

INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

ROGÉRIO FREITAS DE OLIVEIRA

**FRACTAIS E O CRESCIMENTO MICROBIANO: UM NOVO
HORIZONTE ENTRE A MATEMÁTICA E A MICROBIOLOGIA**

LONDRINA

2019

INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

ROGÉRIO FREITAS DE OLIVEIRA

**FRACTAIS E O CRESCIMENTO MICROBIANO: UM NOVO
HORIZONTE ENTRE A MATEMÁTICA E A MICROBIOLOGIA**

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade
Estudo de Caso, apresentado ao curso Técnico
em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio do
Instituto Federal do Paraná.

LONDRINA

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

ROGÉRIO FREITAS DE OLIVEIRA

FRACTAIS E O CRESCIMENTO MICROBIANO: UM NOVO
HORIZONTE ENTRE A MATEMÁTICA E A MICROBIOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade
Estudo de Caso, apresentado ao Curso Técnico em
Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio do Instituto
Federal do Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do título de Técnico em Biotecnologia.

Orientadora: _____

Profa. Kátia Socorro Bertolazi

Profa. Gabrielle Jacklin Eler

Profa. Angela Meneghello Passos

Londrina, 11 de novembro de 2019.

Dedico esse trabalho a minha mãe, que sempre me apoiou, me deu forças e alegria para continuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por me incentivarem e me darem forças em minha trajetória.

Agradeço à Aline Prezotti Toledo Piza pelo amor, paciência e por sempre estar ao meu lado, a todo momento.

Agradeço ao Edvaldo Rodrigues de Oliveira Júnior, à Fernanda Landin da Silva e ao Renan Felipe Santos José por serem as melhores pessoas desse mundo.

Agradeço à Bianca da Rocha Cordeiro e à Camille Ferreira Guazzelli, que são minhas irmãs de coração e por me darem suporte nessa caminhada.

Agradeço ao Daniel Felipe Piva dos Santos, ao Gabriel Hideki Saita, à Eduarda Cristina Catandubas Goulart, à Isadora Aviles Cabrera Nuvoli Correia, à Jéssica Larissa Pais dos Santos, ao João Daniel Andrade Bezerra e à Lorena Ricken Rodrigues por contribuírem com o processo de desenvolvimento do trabalho, cada um de sua forma.

Agradeço a meus professores pela contribuição para minha formação, em especial à Profa. Kátia Socorro Bertolazi, ao Prof. Reinaldo Benedito Nishikawa, ao Prof. Omar Arafat Kdudsi Khalil e à Profa. Cristiani Baldo da Rocha.

Agradeço à banca de docentes avaliadores que aceitou o convite para participar desse momento importante de minha formação acadêmica.

Agradeço ao *Institute of Livestock and Grassland Science, NARO (NILGS)*, do Japão por disponibilizar de forma gratuita o *software Fractal Analysis System for Windows™* utilizado para elaborar análises dos dados coletados neste trabalho. Igualmente, agradeço ao Laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual de Londrina por ceder o espaço e insumos necessários para o desenvolvimento dos experimentos realizados.

Por fim, agradeço ao corpo docente do Colegiado do Curso de Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio e ao Instituto Federal do Paraná – Campus Londrina por me proporcionar uma formação acadêmica de qualidade.

Muito obrigado!

“Cada vez mais, a Matemática demandará coragem para enfrentar suas implicações.”

Michael Crichton, Jurassic Park.

RESUMO

Fractais são considerados figuras geométricas complexas e quando é feita a sua ampliação não há desconfiguração de sua forma. Desde o início de pesquisas relacionadas ao tema, os fractais já foram chamados de "monstros matemáticos" e muitas dificuldades foram enfrentadas para que pudéssemos ter seu entendimento. Atualmente esse ramo da Geometria não euclidiana é aplicado na Medicina, na Biologia, na Mineralogia, entre outras áreas do conhecimento. O objetivo do presente trabalho é relacionar noções conceituais de Geometria fractal em Microbiologia, visando a compreensão de representações de uma pela outra a partir da análise de imagens de placas de petri inoculadas com microrganismo mediante o uso de um *software* de computador. O *software* em questão faz uso do método de contagem de caixas para analisar as imagens e, a partir disso, gera dados e gráficos com base em dimensão fractal. Este trabalho é de natureza qualitativa e a metodologia adotada foi o estudo de caso, a fim de atingir objetivos estabelecidos por meio da coleta de dados de forma empírica. Desse modo, foi possível detectar que, conforme as colônias de microrganismos se proliferam, o número da dimensão fractal referente aos meios cresce exponencialmente. Entretanto, devido à pequena variação de disparidade numérica, visualmente os gráficos expressam de forma sutil essa diferença.

Palavras-chave: Fractais. Microbiologia. Contagem de Caixas. Estudo de Caso.

ABSTRACT

Fractals are considered complex geometric figures, because as they are enlarged there is no deconfiguration of their shape. From the beginning of research related to the subject, fractals have been called "mathematical monsters" and many difficulties were faced so that we could have their understanding. Currently this branch of non-Euclidean geometry is applied in Medicine, Biology, Mineralogy, among other areas of knowledge. The aim of the present work is to relate the conceptual notions of fractal geometry in Microbiology, using the understanding of representations again and again from the analysis of images of microorganism inoculated petri dishes using computer software. The software in question makes use of the box counting method to analyze how images and, from that, generates data and graphics based on the fractal dimension. This work is qualitative in nature and the methodology adopted was the case study, in order to achieve the objectives established through empirically collecting data. Thus, it was possible to detect that, as the colonies of microorganisms proliferate, the number of the fractal dimension referring to the media grows exponentially. Thus, it was possible to detect that, as the colonies of microorganisms proliferate, the number of the fractal dimension referring to the media grows exponentially. However, due to the slight variation in numerical disparity, graphs visually subtly express this difference.

Key-words: *Fractals. Microbiology. Box Counting. Case Study.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Função de Weierstrass	15
FIGURA 2 – Conjunto de Cantor	16
FIGURA 3 – Auto similaridade de uma couve-flor	17
FIGURA 4 – Conjunto de Mandelbrot	18
FIGURA 5 – Comparação entre a dimensão Euclidiana e a dimensão fractal	18
FIGURA 6 – O comprimento da costa da Britânia coberto de círculos	19
FIGURA 7 – Método de <i>Box Counting</i>	21
FIGURA 8 – Efeitos da temperatura no crescimento microbiano	23
FIGURA 9 – Efeitos do pH no crescimento microbiano	24
FIGURA 10 – Crescimento microbiano	26
FIGURA 11 – Menus do <i>software</i> computacional utilizado	31
FIGURA 12 – Imagens obtidas de placas petri ao se utilizar o recurso Gray scale	32
FIGURA 13 – Identificação de eixos cartesianos do <i>software Fractal Analysis System for Windows™</i>	33
FIGURA 14 – <i>Box counting</i> das Imagens 1 a 3	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 TEMA	12
1.2 PROBLEMA	12
1.3 HIPÓTESE	13
1.4 OBJETIVO GERAL	13
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
1.6 JUSTIFICATIVA	13
2 DESENVOLVIMENTO	14
2.1 Fractais: a complexa Geometria da natureza	14
2.2 Microbiologia: a Ciência do mundo invisível	22
3 METODOLOGIA	27
4 ANÁLISE DOS DADOS E RESULTADOS	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE 1	40

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa em relação aos fractais de fato não é algo recente. Desde o século XVII, matemáticos já começavam a explorar a superfície de figuras até então desconhecidas. Porém, paravam no começo devido à falta de recursos para prosseguirem com sua pesquisa. Karl Weierstrass, Helge von Koch e Gaston Julia são alguns dos matemáticos que contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa de fractais (PODHOSTNIK, 2012).

A temática da Geometria fractal ganhou visibilidade na comunidade científica a partir das pesquisas de Benoit Mandelbrot. Esse matemático francês estava insatisfeito pelo fato de a Geometria clássica não dispor de representações abstratas adequadas para investigar e compreender a complexidade de formas observadas na natureza (NUNES, 2006). Conforme Barbosa (2005, p.12), “a geometria fractal de Mandelbrot reflete uma natureza de irregularidades, de reentrâncias, saliências e depressões, de fragmentação”.

Nesse sentido, fractais constituem um recurso que pode ser adotado em investigações relacionadas à Microbiologia, área do conhecimento dedicada ao estudo dos microrganismos, suas características, formas e variação de seu crescimento. Madigan *et al.* (2016, p.2) explicam que a microbiologia trata de “[...] dois temas que estão interconectados: (1) o entendimento da natureza e funcionamento do mundo microbiano, e (2) a aplicação do nosso entendimento acerca da microbiologia para benefício da humanidade e do planeta Terra”.

A articulação entre fractais e conceitos de microbiologia torna possível o desenvolvimento de novas representações e interpretações quanto ao crescimento de microrganismo. Nesse contexto, o uso de *softwares* de computador colabora para a organização, manipulação e análise de dados, a fim de proporcionar a obtenção de novas informações.

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foi utilizada a estratégia de estudo de caso, com enfoque no entendimento de assuntos abordados por métodos experimentais.

O presente trabalho visa ao conhecimento de noções conceituais de fractais e suas aplicações em contextos matemáticos e biológicos. Além disso, busca compreender características do crescimento de microrganismos a partir do *software* computacional “*Fractal Analysis System for Windows™*”, fornecido pelo *Institute of Livestock and Grassland Science, NARO (NILGS)*, centro de pesquisa biotecnológica voltada ao desenvolvimento da Agricultura e de alimentos no Japão.

1.1 TEMA

O presente trabalho contempla relações entre Geometria fractal e Microbiologia. Esses dois temas aparentemente distintos encontram elos a partir do desenvolvimento de recursos tecnológicos. A conexão estabelecida entre essas áreas do conhecimento leva em consideração o fato de que a Geometria fractal possui métodos relevantes para analisar imagens em diferentes dimensões, mediante a complexidade de formas geométricas observadas na natureza.

1.2 PROBLEMA

A Geometria fractal, conhecida por Geometria da natureza, é um ramo da Matemática que se dedica ao estudo de objetos e organismos complexos, por exemplo, as árvores e seu processo de crescimento. Os fractais são considerados objetos ou fenômenos da natureza que têm forma irregular, porém, se observados de diferentes escalas, não perdem sua definição (STEWART, 1996).

O ramo da Microbiologia tem como ênfase o estudo dos microrganismos e suas características, desde o seu surgimento perpassando pela sua composição, estruturação e afins. Em relação à contagem desses microrganismos, a Microbiologia aplicada explora diferentes formas para tal, podendo ser citadas a *Câmara de Petroff-Hausser*, o *Pour Plate*, a *Turbidimetria*, o *Peso Seco* e até mesmo a própria atividade metabólica dos microrganismos (TORTORA *et al.*, 2017). Mas, há outras maneiras para fazer essa contagem de microrganismos?

Dessa forma, questionamos: é possível que a Geometria Fractal evidencie, de alguma forma, a contagem e a representação do crescimento de microrganismos a partir de um *software* computacional? E se sim, como pode ser realizada tal representação? Com base nesse contexto, o objetivo deste trabalho é utilizar noções

conceituais da Geometria fractal para fazer a contagem e a análise do crescimento de microrganismos, mediante uma representação diferente com o auxílio de um software computacional.

1.3 HIPÓTESE

A partir da análise de imagens de microrganismos obtidas em práticas biotecnológicas realizadas em laboratório e com o uso de um *software* computacional, o crescimento microbiano será evidenciado na dimensão fractal com representações gráficas e numéricas referente à dimensão da imagem.

1.4 OBJETIVO GERAL

Utilizar noções conceituais de Geometria Fractal como alternativa para a contagem e representação do crescimento de microrganismos a partir de um *software* computacional.

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conhecer noções conceituais de fractais e aplicações em contextos matemáticos e biológicos;
- Compreender características do crescimento de microrganismos utilizando recursos da Geometria fractal a partir de um *software* computacional.

1.6 JUSTIFICATIVA

A Geometria fractal é um campo de estudo matemático amplo em relação ao número de conceitos que podem ser investigados, contextualizados e aplicados, tais como a Álgebra, Cálculo, Geometria plana e espacial, Progressões e Logaritmo (BARBOSA, 2005). É relevante destacar que “na ausência dos microrganismos, as formas de vida superiores nunca teriam surgido e não poderiam ser sustentadas. De fato, o próprio oxigênio que respiramos é o resultado de atividade microbiana precedente” (Madigan *et al.*, 2016, p.2). Sendo assim, este trabalho tem o intuito de aplicar noções de Geometria fractal para o desenvolvimento de uma perspectiva diferente de aspectos da Microbiologia relacionados ao crescimento de

microrganismos, os quais se correlacionam com a Matemática, proporcionando novas possibilidades de apresentação e reflexão de tais aspectos.

2 DESENVOLVIMENTO

Para que haja o entendimento em relação aos fractais, antes temos de compreender o desenvolvimento de alguns de seus aspectos históricos na comunidade científica, suas características gerais e suas aplicações. Toda essa construção, estruturação e formalização científica durou aproximadamente quatro séculos; com contribuições significativas do matemático francês Benoit Mandelbrot. Essa mesma ideia de construção do conhecimento é igualmente válida para a área de Microbiologia. Suas diferentes aplicabilidades que podem ser observadas no cotidiano mostram-se abertamente disponíveis para a produção de novos conhecimentos. Nesse sentido, “é, portanto, seguro dizer que nenhuma outra forma de vida é tão importante para o suporte e manutenção da vida na Terra quanto os microrganismos” (Madigan *et al.*, 2016, p.2).

2.1 Fractais: a complexa Geometria da natureza

Fractais são considerados figuras geométricas complexas, pois conforme é feita a sua ampliação não perdem sua forma. A etimologia da palavra “fractal” vem do latim “*fractus*” que significa “fração ou quebrado”, ou seja, “um objeto que apresenta invariância na sua forma à medida em que a escala, sob a qual o mesmo é analisado, é alterada, mantendo-se a sua estrutura idêntica à original” (ASSIS *et al.*, 2008, p.1). Outras definições para esses mesmos objetos são apresentadas de diferentes formas, como a de Stewart (1996, p.16), que coloca os fractais como “formas geométricas que repetem sua estrutura em escalas cada vez menores”. É notável a manutenção do reforço, independente da definição adotada, quanto a relação de sua forma com a ampliação da figura.

As primeiras citações encontradas sobre fractais, não exatamente o termo, mas sim as estruturas, datam do século XVII. Nessa época, Gottfried Leibniz (1646-1716), polímata e filósofo alemão, escreveu sobre “auto similaridade recursiva”. Ele e

outros matemáticos da sua época não estudaram muito a fundo os fractais por falta de meios para tal, sendo que essas estruturas ficaram conhecidas como “monstros matemáticos”. E, então, em 1872, Karl Weierstrass (1815-1897) publicou o modelo matemático $f(x) = \sum_{n=0}^{\infty} a^n \cos(b^n \pi x)$ que possibilita a geração de um gráfico, conforme FIGURA 1 que é um fractal (FERNANDES, 2007; PODHOSTNIK, 2012).

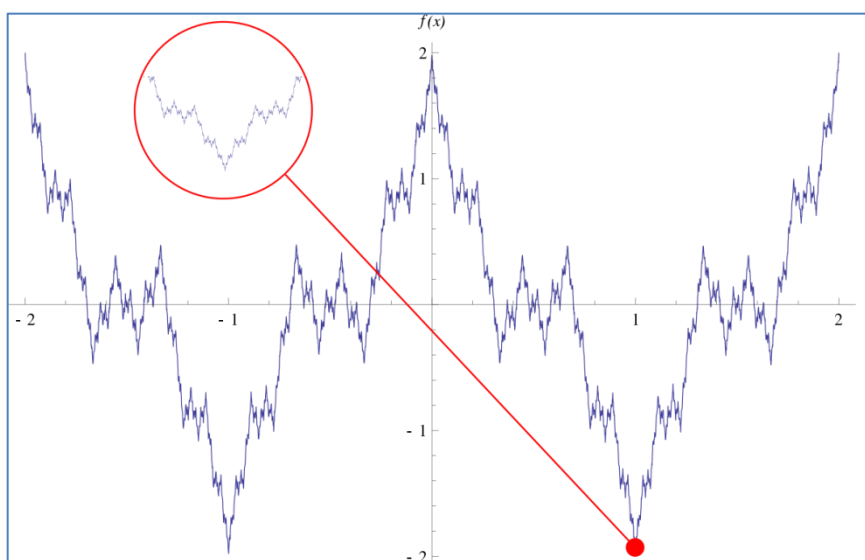


FIGURA 1 - Função de Weierstrass
Fonte: Wikipédia, 2019

Depois, em 1883, o matemático alemão Georg Cantor (1845-1918) revolucionou a Matemática com a Teoria dos Conjuntos, que ajudou a desenvolver o subconjunto no intervalo $[0,1]$, que hoje é conhecido como Conjunto de Cantor, conforme ilustração da FIGURA 2. Esse tipo de fractal foi descrito como “iteração de um conjunto de regras”, o que inspirou, em 1904, o matemático sueco Helge von Koch (1870-1924) a criar uma série de figuras, entre elas o “Floco de Neve de Koch”, sendo essa a mais conhecida. Waclaw Sierpinski (1889-1969), um matemático polonês, dez anos depois de von Koch, utilizou a mesma técnica para criar mais figuras fractais, sendo o “Triângulo de Sierpinski” o mais famoso. Então, em 1918, os matemáticos franceses Pierre Fatou (1878-1929) e Gaston Julia (1893-1978), a partir de uma nova abordagem, isto é, utilização de funções iterativas num plano complexo, criaram o Conjunto de Julia e outros fractais. Simultaneamente, o matemático alemão Felix Hausdorff definiu que a dimensão fractal não precisa ser um número inteiro, o que será explicado mais adiante (FERNANDES, 2007; PODHOSTNIK, 2012).

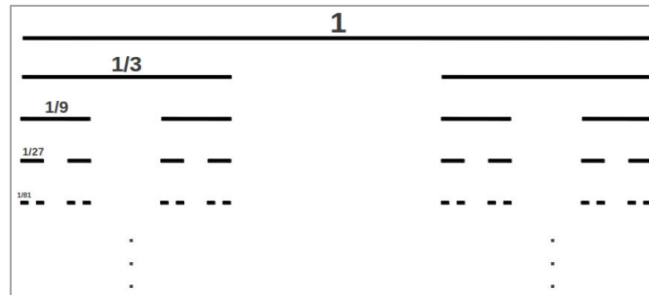


FIGURA 2 - Conjunto de Cantor
 Fonte: MindtoMultiverse, 2015

O grande problema da maioria dos matemáticos que trabalharam com figuras fractais foi exatamente o passo de criar as figuras, levando em consideração que tinham de desenhar à mão e, conseqüentemente, muitos detalhes eram perdidos. Então, na década de 1960, o matemático Benoit B. Mandelbrot (1924-2010), considerado o pai dos fractais devido às suas contribuições, com o auxílio de computadores, pode finalmente dar um salto em relação ao desenvolvimento dessa ciência. Fernandes (2007) explica que:

[...] os computadores com seu poder de cálculo e as representações gráficas que conseguem executar, são responsáveis por trazer de novo esses 'monstros', chamados fractais à vida, gerando quase instantaneamente os fractais no monitor, com as suas formas estranhas, seus desenhos artísticos ou pormenorizadas paisagens e cenários (FERNANDES, 2007, p. 14).

Mandelbrot (1967) investigou e, a partir do conjunto de informações encontradas em trabalhos de pesquisadores que antecederam seu tempo, criou a palavra *fractal*, utilizada pela primeira vez em 1967. Com o passar do tempo, a pesquisa em relação aos fractais foi se desenvolvendo e características foram sendo observadas e aprimoradas. A auto similaridade expressa a característica principal dos fractais, isto é, propriedade de uma figura ou de um objeto que conforme for ampliado, não desconfigura a forma original de sua estrutura.

Nunes (2006, p.29) descreve que “uma figura é auto semelhante se apresenta sempre o mesmo aspecto visual a qualquer escala que seja ampliada ou reduzida, ou seja, se parte de uma figura se assemelha à figura vista como um todo”.

A auto similaridade está presente em nosso dia a dia. A FIGURA 3 mostra um exemplo clássico de auto similaridade encontrado na natureza, a couve-flor. Imagine que você está preparando o almoço e um dos ingredientes é a couve-flor. Quando você corta e separa um dos floretes, é possível notar que ele é como uma outra couve-flor, porém, menor. Assim, você continua a cortá-la, e de novo, e de novo, e de novo.

Mesmo o menor pedaço de florete ainda vai se parecer com a original. A parte se assemelha ao todo. Porém, se nós dermos um *zoom* numa couve-flor, nota-se que a auto similaridade que ali se encontrava se acaba. Isso acontece com todo fractal natural. Entretanto, não com os fractais matemáticos, que estão livres desse “problema”. Levando tais informações em consideração, é possível separar a auto similaridade em três perspectivas: a auto similaridade exata, a quase auto similaridade e a auto similaridade estatística (FERNANDES, 2007).



FIGURA 3 - Auto-similaridade de uma couve-flor
Fonte: Chip's Page, [S.I.].

A *auto similaridade* exata é a forma mais forte e evidente, encontrada apenas em fractais teóricos, como o Triângulo de Sierpinski e o Floco de Neve de Koch. Tais fractais possuem cópias exatas, idênticas, em todas as diferentes escalas. Já a *quase auto similaridade* é a variedade mais livre de auto similaridade. De acordo com Podhostnik (2012), esse tipo de fractal compõe-se de cópias distorcidas ou degeneradas de si mesmos. Além disso, esse tipo de fractal é comum aos fractais naturais e alguns fractais teóricos, como o Conjunto de Mandelbrot exemplificado na FIGURA 4. Agora, a *auto similaridade estatística* é a forma mais fraca de manifestação de todas as três. Isso se dá pelo fato de que somente as características numéricas e estatísticas são mantidas em todas as escalas, sendo comuns a esses fractais figuras geradas por algum tipo de comportamento aleatório (como raios provenientes de descargas elétricas e o crescimento das plantas), a exemplo da Árvore de Brownian (FERNANDES, 2007).

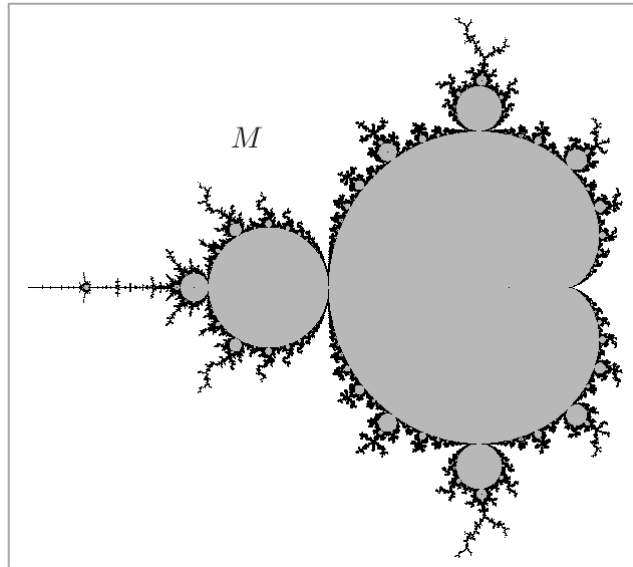


FIGURA 4 - Conjunto de Mandelbrot
Fonte: Hubbard, 2009

A geração de diferentes fractais é realizada de formas distintas. Entretanto, como funciona o campo dimensional em que se localizam tais figuras? A dimensão fractal, diferindo-se da Geometria Euclidiana que retrata a dimensão de um ponto como zero, a de uma linha como um, de uma superfície como dois, e de um volume como três, representa a dimensão de figuras com valores não inteiros¹. A FIGURA 5 a seguir ilustra essa descrição geométrica. Dessa forma, é possível compreender que “cada fractal tem sua dimensão, característica própria de cada objeto que tem a ver com seu grau de irregularidade, caracterizando a superfície de contato entre o objeto e o meio” (FERNANDES, 2007, p. 20).

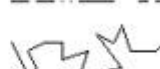




Dimensão Euclidiana		Dimensão Fractal	
.	(ponto) 0	---	0.4
—	1		1.4
	2		1.8
	3		2.6

FIGURA 5 - Comparação entre a dimensão Euclidiana e a dimensão fractal
Fonte: SIQUEIRA (2005) *apud* FERNANDES, 2007

¹ O valor numérico dessa dimensão pode ser expresso de forma fracionária ou decimal.

A dimensão fractal foi introduzida e desenvolvida no mundo das pesquisas pelo matemático alemão Felix Hausdorff (1868-1942). Mandelbrot (1967) no artigo *“How Long Is the Coast of Britain? Statistical Self-Similarity and Fractional Dimension”* utiliza os conceitos da dimensão de Hausdorff para exemplificar as rugosidades encontradas na costa do Reino Unido. Tais conceitos *“hausdorffianos”* não serão abordados neste trabalho em razão da complexidade científica, e é mencionado aqui baseado no princípio de fidedignidade à História da Ciência. De acordo com Podhostnik (2012, p.4), a dimensão de Hausdorff (no caso da pesquisa de Mandelbrot) pode ser definida como: “Seja X um espaço métrico. Se $S \subset X$ e $d \in [0, \infty]$, então o conteúdo d -dimensional de Hausdorff pode ser definido por: $C_H^d(S) := \inf\{\sum_i r_i^d : \text{há uma cobertura de } S \text{ por bolas com raios } r_i > 0\}$; e a dimensão Hausdorff de X é definida por: $\dim_H(X) := \inf\{d \geq 0 : C_H^d(X) = 0\}$.

Mandelbrot (1967, p. 636) correlaciona os conceitos de auto similaridade estatística e curvas geográficas para, a partir disso, definir a dimensão de Hausdorff da costa britânica. Sendo assim, expressa que *“de um modo mais geral, curvas geográficas podem ser consideradas como superposições de tamanho característico amplamente disperso.”* Ou seja, cada pedaço da costa britânica apresenta-se matematicamente similar em diferentes escalas, assim como Podhostnik (2012) representa utilizando círculos de diferentes diâmetros para cobrir a costa do país.

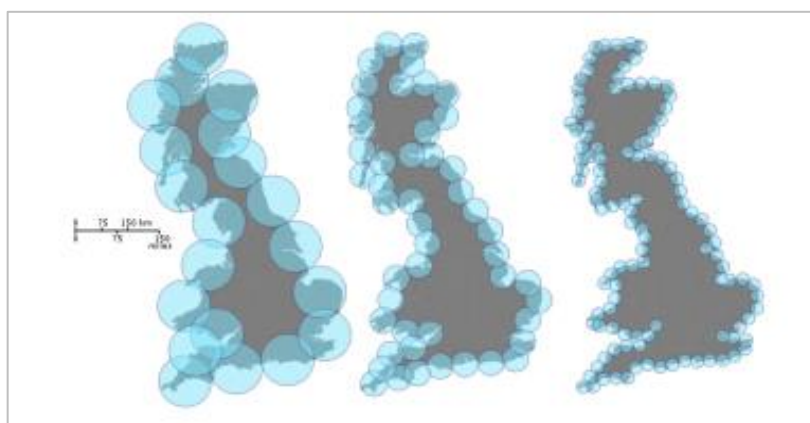


FIGURA 6 - O comprimento da costa da Britânia coberto de círculos
 Fonte: PODHOSTNIK, 2012

Quando se trata de objetos geométricos, a dimensão fractal adapta-se naturalmente ao processo de desenvolvimento e representação da situação em estudo. Historicamente, devido à falta de meios para o avanço da pesquisa na área,

é notável o número de fractais elaborados a partir de simples figuras geométricas que cobrem um plano conforme se tem sua progressão, a exemplos da curva de Peano, da curva de Hilbert e da curva de Gosper. Dessa forma, quando se trata de objetos geométricos, a dimensão fractal pode ser calculada pelo modelo matemático $D = \frac{\log N}{\log\left(\frac{1}{L}\right)}$,

onde N é o número de segmentos a substituir o segmento original e L é o tamanho de tal segmento substituído (BARBOSA, 2005). A demonstração desta fórmula e de suas adaptações é feita a partir da contagem de caixas ou *box counting*, sendo esse de aplicação acessível e que abrange inúmeras possibilidades de trabalho.

O *box counting* possui interpretações científicas distintas, levando em consideração que alguns autores abordam como uma dimensão diferente da de Hausdorff. Coelho e Costa (1995), por exemplo, tratam o *box counting* como uma dimensão que varia no intervalo [1,2], apresentando-se como uma curva topológica tradicional ou uma curva bidimensional. Entretanto, Fernandes (2007) refere-se ao *box counting* como um método matemático utilizado para expressar cálculos relacionados à dimensão fractal. Neste trabalho, considera-se o *box counting* como um método matemático que pode ser aplicado para analisar os dados obtidos, a partir da observação de uma situação envolvendo o crescimento de microrganismos. Dessa forma, de acordo com Antoniazzi (2007), o *box counting* de forma prática pode ser compreendido como a divisão de uma imagem em quadrados cada vez menores com o objetivo de gerar dados quanto à dimensão da mesma, a exemplo da FIGURA 7.

[...] o método de *box counting*, em linhas gerais, consiste em dividir a imagem em quadrados e contar quantos quadrados contém a forma analisada. Aumenta-se ou diminui-se progressivamente o tamanho dos quadrados e repete-se a contagem. Assim, tem-se uma série de dados: números de quadrados e suas dimensões (ANTONIAZZI, p. 19, 2007).

A representação de Fernandes (2007) possibilita observar que conforme o número de caixas vai aumentando ou diminuindo, se desenvolve uma relação com o tamanho delas, variando assim a alteração da imagem no plano em que se encontra. Sendo assim, conforme as imagens vão ocupando as caixas, é possível observar uma relação do número de caixas com a própria ocupação, o que pode ser visto na Tabela 1.

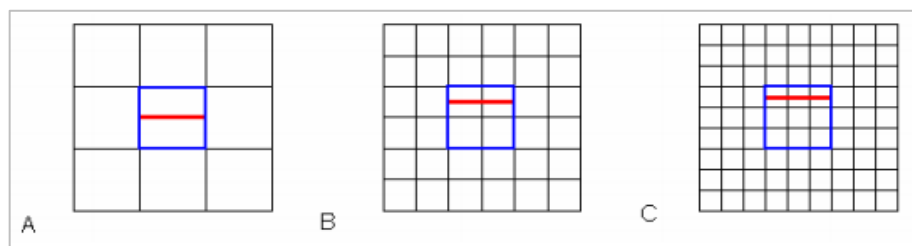


FIGURA 7 - Método de *Box Counting*
 Fonte: FERNANDES, 2007

TABELA 1: Relação entre o número e o comprimento das caixas

Número de caixas	Comprimento das caixas
N = 1	$L = 1$
N = 2	$L = \frac{1}{2}$
N = 3	$L = \frac{1}{3}$

Fonte: FERNANDES, 2007

Além disso, existe ainda a *Complexidade Infinita*, que diz respeito à própria geração da figura, mais especificamente a característica recursiva da geração, ou seja, a repetição do processo utilizado para a geração da mesma. Então, quando se é desenvolvido um determinado procedimento, também é executado um sub-procedimento, exatamente igual ao anterior (FERNANDES, 2007).

Atualmente, a Geometria fractal e suas características são utilizadas para a resolução de problemas variados de diferentes áreas do conhecimento. Na Medicina, por exemplo, as aplicações são muitas, desde a análise das medições de um coração ao diagnóstico do desenvolvimento de células cancerígenas² a partir do método de contagem de caixas. Na Arquitetura, é empregada para a avaliação da complexidade de crescimento de plantas urbanas. Na Biologia, pode ser utilizada para a análise da rugosidade de diferentes seres vivos, medição de copas ou troncos de árvores, e até mesmo o contorno de habitats para a determinação da influência exercida por predadores ante suas presas. Na Mineralogia, aparece com o objetivo de medir a densidade dos minerais, a evolução dos terrenos e a irregularidade das rochas. Na Ciência da Computação, os fractais são aplicados na geração de músicas, na compressão de dados³, simulações e entre outras situações. No geral, a dimensão

² Especialmente os seguintes tipos: câncer de colo de útero, câncer de mama e câncer bucal.

³ Compreende que os dados em questão possuem muitas semelhanças e se usa para gravar em apenas uma parte da memória.

fractal em si nos fornece um parâmetro extra para comparação de fenômenos diversos, colaborando para ampliar perspectivas detalhadas em relação à uma investigação realizada (FERNANDES, 2007; PODHOSTNIK, 2012; NAOUMOVA *et al.*, 2014).

2.2 Microbiologia: a Ciência do mundo invisível

Os microrganismos impactam e afetam a vida humana de diversas formas trazendo benefícios como a aplicação desses em produtos transgênicos e malefícios como agentes causadores de doenças. De acordo com MADIGAN *et al.* (2016, p.2), “embora os microrganismos sejam as menores formas de vida, coletivamente eles constituem a maior parte da biomassa da Terra [...]”, e por isso torna-se necessário o estudo desses seres microscópicos. A Microbiologia é a ciência voltada para o estudo dos microrganismos, considerando o surgimento, a origem, o funcionamento, os mecanismos biológicos e como atuam em diferentes meios.

A ciência da microbiologia gira em torno de dois temas que estão interconectados: (1) o entendimento da natureza e funcionamento do mundo microbiano, e (2) a aplicação do nosso entendimento acerca da microbiologia para benefício da humanidade e do planeta Terra (MADIGAN *et al.*, p. 2, 2016).

Tais microrganismos crescem e se desenvolvem numa velocidade muito maior do que outros seres vivos. Quando nos referimos ao crescimento microbiano, isso quer dizer que estamos falando no aumento do número de células, ou seja, o crescimento da quantidade de microrganismos e o agrupamento dos mesmos em colônias (MANDIGAN *et al.*, 2016).

As bactérias⁴ crescem a partir do acúmulo de macromoléculas no citoplasma, que são aglomeradas em diferentes estruturas das células tais como membrana citoplasmática, flagelos, ribossomos, entre outros, o que eventualmente leva à divisão celular. Essa divisão é chamada de fissão binária, processo no qual as bactérias alongam seu tamanho até duas vezes em relação ao original e, a partir de uma partição chamada de septo, divide a célula em duas células-filhas. Esse acontecimento é conhecido como geração. Durante a geração, cada célula-filha recebe um cromossomo, cópias de ribossomos entre outros componentes

⁴ Esse microrganismo foi adotado neste trabalho para os experimentos laboratoriais realizados. Mais adiante serão apresentadas outras informações.

necessários para que a célula possa existir independentemente. Já o tempo necessário para que a geração ocorra, é chamado de tempo de geração. Cada espécie de bactéria possui um tempo de geração diferente, sendo esse independente de fatores nutricionais, genéticos e da temperatura; e a maioria das bactérias crescem com um tempo de geração de horas ou dias (MADIGAN *et al.*, 2016).

Em laboratório, sempre se busca as melhores condições para o crescimento dos microrganismos em estudo, no caso, a manipulação dos fatores necessários para o crescimento desses microrganismos. Tais fatores podem ser separados em duas categorias principais: físicos, os quais incluem temperatura, pH e pressão osmótica; e químicos, os quais incluem fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio, elementos traços e fatores orgânicos do crescimento (MADIGAN *et al.*, 2016).

Em relação à temperatura, é relevante evidenciar que a maioria dos microrganismos tem um ótimo crescimento em temperatura ambiente ideal aos seres humano. Porém, certas bactérias têm sua geração potencializada por extremos de temperatura. Cada espécie bacteriana possui uma temperatura mínima, ótima e máxima para o seu crescimento ideal. Basicamente, os microrganismos são classificados em três grupos principais com base em sua afeição pela temperatura, conforme representado na FIGURA 8: os psicrófilos, que crescem em baixas temperaturas; os mesófilos, que crescem em temperaturas moderadas; termófilos, que crescem em temperaturas elevadas (TORTORA *et al.*, 2012).

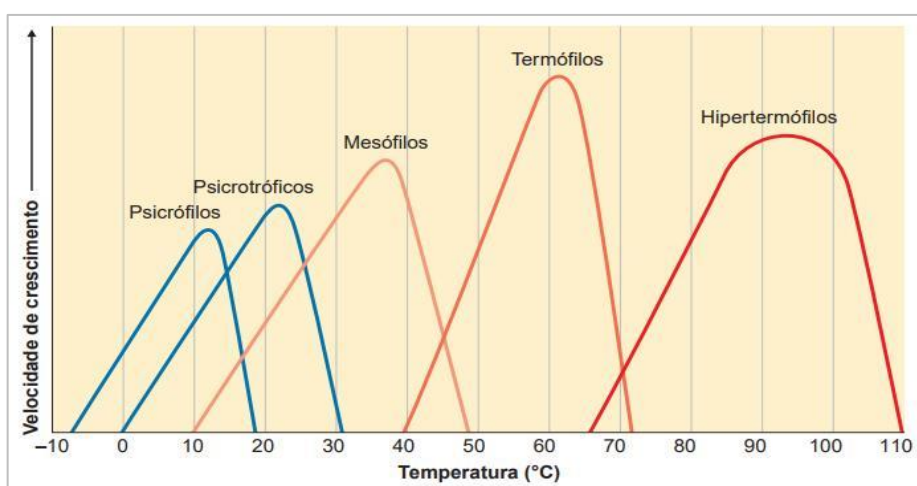


FIGURA 8 - Efeitos da temperatura no crescimento microbiano
Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017

Já o pH, refere-se a acidez ou alcalinidade de um meio ou solução. De acordo com Tortora, Funke e Case (2012), a maior parte das bactérias tem um melhor

crescimento em faixas de pH mais próximas da neutralidade, entre 6,5 e 7,5 a exemplo da ilustração da FIGURA 9. É necessário levar em consideração o fato de que poucas bactérias crescem em pH abaixo de 4, sendo que as bactérias que conseguem sobreviver a essa faixa são conhecidas como acidófilas. No laboratório, ao serem cultivadas, as próprias bactérias produzem ácidos que podem ser capazes de inibir o seu crescimento e, para neutralizar esses ácidos e manter o pH na faixa adequada, são utilizados tampões químicos.

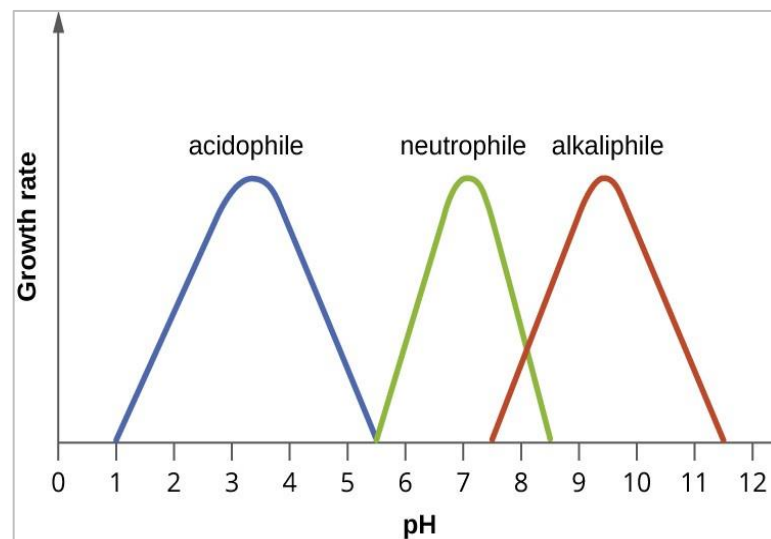


FIGURA 9 - Efeitos do pH no crescimento microbiano
Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017

Quanto à pressão osmótica, referimo-nos a entrada e saída de água da célula, ou seja, a relação do microrganismo com a quantidade de água ideal necessária para o seu crescimento no meio. Pressões osmóticas elevadas, por exemplo, têm como consequência a remoção da água necessária para a célula. Tortora, Funke e Case (2012, p.159) explicitam que “no caso, o que ocorre é que quando a bactéria se encontra em um meio onde a concentração de solutos é maior do que dentro dela mesma, a água atravessa a membrana celular para o meio com a concentração mais elevada de soluto”.

Além disso, os microrganismos têm como nutriente principal o carbono. Esse pode provir de fontes como materiais orgânicos (proteínas, carboidratos etc.) ou de fontes de dióxido de carbono, dando ao microrganismo o que pode ser chamado de “esqueleto estrutural”. É relevante destacar que aproximadamente metade do peso seco de uma célula bacteriana é composto de carbono. Além desse, os microrganismos também precisam de outros nutrientes, no caso, elementos para que

possam fazer a sintetização de seu material celular, como nitrogênio, enxofre e fósforo (TORTORA *et al.*, 2012).

O crescimento microbiano acontece por meio de fissão binária, forma de reprodução bacteriana. Ela se inicia com o alongamento da célula e a replicação do DNA. Após isso, é iniciado um processo de estreitamento da parede celular e da membrana plasmática, que culmina com a formação das paredes intermediárias e na separação completa entre as duas cópias de DNA. Por fim, as células se separam. Todo este processo ocorre dentro de um determinado tempo de geração, que consiste no tempo necessário para a população de bactérias dobrar. Tal tempo varia de acordo com os fatores citados anteriormente, sendo cada um específico para cada bactéria, podendo variar de 3 a 24 horas ou mais cada intervalo de geração (TORTORA *et al.*, 2012).

Se a fissão binária não é controlada, uma grande quantidade de célula será produzida. Se a divisão ocorre a cada 20 minutos, como é o caso da *E. coli* em condições favoráveis, após 20 gerações, uma única célula inicial poderá ter gerado mais de um milhão de células. Esse aumento ocorrerá em cerca de 7 horas. Em 30 gerações, ou 10 horas, a população poderá ser de um bilhão, tendo atingindo um número com 21 zeros em 24 horas (TORTORA; FUNKE; CASE, p. 164, 2017).

Devido à imensa quantidade de microrganismos que compõem uma população, por exemplo, de bactérias, a utilização de representações aritméticas em casos como esses são praticamente inviáveis. Por isso, representações gráficas baseadas em funções logarítmicas são a solução “perfeita” já que as fases do crescimento se tornam muito mais visíveis e perceptíveis (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A FIGURA 10 representa a divisão do crescimento microbiano em quatro fases: *lag*, exponencial ou logarítmica (*log*), estacionária e declínio. A *fase lag* pode ser compreendida como o momento de adaptação dos microrganismos inoculados ao meio em que foram inseridos. Ou seja, é o período em que os microrganismos têm intensa atividade metabólica, como a síntese de enzimas e outras macromoléculas, podendo durar horas ou dias, variando de acordo com as condições do microrganismo em relação ao meio. Agora, a *fase log* é o período em que a divisão celular se inicia, se tornando intensa, assim como o tempo de geração. A *fase estacionária* diz respeito à etapa em que o crescimento exponencial se encerra devido à falta de nutrientes necessários para os microrganismos, igualando-se ao número de células mortas (NICOLAU, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Ainda no contexto do crescimento microbiano, o mesmo pode ser calculado mediante a aplicação do modelo matemático de iteração $N = N_0 \cdot 2^n$. Nesse modelo, N é o número de células da população; N_0 é o número de células inicial; n é o número de divisões e a base 2 se refere à fissão binária das células, mecanismo biológico em que de uma célula se originam duas. Para evidenciar o funcionamento do processo do crescimento bacteriológico baseado nesse modelo exponencial, utilizamos um exemplo simples. A bactéria *Escherichia coli* tem seu tempo de geração de 20 minutos, sendo assim, em uma hora (60 minutos) nós teremos 3 gerações (n). Nesse caso, $N_0 = 1$ (crescimento bacteriano iniciado por uma única bactéria), ou seja, para calcular o número de bactérias *Escherichia coli* ao longo de três gerações aplicamos o modelo matemático " $N = N_0 \cdot 2^n$ ". Dessa forma, prossegue-se com as substituições dos valores numéricos, e então, temos " $N = 1 \cdot 2^3$ "; e finalmente resolvendo as operações matemáticas obtemos " $N=8$ " (DANTES, 2014; MARSH, 2015).

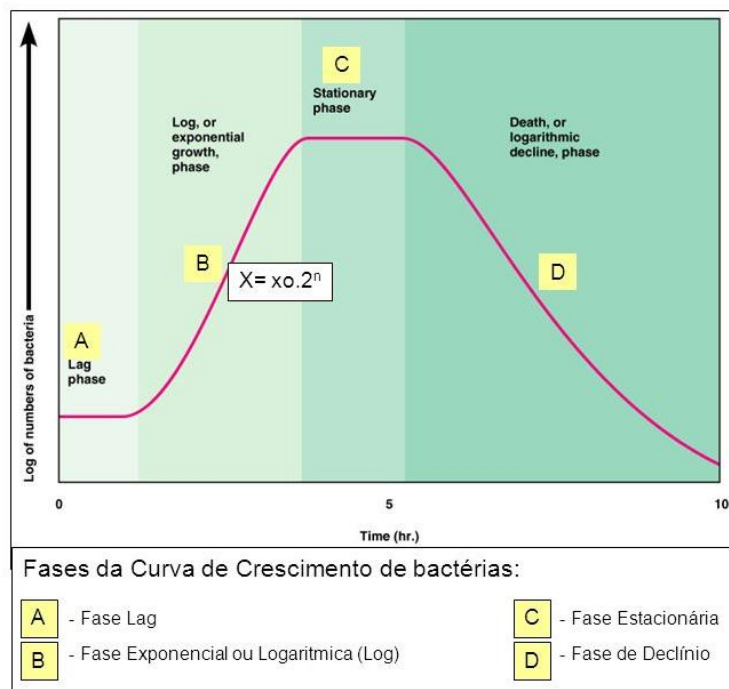


FIGURA 10 - Crescimento microbiano
 Fonte: DANTES, 2014

Todos os fatores biológicos ou ambientais mencionados anteriormente influenciam o crescimento dos microrganismos, e conseqüentemente interferem na disposição geométrica de formas irregulares dos meios inoculados, alterando assim o número da dimensão fractal. A seguir, serão apresentados os procedimentos metodológicos adotados para a realização desta pesquisa.

3 METODOLOGIA

O presente trabalho adota uma abordagem qualitativa. Trata-se de um estudo de caso que aplica noções conceituais de Geometria fractal para analisar o crescimento de microrganismos com base em uma prática laboratorial, a partir de imagens obtidas por registros fotográficos conforme condições biológicas previamente determinadas. Dessa forma, compreendemos que:

O enfoque qualitativo apresenta as seguintes características: o pesquisador é o instrumento-chave, o ambiente é a fonte direta dos dados, não requer o uso de técnicas e métodos estatísticos, têm caráter descritivo, o resultado não é o foco da abordagem, mas sim o processo e seu significado, ou seja, o principal objetivo é a interpretação do fenômeno objeto de estudo (FREITAS; JABBOUR, p. 3, 2011).

O estudo de caso é uma forma de conduzir uma pesquisa para se aprofundar em um assunto específico, oferecendo recursos metodológicos viáveis. Baseia-se em experimentos, levantamentos de diferentes informações, pesquisas históricas e análises de dados obtidos mediante investigação empírica.

Conforme Yin (2001, p.32), um estudo de caso “investiga um fenômeno contemporâneo dentro de seu contexto de vida real, especialmente quando os limites entre o fenômeno e o contexto não estão claramente definidos”. Dessa forma, entendemos como “*fenômeno contemporâneo dentro de seu contexto de vida real*” a análise de imagens que representam o crescimento de microrganismos em condições laboratoriais previamente definidas com base em conhecimentos técnicos da área de Biotecnologia. Ademais, a perspectiva “contemporânea” também é contemplada mediante a utilização de recursos tecnológicos atuais para subsidiar as análises a serem realizadas. Posto isso, Yin (2001) salienta que “*os limites entre o fenômeno e o contexto não estão claramente definidos*”, aspecto considerado na temática deste trabalho, isto é, procurar aproximar conhecimentos entre a Geometria fractal e a área da Microbiologia visando uma abordagem interdisciplinar.

Quanto às características do estudo de caso adotadas neste trabalho, pode-se identificar a natureza explicativa, levando em consideração que o objetivo principal é a busca pelo entendimento de relações entre da Geometria fractal e da Microbiologia. Além disso, este trabalho apresenta uma perspectiva fundamentada em experimentos como estratégia de pesquisa, devido ao fato de as perguntas “Como?”

e “Por quê?” serem a base do desenvolvimento das atividades de pesquisas aqui abordadas. De acordo com Yin (2001), o estudo de caso consiste em uma estratégia de investigação, por exemplo, à medida em que:

[...] são realizados experimentos quando o pesquisador pode manipular o comportamento direta, precisa e sistematicamente. Isso pode ocorrer em um laboratório, no qual o experimento pode focar uma ou duas variáveis isoladas (e presume que o ambiente de laboratório possa "controlar" todas as variáveis restantes além do escopo de interesse) [...] (YIN, p. 27, 2001).

Para desenvolver a prática laboratorial principal foi feito um teste a fim de identificar erros a serem corrigidos ou etapas a serem modificadas. Os testes da prática foram realizados nos laboratórios do Instituto Federal do Paraná - Campus Londrina, Unidade Alagoas sob orientação e supervisão docente especializada.

Os procedimentos metodológicos utilizados são apresentados a seguir conforme o planejamento proposto que incluiu:

1. Preparo de meio de cultura PCA (Agar Padrão para Contagem) para o crescimento de bactérias;
2. Preparo de um inóculo de um microrganismo a partir de uma colônia isolada em meio de cultura agar sal manitol. Transferiu-se com alçada uma porção da colônia para um tubo de ensaio com caldo MHB (caldo Mueller-Hinton);
3. Preparo de salina feita com uma mistura de 200mL de água destilada e 1,8 g de NaCl de concentração 0,9%, que foi aquecida num bico de bunsen até o ponto de ebulição com o objetivo de reduzir qualquer possível contaminação presente;
4. Preparo da solução de hipoclorito de sódio de concentração de 2 a 2,5% (Girando Sol®) obtida no comércio varejista de Londrina;
5. Diluição do inóculo na salina em três tubos de ensaio, sendo o primeiro com 10mL de salina, o segundo com 9mL e o terceiro também com 9mL. Após isso, foi adicionado 50µL do inóculo no primeiro tubo, que foi colocado no agitador Vortex⁵ para que houvesse a homogeneização. Sendo assim, foi transferido 1mL do tubo 1 para o tubo 2, que também foi colocado no agitador Vortex; foi transferido 1mL do tubo 2 para o tubo 3, que também foi colocado no agitador

⁵Agitador Vortex é um equipamento de laboratório utilizado para a agitação e homogeneização de líquidos contidos em pequenos tubos ou frascos.

Vortex;

6. Adição de 50µL do tubo 3 a um meio de cultura PCA que ficou como grupo controle (CTR) para que houvesse a comparação em relação às variáveis adicionadas nos outros dois grupos;
7. Adição de 50µL do tubo 3 a um meio de cultura PCA mais 50µL da solução de hipoclorito de sódio (G1) com o objetivo de inibir o crescimento dos microrganismos;
8. Adição de 50µL do tubo 3 a um meio de cultura PCA mais 75µL da solução de hipoclorito de sódio (G2) com o objetivo de inibir o crescimento dos microrganismos;
9. O processo foi repetido a cada duas horas, por um período de seis horas, para se observar como se dava a proliferação dos microrganismos nos meios de cultura.

Com esses procedimentos técnicos em vista, os resultados obtidos durante a fase de testes estão apresentados na Tabela 2. As culturas de microrganismos do teste realizado foram nomeadas por **CTR** (Grupo Controle), **G1** (Grupo 1) e **G2** (Grupo 2).

TABELA 2 - Teste de crescimento de microrganismos

GRUPO/TEMPO	0h	2h	4h	6h
CTR	6	20	191	60
G1	1	12	19	15
G2	8	15	11	----- ⁶

Fonte: autoria própria

Com os testes realizados foi possível observar os procedimentos técnicos adequados, compreender a manipulação de instrumentos, e entender o funcionamento das atividades para a otimizar a prática principal.

A prática laboratorial principal foi desenvolvida no Laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob orientação e supervisão docente especializada, sendo utilizada a bactéria *Proteus mirabilis* que é um bacilo Gram negativo. Para o cultivo bacteriológico, a cepa utilizada foi

⁶ Número incontável de colônias de microrganismos.

isolada de um paciente com infecção urinária. A bactéria foi cultivada em meio caldo LB por 18h a 37°C. A seguir, foi diluída em solução salina (NaCl 0.9%) nas diluições 1:100, 1:1000 e 1:10000 e plaqueada por espalhamento por superfície em placas contendo o meio ágar MacConkey. Após o período de 18h, foram realizados registros fotográficos das placas em questão a fim de coletar dados para a análise dessas imagens por meio do *software* computacional. As imagens foram transferidas para o computador e recortadas para que somente as placas onde cresceram os microrganismos aparecessem, para que não houvesse interferências externas, sendo todas no formato de quadrado com dimensões de 8,62 cm de largura por 8,62 cm de altura. Em seguida, as imagens foram convertidas do formato *Joint Photographic Experts Group* (JPEG) para Bitmap (BMP) de acordo com as necessidades especificadas pelo *software* adotado.

Para a análise dos registros fotográficos obtidos durante o processo de proliferação das colônias de microrganismos nas placas de petri foi utilizado o *software* de computador *Fractal Analysis System for Windows*⁷, fornecido pelo *Institute of Livestock and Grassland Science, NARO (NILGS)*, do Japão. Esse instituto japonês é centro de realização de pesquisas voltadas para o desenvolvimento da Agricultura e de alimentos. O documento que autoriza o uso do *software* para esta pesquisa pode ser visto no Apêndice 1. A partir disso, foram utilizados recursos e funções disponibilizadas pelo programa computacional supracitado para calcular a dimensão fractal do crescimento dos microrganismos, nos diferentes meios de cultura pelo método de Contagem de Caixas (*box counting*). De acordo com Sasaki, Shibata e Hatanaka (1994) o *software*⁸ pode:

Gerar % de imagem RGB ou imagem de desbaste, extrair área vermelha ou verde, calcular dimensão fractal e outros dados, de imagem colorida, imagem em escala de cinza, imagem binária (preto e branco) ou imagens em fatias (camadas) 3D de bitmap (BMP). A dimensão fractal é calculada pelo método de contagem de caixas após o pré-processamento. O desbaste costuma ter 1 pixel de espessura ao analisar imagens que contêm ondas ou rachaduras. A relação entre o tamanho da caixa e a contagem pode ser exibida com o gráfico de plotagem. Assim, você pode confirmar se a imagem é fractal ou não pela linearidade das plotagens. Se plotagens limitadas devem ser usadas para calcular a dimensão fractal, qualquer dado de contagem pode ser excluído ou editado e outra dimensão fractal pode ser recalculada (sem paginação, tradução nossa).

⁸ Mais informações sobre o *software* podem ser encontradas em:
< <http://cse.naro.affrc.go.jp/sasaki/fractal/fractal-e.html> >

O *software Fractal Analysis System for Windows™*, possui sete *menus* diferentes, sendo respectivamente: *File*, para introduzir as imagens utilizadas no *software*; *Edit*, para copiar e colar as imagens; *Image processing*, para realizar processos anteriores às análises das imagens, o que pode ser observado na FIGURA 11; *Fractal dimension*, para realizar análises em relação à dimensão fractal das imagens processadas; *Define area*, para definir a área da imagem que será analisada; *Filter*, para editar características específicas das imagens, tais como pontos pretos isolados; e por fim, o menu *Help*, que pode auxiliar em relação à dúvidas que possam surgir quanto ao funcionamento do *software*.

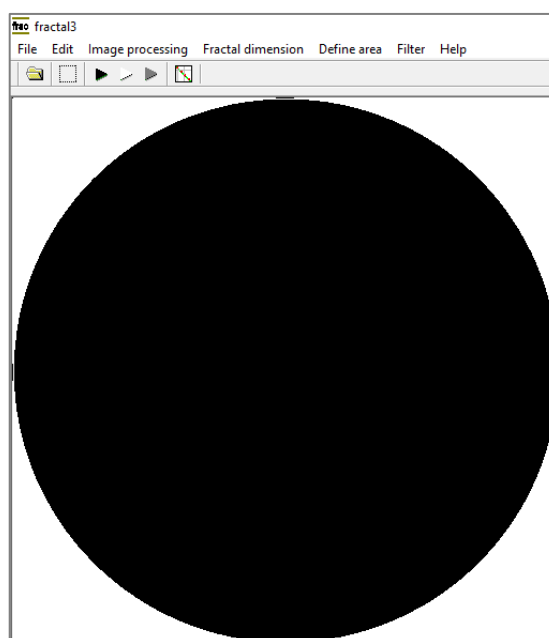


FIGURA 11 - Menus do *software* computacional utilizado
Fonte: organizado pelo autor

O recurso comparativo para a análise das imagens se baseou nas diluições das culturas citadas anteriormente como critério de variação populacional. Além disso, os números que se referem à dimensão fractal das imagens foram usados como parâmetro de comparação, assim como os gráficos gerados pelo *software*. A seção seguinte apresenta a análise de dados e resultados obtidos neste trabalho.

4 ANÁLISE DE DADOS E RESULTADOS

As imagens, antes de terem sido processadas pelo *software*, foram alteradas para *Gray scale* por proporcionar uma análise detalhada em relação às irregularidades encontradas. A *Gray scale* é uma gama de tons monocromáticos que varia do branco ao preto, possuindo somente informações referentes aos níveis de brilho. Em consequência disso, o valor máximo de luminosidade é branco e o mínimo é preto. Por isso, as imagens em *Gray scale* contêm exclusivamente tons de cinza e sem cor, o que pode ser observado no agrupamento de imagens da FIGURA 12.

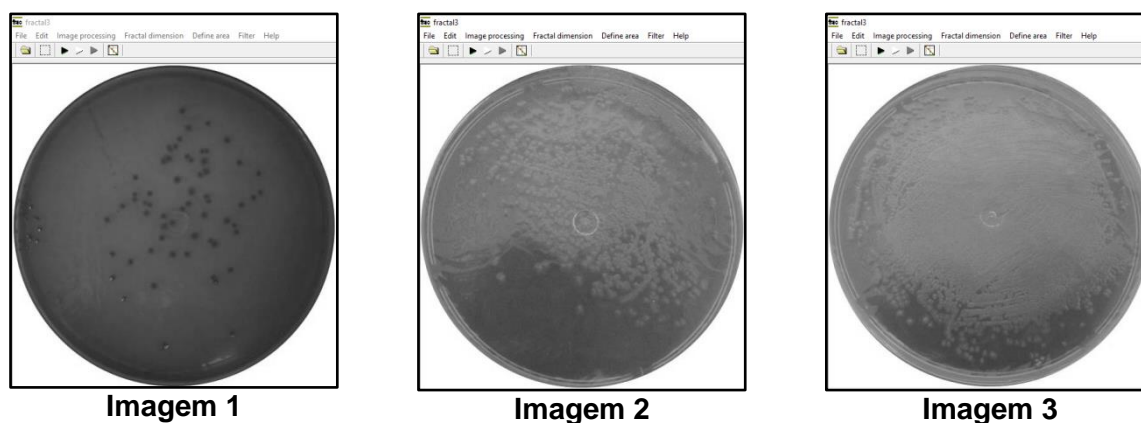


FIGURA 12 – Imagens obtidas de placas petri ao se utilizar o recurso *Gray scale*
Fonte: Autoria própria

Em seguida, no menu *Fractal dimension*, foi selecionada a opção *Gray scale*, para que fosse feito o cálculo da dimensão fractal. Após o processamento das imagens, foram obtidos os seguintes resultados, conforme a Tabela 3:

TABELA 3 - Resultados obtidos após o processamento das imagens da Figura 12 no *software Fractal Analysis System for Windows™*

	Imagem 1	Imagem 2	Imagem 3
Cover or BrightDiff	193,0	179,0	178,0
R (n)	-0,9995 (7)	-0,9997 (7)	-0,9998 (7)
Fractal dimension	2,0579	2,1793	2,2101

Fonte: autoria própria

Cover or BrightDiff se refere à cobertura de brilho e suas diferenças de uma imagem para outra, o que pode ser observado conforme os registros numéricos

relativos às imagens 1 a 3. Na primeira, o nível de brilho se encontra em 193,0 e tem uma disparidade não muito significativa em relação à segunda e a terceira, que é de 179,0 e 178,0 respectivamente. Isso ocorre porque na primeira imagem existem ainda poucas colônias de microrganismos, condição em que o reflexo da luz aumenta potencialmente o brilho, o que não ocorre tanto na segunda quanto terceira imagens, já que o número de colônias cresceu consideravelmente.

As produções gráficas foram obtidas por meio do *software Fractal Analysis System for Windows™* e sua representação referente ao plano cartesiano indica no o eixo horizontal, log 10 (tamanho), e eixo vertical, log 10 (contagem). A Figura 13 expressa essa configuração.

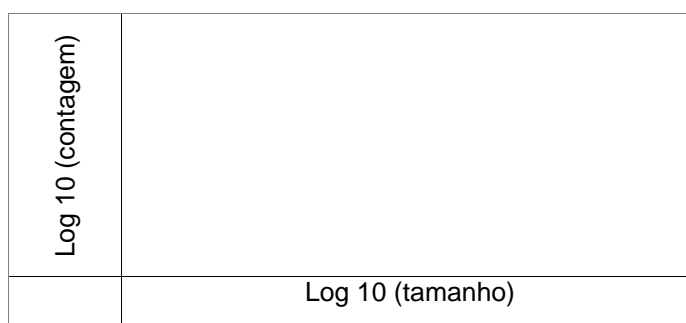


FIGURA 13 – Identificação de eixos cartesianos do *software Fractal Analysis System for Windows™*
 Fonte: Autoria própria

No segundo item da Tabela 3 temos R (n), que é o coeficiente de correlação dos dados obtidos pelo *software Fractal Analysis System for Windows™* no processo de contagem de caixas. Os valores obtidos nesse item para (R) foram: -0,9995; -0,9997; -0,9998, com (n) valendo 7, os quais podem ser visualizados na FIGURA 14.

De acordo com Antoniazzi (2007, p.19), o método de contagem de caixas “consiste em dividir a imagem em quadrados e contar quantos quadrados contém a forma analisada. Aumenta-se ou diminui-se progressivamente o tamanho dos quadrados e repete-se a contagem”; e tal processo possibilita “[...] uma série de dados: números de quadrados e suas dimensões”. Nesse sentido, os gráficos gerados pelo *software* evidenciam o comportamento das variáveis encontradas na contagem de caixas (pontos destacados em vermelho) e representam alterações decrescentes. Desse modo, quanto maior o número de caixas, menor será o tamanho das caixas resultando numa maior área de contato com a imagem, situação que é expressa no número da dimensão fractal.

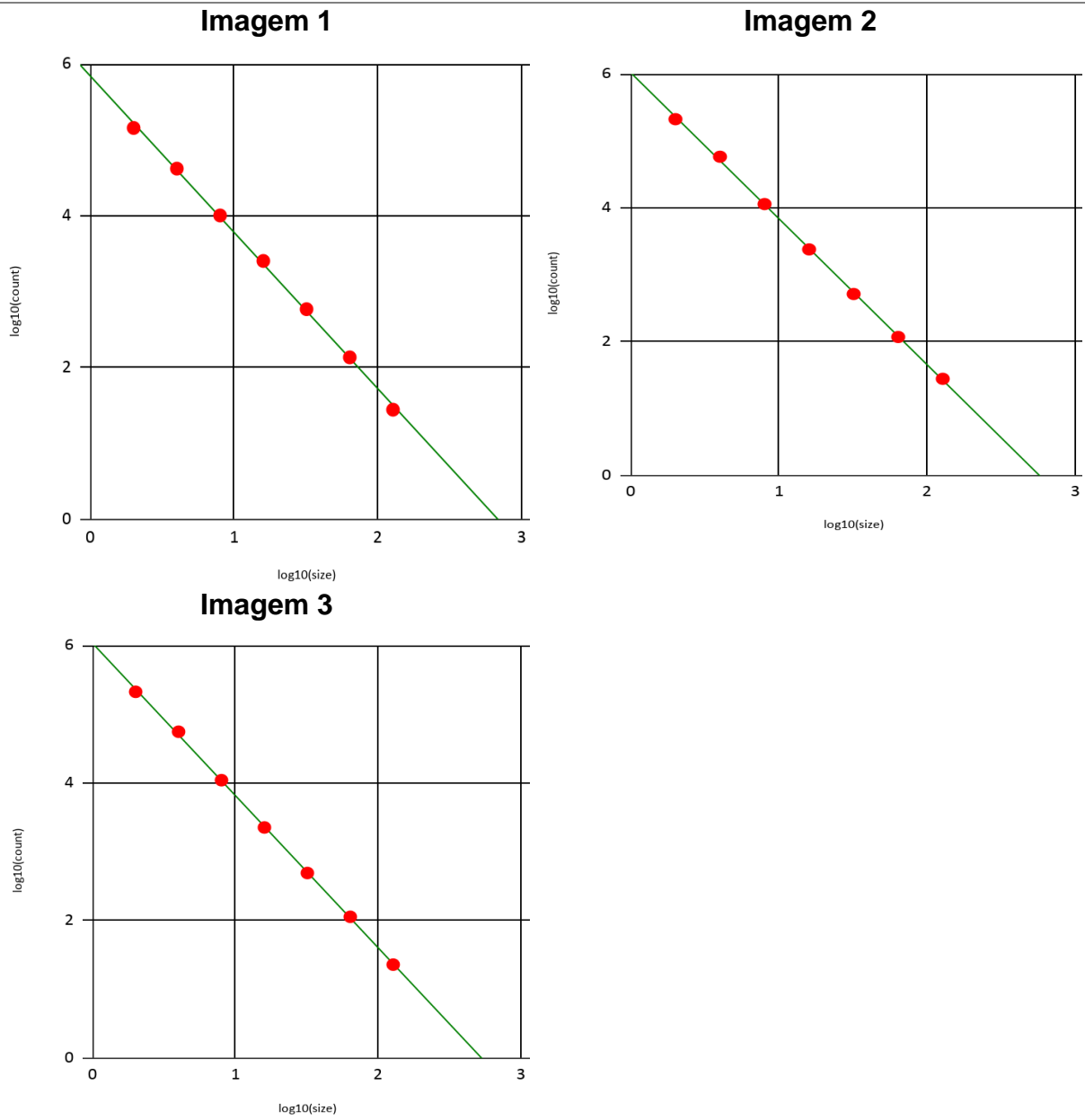


FIGURA 14 - *Box counting* das Imagens 1 a 3
 Fonte: Autoria própria

Em relação à *Fractal dimension* (dimensão fractal), seus valores aumentam consideravelmente ao passar de uma placa⁹ para a outra, sendo 2,0579; 2,1793; e 2,2101, fato que indica a expansão progressiva do crescimento do número de colônias de microrganismos da bactéria *Proteus mirabilis*, bacilo Gram negativo. Por exemplo, houve um aumento de aproximadamente 7% do número da dimensão fractal em comparação com a primeira e a terceira imagem. Dessa forma, é possível compreender que quanto mais diluída a solução (Imagem 1 – FIGURA 12) temos menos microrganismos, conseqüentemente obtendo um menor número de colônias e alterações menos sutis; o que resulta em um menor número de dimensão fractal. Por outro lado, quanto menos diluída a solução (Imagem 3 – FIGURA 12) temos mais microrganismos, maior número de colônias, e por conseguinte mais alterações decorrendo em um maior número de dimensão fractal.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As noções conceituais de fractais associadas ao método de *box counting* demonstram de formas diferentes o crescimento de microrganismos.

O objetivo geral deste trabalho foi o de utilizar noções conceituais de Geometria Fractal como alternativa para a contagem e representação do crescimento de microrganismos a partir de um *software* computacional, o qual consideramos alcançado com êxito. Para isso, a parceria científica firmada com pesquisadores japoneses que atuam na área de Biotecnologia no *Institute of Livestock and Grassland Science, NARO (NILGS)*, do Japão, possibilitou o uso do *software Fractal Analysis System for Windows™* permitindo ampliar a compreensão entre áreas aparentemente tão distintas entre si – a relação entre Geometria fractal e Microbiologia.

As leituras que embasaram a fundamentação teórica deste trabalho oportunizaram conhecer noções conceituais de fractais e aplicações em contextos matemáticos e biológicos, e compreender características do crescimento de

⁹ Vale lembrar que as diluições utilizadas nos experimentos laboratoriais foram respectivamente: 1:10000, 1:1000 e 1:100.

microrganismos utilizando recursos da Geometria fractal a partir de um *software* computacional.

O presente trabalho partiu da hipótese de que a análise de imagens de microrganismos obtidas em práticas laboratoriais biotecnológicas processadas em *software* computacional específico evidenciaria o crescimento microbiano, em dimensão fractal com possibilidade de obter representações gráficas numéricas referente à dimensão da imagem.

Os dados coletados por meio da prática laboratorial neste trabalho sinalizam que a Geometria fractal apresenta potencial para expressar o crescimento microbiano a partir do número da dimensão fractal das imagens obtidas dos meios de cultura inoculados.

Desse modo, foi possível detectar que, conforme as colônias de microrganismos se proliferaram, o número da dimensão fractal referente aos meios de cultura acompanharam tal crescimento. Entretanto, devido à pequena variação de disparidade numérica, visualmente os gráficos expressam de forma sutil essa diferença.

REFERÊNCIAS

ANTONIAZZI, R. L. **Aplicação do método Box Counting para a estimativa da dimensão fractal de figuras planas digitalizadas**. 2007. 52 f. Monografia (Especialização em Geomática) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

ASAKI, H., S. SHIBATA, and T. HATANAKA (1994): **Na Evaluation Method of Ecotypes of Japanese Lawn Grass (Zoysia japonica STEUD.) for Three Different Ecological Functions**. Bull. Natl. Grassl. Res. Inst. 49: 17-24 (in Japanese with English summary and then version 1.0 was released).

ASSIS, Thiago Albuquerque de et al. Geometria fractal: propriedades e características de fractais ideais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.2304.1-2304.10, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-11172008000200005>.

BARBOSA, R.M. **Descobrimo a Geometria Fractal para a sala de aula**. 2.ed. Belo Horizonte: Autêntica, 2005.

CHRICHTON, Michael. **Jurassic Park**. Nova Iorque: Aleph, 2015. 525 p. Tradução de: Marcia Men.

COELHO, R. C.; COSTA, L. F. **The box-counting fractal dimension: does it provide an accurate subsidy for experimental shape characterization? If so, how to use it?** In: CONFERENCE ON GRAPHICS, PATTERNS AND IMAGES, 8., 1995, São Carlos. Proceedings [...]. São Carlos: Cybernetic Vision Research Group, 1995.

Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 24., 2014, Uberlândia. **Utilizando box-counting para calcular a dimensão fractal de nódulos mamários**. Ilhéus: sbeb, 2014. 4 p.

DANTES, M. **Fisiologia microbiana**. Disponível em: <encurtador.com.br/atEKW>. Acesso em: 29 out. 2019.

DOUBLE AND Nothing: The Return of The Cantor Set. The Return of The Cantor Set. 2015. Disponível em: <encurtador.com.br/cyPX9>. Acesso em: 20 jun. 2019.

FERNANDES, J. A. **Fractais: uma nova visão da matemática**. 2007. 46 f. Monografia (Especialização em Matemática) – Centro Universitário de Lavras, Lavras, 2007.

FREITAS, W. R.; JABBOUR, C. J. C. Utilizando estudo de caso(s) como estratégia de pesquisa qualitativa: boas práticas e sugestões. **Estudo & Debate**, Lajeado, v.18, n. 2, p. 7-22, jul./dez. 2011.

FUNÇÃO de Weierstrass. 2019. Disponível em: <encurtador.com.br/cdgwG>. Acesso em: 20 jun. 2019.

MANDELBROT, Benoît B. How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractional dimension. **Science**, [S. l.], v. 156, n. 3775, p. 636-638, May 5, 1967.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARSH, F. Industrial microbiology. [S. l.]: Sonoro-vídeo, 2015. Color. Disponível em: <https://slideplayer.com/slide/5871861/>. Acesso em: 29 out. 2019.

NAOUMOVA, N.; BOURCHTEIN, A.; BOURCHTEIN, L. **Sobre dimensões fractais de ambientes construídos e naturais**. Pós, São Paulo, v. 21, n. 36, p.174-193, dez. 2014. Disponível em: <encurtador.com.br/crCWY>. Acesso em: 20 out. 2019.

NICOLAU, P. B. **Microrganismos e crescimento microbiano**. [S. l.]: Universidade Aberta, 2014.

NUNES, R. S. R. **Geometria fractal e aplicações**. 2006. 78 f. Tese (Doutorado em Matemática) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2006.

OLIVEIRA, Bruno. **Coeficientes de correlação**. 23 ago. 2019. Disponível em: <https://operdata.com.br/blog/coeficientes-de-correlacao/>. Acesso em: 6 nov. 2019.

PODHOSTNIK, J. **Fractal structures**. 2012. 15 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Matemática) – Universidade de Ljubljana, Liubliana, 2012. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 30, n. 2, 2304 (2008).

RIBEIRO, N. C.; TORRES, F. **Fundamentos das Matemática: Conjunto de Cantor**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

ROSS, Chip. **Cauliflower**. Disponível em: <encurtador.com.br/pMS69>. Acesso em: 19 nov. 2019.

SASAKI, H.; SHIBATA, S.; HATANAKA, T. Na evaluation method of ecotypes of Japanese Lawn Grass (*Zoysia japonica* STEUD.) for three diferente ecological functions. **Bulletin National Grassland Res. Inst.**, [S. l.], n. 49, p. 17-24, 1994.

STEWART, I. **Nature's numbers**. Nova Iorque: Basic Books, 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VÉHEL, Jacques Lévy; LUTTON, Evelyne; TRICOT, Claude (Ed.). **Fractals in engineering: from theory to industrial applications**. Springer Science & Business Media, 2012.

WHAT is Grayscale? Disponível em:<encurtador.com.br/psyE4>. Acesso em: 6 nov. 2019.

XAVIER, Bernardo. **Qual é o comprimento da costa do Brasil?** Rio de Janeiro: Imagem, [20--]. 22 slides, color, 2007.

YIN, R. K. **Estudo de caso**: planejamento de métodos. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2001.

APÊNDICE 1

Termo de autorização para uso científico do software *Fractal Analysis System for Windows™*



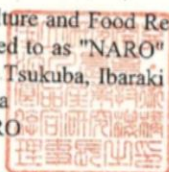
Agreement on Grant of License to use the program created in National Agriculture and Food Research Organization

Date : 26, August, 2019

To : Ms. Kátia Socorro Bertolazi

Address : National Agriculture and Food Research Organization
(hereafter referred to as "NARO"),
3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8517, Japan

From : Dr. Kazuo Kyuma
President of NARO



I hereby grant to the affiliation set forth under clause 4 of this Agreement a license to use the program within the scope of the aim and the plan set forth in your submission letter dated 13 August, 2019 as follows :

1. Name of the program:
Fractal analysis system
2. Registration number of copyright in Japan:
P6065-1
3. Period of use:
Date From: Permitted day To: 20 December, 2020
4. Name of the affiliation to use the program
Federal Institute of Paraná – Campus Londrina
5. Name of the person in charge of using the program
Kátia Socorro Bertolazi
6. Conditions on the usage of the program
 - (1) The license granted hereby is solely for internal use by the members of the research staff of the Federal Institute of Paraná .
 - (2) The program user shall not infringe the copyright of NARO.
 - (3) The program user shall not erase the copyright statement.
 - (4) NARO shall not be liable for the results arising from the use of the program by the program user.
 - (5) The program user shall obey the order of NARO in case of change of this Agreement or causing the suspicion about the usage of the program.
 - (6) The person in clause 5 shall give NARO the report on the results by using the program in another form on the following page within one month after the end of the period of use set forth under clause 3 of this Agreement.
 - (7) The program user shall consult with NARO before publication of the outcome and selling products from the outcome.
 - (8) The program user shall delete the program after the period of use set forth under clause 3 of this Agreement.