

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS EXATAS E DA COMPUTAÇÃO
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA COMPUTAÇÃO



**CLASSIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DETERMINAÇÃO DA COLORAÇÃO DE
GRAM UTILIZANDO IMAGENS HIPERESPECTRAIS E APRENDIZADO DE
MÁQUINA**

ARTHUR RICARDO DE SOUSA VITÓRIA

GOIÂNIA

2020

ARTHUR RICARDO DE SOUSA VITÓRIA

**CLASSIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DETERMINAÇÃO DA COLORAÇÃO DE
GRAM UTILIZANDO IMAGENS HIPERESPECTRAIS E APRENDIZADO DE
MÁQUINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Ciências Exatas e da Computação, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Ciência da Computação.

Orientador(a): Prof. Dr. Arlindo Rodrigues Galvão Filho

GOIÂNIA

2020

ARTHUR RICARDO DE SOUSA VITÓRIA

**CLASSIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E DETERMINAÇÃO DA COLORAÇÃO DE
GRAM UTILIZANDO IMAGENS HIPERESPECTRAIS E APRENDIZADO DE
MÁQUINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Ciências Exatas e da Computação, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Ciência da Computação.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Rodrigues Galvão Filho

Membro: Prof. Dr. Rafael Viana de Carvalho

Membro: Prof. Dr. Clarimar José Coelho

Membro: Ms. Isaac Yves Lopes de Macêdo

GOIÂNIA

2020

RESUMO

O objetivo desse trabalho é classificar à nível de gênero/espécie, e coloração de Gram de dezesseis bactérias distintas, a partir de imagens hiperespectrais no infravermelho próximo. As classificações realizadas são feitas a partir do uso de uma rede neural artificial de múltiplas camadas. O resultado para a classificação de gênero/espécie foi de 95.6% em média, considerando todas as bactérias analisadas para a classificação quanto a coloração de gram a acurácia média foi de 98.21%. Como resultado, pode-se observar que há possibilidade de classificação das bactérias por gênero/espécie e coloração de Gram.

Palavras-chave: Redes Neurais Artificiais, Bactérias, Imagens Hiperespectrais, Coloração de Gram.

ABSTRACT

The aim of this study is to classify at the level of genus/species, and Gram stain of sixteen different bacterias, using hyperspectral imaging on near infrared. The classifications performed are based on the use of multilayer artificial neural network. The result of the classification of genus/species was 95.6% on average, considering all the bacteria analyzed for the classification of the Gram stain the average accuracy was 98.21%. As result, it can be observed there is a possibility of classifying distinct bacteria by genus/species and Gram stain.

Keywords: Artificial Neural Networks, Bacteria, Hyperspectral Imaging, Gram stain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação cubo hiperspectral	10
Figura 2 – Filtragem por Savitzky-Golay	11
Figura 3 – Agrupamentos <i>k-means</i>	14
Figura 4 – Neurônio artificial proposto por McCulloch e Pitts (1943)	14
Figura 5 – Função de ativação: Tangente hiperbólica	15
Figura 6 – Função de ativação: Sigmoide	15
Figura 7 – Rede <i>Multilayer Perceptron</i>	16
Figura 8 – Superfície de erro de uma rede <i>Multilayer Perceptron</i>	17
Figura 9 – Desdobramento cubo hiperspectral	18
Figura 10 – Gráfico de dispersão PC1xPC2.	20
Figura 11 – Gráfico de dispersão PC1xPC2 classificados em amostra e fundo.	20
Figura 12 – Representação processo de segmentação para seleção da região de interesse.	21
Figura 13 – Espectros médios das bactérias.	21
Figura 14 – Espectros médios bactérias após filtro de Savitzky-Golay	22
Figura 15 – Espectros médios bactérias após aplicação do SNV.	23
Figura 16 – MSE ao decorrer da classificação quanto à coloração de Gram.	25
Figura 17 – MSE ao decorrer da classificação quanto ao gênero/espécie.	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação bactérias	19
Tabela 2 – Resultados treinamento classificação quanto à coloração de Gram. . . .	24
Tabela 3 – Resultado da classificação do conjunto de teste na classificação quanto ao Gram.	24
Tabela 4 – Resultados treinamento na classificação quanto a gênero/espécie	26
Tabela 5 – Resultados treinamento na classificação quanto a gênero e espécie . . .	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
2.1	Imagem Hiperspectral	10
2.2	Filtro de Savitzky-Golay	10
2.3	Análise dos Componentes Principais	11
2.4	K-Médias ou <i>k-means</i>	13
2.5	Redes Neurais Artificiais (RNAs)	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Aquisição dos dados	18
3.2	Calibração e organização dos dados	18
3.3	Pré-processamento dos dados	19
3.4	Classificação	23
4	ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS	24
4.1	Classificação quanto à coloração de Gram	24
4.2	Classificação quanto ao gênero e espécie	25
5	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Por meio de abordagens clássicas, na microbiologia, é possível que se tenha a identificação de bactérias sendo elas patogênicas ou não. Com o uso de métodos que se baseiam em cultura, seguido de testes fenotípicos voltados a exploração de características metabólicas presentes entre várias espécies. A cultura, portanto, pode demorar de horas à semanas (PASTERNAK, 2012). Adicionalmente, testes fenotípicos dependem do processo metabólico de cada microorganismo e os resultados podem ser inconclusivos (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

Características fenotípicas são aquelas dadas pelo resultado da expressão dos genes de um organismo e podem ser essenciais para a diferenciação de microorganismos (MOORE et al., 2010). Diferentes tipos de bactérias exercem diferentes atividades bioquímicas utilizando nutrientes que são obtidos diretamente do ambiente em que são encontradas. Mesmo as bactérias intimamente relacionadas podem ser separadas em espécies distintas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O longo tempo de incubação necessário para a cultura bacteriana contribui no atraso do tratamento e à disseminação de doenças infecciosas, além de incentivar o uso indevido de antibióticos culminando com o desenvolvimento de resistências a estes (KELLEY, 2017). Como demonstrado por Kumar *et al.* (2006) em alguns casos, como bacteremias, a identificação e o tratamento adequado são críticos. Tendo como exemplo o caso da septicemia, que sem o tratamento adequado, a cada hora, a mortalidade aumenta de 10 a 20%. Portanto, com uma identificação precoce da etiologia de uma sepse, o tempo de hospitalização e o custo são reduzidos (BEEKMANN et al., 2003).

Além da identificação por gênero/espécie, as bactérias podem ser classificadas quanto à coloração de Gram como, gram-positivas e gram-negativas. Sendo essa uma das mais importantes técnicas de coloração na microbiologia médica. No entanto, seus resultados não são aplicáveis em todas as bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Bactérias gram-negativas são mais resistentes porque os antibióticos não conseguem penetrar sua parede celular, devido a uma membrana externa (PARK et al., 2015). Devido ao número de etapas, reagentes envolvidos na coloração de Gram e variabilidade das bactérias o resultado pode não ser confiável (MOYES; REYNOLDS; BREAKWELL, 2009).

Atualmente, diversos métodos que visam fazer a detecção e diferenciação de bactérias tem se tornado cada vez mais importantes em diferentes áreas, visto que, que os métodos clássicos para a caracterização fenotípica demandam mais tempo de execução e trabalho (GOWEN et al., 2015).

Como técnica analítica não destrutiva e rápida, Imagens Hiperespectrais (*Hyperspectral Imaging*, HSI) estão sendo amplamente usadas para analisar as informações referentes a composição bioquímica de amostras biológicas (GU et al., 2020; LI et al.,

2011). Como demonstrado por Gowen *et al.* (2015) a HSI possibilita a identificação em um curto espaço de tempo em comparação às abordagens clássicas como a fenotipagem, e fornece resultados ainda mais precisos na identificação à nível de gênero/espécies por meio da informação espectral e a análise de imagens. As variações refletidas nas imagens capturadas pelas análises hiperespectrais representam as informações químicas das colônias bacterianas.

Como mostrado por Turra, Conti e Signoroni (2015) através da aquisição de HSI referentes a cinco bactérias patogênicas, responsáveis por infecções do trato urinário, através de uma abordagem baseada na aplicação da Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) e Máquina de Vetores Suporte (*Support Vector Machine*, SVM) foi possível se obter um resultado médio de 91.2%.

Arrigoni, Turra e Signoroni (2017) a fim de comparar o resultado na discriminação de dezesseis bactérias obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC), a partir das HSI, usa diversos algoritmos de aprendizado de máquina para que os resultados sejam comparados, sendo o maior resultado dado pelo uso do SVM, com uma acurácia de 95%.

Kammies *et al.* (2016) investiga o potencial uso das imagens hiperespectrais no infravermelho próximo de 5 diferentes bactérias (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*), as culturas se dão no agar Luria-Bertani (LB), e os melhores resultados se dão para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, sendo eles de 82% e 99.96% respectivamente, sendo este resultado a quantidade de *pixels* corretamente classificados, o modelo utilizado foi o Mínimos Quadrados Parciais com a Análise de Discriminante (*Partial Least Square - Discriminant Analysis*, PLS-DA).

Esse trabalho tem como objetivo classificar por gênero/espécie, e coloração de Gram, dezesseis bactérias distintas. Em que as imagens hiperespectrais das bactérias são geradas a partir de uma câmera hiperespectral que opera na região do Infravermelho de Ondas Curtas (*Short-Wave InfraRed*, SWIR).

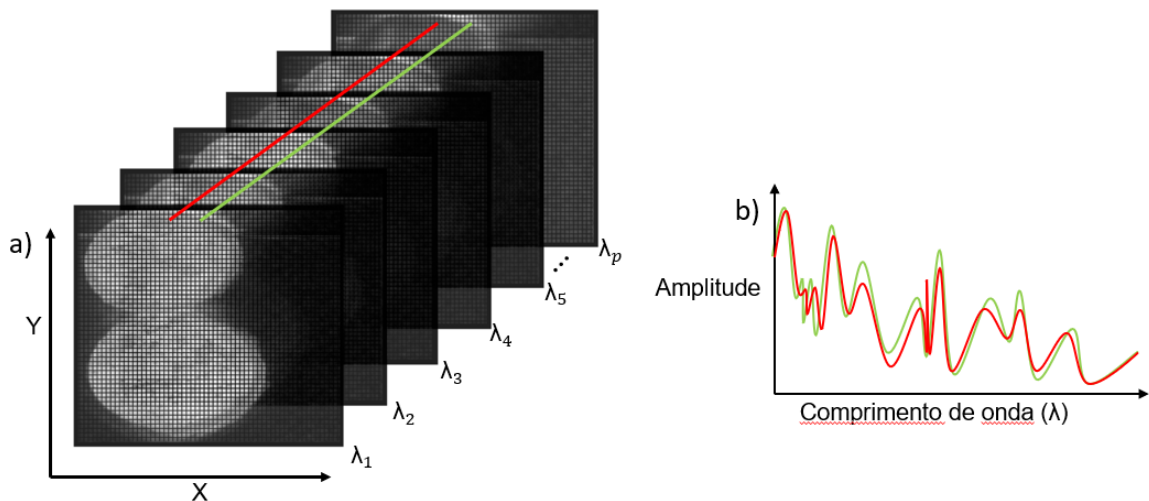
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Imagem Hiperspectral

Imagem Hiperspectral (*Hyperspectral Imaging*, HSI) pode ser descrita como uma técnica que combina uma imagem digital com a espectroscopia para se obter tanto as informações espaciais quanto espectrais de uma determinada amostra (CHENG; SUN, 2014). HSI vem sendo utilizada em diversas áreas, incluindo controle de recursos hídricos e vegetais, controle de qualidade e segurança alimentar, biomedicina, entre outras (GOWEN et al., 2007; GOVENDER; CHETTY; BULCOCK, 2007; CARRASCO et al., 2003; AFROMOWITZ et al., 1988).

Quando combinadas as informações espaciais com as espectrais de uma amostra, se obtém uma estrutura tridimensional. Que pode ser representada por $I(x, y, \lambda)$ (SILVA et al., 2014) denominada como cubo hiperspectral. Cada *pixel* vai conter um espectro contendo uma informação espectral da amostra analisada (SANDASI et al., 2014), assim como demonstrado na Figura 1. Para um determinado comprimento de onda λ , uma imagem pode ser vista utilizando uma escala de cinza ou uma outra escala de cor para representar sua intensidade (GELADI; GRAHN; BURGER, 2007).

Figura 1 – Cubo hiperspectral. (a) Para cada comprimento de onda obtido pelo equipamento se tem as informações espaciais da amostra e (b) cada *pixel* pode ser representado por um espectro.



Fonte: adaptada de Laboratório de Computação Científica da PUC-GO (2020).

2.2 Filtro de Savitzky-Golay

O algoritmo de Savitzky-Golay tem como objetivo a atenuação dos ruídos e conservação do sinal de interesse (FIGUEIREDO, 2018). O método proposto por Savitzky

e Golay (1964) que foi posteriormente corrigido por Steiner et al. (1972) é baseado na correção de um valor central de uma janela de $2m + 1$ pontos pela interpolação polinomial de grau p , usando um processo de convolução:

$$x_j = \sum_{i=-m}^m h_i x_{j+i} \quad (1)$$

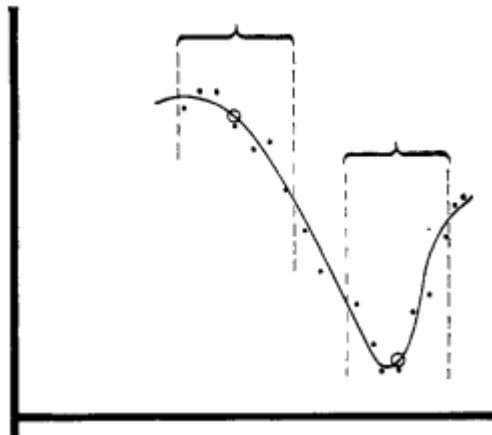
Ainda segundo os autores a janela de pontos $2m + 1$ é centrada em $i = 0$ e varia de $-m$ à m , onde é definido o polinômio interpolante descrito por:

$$h_i = \sum_{k=0}^p b_k i^k, \quad (2)$$

De acordo com Shafer (2011) a partir dos coeficientes dados pela Equação 2 o valor obtido pelo método dos mínimos-quadrados será minimizado:

$$\varepsilon = \sum_{i=-m}^m (h_i - x_i)^2 = \sum_{i=-m}^m \left(\sum_{k=0}^p b_k i^k - x_i \right)^2 \quad (3)$$

Figura 2 – Representação da janela de convolução no ajuste polinomial usando o filtro de Savitzky-Golay



Fonte: (SAVITZKY; GOLAY, 1964).

2.3 Análise dos Componentes Principais

A análise de componentes principais (*Principal Components Analysis*, PCA) é uma técnica estatística de natureza multivariada capaz de representar as informações originais em um novo conjunto de dados com um número menor de variáveis, não correlacionadas, chamadas de componentes principais (CPs) (ABDI; WILLIAMS, 2010). O objetivo principal da PCA é explicar a estrutura da variância e covariância, por meio de combinações lineares do conjunto de dados originais (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2016).

Seja um conjunto de dados com n amostras, sendo cada uma com as variáveis X_1, X_2, \dots, X_p , denotado por:

$$X_{n,p} = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1p} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{np} \end{bmatrix} \quad (4)$$

De acordo com Filho (2010) com a PCA é possível representar o conjunto de dados $X_{n,p}$ da maneira como descrita na Equação 5, onde X são as amostras originais como descrito na Equação 4, T é a matriz de *scores* e L é a matriz de *loadings*.

$$X = TL' \quad (5)$$

Segundo Vicini (2005) para se obter as CPs, primeiro é necessário calcular a matriz de variância-covariância Σ , encontrar os seus autovalores e autovetores respectivamente e, por fim, por meio de combinações lineares, obter as CPs que serão usadas pra representar o conjunto de dados. A matriz de variância-covariância pode ser descrita de acordo com a Equação 6, onde $Var(X_i)$ e $Cov(X_i, X_j)$ são denotadas nas Equações 7 e 8, respectivamente.

$$\Sigma = \begin{bmatrix} Var(X_1) & Cov(X_1, X_2) & \dots & Cov(X_1, X_p) \\ Cov(X_1, X_2) & Var(X_2) & \dots & Cov(X_2, X_p) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ Cov(X_n, X_p) & Cov(X_n, X_p) & \dots & Var(X_p) \end{bmatrix} \quad (6)$$

$$Var(X_j) = \frac{1}{n-1} \left[\sum_{i=1}^n x_{ij}^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_{ij} \right)^2}{n} \right] \quad (7)$$

$$Cov(X_j, X_k) = \frac{1}{n-1} \left[\sum_{i=1}^n x_{ij}x_{ik} - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_{ij} \right) \left(\sum_{i=1}^n x_{ik} \right)}{n} \right] \quad (8)$$

A partir da matriz de variância-covariância Σ encontram-se os autovalores e autovetores $(\lambda_1, e_1), (\lambda_2, e_2), \dots, (\lambda_p, e_p)$. O fator de importância de um autovalor segue de forma decrescente, ou seja, $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_p$ (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2016).

Forgiarini (2014) diz que a i -ésima componente principal pode ser obtida através da combinação linear entre os dados originais e os elementos dos autovetores calculados \vec{x}_i a partir da matriz Σ .

$$.Y_{ni} = x_{i1}X_{n1} + x_{i2}X_{n2} + \dots + x_{ip}X_{np} \quad (9)$$

A variabilidade total contida nas CPs é igual a variabilidade total contida nas variáveis originais. A contribuição da k -ésima CP, representada em porcentagem, é dada pela Equação 10 (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2016).

$$C_k = \frac{Var(Y_i)}{\sum_{i=1}^p Var(Y_i)} 100 = \frac{\lambda_i}{\sum_{i=1}^p \lambda_i} 100 \quad (10)$$

Como Y_i é uma variável latente, ou seja, ela não é mensurada por meio de experimentos ou pesquisas amostrais. O objetivo da PCA é projetar as variáveis originais em um novo plano, onde essas variáveis não possuam correlação e expliquem da maneira mais aproximada os dados originais (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2016). O equivalente a isso é maximizar a variabilidade da variável latente Y_i , dada por:

$$Var(Y_i) = Var(\vec{x}'_i X) = \vec{x}'_i Var(X) \vec{x}_i = \vec{x}'_i \Sigma \vec{x}_i \quad (11)$$

2.4 K-Médias ou *k-means*

Segundo Forsyth (2016) *k-means* é uma técnica capaz de criar grupos ou *clusters* mensurando a similaridade entre as amostras do conjunto de dados. Uma forma de se mensurar a similaridade entre as amostras é calculando a distância entre elas, que pode ser calculada usando uma generalização das distâncias Euclidiana e Manhattan, chamada de distância de Minkowski (KAMBER; PEI et al., 2001):

$$d(x_i, x_j) = (|x_{i1} - x_{j1}|^g + |x_{i2} - x_{j2}|^g + \dots + |x_{ip} - x_{jp}|^g)^{1/g} \quad (12)$$

Dado um conjunto de dados X , o agrupamento é o processo de criar múltiplos grupos C_1, C_2, \dots, C_k em que as amostras nele representados tenha uma alta semelhança entre si e uma dessemelhança maior entre diferentes grupos (KAMBER; PEI et al., 2001). Os pontos que representam cada grupo são denominados de centroide (MACQUEEN, 1967). De acordo com Maimon (2005) as centroides são dadas pelo vetor média de C_k :

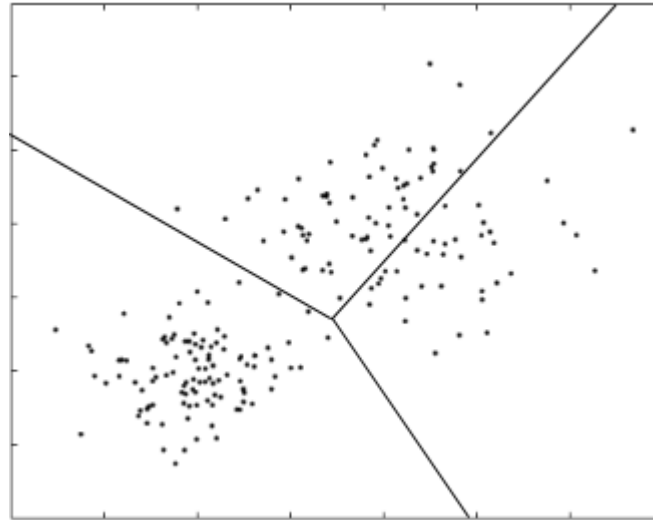
$$\mu_{k,j} = \frac{1}{N_k} \sum_{\forall x_i \in C_k} x_{i,j} \quad (13)$$

Para se obter os grupos, primeiro é necessário definir a quantidade de grupos, após isso, todas as amostras são atribuídas à centroide mais próxima e então as centroides são calculadas novamente. Esse processo se repete até que o algoritmo encontre uma convergência (MAIMON; ROKACH, 2005; SELIM; ISMAIL, 1984).

A Soma dos Erros Quadráticos (*Sum of Squared Error*, SSE) é o mais simples e comum método para se avaliar os grupos formados pelo algoritmo *k-means* (MAIMON; ROKACH, 2005), sendo calculado por:

$$SSE = \sum_{i=1}^k \sum_{\forall x_i \in C_k} \|x_i - \mu_k\|^2 \quad (14)$$

Figura 3 – Ilustração agrupamentos feitos após a convergência do algoritmo *k-means*.

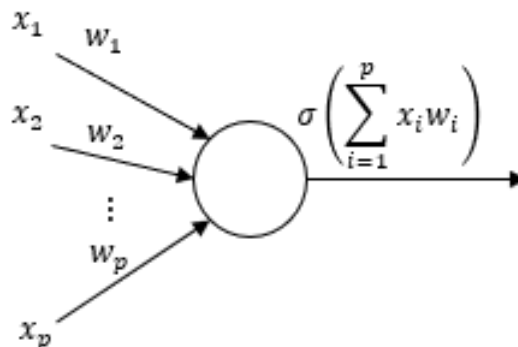


Fonte: Autoria própria.

2.5 Redes Neurais Artificiais (RNAs)

As RNAs são inspiradas no nosso entendimento biológico do sistema nervoso humano (LIPPMANN, 1987). As Redes Neurais Artificiais têm uma estrutura que permite que as informações sejam recebidas e então associadas a repostas, por meio de um sistema altamente conectado baseado em neurônios, sua unidade básica (OLIVEIRA, 2010). A ideia de um neurônio artificial foi inicialmente proposta por McCulloch e Pitts (1943), como pode ser representado na Figura 4. Posteriormente, o modelo do neurônio artificial de McCulloch culminou na concepção do *Perceptron* (ROSENBLATT, 1958) e *Adaline* (WIDROW; HOFF, 1960).

Figura 4 – Modelo de um neurônio artificial proposto por McCulloch e Pitts.



Fonte: (RAUBER, 2005).

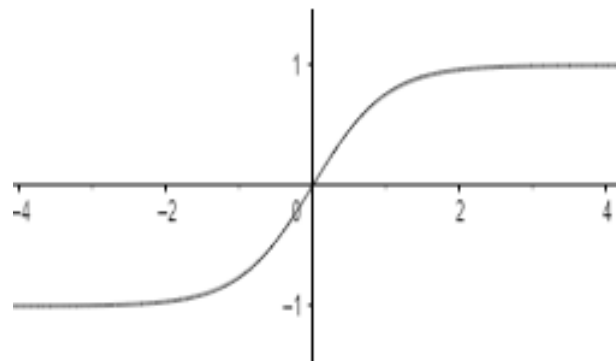
Cada valor de entrada no neurônio está associado com um peso w_i que vai refletir a importância dessa entrada para a saída y_j . A saída do *perceptron* pode ser representado

pela Equação 15, onde é subtraído um limiar μ da combinação linear entre as entradas e seus respectivos pesos, se o resultado for ≥ 0 então $y = +1$ e $y = -1$ caso contrário. Sendo possível apenas a resolução de problemas linearmente separáveis (LIPPMANN, 1987; RAUBER, 2005).

$$y_j = \sigma \left(\sum_{i=1}^p w_i x_i - \mu \right) \quad (15)$$

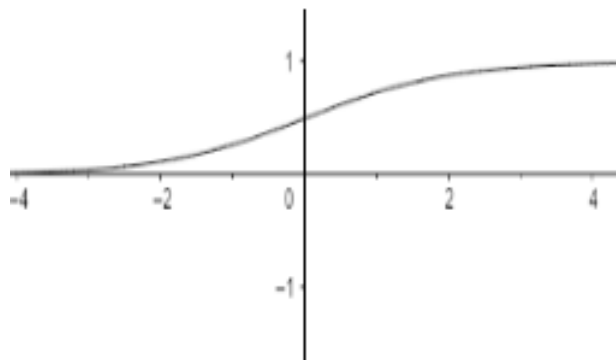
A função de ativação σ apresentada por McCulloch e Pitts (1943) não é a única que pode ser utilizada. As Figuras 7 e 5 ilustram outras funções de ativação que podem ser usadas na saída do neurônio artificial *perceptron* (SHARMA, 2017).

Figura 5 – Representação da função de ativação: Tangente Hiperbólica



Fonte: (SHARMA, 2017).

Figura 6 – Representação da função de ativação: Sigmoide



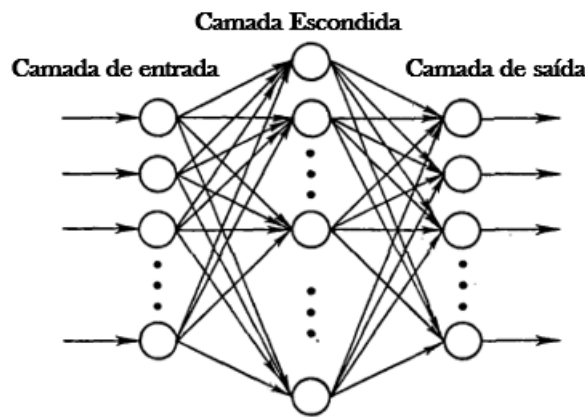
Fonte: (SHARMA, 2017).

O potencial e a flexibilidade dos cálculos realizados em uma rede neural vêm da criação de um conjunto de neurônios interconectados. Devido ao método de propagação da informação recebida uma RNA pode ser denominada de rede de propagação para frente (*feedforward*), sendo o fluxo de informações unidirecional (RAUBER, 2005).

Os neurônios que recebem informações simultaneamente são organizados em camadas. A forma mais comum de uma RNA é aquela com *perceptrons* de múltiplas

camadas (*MultiLayer Perceptrons*, MLP). Como pode ser visto na Figura 7, uma rede MLP possui uma camada de entrada (*input layer*), composta por neurônios que apenas propagam a informação, uma camada de saída (*output layer*), composta por neurônios que vão determinar a saída y_k para uma determinada entrada e todas as camadas que estão entre a camada de entrada e saída são descritas como camadas escondidas (*hidden layers*) (LIPPMANN, 1987; OLIVEIRA, 2010).

Figura 7 – Uma *Multilayer Perceptron*. A camada de entrada é responsável por propagar a informação para frente sem a submeter a nenhum cálculo, as camadas escondidas computam o grau de importância de cada entrada e por fim, a camada de saída é responsável por determinar a saída mais adequada.



Fonte: (RUMELHART; HINTON; WILLIAMS, 1985).

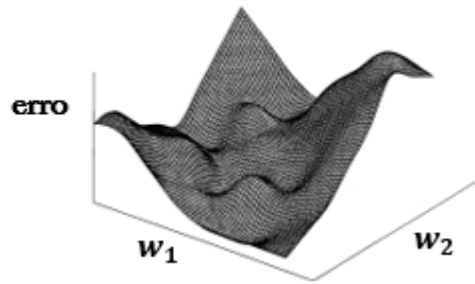
”Uma rede padrão com multiplas camadas *feedforward* é capaz de fazer a aproximação de qualquer função mensurável em qualquer grau de acurácia”(HORNÍK et al., 1989). Com um determinado número de neurônios na camada escondida, uma rede *feedforward* é capaz de aproximar uma grande classe de funções. O aprendizado de uma rede MLP pode ser dado de maneira supervisionada. Para que o treinamento ocorra é necessário um conjunto de dados de treinamento associados com as suas respectivas saídas (GARDNER; DORLING, 1998).

Segundo Gardner (1998), o treinamento de uma rede MLP é o procedimento pelo qual os valores dos pesos são determinados para que a rede seja capaz de generalizar novos dados, ou seja, os pesos w_i são encontrados para que o valor do erro seja minimizado.

Sendo o objetivo minimizar o erro, Rumelhart et al. (1985) propôs um método para atualização de pesos, que consiste no cálculo do gradiente descendente para obter a direção em que o erro seja minimizado, método este conhecido como retropropagação de erro (*backpropagation*). Na Figura 8 podemos ver a superfície de erro formada por uma rede MLP. Para cada saída obtida, o algoritmo *backpropagation* calcula o gradiente local, e toma a direção oposta para buscar minimizar o erro (BISHOP et al., 1995).

Um método para se mensurar a qualidade da saída da rede y_j , para uma amostra

Figura 8 – Ilustração da superfície de erro formada por uma rede MLP com dois pesos w_1 e w_2 .



Fonte: (GARDNER; DORLING, 1998).

X_j , calculado pela Equação 16, é determinado o valor do Erro Médio Quadrático (EQM) descrito na Equação 17 (HINTON, 1992).

$$y_j = \sigma \left(\sum_{i=0}^p w_i x_i \right) \quad (16)$$

$$\varepsilon = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (y_j - \hat{y}_j)^2 \quad (17)$$

O propósito do algoritmo de *backpropagation* é, a partir do erro ε e os pesos w , definir a direção de crescimento da variável ε que é dado pelo gradiente definido na Equação 18, como a variável ε deve ser minimizada então o gradiente descendente é dado por $-\nabla\varepsilon$. Uma vez que se tem a direção em que ε é minimizado, basta calcular o valor que o peso w irá assumir na próxima iteração, dada uma taxa de aprendizado pré-definida η , sendo calculado pela Equação 19 (RAUBER, 2005).

$$\nabla\varepsilon(w) = \frac{\partial\varepsilon(w)}{\partial w} \quad (18)$$

$$w_{i+1} = w_i - \eta \nabla\varepsilon \quad (19)$$

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aquisição dos dados

As bactérias (Tabela 1) são obtidas a partir de lâminas preparadas no laboratório Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTESP-UFG). As imagens hiperespectrais são geradas usando a câmera hiperespectral sisuChema infravermelho de ondas curtas (*Short-Wave InfraRed*, SWIR) (Specim, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finlândia) com o alcance espectral de 900-2514 nm. A estação sisuChema dispõe de um sensor MCT, controlador de temperatura, com 320 *pixels* espaciais e 256 bandas espectrais, com uma taxa de leitura de 400 linhas por segundo. O equipamento foi disponibilizado pelo Laboratório de Computação Científica (LCC) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

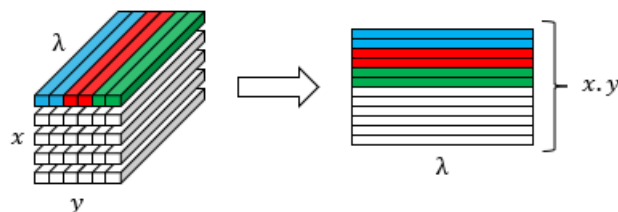
3.2 Calibração e organização dos dados

Para cada imagem hiperespectral também é gerado uma imagem de referência do preto (0% de reflectância) e branco (100% de reflectância) automaticamente pela câmera hiperespectral. Adicionalmente, tendo como objetivo minimizar as variações devido a iluminação, resposta do sensor e condições nas imagens hiperespectrais é realizado a calibração da reflectância obtida usando as imagens do branco e preto como referência, como demonstrado na Equação (20). Onde a variável D é a referência do preto, W é a referência do branco e I o cubo hiperespectral.

$$I_{x,y,\lambda} = -\log_{10} \left[\frac{I_{x,y,\lambda} - D_{y,\lambda}}{W_{y,\lambda} - D_{y,\lambda}} \right] \quad (20)$$

As imagens hiperespectrais que até então representadas por uma estrutura de três dimensões $I(x, y, \lambda)$, devem ser arranjadas de forma que a intensidade em cada comprimento de onda, seja organizada individualmente em colunas, para cada *pixel* (AMIGO; MARTI; GOWEN, 2013).

Figura 9 – Representação esquemática do desdobramento do cubo hiperespectral.



Fonte: Autoria própria

Tabela 1 – Identificação das bactérias de acordo com o número de acesso a linhagem e coloração de gram.

Nº de acesso da linhagem	Bactéria (ANVISA Manual)
Gram positivas	
ATCC 14579	<i>Bacillus cereus</i>
ATCC 6633	<i>Bacillus subtilis</i>
ATCC 13032	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
ATCC 29212	<i>Enterococcus faecalis</i>
ATCC 9341	<i>Micrococcus luteus</i>
ATCC 6538	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 12228	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Gram negativas	
ATCC 13048	<i>Enterobacter aerogenes</i>
HMF:FTA	<i>Enterobacter cloacae</i>
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>
ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
NWP 9433	<i>Proteus mirabilis</i>
ATCC 9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ATCC 10708	<i>Salmonella enterica</i>
ATCC 14765	<i>Serratia marcescens</i>

Fonte: Laboratório de Computação Científica da PUC-GO

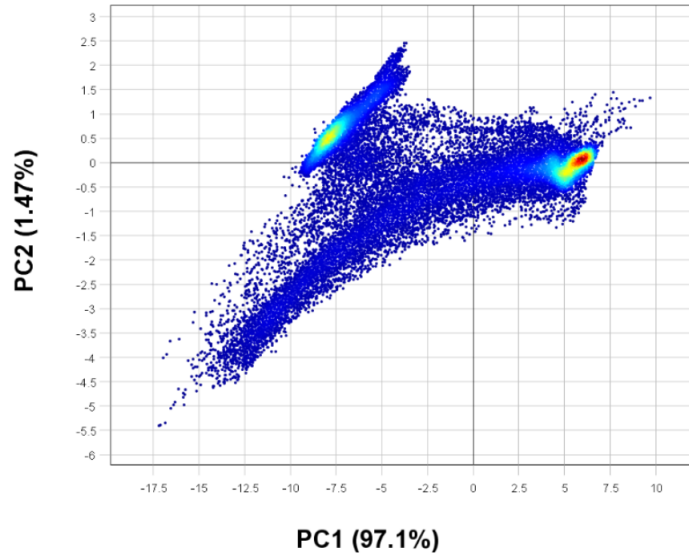
3.3 Pré-processamento dos dados

Ao lidar com imagens hiperespectrais, é de extrema importância realizar determinadas correções nos dados para aumentar a acurácia nos resultados ao final da análise. Os dados espectrais NIR, geralmente precisam de correções para minimizar, da informação espectral, variações aleatórias ou sistemáticas que não estão relacionadas à propriedade de interesse analisada, independentemente do seu modo de aquisição (GOWEN et al., 2007). Nesse sentido, algumas técnicas de pré-processamento podem ser utilizadas.

Com o objetivo de selecionar os *pixels* correspondentes a amostra das bacterias, recorreu-se a uma abordagem para segmentar a região de interesse (Region Of Interest, ROI). A partir da PCA foram utilizadas as duas primeiras componentes principais: PC1 e PC2 e então a execução do algoritmo de *k-means* com o valor de $k = 2$ sendo os dois *clusters* classificados em fundo e amostra. Na Figura 10 pode ser visualizado os *clusters*

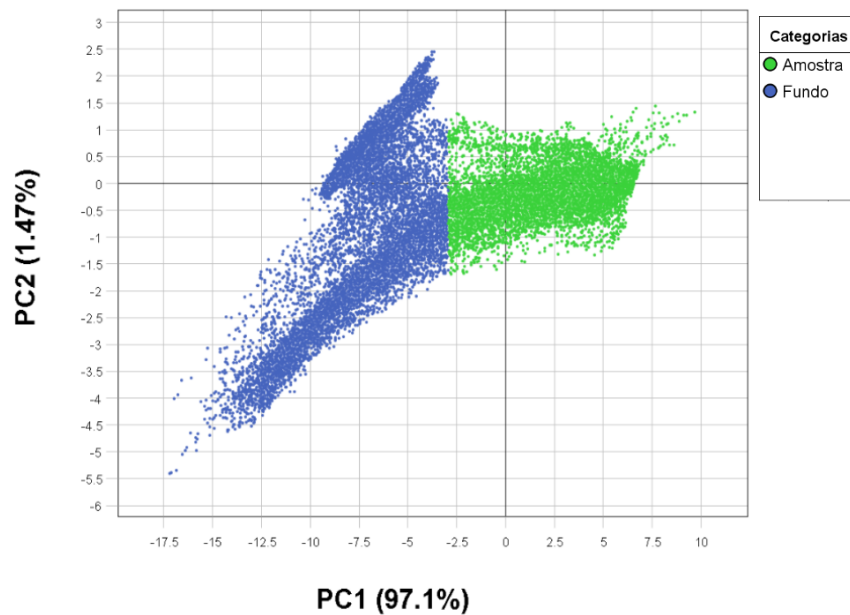
que os dados originais formam, onde as cores representam a densidade dos dados. Já na Figura 11 pode ser visto a classificação de acordo com algoritmo *k-means* e na Figura 12 o mesmo procedimento pode ser visualizado utilizando uma camada do cubo hiperespectral.

Figura 10 – Representação dos dois primeiros componentes principais na imagem hiperespectral coletada a partir da placa da bactéria N^o 14579 *Bacillus cereus*.



Fonte: Laboratório de Computação Científica, PUC-GO.

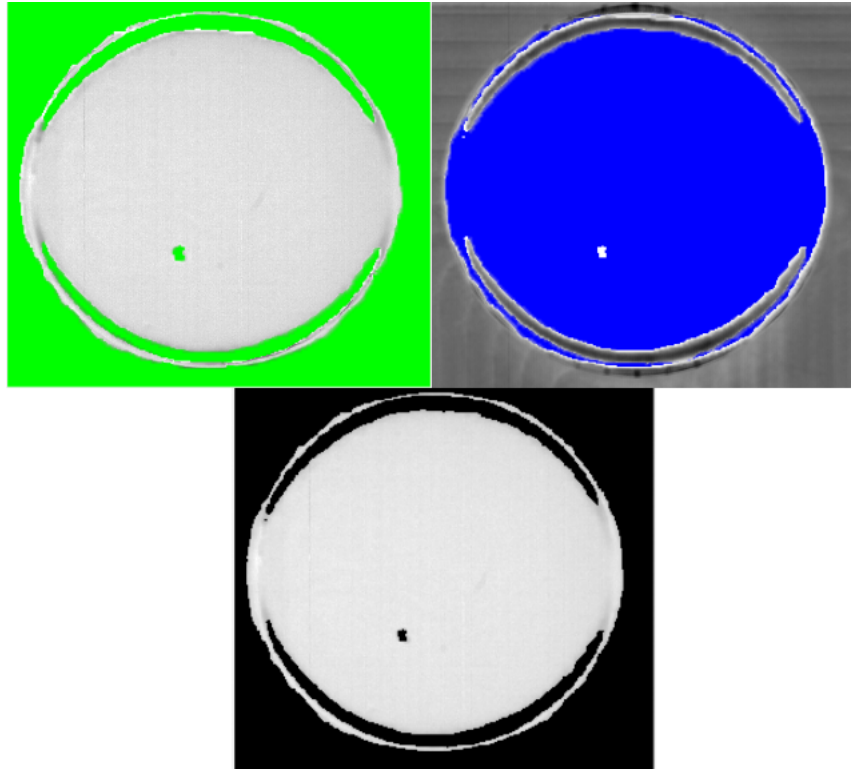
Figura 11 – Representação dos dois primeiros componentes principais classificados com o algoritmo *kmeans* na imagem hiperespectral coletada a partir da placa da bactéria N^o 14579 *Bacillus cereus*.



Fonte: Laboratório de Computação Científica, PUC-GO.

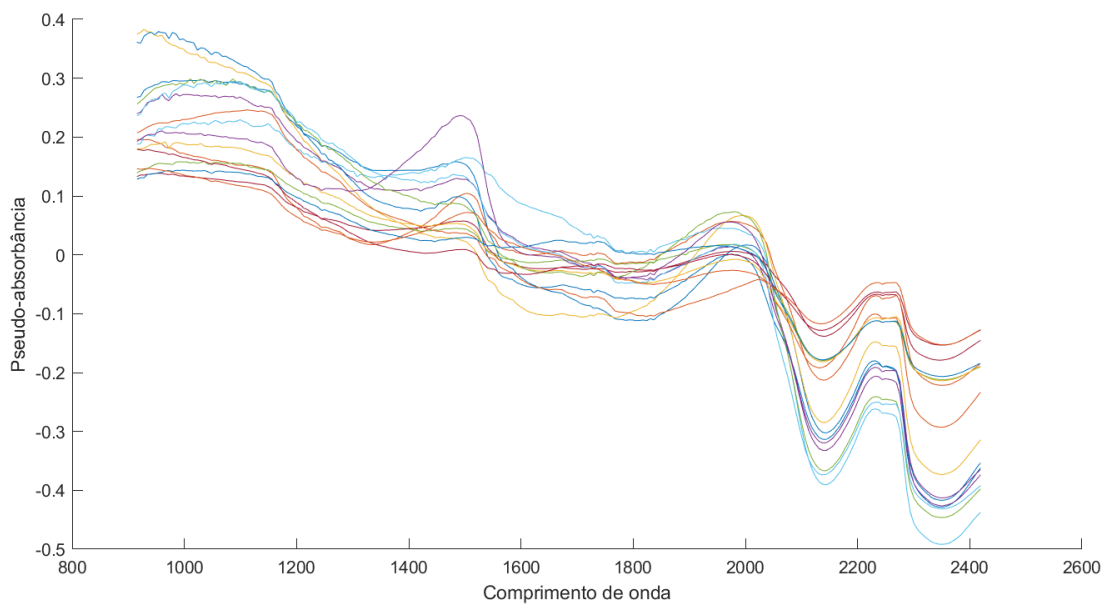
Uma vez que as imagens hiperespectrais representam apenas a região de interesse, o espectro médio de cada amostra pode ser visualizado de acordo com a Figura 13.

Figura 12 – Representação da abordagem de segmentação utilizando os dois primeiros componentes principais e o algoritmo de *k-means* para classificação dos *pixels* em amostra e fundo. Imagem hiperespectral coletada a partir da placa da bactéria N^o 14579 *Bacillus cereus*.



Fonte: Laboratório de Computação Científica, PUC-GO.

Figura 13 – Espectros médios das bactérias. Onde cada linhas obedece a Tabela (1), cada cor representa a média entre todos os *pixels* correspondentes à cada bactéria, todas os espectros são centradas em 0.



Fonte: Laboratório de Computação Científica, PUC-GO.

O filtro de Savitzky e Golay (1964), é uma técnica frequentemente aplicada para reduzir os efeitos da linha de base e suavizar os espectros, tornando possível evidenciar sinais não muito perceptíveis. Das várias variantes presentes no conjunto de dados, as mais comuns para dados de reflectância são flutuações sistemáticas geradas devido à dispersão de luz, para reduzir tais efeitos a técnica de Variação Normal Padrão (*Standard Normal variate*, SNV) é utilizada (SILVA, 2013).

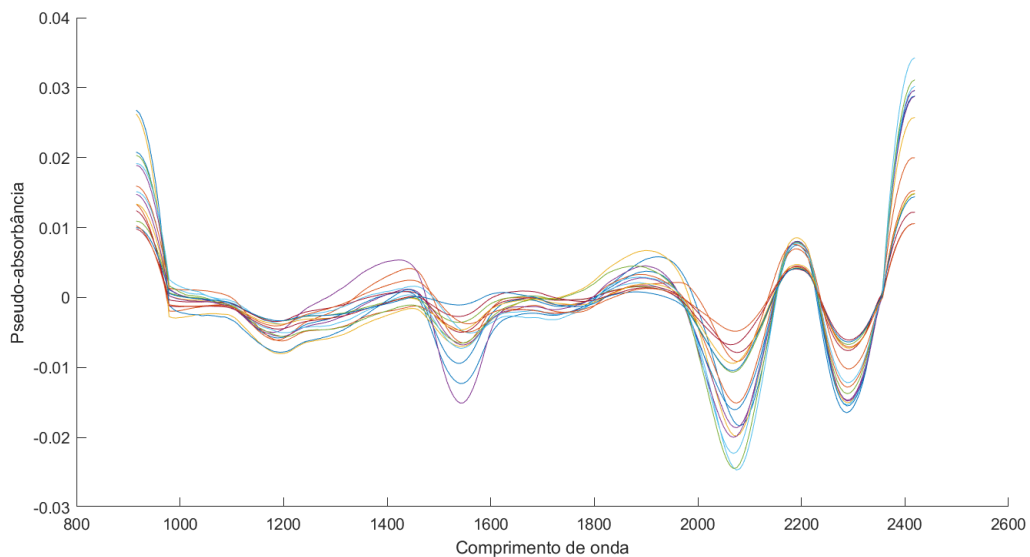
Com o objetivo de remover bandas ruidosas, o alcance espectral utilizado foi de 915.51-2419nm. Chamado de efeito aditivo, a primeira derivada de Savitzky e Golay (1964) remove apenas os efeitos de linha de base. Com esta finalidade, a primeira derivada do filtro de Savitzky-Golay com um polinômio de 2^a-ordem e uma janela de 21 pontos foi usado. Por fim, é aplicada a técnica SNV no conjunto de dados para centralizar na média e normalizar. Além de minimizar a variabilidade que não está relacionada com a composição química das amostras analisadas (WALPOLE; MYERS, 2012; SANDASI et al., 2014), denotado pela Equação (22).

$$\sigma(x_i) = \sqrt{\frac{\sum (x_{i,j} - \bar{x}_i)^2}{p - 1}} \quad (21)$$

$$x_{i,j} = \frac{(x_{i,j} - \bar{x}_i)}{\sigma(x_i)} \quad (22)$$

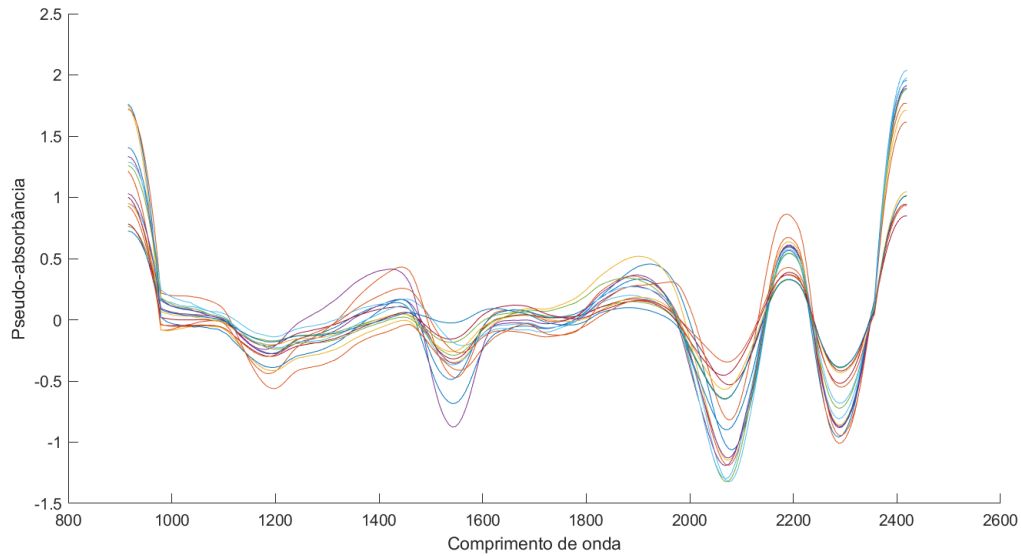
A transformação que ocorre com os espectros, de acordo com a aplicação do filtro de Savitzky-Golay pode ser visualizada através dos espectros médios de cada amostra representados na Figura 14. A partir da aplicação do SNV os espectros médios de cada amostra podem ser visualizados de acordo com a Figura 15.

Figura 14 – Espectros médios bactérias após aplicação do filtro de Savitzky-Golay. As linhas obedecem a Tabela 1, onde cada cor representa uma amostra.



Fonte: Laboratório de Computação Científica, PUC-GO.

Figura 15 – Espectros médios bactérias após aplicação do SNV. As linhas obedecem a tabela 1, onde cada cor representa uma amostra.



Fonte: Laboratório de Computação Científica, PUC-GO.

3.4 Classificação

A fim de poder determinar qual a coloração de Gram de novos dados, as amostras utilizadas para treinamento foram associadas à duas classes: Gram-negativas e Gram-positivas: 1 e 2 respectivamente, de acordo com a Tabela 1. Para a classificação quanto ao gênero e espécie cada amostra foi associada a uma classe diferente variando de $y = 1, 2, \dots, 16$.

O conjunto de treinamento foi selecionado usando os primeiros 50% da quantidade de total de *pixels*, de cada amostra, já para o teste os últimos 50% foram selecionados. Para processo de treinamento, teste e validação da RNA foram utilizados 70%, 15% e 15% respectivamente. Para atender os objetivos propostos nesse trabalho, duas RNAs *feed-forward* foram treinadas. Com configurações semelhantes, dadas a partir de testes empíricos, as redes foram treinadas variando o número de camadas escondidas, neurônios, funções de ativação e método para atualização de pesos, a fim de se obter a melhor configuração.

A configuração da RNA que mais se deu adequada para este estudo foi uma rede *feed-forward* com uma camada de entrada de 240 neurônios, uma camada escondida, composta por 100 neurônios com a tangente-hiperbólica como função de ativação. Para a classificação quanto ao Gram a rede foi configurada com dois neurônios na camada de saída, para a classificação quanto ao gênero e espécie são utilizados 16 neurônios de saída, sendo suas funções de ativação a *softmax*. O algoritmo de gradiente conjugado em escala é utilizado para a atualização dos pesos durante o treinamento, processo este mais detalhado em Moller (1993).

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS

Tendo em vista o escopo de estudo aqui abordado, esse capítulo se dividirá em duas sub-sessões a fim de apresentar e discutir os resultados obtidos relativamente aos objetivos propostos.

4.1 Classificação quanto à coloração de Gram

Primeiramente foi feito o treinamento da rede neural para a classificação das bactérias com relação a coloração de Gram, portanto todas as 16 bactérias são associadas a duas classes. A Tabela 2 traz os resultados no processo de treinamento. Para se mensurar a acurácia do método de classificação utilizado é calculado a porcentagem de acerto dado pela quantidade *pixels* corretamente classificados divididos pela quantidade de total de *pixels* que foram submetidos a classificação.

Tabela 2 – Resultados ao final do treinamento da rede responsável pela determinação da coloração de Gram das bactérias analisadas.

Classe	Treinamento	Teste	Validação	Total
1 - Gram-negativas	49.8%	49.5%	49.3%	49.6%
2 - Gram-positivas	49.8%	49.6%	50.0%	49.8%
% Total	99.6%	99.1%	99.3%	99.4%

Fonte: Autoria própria.

Adicionalmente, o Erro Quadrático Médio (*Mean Squared Error*, MSE) foi calculado para se mensurar a qualidade da classificação utilizada durante o processo de treinamento. Processo este visualizado na Figura 16, o melhor resultado para o MSE se dá na época 500.

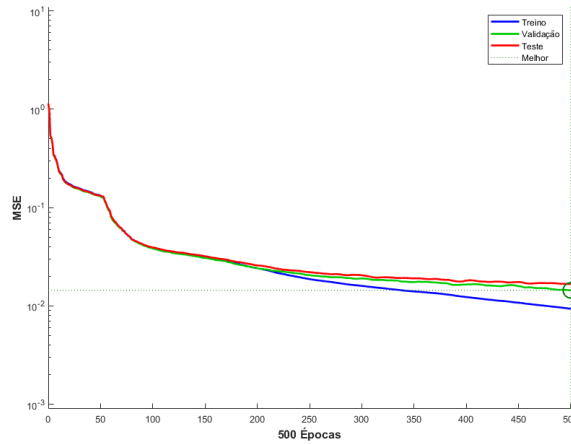
Para validar a rede treinada foram selecionados os 50% de cada amostra que não estavam no treinamento. A Tabela 3 mostra esses resultados.

Tabela 3 – Resultado da classificação *pixel à pixel* do conjunto de teste formado a partir das amostras das bactérias analisadas.

Classe	n ^o pixels	n ^o acertos	n ^o erros
Gram-negativas	158967	156349 (98.35%)	2618 (1.6468%)
Gram-positivas	159720	156636 (98.06%)	3084 (1.9308%)

Fonte: Autoria própria.

Figura 16 – Representação da curva do MSE durante o treinamento da rede neural responsável pela classificação quanto à coloração de Gram.

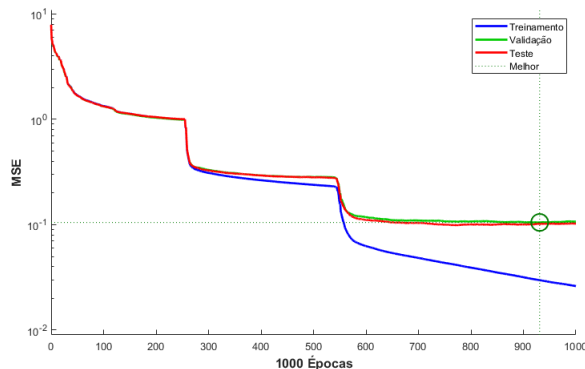


Fonte: Autoria própria.

4.2 Classificação quanto ao gênero e espécie

Para o treinamento da RNA que vai classificar as bactérias quanto ao gênero/espécie, cada amostra é associada a uma classe. O treinamento se dá por 1000 épocas, mostrados na Tabela 4. Assim como na Sessão (4.2) a mesma medida para se mensurar a acurácia foi utilizada. Adicionalmente, o MSE foi calculado durante o treinamento para mensurar o erro médio durante a classificação e pode ser visualizado na Figura 17, onde o menor MSE dado pelo conjunto de validação ocorre na época 931.

Figura 17 – Representação da curva do MSE durante o treinamento da rede neural responsável pela classificação quanto ao gênero/espécie.



Fonte: Autoria própria.

Assim como para a classificação quanto à coloração de Gram, nessa abordagem os primeiros 50%, da quantidade total de *pixels*, de cada amostra foram selecionadas para treinamento e os últimos 50% para teste. A classificação *pixel à pixel* para o conjunto de

dados de teste pode ser demonstrada de acordo com a Tabela 5.

Tabela 4 – Resultados ao final do treinamento da RNA responsável pela classificação da classificação quanto ao gênero/espécie das bactérias analisadas.

Classe	Treinamento	Teste	Validação	Total
<i>Bacillus cereus</i>	7.9%	8.0%	7.9%	7.9%
<i>Bacillus subtilis</i>	7.9%	8.1%	8.1%	8.0%
<i>Coryniumbacterium glutaminum</i>	8.1%	8.0%	8.0%	8.1%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	7.8%	7.6%	8.0%	7.8%
<i>Enterobacter cloacal</i>	3.2%	3.2%	3.2%	3.2%
<i>Enterococcus faecalis</i>	7.7%	7.7%	7.6%	7.7%
<i>Escherichia coli</i>	3.2%	3.3%	3.2%	3.2%
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	8.1%	8.1%	8.0%	8.1%
<i>Micrococcus luteus</i>	8.1%	8.1%	8.1%	8.1%
<i>Proteus mirabilis</i>	3.4%	3.2%	3.3%	3.4%
<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	8.2%	8.0%	7.9%	8.1%
<i>Salmonella enterica</i>	7.8%	7.7%	7.5%	7.7%
<i>Serratia marcescens</i>	8.0%	7.7%	7.9%	8.0%
<i>Staphylococcus aureus 25923</i>	3.2%	3.2%	3.1%	3.2%
<i>Staphylococcus aureus 6538</i>	3.2%	3.2%	3.2%	3.2%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.4%	3.4%	3.3%	3.4%
% Total	99.3%	98.5%	98.5%	99.0%

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 – Resultados ao final do treinamento da RNA responsável pela classificação quanto ao gênero e espécie das bactérias analisadas.

Classe	nº pixels	nº acertos	nº erros
<i>Bacillus cereus</i>	27120	26309 (97.0%)	811 (3.0%)
<i>Bacillus subtilis</i>	27447	26724 (97.4%)	723 (2.6%)
<i>Coryniumbacterium glutaminum</i>	28074	26153 (93.2%)	1921 (6.8%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	27291	25619 (93.9%)	1672 (6.1%)
<i>Enterobacter cloacal</i>	11104	10250 (92.3%)	854 (7.7%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	26506	25616 (96.6%)	890 (3.4%)
<i>Escherichia coli</i>	11097	10465 (94.3%)	632 (5.7%)
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	27654	27376 (99.0%)	278 (1.0%)
<i>Micrococcus luteus</i>	27752	26804 (96.6%)	948 (3.4%)
<i>Proteus mirabilis</i>	11774	10951 (93.0%)	823 (7.0%)
<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	27977	27393 (97.9%)	584 (2.1%)
<i>Salmonella enterica</i>	26351	25038 (95.0%)	1313 (5.0%)
<i>Serratia marcescens</i>	27289	25037 (91.7%)	2252 (8.3%)
<i>Staphylococcus aureus 25923</i>	10799	10687 (99.0%)	112 (1.0%)
<i>Staphylococcus aureus 6538</i>	10893	10191 (93.6%)	702 (6.4%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11462	10936 (95.4%)	526 (4.6%)

Fonte: Autoria própria.

Com os resultados acima, pode ser observado que para a classificação quanto ao gênero/espécie durante o treinamento o menor valor que o MSE assume é de 0.10521, na fase de testes a acurácia média com todas as bactérias é de 95.60%. Para a determinação da coloração de Gram durante o treinamento o MSE assume o valor de 0.014422, durante a fase de testes a acurácia média entre todos os *pixels* classificados é de 98.21%.

5 CONCLUSÕES

No presente estudo, imagens hiperespectrais foram utilizadas para a classificação de bactérias por gênero/espécie e pela sua coloração de Gram. O método proposto se mostrou eficaz. Envolveu a cultura de bactérias isoladas seguido da aquisição das imagens hiperespectrais na estação sisuChema, posteriormente houve o pré-processamento das imagens utilizando uma análise multivariada a partir da PCA, com a adição do *k-means* para a remoção de fundo, para remoção de ruídos e correção de linha de base, foram utilizados o filtro de Savitzky-Golay e SNV. A classificação quanto à gênero/espécie e coloração de Gram foram dadas através de uma RNA, utilizando 50% das amostras para treinamento e 50% para a validação, quantidade essa inerente ao total de *pixels* do cubo hiperespectral de cada bactéria. Através das métricas utilizadas para se mensurar a qualidade do modelo, pode-se concluir que a metodologia abordada ofereceu resultados satisfatórios.

A experiência adquirida nesse estudo sugere que com o uso de HSI as informações obtidas são eficazes para a diferenciação dos diferentes tipos de bactérias e coloração de Gram. Nesse sentido, um possível estudo aprofundado relacionando as respostas espectrais das amostras analisadas, com os seus respectivos componentes químicos. Adicionalmente, novos testes podem ser feitos usando como validação, placas com mais de uma cultura de bactéria. Novos modelos para a resolução desse problema podem ser utilizados, como exemplo temos as Redes Neurais Convolucionais. Por fim, um estudo pode ser direcionado a identificação de possíveis resistências à antimicrobianos pelas bactérias observadas utilizando metodologias a partir do uso de imagens hiperespectrais.

REFERÊNCIAS

- ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics**, Wiley Online Library, v. 2, n. 4, p. 433–459, 2010.
- AFROMOWITZ, M. A.; CALLIS, J. B.; HEIMBACH, D. M.; DESOTO, L. A.; NORTON, M. K. Multispectral imaging of burn wounds: a new clinical instrument for evaluating burn depth. **IEEE transactions on biomedical engineering**, IEEE, v. 35, n. 10, p. 842–850, 1988.
- AMIGO, J. M.; MARTI, I.; GOWEN, A. Hyperspectral imaging and chemometrics: a perfect combination for the analysis of food structure, composition and quality. In: **Data handling in science and technology**. [S.l.]: Elsevier, 2013. v. 28, p. 343–370.
- ARRIGONI, S.; TURRA, G.; SIGNORONI, A. Hyperspectral image analysis for rapid and accurate discrimination of bacterial infections: A benchmark study. **Computers in Biology and Medicine**, Elsevier, v. 88, p. 60–71, 2017.
- ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Universidade Vale do Rio Verde, v. 9, n. 2, p. 344–355, 2011.
- BEEKMANN, S.; DIEKEMA, D.; CHAPIN, K.; DOERN, G. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. **Journal of clinical microbiology**, Am Soc Microbiol, v. 41, n. 7, p. 3119–3125, 2003.
- BISHOP, C. M. et al. **Neural networks for pattern recognition**. [S.l.]: Oxford university press, 1995.
- CARRASCO, O.; GOMEZ, R. B.; CHAINANI, A.; ROPER, W. E. Hyperspectral imaging applied to medical diagnoses and food safety. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICS AND PHOTONICS. **Geo-Spatial and Temporal Image and Data Exploitation III**. [S.l.], 2003. v. 5097, p. 215–221.
- CHENG, J.-H.; SUN, D.-W. Hyperspectral imaging as an effective tool for quality analysis and control of fish and other seafoods: current research and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, Elsevier, v. 37, n. 2, p. 78–91, 2014.
- FIGUEIREDO, N. d. S. **Aplicação de filtros de Savitzky-Golay no processamento de sinais de eletrocardiografia**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2018.
- FILHO, D. B. **Aplicação de métodos quimiométricos para a classificação de águas minerais comercializadas em Goiânia-GO**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- FORGIARINI, G. J. **IEP: ferramenta para medição da eficiência produtiva em indústria frigorífica bovina**. Dissertação (Mestrado) — Universidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.
- FORSYTH, D. **Probability and statistics for computer science**. [S.l.]: Springer, 2016.

- GARDNER, M. W.; DORLING, S. Artificial neural networks (the multilayer perceptron)—a review of applications in the atmospheric sciences. **Atmospheric environment**, Elsevier, v. 32, n. 14-15, p. 2627–2636, 1998.
- GELADI, P.; GRAHN, H.; BURGER, J. 1 multivariate images, hyperspectral imaging : Background and equipment. In: . [S.l.: s.n.], 2007.
- GOVENDER, M.; CHETTY, K.; BULCOCK, H. A review of hyperspectral remote sensing and its application in vegetation and water resource studies. **Water Sa**, v. 33, n. 2, 2007.
- GOWEN, A. A.; FENG, Y.; GASTON, E.; VALDRAMIDIS, V. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. **Talanta**, Elsevier, v. 137, p. 43–54, 2015.
- GOWEN, A. A.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J.; DOWNEY, G.; FRIAS, J. M. Hyperspectral imaging—an emerging process analytical tool for food quality and safety control. **Trends in food science & technology**, Elsevier, v. 18, n. 12, p. 590–598, 2007.
- GU, P.; FENG, Y.-Z.; ZHU, L.; KONG, L.-Q.; ZHANG, X.-l.; ZHANG, S.; LI, S.-W.; JIA, G.-F. Unified classification of bacterial colonies on different agar media based on hyperspectral imaging and machine learning. **Molecules**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 25, n. 8, p. 1797, 2020.
- HINTON, G. E. How neural networks learn from experience. **Scientific American**, JSTOR, v. 267, n. 3, p. 144–151, 1992.
- HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; JUNIOR, G. J. de O. Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **E&S Engineering and Science**, v. 5, n. 1, p. 83–90, 2016.
- HORNIK, K.; STINCHCOMBE, M.; WHITE, H. et al. Multilayer feedforward networks are universal approximators. **Neural networks**, v. 2, n. 5, p. 359–366, 1989.
- KAMBER, M.; PEI, J. et al. **Data mining: Concepts and techniques**. [S.l.]: Morgan Kaufmann Publishers San Francisco, 2001. v. 2.
- KAMMIES, T.-L.; MANLEY, M.; GOUWS, P. A.; WILLIAMS, P. J. Differentiation of foodborne bacteria using nir hyperspectral imaging and multivariate data analysis. **Applied microbiology and biotechnology**, Springer, v. 100, n. 21, p. 9305–9320, 2016.
- KELLEY, S. O. New technologies for rapid bacterial identification and antibiotic resistance profiling. **SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation**, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 22, n. 2, p. 113–121, 2017.
- KUMAR, A.; ROBERTS, D.; WOOD, K. E.; LIGHT, B.; PARRILLO, J. E.; SHARMA, S.; SUPPES, R.; FEINSTEIN, D.; ZANOTTI, S.; TAIBERG, L. et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Critical care medicine**, LWW, v. 34, n. 6, p. 1589–1596, 2006.
- LI, J.-b.; RAO, X.-q.; YING, Y.-b. et al. Advance on application of hyperspectral imaging to nondestructive detection of agricultural products external quality. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, Editorial Office, Spectroscopy and Spectral Analysis, v. 31, n. 8, p. 2021–2026, 2011.

LIPPMANN, R. An introduction to computing with neural nets. **IEEE Assp magazine**, IEEE, v. 4, n. 2, p. 4–22, 1987.

MACQUEEN, J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In: **Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Volume 1: Statistics**. Berkeley, Calif.: University of California Press, 1967. p. 281–297. Disponível em: <<https://projecteuclid.org/euclid.bsmsp/1200512992>>.

MAIMON, O.; ROKACH, L. Data mining and knowledge discovery handbook. Springer, 2005.

MCCULLOCH, W. S.; PITTS, W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. **The bulletin of mathematical biophysics**, Springer, v. 5, n. 4, p. 115–133, 1943.

MØLLER, M. F. A scaled conjugate gradient algorithm for fast supervised learning. **Neural networks**, Elsevier, v. 6, n. 4, p. 525–533, 1993.

MOORE, E. R.; MIHAYLOVA, S. A.; VANDAMME, P.; KRICHEVSKY, M. I.; DIJKSHORN, L. Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. **Research in microbiology**, Elsevier, v. 161, n. 6, p. 430–438, 2010.

MOYES, R. B.; REYNOLDS, J.; BREAKWELL, D. P. Differential staining of bacteria: gram stain. **Current Protocols in Microbiology**, Wiley Online Library, v. 15, n. 1, p. A–3C, 2009.

OLIVEIRA, A. B. **Usando redes neurais para estimação da volatilidade: redes neurais e modelo híbrido GARCH aumentado por redes neurais**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PARK, B.; SEO, Y.; YOON, S.-C.; JR, A. H.; WINDHAM, W. R.; LAWRENCE, K. C. Hyperspectral microscope imaging methods to classify gram-positive and gram-negative foodborne pathogenic bacteria. **Transactions of the ASABE**, American Society of Agricultural and Biological Engineers, v. 58, n. 1, p. 5–16, 2015.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: Maldi-tof. **Einstein**, v. 10, p. 118–119, 2012.

RAUBER, T. W. Redes neurais artificiais. **Universidade Federal do Espírito Santo**, p. 29, 2005.

ROSENBLATT, F. The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain. **Psychological review**, American Psychological Association, v. 65, n. 6, p. 386, 1958.

RUMELHART, D. E.; HINTON, G. E.; WILLIAMS, R. J. **Learning internal representations by error propagation**. [S.l.], 1985.

SANDASI, M.; VERMAAK, I.; CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Hyperspectral imaging and chemometric modeling of echinacea—a novel approach in the quality control of herbal medicines. **Molecules**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 19, n. 9, p. 13104–13121, 2014.

- SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical chemistry**, ACS Publications, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.
- SCHAFER, R. W. What is a savitzky-golay filter?[lecture notes]. **IEEE Signal processing magazine**, IEEE, v. 28, n. 4, p. 111–117, 2011.
- SELIM, S. Z.; ISMAIL, M. A. K-means-type algorithms: A generalized convergence theorem and characterization of local optimality. **IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence**, IEEE, n. 1, p. 81–87, 1984.
- SHARMA, S. Activation functions in neural networks. **Towards Data Science**, v. 6, 2017.
- SILVA, C. S. **Uso de imagens hiperespectrais na região do infravermelho próximo para identificar fraudes em documentos**. Dissertação (Mestrado) — Universidade federal de pernambuco, 2013.
- SILVA, C. S.; PIMENTEL, M. F.; HONORATO, R. S.; PASQUINI, C.; PRATSMONTALBÁN, J. M.; FERRER, A. Near infrared hyperspectral imaging for forensic analysis of document forgery. **Analyst**, Royal Society of Chemistry, v. 139, n. 20, p. 5176–5184, 2014.
- STEINIER, J.; TERMONIA, Y.; DELTOUR, J. Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedure. **Analytical chemistry**, ACS Publications, v. 44, n. 11, p. 1906–1909, 1972.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [S.l.: s.n.], 2012.
- TURRA, G.; CONTI, N.; SIGNORONI, A. Hyperspectral image acquisition and analysis of cultured bacteria for the discrimination of urinary tract infections. In: IEEE. **2015 37th annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology society (EMBC)**. [S.l.], 2015. p. 759–762.
- VICINI, L. Análise multivariada: da teoria à prática. Universidade Federal de Santa Maria, 2005.
- WALPOLE, R. E.; MYERS, R. H. **Probability & statistics for engineers & scientists**. [S.l.]: Pearson Education Limited, 2012.
- WIDROW, B.; HOFF, M. E. **Adaptive switching circuits**. [S.l.], 1960.