantes). Na segunda etapa, ocorre a designação dos pixels para cada uma das classes distinguidas, podendo classificar pixel a pixel ou por regiões de interesse. Por fim, a última etapa apresenta os resultados obtidos através da classificação (PEDRINI; SCHWARTZ, 2007).

Com a técnica de classificação é possível especificar as classes pertencentes à imagem e obter dados para a associação dos pixels nas diferentes classes identificadas nesta técnica. O resultado da classificação é geralmente dado em tabela de valores (*e.g.* localização de elementos de interesse na imagem) ou probabilidade de um evento (*e.g.* reconhecimento de padrões).

#### 2.1.3.1 Detecção de contornos

A detecção de contornos é um procedimento importante no processamento de imagens, pois facilita a identificação e reconhecimento dos objetos. Dentro desta funcionalidade, estão as funções de erosão e subtração. A erosão é a técnica utilizada para exclusão de pixels que não se enquadram ao padrão (elemento estruturante) especificado pelo usuário. Já a subtração serve para detectar diferenças entre duas imagens.

Para fazer a detecção de bordas, usa-se um elemento estruturante. Esse elemento perpassa por todos os pixels da imagem fazendo uma erosão, deixando apenas os pontos semelhantes com os pixels da imagem de interesse. Após esse processo, sobram os pixels que não fazem parte da borda. Assim, para se obter somente os pixels das bordas, é necessário realizar a subtração da imagem original pela imagem obtida pela erosão (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

Portanto, essa técnica simplifica o reconhecimento de objetos, através de funções matemáticas que auxiliam no melhoramento do contorno de uma imagem.

#### 2.1.3.2 Detecção de área de interesse

A Região de Interesse ou ROI (*Region Of Interest*) é estabelecida automaticamente com fundamento em parâmetros existentes da imagem ou definidos no momento da programação. Para que o sistema reconheça a área de interesse, é necessário que os processos estejam bem definidos. Por exemplo, se uma imagem possuir um objeto central e um fundo de cor sólida e, nesse caso, o interesse for o objeto central, há diferentes maneiras de fazer a identificação da ROI. Um dos procedimentos possíveis é fazer com que o programa identifique as bordas do objeto e tudo que estiver dentro dele seja a área de interesse. Outra forma é detectar o fundo da imagem e subtrair o que foi encontrado de fundo pela própria imagem (BRINKMANN, 1999). À vista disso, não há uma regra específica para definir uma ROI, conseqüentemente, a ordem de processamento deverá ser especificada de acordo com a necessidade de cada projeto. Nesse trabalho a ROI foi uma das partes da câmara de Neubauer.

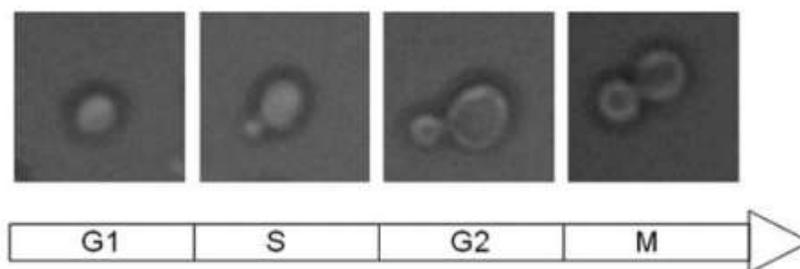
#### 2.1.3.3 Detecção de círculos

Para detectar os objetos de forma semelhante (*e.g.* círculos e quadrados) pode-se usar uma função de detecção geométrica do agente de interesse. Como este trabalho trata de detecção de células de leveduras, utilizou-se a função de detecção de círculos. Com essa função, o usuário também tem a possibilidade de reconfigurar o círculo, tornando ele uma figura oval. Observa-se que até chegar nessa etapa é necessário realizar as técnicas apresentadas anteriormente, a fim de se obter um resultado mais próximo do esperado. Caso contrário, a função de detecção poderá apresentar vários falsos-positivos.

## 2.2 AS LEVEDURAS

Durante seu ciclo de replicação, a célula passa por algumas etapas até chegar no momento da sua divisão ou morte. Essas etapas geralmente são divididas em quatro fases: primeira fase de intervalo (fase G1), fase de síntese (fase S), segunda fase de intervalo (fase G2), fase mitótica (fase M) (YANG YU *et al.*, 2011). Há ciclos que podem demorar cerca de 24 horas, como por exemplo, algumas das células humanas. Existem outros ciclos que possuem duração de 9 a 10 horas quando as células são mantidas em cultura, como é o caso daquelas que revestem o intestino. (RAVEN *et al.*, 2011). A Figura 2.1 mostra a morfologia de uma célula nas suas diferentes fases do ciclo de vida.

Figura 2.1 - Morfologia de uma célula durante seu ciclo de replicação.



Fonte: YANG YU *et al.*, 2011.

Na fase G1, a célula cresce, faz a cópia de suas organelas e gera os componentes moleculares que necessitará nas demais etapas. Na fase S, a célula faz a síntese da cópia do seu DNA no seu núcleo. Além disso, nessa fase também ocorre a duplicação do centrôssomo, que é uma estrutura organizadora de microtúbulos. Esses centrôssomos são utilizados posteriormente para ajudar a separação do DNA na fase mitótica. Na fase G2, a célula cresce um pouco mais e, com isso, produz organelas e proteínas. Ulteriormente, há uma reorganização do conteúdo presente dentro dela como preparativo para a ocorrência da mitose. A fase M é composta pelas etapas de mitose e citocinese. No processo de mitose, o DNA presente no núcleo da célula se condensa em cromossomos visíveis e, através do fuso mitótico, é dissociado formando uma composição de microtúbulos. Um pouco antes da finalização da meiose, a etapa de citocinese já inicia com a separação dos citoplasmas, formando assim, as duas novas células.

O que acontece com as novas células depende muito do tipo de célula que está sendo estudada. Em alguns tipos de células, logo após a divisão, já se inicia um novo ciclo de separação, como no caso das células de um tumor. Em outros tipos, a nova divisão ocorre

lentamente ou até mesmo nem se dividem. Isso depende de fatores externos, como temperatura, pH e concentração de nutrientes (HELD, 2010). O entendimento do ciclo celular é essencial na escolha da célula que será estudada, pois interfere na identificação de sua morfologia. Este trabalho tem como foco as células da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

### **2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae***

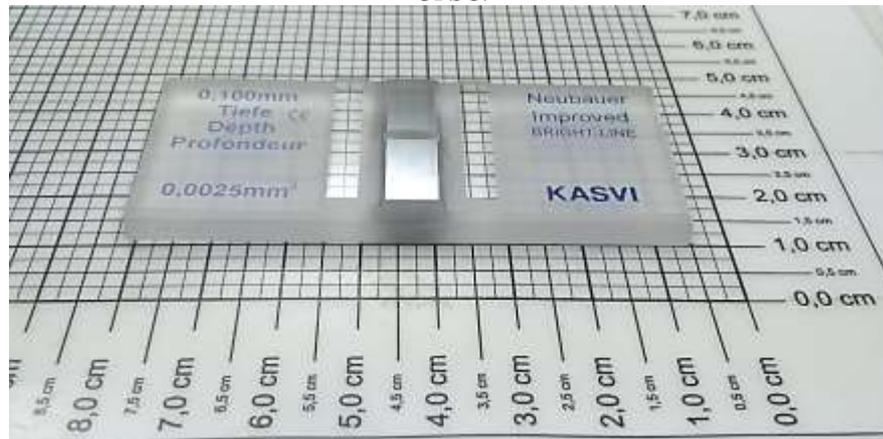
As leveduras do gênero *Saccharomyces* são classificadas como fungos ascomicetos pertencentes à ordem *Saccharomycetales* e à família *Saccharomycetaceae*. Em geral, elas apresentam fermentação intensa, não produzem agrupamentos de amiloides, não necessitam a utilização de nitrato como fonte de nitrogênio e sua primacial fonte de carbono e energia é a glicose (KURTZMAN et al., 2011).

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma espécie de célula muito utilizada em processos industriais aplicados na produção de produtos fermentados (DANTAS, 2018). Por ser um microrganismo eucariótico, é uma boa escolha para o estudo de organelas e complexos proteicos presentes dentro da célula. Além disso, na fase de brotamento a análise da morfologia intracelular dessa levedura torna-se mais eficaz para o entendimento da sua genética, se comparada com outros tipos de células (NEGISHI et al., 2009). Devido a facilidade de manipulação genética, a *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a ter o genoma completo sequenciado (GOFFEAU et al., 1996). Posto isso, por apresentar uma abundante fermentação e por ser uma célula acessível ao estudo morfológico, essa levedura é um modelo exemplar para ser utilizada em procedimentos industriais e estudos celulares.

### **2.2.2 Câmara de Neubauer e contagem celular**

A Câmara de Neubauer (Figura 2.2) é o instrumento mais comum do mundo para realizar contagem de células (BASTIDAS, 2011). Esse equipamento é composto por uma lâmina de cristal, que é dividida em três regiões diferentes padronizadas para facilitar a contagem. A parte central é onde fica a grade de contagem, subdividida em diferentes partes a fim de uniformizar a contagem de qualquer tipo de célula.

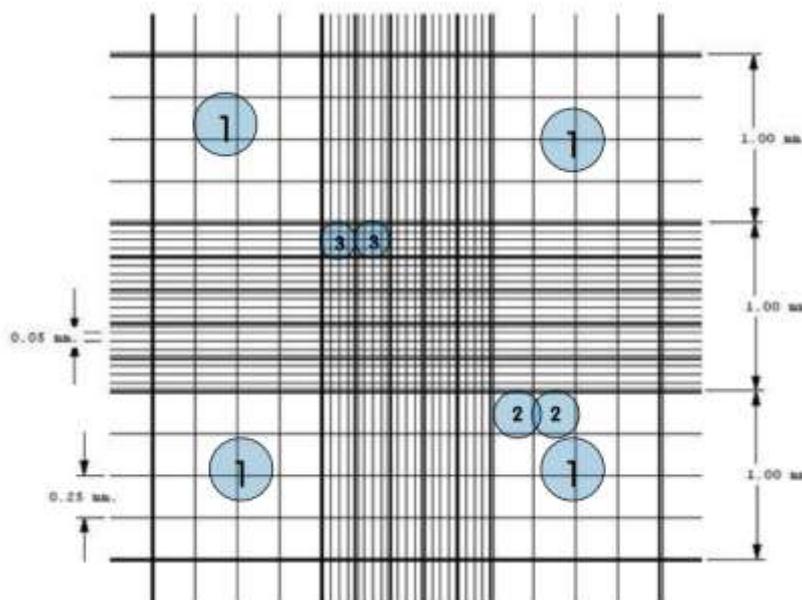
Figura 2.2 - Câmara de Neubauer. Imagem capturada no laboratório do Instituto de Engenharia Biomédica da UFSC.



Fonte: Autor, 2020.

O tamanho da câmara de Neubauer é padrão. No centro da lâmina está desenhado um quadrado de 3 mm x 3 mm subdividido em 9 quadrados de 1 mm x 1 mm, conforme a Figura 2.3. Para este trabalho, a região de interesse é o quadrado central, que possui uma divisão de 25 quadrados de apenas 0,2 mm cada. Esses quadrados (região 3 da Figura 2.3) são subdivididos em 16 quadrados, totalizando 400 pequenos quadrados apenas na área central. Os quadrados presentes nos cantos da grade (região 1 e 2 da Figura 2.3) são utilizados principalmente para contagem de células grandes ou em escassez. Por exemplo, no hemograma, a presença de glóbulos brancos é em menor concentração do que os glóbulos vermelhos (COUNTING CHAMBERS, 2015).

Figura 2.3: Subdivisões da câmara de Neubauer.



Fonte: BASTIDAS, 2011.

Para realizar a contagem nesse tipo de instrumento é necessário seguir alguns passos. Primeiramente, faz-se necessário realizar a preparação da amostra que será utilizada, portanto, é preciso saber se é mandatório algum tipo de diluição. Após preparada a solução, é preciso colocá-la na tampa de vidro do instrumento através de uma micropipeta; essa tampa é posicionada na área central da câmara. Posteriormente, é importante realizar a configuração e focar em um dos 25 quadrados presentes na área central do instrumento.

Há diferentes regras para realizar a contagem das células, que dependem muito em que laboratórios estão sendo realizadas. Porém, há uma regra bastante popular que expõe que “células tocando os limites superior e esquerdo do quadrado devem ser contadas, já as células que tocam os limites inferior e direito não devem ser levadas em conta” (BASTIDAS, 2011).

Nos casos onde a concentração de células fica localizada em mais de uma divisão, utiliza-se a técnica de contagem em ziguezague, para que não haja risco de esquecer algum quadrado (BASTIDAS, 2011). Ao fazer a soma das contagens em todos os quadrados, pode-se calcular a concentração de células presentes por mL da amostra, mediante a equação (1) (COUNTING CHAMBERS, [s. d.]):

$$\text{Concentração} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células} \times 10000}{\text{N}^\circ \text{ de quadrados}} \quad (1)$$

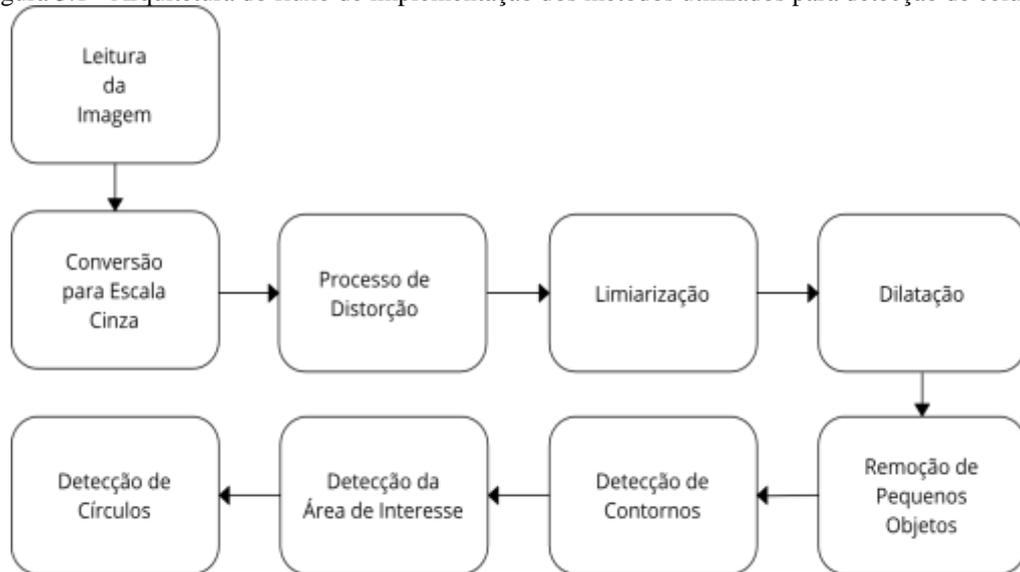
Ressalta-se que, para as situações em que ocorrer diluição, deve-se converter o resultado da equação acima, dividindo o valor da concentração obtida pelo volume de diluente utilizado na amostra.

### 3 METODOLOGIA

A criação da programação para a detecção de células incluiu uma série de métodos de processamentos de imagens. No diagrama de blocos apresentado na Figura 3.1, está apresentado o fluxo de implementação dos métodos utilizados durante a elaboração do trabalho. Isso foi necessário para que, ao final, fossem reconhecidas as células presentes na câmara de Neubauer. As próximas sub secções descrevem as etapas da implementação da contagem celular.

A linguagem de programação utilizada foi *Python* versão 3.7, a IDE utilizada para a programação foi a *PyCharm*<sup>2</sup> versão 2020.1. A principal biblioteca utilizada na programação foi *OpenCV*<sup>3</sup>. O computador utilizado para o desenvolvimento do programa possuía processador Intel ® Core™ i5-5200U CPU @ 2.20 GHz 2,19 GHz, memória RAM de 4 G e disco rígido de 300 GB. Nas subsecções a seguir, serão explicados como cada método foi desenvolvido através de uma IDE para programação em linguagem *Python*.

Figura 3.1 - Arquitetura do fluxo de implementação dos métodos utilizados para detecção de células.



Fonte: Autor, 2020.

<sup>2</sup> Website: <https://www.jetbrains.com/pycharm/>

<sup>3</sup> Website: <https://opencv.org/>

### 3.1 CONVERSÃO PARA ESCALA CINZA

A imagem, após carregada (leitura da imagem) foi convertida para a escala cinza, para que posteriormente fosse segmentada através dos níveis de cinza da imagem. Para convertê-la para escala de cor cinza, foi utilizada a função “`cv2.cvtColor`” que serve para converter a escala de cores dos pixels (OPENCV, 2019). Nesse caso, foi utilizada a conversão RGB (definida pelos níveis de vermelho, verde e azul, respectivamente) para tipo *gray* (*i.e.*, escala de cinza).

Após a conversão para escala de cinza, os pixels foram descritos por valores únicos que são os dos níveis de cinza da imagem. A escala de cinza é em 8-bits (0 a 255) que é uma resolução comum no tratamento dos gradientes dos pixels da imagem.

### 3.2 ELIMINAÇÃO DO EFEITO OLHO DE PEIXE

Com o intuito de deixar os objetos mais próximos dos seus formatos originais, utilizou-se a função “`cv2.undistort`” para retirar o efeito olho de peixe causado pelas lentes do microscópio. Essa operação é importante para que as distorções deixassem de impactar no formato original dos objetos.

### 3.3 LIMIAÇÃO (THRESHOLDING)

Nessa etapa do programa, foi utilizada a função “`cv2.adaptiveThreshold`”. Essa função executa uma limiarização adaptativa, convertendo a imagem de escala cinza para uma imagem de escala binária. Então, a matriz da imagem que antes apresentava valores de 0 a 255, após a transformação, apresenta somente valores 0 e 1.

A execução do *threshold* fez a separação das diferentes regiões da imagem, tornando possível a distinção entre fundo (divisões da câmara de Neubauer) e objetos (células).

### 3.4 DILATAÇÃO

A imagem pode perder alguns detalhes após a limiarização. Por exemplo, elementos geométricos (como círculos) podem ficar desconexos e atrapalhar a computação. Como o elemento de interesse desse projeto foram as células, foi necessário que elas possuíssem

contornos bem definidos a fim de diminuir a probabilidade de não detecção. Por isso, foi adicionado a etapa de dilatação, que conecta os componentes da imagem que acabaram sofrendo algum tipo de alteração devido aos procedimentos realizados anteriormente.

Antes de executar essa função, foi preciso definir os elementos estruturantes para obter uma resposta em que as bordas das células fossem preenchidas corretamente. Foi definido um elemento estruturante de 5x5 pixels, ou seja, a cada pixel averiguado na imagem, a função operava por toda a vizinhança de 5 pixels em torno do principal e preenchia as lacunas onde havia falhas entre os componentes.

### 3.5 REMOÇÃO DE PEQUENOS OBJETOS

Após a dilatação, muitos elementos sem interesse na imagem (como ruídos) aumentaram seu tamanho consideravelmente. Então, foi necessário realizar a remoção desses elementos a fim de deixar a imagem alva o suficiente para que não houvesse falsos positivos. A função utilizada para fazer esse processamento foi a “*cv2.connectedComponentsWithStats*”.

### 3.6 DETECÇÃO DE ÁREA DE INTERESSE

Para extrair valores de densidade celular com a câmara de Neubauer é necessário que a contagem ocorra dentro de uma região de interesse (ROI). Para realizar essa função, utilizou-se a “*cv2.selectROI*”. A ROI foi definida como o quadrado principal da câmara de Neubauer (ver Figura 2.3).

### 3.7 DETECÇÃO DE CÉLULAS

A última etapa da programação foi realizar a detecção de formas circulares presentes na imagem a fim de identificar as células para contagem e estudo morfológico. As leveduras geralmente são elipsoidais ou semiesféricas. Neste trabalho as células foram aproximadas em seu raio médio. A função utilizada para identificar as células presentes na amostra de levedura foi “*cv2.HoughCircles*”. Essa função foi parametrizada a fim de pegar o formato que mais se identificava com uma célula.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 4.1(a) apresenta uma amostra de leveduras colocadas em uma câmara de Neubauer e faz parte do banco de imagens do grupo Electroporation UFSC<sup>4</sup>. Foi registrada com câmera de celular (12 MP, f/2.2, 26 mm, Xiaomi Redmi 5 Plus) através de um microscópio e está sem nenhum tipo de processamento de imagem. Na Figura 4.1(a), as linhas de grade da câmara de Neubauer estão distorcidas devido ao efeito olho de peixe do microscópio. Esse tipo de situação necessita de correção para detecção de alterações morfológicas presentes nas células.

O resultado da correção da distorção (efeito olho de peixe causado pelas lentes do microscópio) foi conforme a Figura 4.1(b). Essa possui linhas de grade da câmara de Neubauer retas, ou seja, o tratamento corrigiu a distorção das lentes. Essa imagem foi segmentada em níveis de cinza, conforme a Figura 4.1(c) (imagem com apenas tons acinzentados).

O *threshold* adaptativo separa as diferentes regiões da imagem, distinguindo as divisões da câmara de Neubauer das células, conforme apresentado na Figura 4.1(d). Apesar da possibilidade de distinguir o fundo dos objetos, constata-se que após a execução do *threshold* adaptativo a imagem apresentou algumas falhas nos contornos das células.

A dilatação corrigiu as falhas nos contornos das células. A Figura 4.1(e) apresenta a imagem após a aplicação da função. Nesta, os contornos das células estão todos conectados, portando, melhor definidos do que a figura anterior. Apesar de melhorar a definição dos contornos, essa função aumentou os ruídos na imagem.

Com a remoção de pequenos objetos foi possível remover os ruídos introduzidos na dilatação. Na Figura 4.1(f) a imagem possui quantidade menor de ruídos se comparada com a anterior (Figura 4.1(e)). Observa-se que essa técnica ajudou na detecção dos objetos de interesse a serem estudados, pois evitou que diversos dos ruídos causados pelos processamentos anteriores fossem confundidos com as células. Após a realização desse tratamento, nota-se que a imagem tratada apresenta, na sua maioria, apenas os objetos de interesse, quase sem interferência de ruídos. Assim, foi possível enxergar com melhor nitidez o delineamento das células e das formas da câmara de Neubauer.

Para corresponder com os métodos que usam câmara de Neubauer, foi executada a função para detectar somente a ROI. Na Figura 4.1(g), percebe-se que a ROI escolhida foi o

---

<sup>4</sup> Website: [electroporation.ufsc.br](http://electroporation.ufsc.br)

quadrado principal das linhas de grade da câmara de Neubauer. Com isso, foi possível chegar a um resultado eficiente quantitativamente da amostra de leveduras utilizada.

A etapa final consistiu-se em detectar as formas circulares presentes na Figura 4.1(h). Essa função possibilitou a reconhecer as formas que mais se enquadravam no formato de uma célula. Além disso, ao realizar a função foi possível contabilizar o número de células detectadas dentro da região de interesse.

A Figura 4.1(h) apresenta um resultado esperado e satisfatório da detecção celular, com baixa incidência de falsos-positivos na detecção de leveduras. A detecção das células foi a última etapa desenvolvida. Antes dela, foi necessário realizar uma série de pré-processamentos a fim de eliminar a ocorrência de falsos-positivos. Na Tabela 4.1 está apresentada o paralelo da contagem de células realizada manualmente e a resposta do programa. O erro percentual foi computado com a equação (2), considerando a contagem manual como valor verdadeiro. A Tabela 4.2 traz a diferença de tempo de contagem para os dois métodos. A contagem manual foi realizada pela autora do trabalho. As imagens utilizadas para construção das tabelas estão presentes no apêndice A.

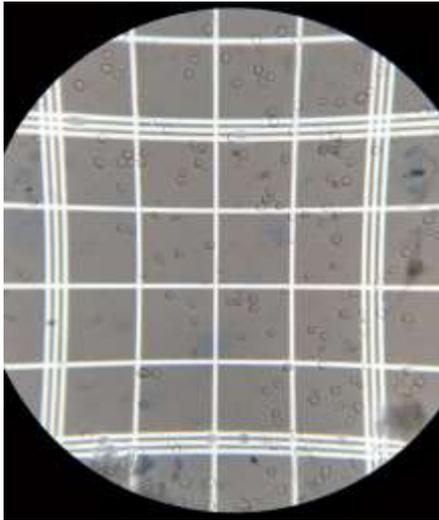
$$\%Erro = \frac{Valor AUT - Valor CM}{Valor CM} \times 100 \quad (2)$$

Há uma diferença entre a contagem manual e a automática, o erro percentual médio é 7,6%. O pesquisador usuário do *software* pode optar em função de seus requerimentos se esse erro é aceitável. Além disso, a contagem realizada pelo programa foi mais rápida (média de 2 vezes, considerando a contagem de um usuário treinado). Salienta-se que o tempo de contagem do pesquisador pode demorar mais do que previsto, pois em algumas vezes pode ser necessária mais de uma contagem da amostra analisada. Além da vantagem na rapidez na contagem, o método automático pode ser viável. Observa-se também que a contagem automática possui desvios definidos e conhecidos, isso se traduz em precisão nas contagens, ou seja, maior confiabilidade na análise da amostra.

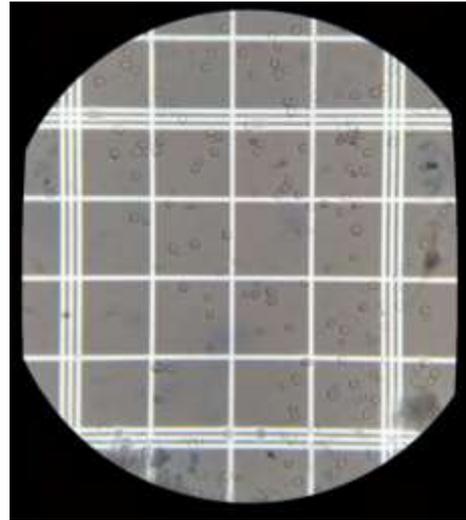
Após a contagem, foi identificado alguns parâmetros da imagem que possibilitaram o estudo da morfologia das células detectadas. O primeiro parâmetro utilizado foi a detecção do raio das células. A função de detecção de círculos retorna os valores aproximados das coordenadas  $x$  e  $y$  do centro da célula e o raio. Com isso, foi possível identificar em qual fase do ciclo de vida a célula estava no momento da análise microscópica.

Figura 4.1 – (a) Imagem sem processamento de uma amostra da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na câmara de Neubauer. (b) Imagem após execução da função para remoção do efeito olho de peixe causado pelo microscópio. (c) Imagem depois da conversão da escala RGB para escala cinza. (d) Imagem após a execução do *threshold* adaptativo. (e) Imagem após a execução da função de dilatação. (f) Imagem após remoção de pequenos objetos. (g) Imagem somente com a região de interesse. (h) Imagem com identificação das células.

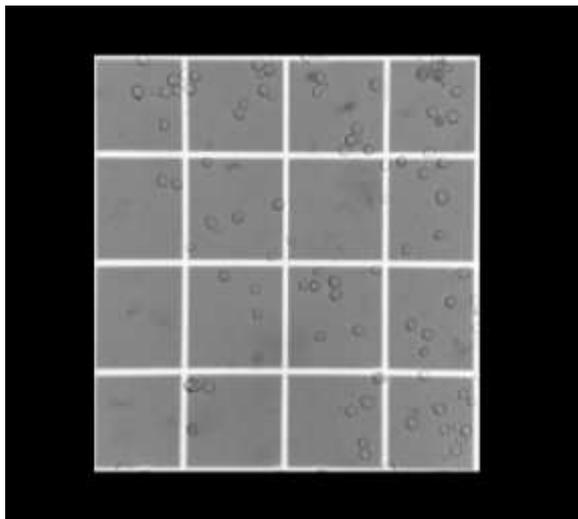
(a)



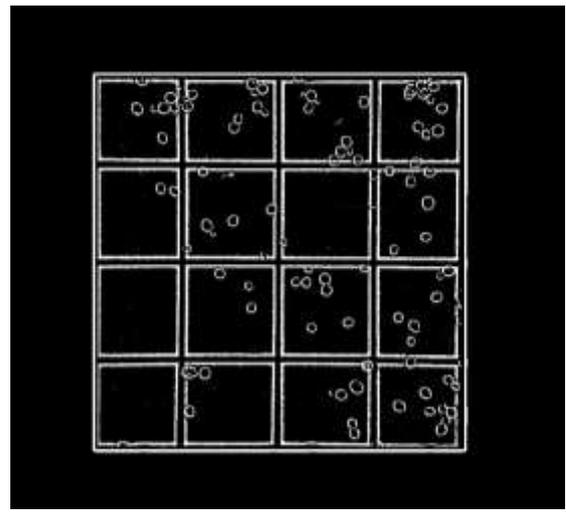
(b)



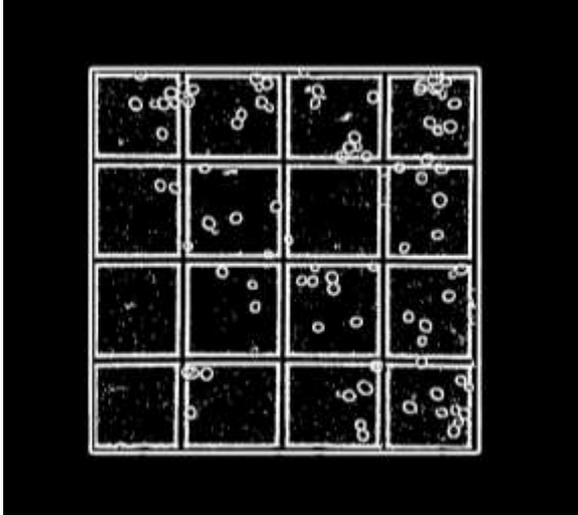
(c)



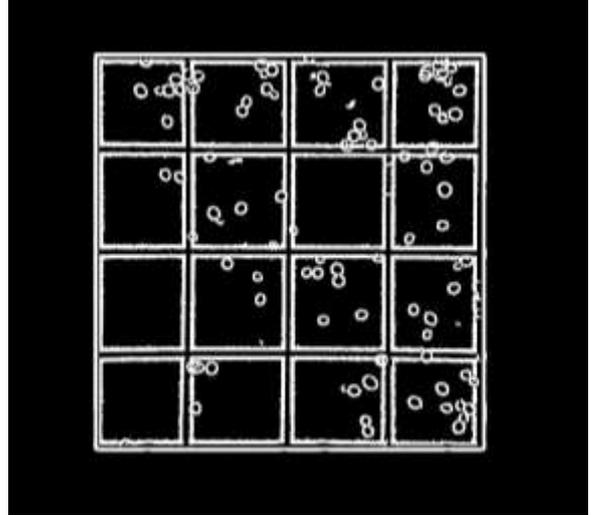
(d)



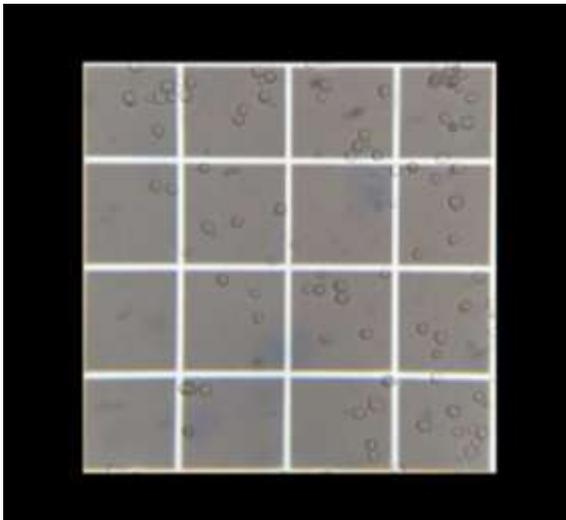
(e)



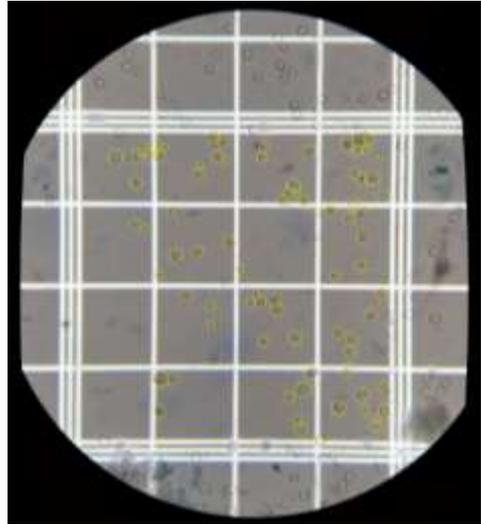
(f)



(g)



(h)



Fonte: Autor, 2020.

Tabela 4.1 - Comparação entre métodos de contagem das células.

<b>Imagem</b>	<b>Valor da Contagem Manual (Valor CM)</b>	<b>Valor da Contagem Automatizada (Valor AUT)</b>	<b>%Erro</b>
A	93	81	12
B	69	56	13
C	71	70	1
D	108	110	2
E	73	63	10

Fonte: Autor, 2020

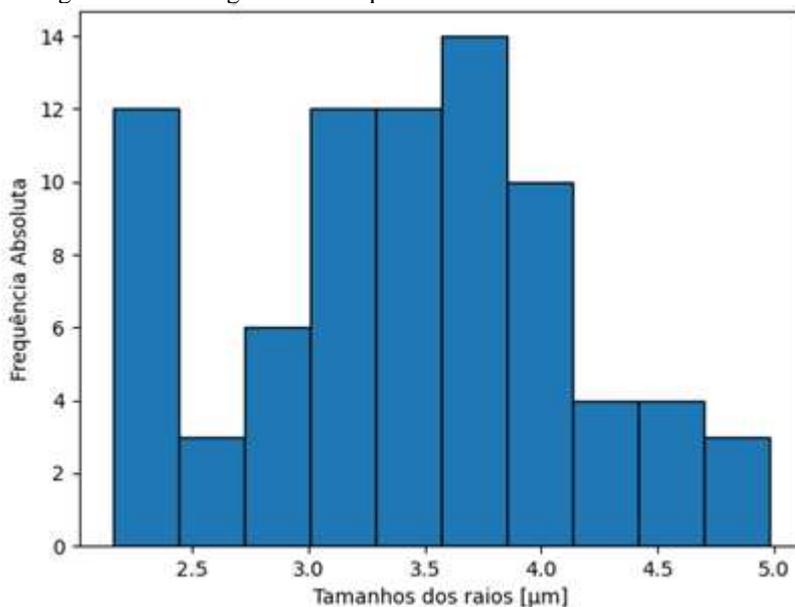
Tabela 4.2 - Comparação entre métodos do tempo de contagem das células.

<b>Imagem</b>	<b>Tempo da Contagem Manual (Valor CM) [segundos]</b>	<b>Tempo da contagem automatizada (Valor AUT) [segundos]</b>	<b>Razão entre métodos (CM/AUT)</b>
A	81	51	1,58
B	71	32	2,21
C	69	39	1,77
D	108	59	1,83
E	73	32	2,28

Fonte: Autor, 2020

Com o intuito de estimar a quantidade de células versus o tamanho dos raios, foi implementado o histograma da Figura 4.2 para visualizar de maneira mais direta o tamanho das células presentes na amostra analisada. Observa-se que isso não é possível tradicionalmente com a câmara de Neubauer, pois ela não fornece uma escala para o usuário quantificar tamanhos celulares a olho nu. A maioria das células utilizadas na imagem dada como exemplo (Figura 4.1(a)) possuem tamanho de raios entre 3 e 4 micrometros. A ficha técnica da levedura utilizada (ATCC® 36900™), possui o tamanho médio dessa célula entre 4 micrometros. Sendo assim, o resultado obtido através do programa executado foi bem próximo à ficha do produto da levedura utilizada (ATCC, 2013). Percebe-se também muitas células com tamanho do raio de 2 micrometros, que são os brotos das células da Figura 4.1(a). Esse valor está dentro do esperado, pois estudos mostram que a variação de tamanho inicial e final dessa levedura é de aproximadamente 2 a 4,4 micrometros (JANSSENS; VEENHOFF, 2016).

Figura 4.2 - Histograma da frequência dos tamanhos dos raios das células.



Fonte: Autor, 2020.

As alterações de cores (geradas por marcadores celulares) podem ocorrer devido a algum tratamento químico para salientar anomalias, foi feita a análise das cores em cada célula, sendo emitido um aviso ao rodar o programa caso alguma célula saia fora do padrão normal de cores. Vale ressaltar que, pelo motivo das células possuírem um corpo transparente, o padrão adotado para a identificação de normalidade foi a escala RGB cinza, devido à cor do fundo da câmara de Neubauer que é refletido nas células. Então, se qualquer célula sair dos limites de cinza, estipulado entre 110 e 160 para R, G e B, ocorre uma sinalização ao usuário do sistema. Após a execução da análise é possível que o usuário identifique também a cor média no padrão RGB de todas as células, conforme mostrado na Figura 4.3.

Figura 4.3 - Cor média nas células.

```
Cor média das células (R): 182.0
Cor média das células (G): 180.0
Cor média das células (B): 172.0
```

Fonte: Autor, 2020.

Identificou-se que a maior parte dos erros está associada à posição da célula na câmara de Neubauer, não foram detectadas células localizadas acima das linhas brancas e células

sobrepostas. Por este motivo, sugere-se em trabalhos futuros desenvolver técnicas de processamento de imagem que consigam detectar se as células estão aglomeradas ou até mesmo conectadas, como nos casos de brotamento. Além disso, sugere-se o desenvolvimento de uma função para identificar a cor individual de cada imagem para possibilitar identificação de alterações morfológicas após algum tratamento químico. Outra melhoria sugerida é a criação de uma interface gráfica (aplicativo) para facilitar uso de um usuário final.

## 5 CONCLUSÃO

Com o estudo realizado e com a construção do programa de detecção de células presentes em uma câmara de Neubauer, foi possível obter de maneira ágil e assertiva, a concentração de leveduras presentes em uma amostra. Além do mais, o programa possibilita ao usuário a identificação de alterações morfológicas causadas por tratamentos químicos.

Como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é muito utilizada em processos industriais aplicados a produtos fermentados, o programa desenvolvido pode alavancar e aprimorar esses tipos de produções. Sabendo como as células se comportam em determinado tratamento químico, faz-se possível a criação de novas fórmulas para desenvolvimento de novos produtos que utilizam fermentação no seu processo.

Por fim, o trabalho pode ser continuado com a elaboração de novas técnicas que possibilitem a detecção de células que estão aglomeradas ou acima das linhas de grade da câmara de Neubauer, com a identificação da cor individual de cada imagem com o intuito de reconhecer alterações morfológicas após algum tratamento químico e do desenvolvimento de uma interface gráfica para facilitar a utilização do *software*.



## REFERÊNCIAS

- AL-AMEEN, Zohair. Expeditious contrast enhancement for grayscale images using a new swift algorithm. **Statistics, Optimization and Information Computing**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 577–587, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.19139/soic.v6i4.436>
- ATCC, American Type Culture Collection. **Product Sheet: Saccharomyces cerevisiae**. [S. l.: s. n.], 2013.
- BASTIDAS, Oscar. Conteo Celular con Hematocitómetro. **Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting**, [s. l.], p. 1–6, 2011.
- BRINKMANN, Ron. **The Art and Science of Digital Compositing**. [S. l.]: Morgan Kaufmann, 1999.
- CLETUS KURTZMAN J.W. FELL TEUN BOEKHOUT. **The Yeasts - 5th Edition**. [S. l.: s. n.], 2011. *E-book*.
- COUNTING CHAMBERS. [s. l.], n. page 313, [s. d.]. p. 56. Disponível em: [http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900\\_05\\_Clinical\\_Lab\\_Zaehlkammern\\_e.pdf](http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_e.pdf)
- DANTAS, Eliana. **O papel da levedura Saccharomyces cerevisiae na saúde intestinal**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://opresenterural.com.br/o-papel-da-levedura-saccharomyces-cerevisiae-na-saude-intestinal/>. Acesso em: 20 abr. 2020.
- GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 genes. **Science**, [s. l.], v. 274, n. 5287, p. 546–567, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>. Acesso em: 23 ago. 2020.
- HELD, Paul. Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of Saccharomyces Cerevisiae. **BioTek Instruments**, [s. l.], n. 18, p. 1–6, 2010. Disponível em: [www.biotek.com](http://www.biotek.com)
- JANSSENS, Georges E.; VEENHOFF, Liesbeth M. The natural variation in lifespans of single yeast cells is related to variation in cell size, ribosomal protein, and division time. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1–18, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167394>
- LAPOLLI, Édis Mafra. **PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS: UMA ABORDAGEM UTILIZANDO CONJUNTOS DIFUSOS**. Florianópolis: [s. n.], 2012.
- MARQUES FILHO, Ogê.; VIEIRA NETO, Hugo. **Processamento digital de imagens**. [S. l.]: BRASPORT, 1999.
- NEGISHI, Takahiro; NOGAMI, Satoru; OHYA, Yoshikazu. Multidimensional quantification of subcellular morphology of Saccharomyces cerevisiae using CalMorph, the high-throughput image-processing program. **Journal of biotechnology**, [s. l.], v. 141, n. 3–4, p. 109–117, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.03.014>
- OTSU; N. A threshold selection method from gray-level histograms. **IEEE Trans. on Systems**,

**Man and Cybernetics**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 62–66, 1996.

PEDRINI, Hélio; SCHWARTZ, William Robson. **Análise de Imagens Digitais: Princípios, Algoritmos e Aplicações**. [S. l.: s. n.], 2007.

QUINTANILHA, José Alberto. Processamento de Imagens Digitais. São Paulo, p. 37–52, 1990.

RAVEN, Peter H. *et al.* **How Cells Divide**. New York: [s. n.], 2011.

RÉZIO, Ana Carolina Correia; SCHWARTZ, William Robson; PEDRINI, Hélio. Super-Resolução De Imagens Baseada Em Aprendizado Utilizando Descritores De Características. [s. l.], p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21528/cbic2011-15.4>

SANCHES, Carlos H *et al.* Técnicas de Suavização de Imagens e Eliminação de Ruídos. **Anais do EATI - Encontro Anual de Tecnologia da Informação e Semana Acadêmica de Tecnologia da Informação**, [s. l.], v. 1, p. 21–30, 2015. Disponível em: <http://eati.info/eati/2015/assets/anais/Longos/L2.pdf?fbclid=IwAR2-2SWLzc4T7htAzlFpOFEOtCu-TYd1zbxUS-E2UbWP2zhdLdsZ2LEpBE>

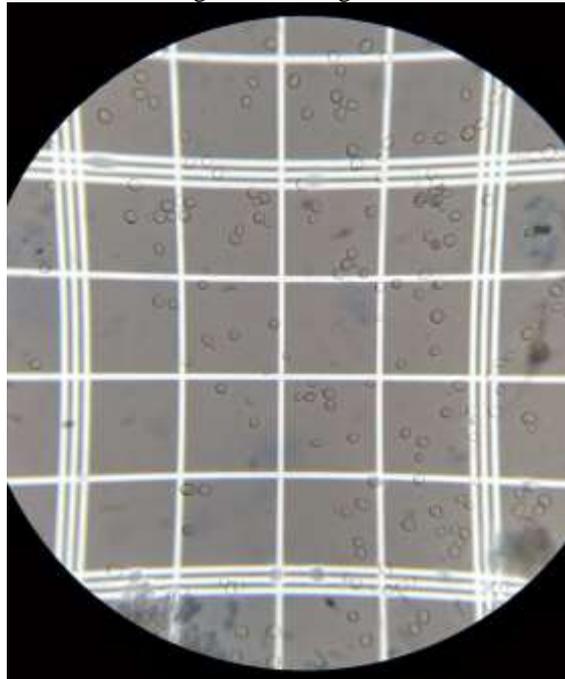
TEIXEIRA, JULIANA DE FREITAS. **A LEVEDURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE: CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO, DOMESTICAÇÃO E IMPORTÂNCIA NA COMPOSIÇÃO DE VINHOS**. 10–17 f. 2015. - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, [s. l.], 2015.

YANG YU, Bo *et al.* Image processing and classification algorithm for yeast cell morphology in a microfluidic chip. **Journal of Biomedical Optics**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 066008, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1117/1.3589100>

## APÊNDICE A – IMAGENS UTILIZADAS PARA COMPARAÇÃO DE CONTAGEM MANUAL E AUTOMATIZADA

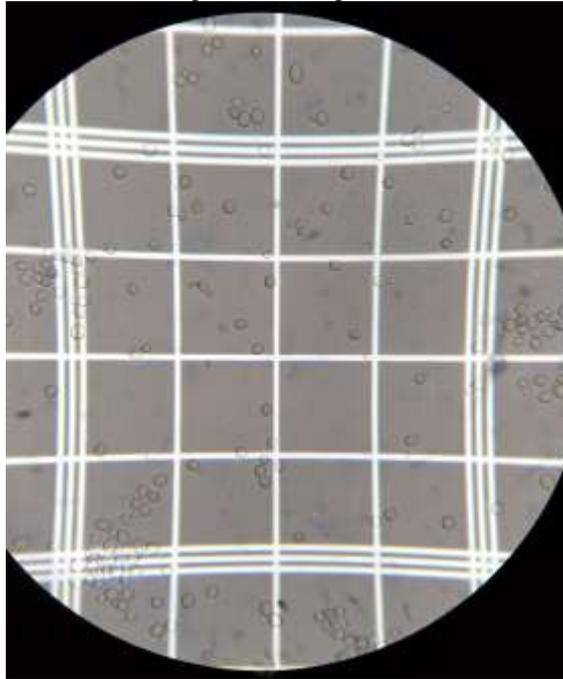
Neste apêndice estão apresentadas as imagens (Figuras A à E) utilizadas para calcular a porcentagem de erro entre a contagem manual e a contagem realizada pelo programa elaborado. Essas imagens fazem parte do banco de imagens do grupo Electroporation UFSC.

Figura A - Imagem A



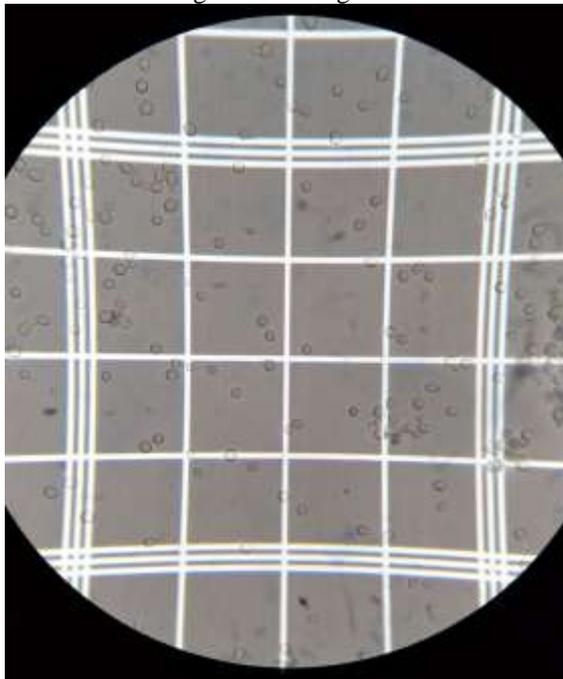
Fonte: Autor, 2020.

Figura B - Imagem B.



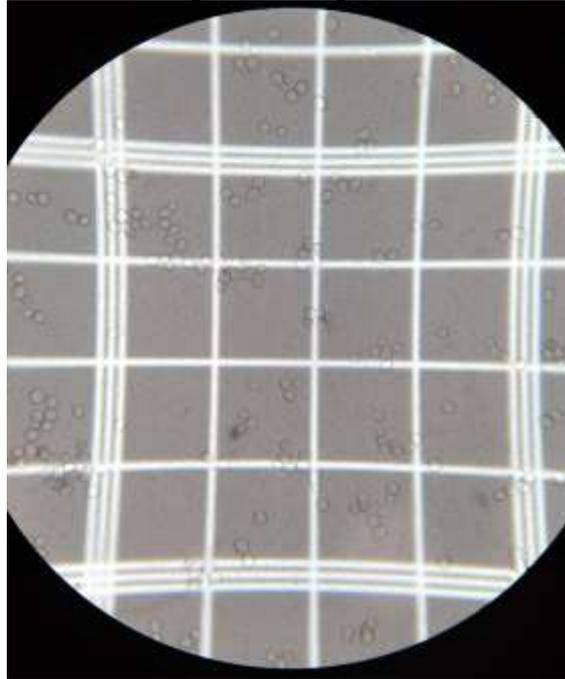
Fonte: Autor, 2020.

Figura C - Imagem C



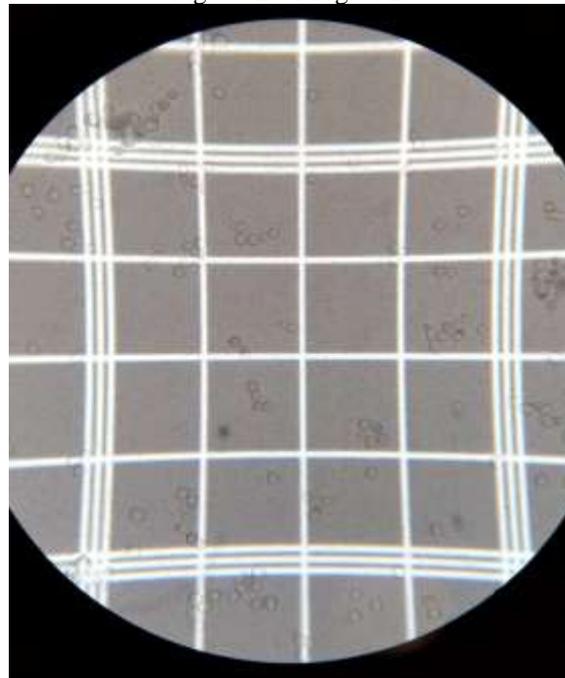
Fonte: Autor, 2020.

Figura D - Imagem D.



Fonte: Autor, 2020.

Figura E - Imagem E.



Fonte: Autor, 2020.