

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

CARACTERIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS AQUÁTICOS POR PROCESSAMENTO  
DIGITAL DE IMAGENS E REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

por

Sonia Magalhães dos Santos

Tese para obtenção do Título de  
Doutor em Engenharia

Porto Alegre, dezembro 2001.

CARACTERIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS AQUÁTICOS POR PROCESSAMENTO  
DIGITAL DE IMAGENS E REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS

por

Sonia Magalhães dos Santos

MSc

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, PROMEC, da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do Título de

Doutor em Engenharia

Área de Concentração: Fenômenos de Transporte

Orientador: Prof. Dr. Vilson Carlos da Silva Ferreira

Comissão de Avaliação:

Prof. Dr. Alwin Wilhelm Elbern

Prof. Dr. Jorge Alberto Almeida

Profa. Dra. Virgínia Maria Tavano Garcia

Prof. Dr. Alberto Tamagna

Coordenador do PROMEC

Porto Alegre, dezembro 2001.

À memória de meus pais

Ramão e Edith

Pelos valores em mim desenvolvidos  
de paixão pelo estudo e pelo trabalho

## AGRADECIMENTOS

Minha família

Prof. Vilson Carlos da Silva Ferreira, PhD. - orientador

Prof<sup>a</sup> Virgínia Maria Tavano Garcia, PhD. - membro da banca e parceira de trabalhos e projetos

Prof. Alwin Wilhelm Elbern, PhD. - membro da banca, parceiro de trabalhos e projetos e professor de processamento de imagens

Prof. Dr. Jorge Alberto Almeida - membro da banca, parceiro de trabalhos e projetos

Prof. Luiz Fernando Alzuguir Azevedo, PhD. - colaborador do trabalho

Companheiros do Dept<sup>o</sup> de Física da FURG:

Prof<sup>a</sup> Sílvia da Costa Botelho, PhD. - colaboradora do trabalho e parceira de projetos

Prof. MSc. Glauber Acunha Gonçalves - colaborador do trabalho

Eng. Márcio Sarres Pessoa

Téc. Luis Adolfo de Sá

Téc<sup>a</sup>. Núbia Cantarelli de Sá

Chefes do Dept<sup>o</sup> de Física da FURG período 1997-2001:

Prof. MSc. Maurice Boulos Halal

Prof. Osmar Olinto Möller Jr., PhD.

Prof. MSc. Ernesto Luiz Casares Pinto

Companheiros de pós-graduação da UFRGS:

Prof. Dr. Flávio Tadeu Van der Laan - colaborador do trabalho e parceiro de projetos

MSc. Lucas Luis Gutkoski - colaborador e parceiro de trabalhos

Dr. Manolo Pires - colaborador do trabalho

Bolsistas de Iniciação Científica:

Acad. Luciano Vaguetti de Oliveira, CNPq

Acad. Marcelo Peres Pinho, FAPERGS

Eng. Vitor Irigon Gervini

Professores e alunos de pós-graduação do Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos do Dept<sup>o</sup> de Oceanografia da FURG

# CARACTERIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS AQUÁTICOS POR PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS E REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS

## RESUMO

A identificação e o monitoramento de microorganismos aquáticos, como bactérias e microalgas, tem sido uma tarefa árdua e morosa. Técnicas convencionais, com uso de microscópios e corantes, são complexas, exigindo um grande esforço por parte dos técnicos e pesquisadores. Uma das maiores dificuldades nos processos convencionais de identificação via microscopia é o elevado número de diferentes espécies e variantes existentes nos ambientes aquáticos, muitas com semelhança de forma e textura.

O presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para a caracterização e classificação de microorganismos aquáticos (bactérias e microalgas), bem como a determinação de características cinemáticas, através do estudo da mobilidade de microalgas que possuem estruturas que permitem a natação (flagelos). Para caracterização e reconhecimento de padrões as metodologias empregadas foram: o processamento digital de imagens e redes neurais artificiais (RNA). Para a determinação da mobilidade dos microorganismos foram empregadas técnicas de velocimetria por processamento de imagens de partículas em movimento (Particle Tracking Velocimetry - PTV).

O trabalho está dividido em duas partes: 1) caracterização e contagem de microalgas e bactérias aquáticas em amostras e 2) medição da velocidade de movimentação das microalgas em lâminas de microscópio. A primeira parte envolve a aquisição e processamento digital de imagens de microalgas, a partir de um microscópio ótico, sua caracterização e determinação da densidade de cada espécie contida em amostras. Por meio de um microscópio epifluorescente, foi possível, ainda, acompanhar o crescimento de bactérias aquáticas e efetuar a sua medição por operadores morfológicos. A segunda parte constitui-se na medição da velocidade de movimentação de microalgas, cujo parâmetro pode ser utilizado como um indicador para se avaliar o efeito de substâncias tóxicas ou fatores de estresse sobre as microalgas. O trabalho em desenvolvimento contribuirá para o projeto "Produção do Camarão Marinho *Penaeus Paulensis* no Sul do Brasil: Cultivo em estruturas Alternativas" em andamento na Estação Marinha de Aquicultura - EMA e para pesquisas no Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos do Departamento de Oceanografia da FURG.

O trabalho propõe a utilização dos níveis de intensidade da imagem em padrão RGB e oito grandezas geométricas como características para reconhecimento de padrões das microalgas. O conjunto proposto de características das microalgas, do ponto de vista de grandezas

geométricas e da cor (nível de intensidade da imagem e transformadas Fourier e Radon), levou à geração de indicadores que permitiram o reconhecimento de padrões.

As redes neurais artificiais desenvolvidas com topologia de rede multinível totalmente conectada, supervisionada, e com algoritmo de retropropagação, atingiram as metas de erro máximo estipuladas entre os neurônios de saída desejados e os obtidos, permitindo a caracterização das microalgas.

## ABSTRACT

### "AQUATIC MICROORGANISMS CHARACTERISATION BY DIGITAL IMAGES PROCESSING AND ARTIFICIAL NEURAL NETWORK"

The identification and monitoring of aquatic microorganisms, such as bacteria and microalgae, have been a tough and very demanding task. Conventional techniques, using microscope and staining procedures, routinely applied in R&D laboratories, are very complex, demanding a great effort from technicians and researchers. One of the greatest difficulties in conventional identification of microorganisms through microscopy is imposed by the high number of different species and existing variants in the aquatic environment, many of which are very similar in shape and texture.

The main goal of the present work is to develop a methodology for characterization and classification of aquatic microorganisms (bacteria and microalgae) as well as to measure cinematic characteristics of microalgae species that bear swimming structures (flagellum). The methodologies adopted for characterization and pattern recognition were digital images processing and artificial neural networks training. The mobility of the microorganisms were studied by velocimetry techniques, through processing images of particles in movement (Particle Tracking Velocimetry - PTV).

This work is divided in two parts: 1) characterization and counting of microalgae and aquatic bacteria species in a seawater sample and 2) measuring the velocity of moving microalgae under the microscope. The first part involved image acquisition from an optical microscope, followed by digital processing to classify and count each species present in a sample. By means of an epi-fluorescence microscope, it was possible to follow the growth of aquatic bacteria through application of morphological operators. The second part comprised measurement of the swimming rate of the moving microorganisms, a parameter used as indicator for evaluating the effect of toxic and/or straining factors to microalgae. These data are extremely important since these micro-organisms are used as food for cultures of shrimps and fish larvae.

The methods developed in this work will be a contribution to the project "Production of the marine shrimp *Penaeus Paulensis* in South Brazil: an Alternative Cultivation Process", under development at the Marine Aquaculture Station - EMA and several projects in the Laboratory of Ecology of Phytoplankton and Marine Microorganisms, of the Oceanography Department, of FURG.

This work propose utilization of levels of the image intensity in RGB pattern, combined with eight geometrical properties, as parameters for pattern recognition of the microalgae. This

set of microalgae characteristics, including geometrical variables and color (levels of image intensity using Fourier and Radon transforms) generated indicators that allowed pattern recognition.

The neural networks, developed with multilevel network topology, totally connected, supervised and with retropropagation algorithm, reached the maximum error allowed between the expected output neurons and the actual values, which provided a good characterization of the studied microalgae.

## ÍNDICE

	Pág.
1. Introdução .....	1
1.1 Descrição do Problema .....	1
1.2 Revisão Bibliográfica .....	4
1.2.1 Morfologia Aplicada à Medição e Contagem de Bactérias Aquáticas .....	4
1.2.2 Reconhecimento de Padrões .....	6
1.2.3 Redes Neurais Artificiais e Aplicações ao Reconhecimento de Microorganismos.....	7
1.2.4 Velocimetria por Processamento de Imagens de Partículas .....	10
2. Técnicas Experimentais para Aquisição e Processamento de Imagens de Bactérias Aquáticas .....	12
2.1 Visualização das Bactérias e das Microalgas .....	12
2.2 Aquisição de Imagens de Bactérias Aquáticas no Microscópio Epifluorescente.....	12
2.3 Tratamento da Imagem e Aplicação de Operadores Morfológicos .....	17
3. Técnicas Experimentais para Caracterização de Microalgas.....	20
3.1 Histogramas .....	20
3.2 Grandezas Características .....	20
3.3 Momentos de Primeira, Segunda, Terceira e N-ésima Ordem .....	21
3.4 Transformadas .....	21
3.5 Função Densidade de Probabilidade das Grandezas Características .....	23
3.6 Tabela de Indicadores .....	24
4. Redes Neurais Artificiais para Reconhecimento de Padrões de Microalgas: Fundamentos e Redes Propostas .....	26
4.1 Fundamentos.....	26
4.2 A Rede com Retropropagação .....	27
4.3 Passos de uma RNA com Retropropagação .....	28
4.4 Treinamento da RNA com Retropropagação .....	33
4.5 Deficiências do Algoritmo de Retropropagação .....	34
4.6 Correções das Deficiências do Algoritmo de Retropropagação .....	35
4.7 Outras deficiências do Algoritmo de Retropropagação .....	36
4.8 Redes Neurais Propostas .....	38
4.9 Ensaios para Avaliação das Redes Propostas .....	41
5. Determinação dos Campos de Velocidades de Microalgas em Imagens Microscópicas por Processamento Digital de Imagens .....	42

	Pág.
5.1 Visualização das microalgas .....	42
5.2 Medição da Velocidade das Microalgas: Velocimetria por Acompanhamento de Partículas .....	42
6. Resultados .....	49
6.1 Aplicações de Operadores Morfológicos à Contagem e Medição de Bactérias Aquáticas .....	49
6.2 Aplicações de Técnicas de Reconhecimento de Padrões para Classificação de Microalgas: Métodos Não Automatizados .....	55
6.2.1 Histogramas da Intensidade da Imagem.....	56
6.2.2 Momentos de 2 <sup>a</sup> e de 4 <sup>a</sup> da Intensidade da Imagem .....	60
6.2.3 Grandezas Geométricas Características.....	61
6.2.4 Transformadas Radon.....	69
6.2.5 Transformadas de Fourier.....	73
6.2.6 Tabelas de Indicadores .....	77
6.3 Reconhecimento de Padrões de Microalgas por Redes Neurais Artificiais: Métodos Automatizados .....	86
6.3.1 Ensaio para Avaliação das Redes Geometria Propostas .....	86
6.3.2 Ensaio para Avaliação das Redes Imagem Propostas .....	93
6.4 Campos de Velocidades de Microalgas em Imagens Microscópicas por Processamento Digital de Imagens .....	103
6.4.1 Determinação dos Campos de Velocidades.....	103
6.4.2 Caracterização das Microalgas por seus Campos de Velocidades .....	108
7. Análise dos Resultados .....	112
7.1 Aplicações de Operadores Morfológicos à Contagem e Medição de Bactérias Aquáticas .....	112
7.2 Aplicações de Técnicas de Reconhecimento de Padrões para Classificação de Microalgas: Métodos Não Automatizados .....	113
7.3 Reconhecimento de Padrões de Microalgas por Redes Neurais Artificiais: Métodos Automatizados .....	115
7.4 Campos de Velocidades de Microalgas em Imagens Microscópicas por Processamento Digital de Imagens.....	117
8. Conclusões Perspectivas de Pesquisas .....	118
Referências Bibliográficas .....	122

	Pág.
APÊNDICE I Calibração das Medidas de Comprimento das Imagens das Microalgas .....	128
APÊNDICE II Análise de Incertezas das Medidas .....	132

## LISTA DE SÍMBOLOS

SÍMBOLO	NOME	UNIDADES
b	Deslocamento dos neurônios	
c	Constante de enfraquecimento	
C	Compactação do objeto	
y	Saída desejada do neurônio	
d	Limite de resolução do microscópio ótico	[ $\mu\text{m}$ ]
$d_{\text{epi}}$	Limite de resolução do microscópio epifluorescente	[ $\mu\text{m}$ ]
D	Deslocamento do neurônio	
DF	Diâmetro de Feret	[pixel]
E	Elongação	
EY	Erro estimado do neurônio	
Esf	Esfericidade do objeto	[ $L/L$ ]
$\mathfrak{F}$	Transformada de Fourier	
F	Fator de escala objeto/imagem	[mm/pixel]
F	Função de transferência	
F'	Derivada da função de transferência	
FFT	Transformada Rápida de Fourier	
h	Função de ativação do neurônio da camada oculta	
$h_g$	Função gaussiana	
L	Comprimento	[pixel]
L	Limiar	[pixel]
m	Coordenada da imagem	[pixel]
M	Nível de intensidade da imagem	
M	Ampliação da imagem	[ $L/L$ ]
n	Coordenadas da imagem	[pixel]
o	Função de ativação do neurônio da camada de saída	
P	vetor dos neurônios de entrada	
w	Pesos dos neurônios	
$p\theta(t)$	Transformada Radon da imagem	
s	Desvio padrão experimental	
$s(\bar{x})$	Desvio padrão da média	
tansig	Tangente hiperbólica da função sigmóide de transferência	

SÍMBOLO	NOME	UNIDADES
t	Coordenada da imagem	[pixel]
T	“Temperatura” ( ganho) do neurônio	
T	Vetor dos neurônios de saída	
TE	Épocas treinadas	
TP	Parâmetros de treinamento	
TR	Registro de treinamento	
u	Componente horizontal da velocidade	[pixel/s], [mm/s], [μm/s]
u(x)	Incerteza padrão da variável x	
v	Componente vertical da velocidade	[pixel/s], [mm/s], [μm/s]
w	Peso dos neurônios intermediários	
W	Peso dos neurônios	
x	Variável genérica	
x	Coordenada da imagem	[pixel]
$\bar{x}$	Média aritmética da variável x	
X	Coordenada da imagem	[pixel]
$X_{max}$	Maior comprimento de eixo do objeto	[pixel]
$X_{min}$	Menor comprimento de eixo do objeto	[pixel]
y	Coordenada da imagem	[pixel]
y	Saída obtida do neurônio	
Y	Coordenada da imagem	[pixel]
$\alpha$	ângulo	[grau]
$\beta$	ângulo	[grau]
$\Delta x$	deslocamento horizontal da partícula	[pixel]
$\Delta y$	deslocamento vertical da partícula	[pixel]
$\Delta z$	deslocamento genérico da partícula	[pixel]
$\Delta t$	intervalo de tempo	[s]
$\delta$	Incerteza	
$\eta$	Velocidade de convergência do aprendizado	
$\lambda$	Comprimento de onda da luz	[nm]
$\mu_n$	Momento de ordem n da imagem	

SÍMBOLO	NOME	UNIDADES
$v_i$	amplitude da intensidade da imagem	
$\theta$	ângulo	[grau]
$\sigma$	Desvio padrão	
$\omega$	frequência do espectro do campo de velocidade	[Hz]

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	TÍTULO	Pág.
1.1	Módulos constitutivos do trabalho	3
2.1	Arranjo dos equipamentos utilizados para aquisição de imagens em microscópio	12
2.2	Origem da radiação fluorescente	13
2.3	Processos de excitação e de emissão de fluorescência	14
2.4	Curvas de transmitância dos filtros divisores	14
2.5	Curvas de transmitância dos filtros de excitação e de barreira	15
2.6	Imagens de bactérias aquáticas em microscópio epifluorescente	16
2.7	Detalhes visíveis das bactérias devido à fluorescência	16
2.8	Processo para aquisição, processamento de imagens e medição de bactérias aquáticas	19
3.1	Representação da transformada Radon de uma imagem	23
4.1	Rede multinível totalmente conectada	27
4.2	Função de transferência sigmoideal	28
4.3	Superfície de erro de uma RNA	35
4.4	Evolução do treinamento da REDE GEOMETRIA	40
4.5	Evolução do treinamento da REDE IMAGEM	40
5.1	Fluxograma das etapas do programa <i>Flowviewer</i>	44
5.2	Aplicação do limiar às imagens das microalgas	46
5.3	Representação gráfica de uma partícula iluminada	47
6.1	Imagem original monocromática	49
6.2	Imagem com objetos etiquetados	49
6.3	Numeração dos objetos (26 bactérias)	50
6.4	Área de cada elemento ( de 1 até 29 objetos)	50
6.5	Perímetro de cada elemento ( de 1 até 29 objetos)	51
6.6	Xmax de cada elemento ( de 1 até 29 objetos)	51
6.7	Xmin de cada elemento ( de 1 até 29 objetos)	52
6.8	Elongação de cada elemento ( de 1 até 29 objetos)	52
6.9	Esfericidade de cada elemento ( de 1 até 29 objetos)	53
6.10	Diâmetro de Feret de cada elemento ( de 1 até 29 objetos)	53
6.11	Compactação de cada elemento ( de 1 até 29 objetos)	54
6.12	Amostra da microalga <i>Tetraselmis chuii</i> após a escolha do limiar	55
6.13	Imagens das cinco microalgas estudadas	55

Fig.	TÍTULO	Pág.
6.14	Histogramas padrões RGB típicos das microalgas estudadas sem considerar ao fundo	56
6.15	Histogramas padrões RGB típicos das microalgas estudadas considerando o fundo da imagem	57
6.16	Histogramas padrões RGB médios das microalgas estudadas considerando o fundo da imagem	58
6.17	Função densidade de probabilidade normal dos histogramas padrão RGB das 5 espécies	59
6.18	Momentos de 2 <sup>a</sup> ordem da imagem, $M_2(I)$ – Linha cheia <i>Amphidinium operculatum</i> e Linha pontilhada <i>Fibrocapasa japonica</i>	60
6.19	Momentos de 4 <sup>a</sup> ordem da imagem, $M_4(I)$ – Linha cheia <i>Amphidinium operculatum</i> e Linha pontilhada <i>Fibrocapasa japonica</i>	61
6.20	Perímetro como função de Área das microalgas	62
6.21	Xmax como função de Xmin das microalgas	62
6.22	Diâmetro de Feret como função da área das microalgas	63
6.23	Perímetro como função da área e do diâmetro de Feret das microalgas	63
6.24	Xmin como função de Elongação e Compactação das microalgas	64
6.25	Esfericidade como função da área e perímetro das microalgas	64
6.26	Compactação como função do diâmetro de Feret e de Xmax das microalgas	65
6.27	Função densidade de probabilidade da grandeza característica Área	65
6.28	Função densidade de probabilidade da grandeza característica Perímetro	66
6.29	Função densidade de probabilidade da grandeza característica Xmin	66
6.30	Função densidade de probabilidade da grandeza característica Elongação	67
6.31	Função densidade de probabilidade da grandeza característica diâmetro de Feret	67
6.32	Função densidade de probabilidade da grandeza característica Esfericidade	68
6.33	Função densidade de probabilidade da grandeza característica Xmax	68
6.34	Função densidade de probabilidade da grandeza característica Compactação	69
6.35	Imagens (32x32) das cinco microalgas estudadas <i>Amphidinium opercolatum</i> , <i>Chaetoceros sp.</i> , <i>Fibrocapasa japonica</i> , <i>Isocrisis Galbana</i> e <i>Tetraselmis chuii</i>	69
6.36	Transformada Radon $p(\theta,t)$ das microalgas <i>Amphidinium opercolatum</i> e <i>Chaetoceros sp.</i> - $\theta = 0^0$ a $180^0$	70
6.37	Transformada Radon $p(\theta,t)$ das microalgas <i>Fibrocapasa japonica</i> e <i>Isocrisis Galbana</i> - $\theta = 0^0$ a $180^0$	70
6.38	Transformada Radon $p(\theta,t)$ da microalga <i>Tetraselmis chuii</i> $\theta = 0^0$ a $180^0$	71

Fig.	TÍTULO	Pág.
6.39	Funções densidade de probabilidade aplicada a $p(\theta,t)$ , $\theta = 0^0$ a $180^0$	71
6.40	Transformada Radon $p(\theta,t)$ das microalgas <i>Amphidinium operculatum</i> e <i>Chaetoceros sp.</i> - $\theta = 0^0$	72
6.41	Transformada Radon $p(\theta,t)$ das microalgas <i>Fibrocapasa japonica</i> e <i>Isocrisis Galbana</i> - $\theta = 0^0$	72
6.42	Transformada Radon $p(\theta,t)$ da microalga <i>Tetraselmis chuii</i> $\theta = 0^0$	72
6.43	Função densidade de probabilidade aplicada a $p(\theta,t)$ , $\theta = 0^0$ - 9 amostras de cada espécie	73
6.44	Transformada FFT das microalgas <i>Amphidinium operculatum</i> e <i>Chaetoceros sp.</i>	74
6.45	Transformada FFT das microalgas <i>Fibrocapasa japonica</i> e <i>Isocrisis Galbana</i>	74
6.46	Transformada FFT da microalga <i>Tetraselmis chuii</i>	74
6.47	Quantificação do espectro de potência de Fourier (E) das microalgas <i>Amphidinium operculatum</i> e <i>Chaetoceros sp.</i>	75
6.48	Quantificação do espectro de potência de Fourier (E) das microalgas <i>Fibrocapasa japonica</i> e <i>Isochrysis Galbana</i>	75
6.49	Quantificação do espectro de potência de Fourier (E) da microalga <i>Tetraselmis chuii</i>	76
6.50	Função densidade de probabilidade do espectro de potência de Fourier (E) das microalgas estudadas	76
6.51	Imagem com teste de caracterização para microalga da espécie <i>Fibrocapasa japonica</i>	77
6.52	Imagem girada da microalga teste e histograma do nível de intensidade da imagem	78
6.53	Quantificação do espectro de potência de Fourier e Função densidade de probabilidade do espectro de potência de Fourier (E)	78
6.54	Transformada Radon $p(\theta,t)$ da microalga teste: $\theta = 0^0$ e $\theta = 180^0$	79
6.55	Imagem com teste de caracterização para microalga da espécie <i>Tetraselmis chuii</i>	81
6.56	Imagem com teste de caracterização para microalga da espécie <i>Amphidinium operculatum</i>	83
6.57	Imagens com teste de caracterização para microalga da espécie <i>Isochrysis Galbana</i>	84
6.58	Imagens de microalgas da espécie <i>Amphidinium operculatum</i>	97
6.59	Imagens de microalgas da espécie <i>Chaetoceros sp</i>	97
6.60	Imagens de microalgas da espécie <i>Fibrocapasa japonica</i>	98
6.61	Imagens de microalgas da espécie <i>Isochrysis Galbana</i>	98

Fig.	TÍTULO	Pág.
6.62	Imagens de microalgas da espécie <i>Tetraselmis chuii</i>	98
6.63	Imagens diferentes de microalgas das espécies <i>Amphidinium operculatum</i> , <i>Chaetoceros sp.</i> , <i>Fibrocapasa japonica</i> , <i>Isocrisis Galbana</i> e <i>Tetraselmis chuii</i>	99
6.64	Imagens rotacionadas de microalgas da espécie <i>Amphidinium operculatum</i>	99
6.65	Imagens rotacionadas de microalgas da espécie <i>Chaetoceros sp</i>	100
6.66	Imagens rotacionadas de microalgas da espécie <i>Fibrocapasa japonica</i>	100
6.67	Imagens rotacionadas de microalgas da espécie <i>Isocrisis Galbana</i>	100
6.68	Imagens rotacionadas de microalgas da espécie <i>Tetraselmis chuii</i>	100
6.69	Imagens rotacionadas diferentes de microalgas das espécies <i>Amphidinium operculatum</i> , <i>Chaetoceros sp.</i> , <i>Fibrocapasa japonica</i> , <i>Isocrisis Galbana</i> e <i>Tetraselmis chuii</i>	101
6.70	Imagem de microalgas <i>Tetraselmis chuii</i> observadas em microscópio	103
6.71	Tempo $t_1 = 0.000s$	104
6.72	Tempo $t_2 = 0.033s$	104
6.73	Tempo $t_3 = 0.066s$	104
6.74	Tempo $t_4 = 0.100s$	104
6.75	Tempo $t_5 = 0.133s$	104
6.76	Vetores velocidade das microalgas <i>Tetraselmis chuii</i>	104
6.77	Deslocamento $\Delta t = t_1 - t_2$	106
6.78	Deslocamento $\Delta t = t_1 - t_2 - t_3$	106
6.79	Deslocamento das microalgas $\Delta t = t_1 - t_2 - t_3 - t_4$	107
6.80	Deslocamento das microalgas $\Delta t = t_1 - t_2 - t_3 - t_4 - t_5$	107
6.81	Campo de velocidades das microalgas da espécie <i>Heterosigma akashiwo</i>	108
6.82	Campo de velocidades das microalgas da espécie <i>Isochrysis galbana</i>	108
6.83	Campo de velocidades das microalgas da espécie <i>Pyramimonas sp.</i>	109
6.84	Campo de velocidades das microalgas da espécie <i>Tetraselmis chuii</i>	109
6.85	Campo de velocidades das microalgas da espécie <i>Fibrocapasa japonica</i>	109
6.86	Função densidade de probabilidade normal da componente da velocidade $u$ para 99 amostras de cada espécie	110
6.87	Função densidade de probabilidade normal da componente da velocidade $v$ para 99 amostras de cada espécie	110

## ÍNDICE DE FIGURAS DOS APÊNDICES I e II

Fig.	TÍTULO	Pág.
AI.1	Régua calibrada	128
AI.2	Imagem com câmara JVC TK1180U, com espaçador, para objetiva de 10x.	129
AI.3	Imagem com câmara JVC TK1180U, com espaçador, para objetiva de 40x.	129
AI.4	Imagem com câmara JVC TK1180U, com espaçador, para objetiva de 100x.	129
AI.5	Relação entre aumento e abertura das lentes	130
AI.6	Imagem com câmara Watec 902H com objetiva 40x, ocular 10x, lente da câmara (f=16mm F=1.6) e espaçador da câmara.	131
AI.7	Imagem com câmara Watec 902H com objetiva 100x, ocular 10x, lente da câmara (f=16mm F=1.6) e espaçador da câmara.	131
AII.1	Não ortogonalidade entre o eixo da objetiva e o plano focado	137
AII.2	Efeito da refração na medida de um segmento	139

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA	TÍTULO	Pág.
3.1	Indicadores das grandezas geométricas	24
3.2	Indicadores das grandezas relacionadas à intensidade da imagem	25
3.3	Indicadores das grandezas geométricas e relacionadas à intensidade da imagem	25
6.1	Indicadores das grandezas geométricas (teste <i>Fibrocapasa japonica</i> )	79
6.2	Indicadores relacionados à intensidade da imagem (teste <i>Fibrocapasa japonica</i> )	80
6.3	Indicadores das grandezas geométricas e relacionadas à intensidade da imagem (teste <i>Fibrocapasa japonica</i> )	81
6.4	Indicadores das grandezas geométricas (teste <i>Tetraselmis chuii</i> )	82
6.5	Indicadores das grandezas geométricas (teste <i>Amphidinium opercolatum</i> )	83
6.6	Indicadores das grandezas geométricas (teste <i>Isochrysis galbana</i> )	85
6.7	1 <sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA – 8 variáveis geométricas	87
6.8	2 <sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA – agrupamento Área, Perímetro, Esfericidade	88
6.9	3 <sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA – Teste agrupamento Área, Perímetro, Diâmetro de Feret	89
6.10	4 <sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA – agrupamento Xmin, Elongação e Compactação	90
6.11	5 <sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA – agrupamento Área, Perímetro, Diâmetro de Feret - Espécies alternadas	91
6.12	6 <sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA – agrupamento Área, Perímetro, Esfericidade- Espécies alternadas	92
6.13	1 <sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 5 espécies – <i>Amphidinium opercolatum</i> , <i>Chaetoceros sp.</i> , <i>Fibrocapasa japonica</i> , <i>Isocrisis Galbana</i> e <i>Tetraselmis chuii</i>	94
6.14	2 <sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 4 espécies – <i>Amphidinium opercolatum</i> , <i>Chaetoceros sp.</i> , <i>Fibrocapasa japonica</i> , e <i>Tetraselmis chuii</i>	95
6.15	3 <sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 3 espécies – <i>Amphidinium opercolatum</i> , <i>Chaetoceros sp.</i> , <i>Fibrocapasa japonica</i> ,	96
6.16	4 <sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 3 espécies – <i>Chaetoceros sp.</i> , <i>Isocrisis Galbana</i> e <i>Tetraselmis chuii</i>	96
6.17	5 <sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 5 espécies e imagens rotacionadas	102
6.18	Número de partículas válidas, deslocamentos, vetores, velocidades e posição	105
6.19	Valores médios e desvio padrão das componentes da velocidade	111

## ÍNDICE DE TABELAS DOS APÊNDICES I e II

TABELA	TÍTULO	Pág.
AI.1	Determinação das aberturas correspondentes das lentes nas câmaras CCD	130
AII.1	Incerteza da grandeza Área	151
AII.2	Incerteza da grandeza Perímetro	151
AII.3	Incerteza da grandeza $X_{max}$	152
AII.4	Incerteza da grandeza $X_{min}$	152
AII.5	Incerteza da grandeza Elongação	153
AII.6	Incerteza da grandeza Esfericidade	153
AII.7	Incerteza da grandeza Diâmetro de Feret	154
AII.8	Incerteza da grandeza Compactação	154

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DESCRIÇÃO DO PROBLEMA

O conhecimento da diversidade de um ambiente (biodiversidade) pressupõe a identificação das espécies presentes e o conhecimento da variação da abundância, para ser possível avaliar o papel das mudanças introduzidas pelo homem nestes ambientes. A identificação e caracterização das espécies presentes em determinado local e no tempo é também importante, pelos aspectos ecológico-ambiental e de saúde pública. Investigações sobre a caracterização, o cultivo e o funcionamento dos microorganismos no ambiente marinho e costeiro do RS, como as microalgas (algas unicelulares microscópicas, também denominadas fitoplâncton) e as bactérias aquáticas, são realizadas no Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos (FURG).

A identificação e o monitoramento destes microorganismos aquáticos tem sido uma tarefa árdua e morosa. Técnicas convencionais, rotineiramente empregadas em laboratórios de pesquisa e desenvolvimento tem se mostrado extremamente complexas pois necessitam de um grande esforço físico por parte dos técnicos e dos pesquisadores.

Uma das maiores dificuldades dos processos convencionais de identificação de um microorganismo via microscopia é o elevado número de diferentes espécies e suas variantes existentes nos ambientes aquáticos, muitas das quais, com semelhança de forma, cor e textura. Atualmente, para a perfeita caracterização de cada uma das espécies em análise, é necessário um amplo e demorado treinamento do pessoal técnico, meses a fio.

As pequenas dimensões destes microorganismos também se constitui numa dificuldade adicional. Assim, enquanto uma bactéria tem dimensões menores do que  $1\mu\text{m}$ , as microalgas marinhas têm dimensões variando aproximadamente entre 2 e  $200\mu\text{m}$ . Isto faz com que os ajustes dos microscópios sejam diferentes, tornando o processo de monitoramento e contagem ainda mais demorado.

É desta forma muito importante o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e automatizadas para análise e caracterização de algas microscópicas e bactérias aquáticas. Estas análises permitirão determinar com melhor precisão a abundância, tamanho, forma e produção destes microorganismos medida a partir da variação de biomassa.

Uma das aplicações imediatas de técnicas rápidas e automatizadas para análise e caracterização de microorganismos será nos projetos em andamento na Estação Marinha de Aquacultura – EMA: "Repovoamento do Camarão Rosa *Penaeus paulensis* no Estuário da Lagoa

dos Patos" e "Produção do Camarão Marinho *Penaeus paulensis* no Sul do Brasil: Cultivo em Estruturas Alternativas" (Wasilieski, 2000).

Nestes projetos, larvas de camarão são desenvolvidas em tanques aerados com água salgada ou doce e as microalgas são usadas como alimento. A evolução do camarão depende da correta dosagem, do tamanho e das diferentes espécies dos microorganismos no tanque. Desta forma, uma caracterização correta das microalgas e a sua contagem automatizada são fundamentais para o adequado monitoramento da evolução do “Camarão Rosa”.

Grande parte das microalgas possuem estruturas para natação, em forma de fios (flagelos), que permitem sua movimentação na coluna d'água. Através desta movimentação, as algas podem buscar os locais onde as condições são boas para seu crescimento (Leadbeater e Green, 2000). Por exemplo, quando os nutrientes estão escassos na camada superficial, as algas flageladas podem migrar para maiores profundidades na coluna d'água, onde os nutrientes estão em maior concentração. Por outro lado, quando as condições de luz não são ideais, estas algas podem se movimentar para um nível adequado de luz, otimizando o processo da fotossíntese. No entanto, a velocidade de natação varia muito entre as diferentes espécies e pode também variar de acordo com sua condição fisiológica (Raven, 2000). Quando as algas estão sob estresse em função de algum fator ambiental (extremos de temperatura ou presença de algum composto tóxico) sua velocidade de natação pode diminuir muito ou aumentar demasiadamente. Assim, em vários casos, a velocidade de natação pode ser utilizada como um indicador para se avaliar o efeito de substâncias tóxicas ou fatores de estresse para as microalgas e, como consequência, para a saúde de um sistema aquático. Considerando estes fatores, a possibilidade de se quantificar rapidamente a velocidade de natação das microalgas é uma ferramenta que permite estudos de grande relevância para a ecologia destes microorganismos.

Estuda-se também a função e utilização de bactérias em aquacultura de animais marinhos (camarões, peixes, moluscos) como fonte de alimento e como auxílio no controle da qualidade da água.

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de uma metodologia para ser empregada no acompanhamento e na caracterização de microorganismos aquáticos usando o processamento digital de imagens. O quadro da fig. 1.1 dá uma visão geral dos módulos constitutivos da metodologia desenvolvida concentrada em três atividades básicas:

a) Caracterização, determinação das dimensões e do número de partículas sólidas (microalgas) contidas em amostras observadas em microscópio. O reconhecimento e interpretação de padrões onde são reunidas as características estudadas das imagens das microalgas, permite classificar seus diferentes tipos, com o auxílio de redes neurais artificiais.

Saliente-se que as características das microalgas utilizadas para estudos neste trabalho são diferentes daquelas apresentadas nos trabalhos constantes na revisão bibliográfica;

b)-Determinação das dimensões e do número de bactérias aquáticas contidas em amostras observadas em microscópio epifluorescente, através de estudos morfológicos;

c) Determinação do campo de velocidades de microalgas em amostras observadas em microscópio utilizando velocimetria por acompanhamento de partículas (Particle Tracking Velocimetry – PTV).

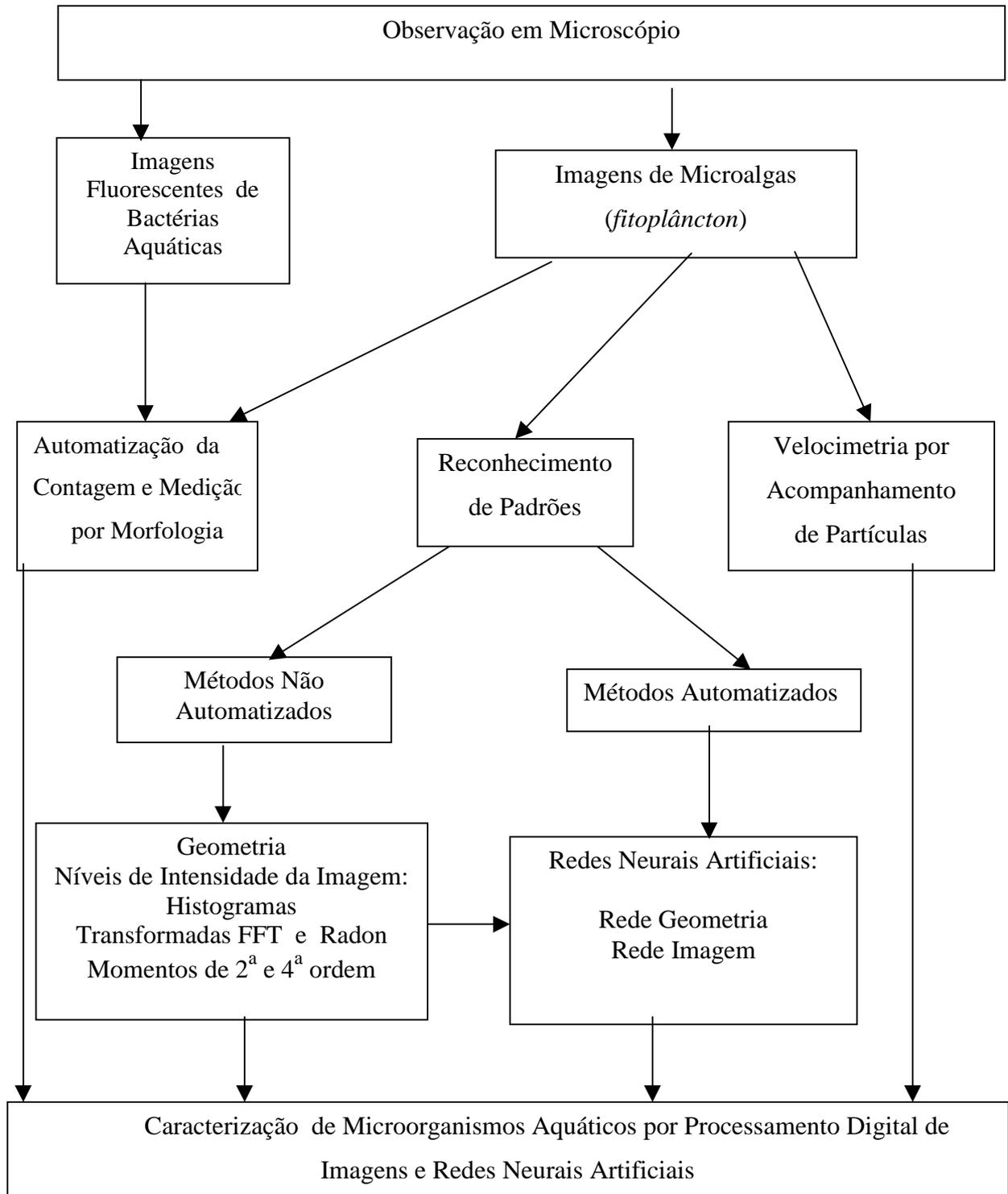


Figura 1.1 Módulos constitutivos do trabalho

## 1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Devido ao caráter multidisciplinar do trabalho, a revisão bibliográfica abrange estudos sobre aplicações de morfologia à contagem e medição de microorganismos aquáticos (microalgas e bactérias), reconhecimento de padrões, redes neurais artificiais e sua aplicação a microorganismos e velocimetria por processamento de imagens de partículas.

### 1.2.1. MORFOLOGIA APLICADA À MEDIÇÃO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS

A palavra morfologia comumente denota um ramo da biologia que trata da forma e estrutura de animais e plantas. No contexto da matemática, morfologia é uma ferramenta para extrair componentes da imagem, que são poderosos na representação e descrição da forma de uma região ou objeto, tais como, contornos, esqueletos e furos [Gonzalez e Woods, 1993].

A abundância, tamanho e morfologia dos microorganismos em geral são importantes fatores ecológicos porque determinam muitos aspectos de seu metabolismo, faixa de tamanho de suas presas e susceptibilidade aos predadores. Tamanho também pode ser usado para definir características individuais e da população de grupos de organismos, assim como da cadeia trófica de uma região. Diversidade de tamanho tem sido proposta como um método para caracterizar comunidades de bactérias aquáticas [Jurgens et. al., 1999].

O tamanho de bactérias aquáticas varia com a temperatura, atividade, disponibilidade de nutrientes e pode refletir a taxa de predação. Num dado sistema, a razão entre a menor célula bacteriana e a maior pode ser da ordem de 100. Considerando, por exemplo, o valor médio para uma comunidade, o tamanho das células pode variar de  $0,03 \mu\text{m}^3$  numa amostra em oceano aberto na Antártica até mais de  $1\mu\text{m}^3$  em bactérias encontradas em neve marinha. O valor médio do tamanho das bactérias é, portanto, um parâmetro importante para informar como estes microorganismos estão evoluindo [Massana et al., 1997, Jurgens et. al., 1999].

Muitos métodos têm sido usados para estimar o tamanho médio de bactérias. Na medição direta por observação visual com medidores calibrados, conta-se uma célula de cada vez, e o método se torna exaustivo pelo grande número de unidades necessárias a uma precisão estatisticamente aceitável. Obter uma fotografia de uma amostra, projetar e medir sobre uma tela introduz uma etapa adicional no processo. Análise direta de uma imagem digitalizada de amostras obtidas em microscópio ótico é o mais preciso e rápido método tendo sido desenvolvidos procedimentos para detecção de eixos dos microorganismos e para calcular seus volumes a partir do conhecimento das áreas. Sieracki et al., 1985, e Bjørnsen, 1986 foram os

primeiros a introduzir análise de imagens de epifluorescência para medir bactérias, mas as câmeras e computadores eram muito caros e lentos (8bits- 33MHz).

Mais recentemente, novos e sofisticados métodos têm sido utilizados: câmeras de vídeo coloridas, câmeras de vídeo CCD (*charge-coupled-device*) ou microscópio plano digital confocal laser, um método que pode alcançar incerteza de  $\pm 0,049 \mu\text{m}/\text{pixel}$ . A maioria destes sistemas são relativamente inacessíveis a muitos pesquisadores, especialmente devido aos seus preços [Massana et al.,1997, Blackburn et. al., 1998, Jurgens et. al., 1999].

Bactérias visualizadas através de epifluorescência aparecem como objetos brilhantes rodeados por um halo de luz decrescente. Por isto, a detecção de seus eixos não é trivial e requer a aplicação de filtros, discutidos por Sieracki et al.,1989 e Blackburn et al.,1998, entre outros.

Para processamento de imagens por morfologia são empregados filtros discretos não lineares baseados em operações matriciais, usados para restauração, segmentação e análise quantitativa de imagens e sinais. Os filtros mais utilizados, Gauss, Laplace e outros estão descritos em Gonzalez e Woods,1993, Thompson e Shure,1995, Wilcox et al., 1997 e Wilkinson, 1996, 1998 a e 1998 b.

Massana et al.,1997 descreveram um sistema de medição de tamanho de bactérias via análise de imagens epifluorescentes e apontaram soluções para os problemas mais comuns, concluindo que 200-250 células em 4-6 imagens são os valores ideais para se obter uma estimativa confiável do tamanho médio de bactérias.

Para o cálculo do volume, através de parâmetros bidimensionais obtidos da análise das imagens, Massana et al.,1997 consideraram todas as bactérias como tendo a geometria cilíndrica com duas calotas semi-esféricas. Utilizaram o algoritmo desenvolvido por Fry, 1988, para o cálculo.

Câmeras convencionais não têm sensibilidade suficiente para detectar bactérias coradas com fluorocromos com dimensões da ordem de décimos de micrometros. A solução para resolver estes problemas é aumentar o tempo de exposição no CCD durante a captura da imagem. Resultados foram descritos por Wilkinson,1995 e Massana et al.,1997 .

Um importante estudo, analisando imagens fluorescentes de bactérias filamentosas e sua diversidade morfológica, foi descrito por Jürgens et al.,1999. Utilizaram uma câmera CCD e as seguintes etapas de processamento de imagens para cálculo de área e perímetro: detecção de eixos, aplicação de limiar à intensidade cinza da imagem e binarização.

Medidas de tamanho (comprimento, largura ou área) são, também, utilizados para determinação de biomassa bacteriana. As bactérias são contadas, seus volumes celulares medidos

e o produto destas variáveis é usado para o cálculo da biomassa. A diversidade bacteriana pode ser descrita por testes fisiológicos, pela diversidade da forma e por técnicas da biologia molecular. Nestes dois últimos métodos pode-se utilizar análise de imagem para sua melhor avaliação [Blackburn et al. 1998].

### 1.2.2. RECONHECIMENTO DE PADRÕES

A diversidade de geometria e de intensidade da imagem impõe que se analisem características que permitam distinguir com clareza cada espécie.

As características que podem formar o padrão de cada imagem de microalga são:

Histograma RGB padrão 24 bits, histograma de tons de cinza padrão 8 bits, área, perímetro, esfericidade, alongação, diâmetro de Feret, compactação, maior e menor comprimento, nível de intensidade mínimo, médio e máximo da imagem [Thompson e Shure, 1995 e Wilcox et al.,1997].

São também calculados os momentos de primeira a quarta ordem da intensidade da imagem e se necessário para diferenciação das espécies, momentos de ordens superiores das imagens [Gonzalez e Woods, 1993].

Para complementar a comparação das intensidades das imagens das amostras com padrões são ainda calculadas as transformadas FFT e Radon das imagens [Lin,1990, Gonzalez e Woods, 1993 e Thompson e Shure, 1995 ].

Outra forma de descrever o microorganismo é definir a geometria do contorno de  $0^0$  a  $360^0$ , ou a sua textura [Gonzalez e Woods, 1993, Govindu e Shekar, 1999 e Randen e Husøy, 1999].

Uma revisão das técnicas de reconhecimento de padrões é feita por Jain et. al, 2000, que divide estas técnicas em: Equiparação, estatística, sintática ou estrutural e redes neurais.

Equiparação é uma operação genérica em reconhecimento de padrões que é usada para determinar a similaridade entre duas entidades (pontos, curvas ou formas) de mesmo tipo. A amostra a ser reconhecida e o padrão disponível são comparados em todas as posições (translação e rotação) e em todas as escalas possíveis.

Na abordagem estatística, cada padrão é representado por uma série de características ou medidas. O objetivo é escolher aquelas características que consigam definir um padrão e separá-lo dos demais.

Na abordagem sintática ou estrutural o padrão é composto de subpadrões, chamados de primitivas, sendo estes subpadrões comparados entre si.

### 1.2.3. REDES NEURAIS ARTIFICIAIS E APLICAÇÕES AO RECONHECIMENTO DE MICROORGANISMOS

Gonzalez e Woods, 1993 e Rauber, 1998 descrevem as principais teorias sobre redes neurais artificiais:

McCulloch e Pitts, 1943 estabelecem muitos dos teoremas fundamentais do estudo das redes neurais artificiais baseados no sistema nervoso. Sua tese fundamental era que todo fenômeno psicológico pode ser analisado e compreendido em termos da atividade em uma rede de dispositivos lógicos de dois estados, os *Psychons*. Os pesos de suas entradas só podiam ser alterados externamente o que praticamente impossibilita a formação de memória;

Hebb, 1949, baseado em estudos biológicos do cérebro, sugeriu um processo pelo qual os neurônios que são frequentemente ativados juntos devem ter seu peso de ligação aumentado;

Rosenblatt, 1962, descreve um modelo linear simples chamado *Perceptron*, que consiste de uma rede linear de neurônios organizados em uma única camada, onde o vetor de entrada alimenta simultaneamente todos os neurônios;

Widrow e Hoff, 1962 criam o ADALINE, que é uma alteração do *Perceptron*, onde se utiliza a regra Delta de Aprendizado, discutidos em Widrow e Winter, 1988 e Widrow e Lehr, 1990;

Minsky e Papert, 1969 publicam críticas ao *Perceptron* e ao ADALINE que causaram um grande choque no meio científico. As críticas baseavam-se na impossibilidade de uma rede de um único nível, como o *Perceptron* e o ADALINE aprender um padrão com variáveis não linearmente separáveis, como o de uma função lógica OU-Exclusivo por exemplo;

Hopfield, 1982, apresenta a memória associativa não localizada, ou categorizador;

Rumelhart et al, 1986, apresenta o algoritmo de aprendizado de Retropropagação (*Backpropagation*). Este algoritmo de aprendizado permitiu o uso de redes neurais artificiais nos sistemas mais diversos e complexos;

Kohonen, 1990, apresenta as Redes Neurais Artificiais Não Supervisionadas, conhecidas como as Redes Topológicas de Kohonen.

A utilização de redes neurais artificiais para reconhecimento de microorganismos é recente. Blackburn et al., 1998 estudaram a dinâmica das bactérias planctônicas no Mar Báltico com o auxílio da análise de imagens binárias e de redes neurais artificiais. Através das redes as bactérias foram classificadas em 4 distintas classes morfológicas e separadas de outros materiais (detritos). Volumes celulares foram também determinados por comparação com esferas de

tamanhos padrão. Esta automatização permitiu a análise de aproximadamente 100 imagens por hora, contendo cerca de 200 bactérias em cada. Os resultados mostraram boa concordância com observações visuais e com valores previamente reportados. Os autores afirmam que esta técnica de análise de imagens, com pequenas modificações, pode ser aplicada para analisar outras classes de organismos planctônicos (por ex. microalgas).

As redes neurais artificiais podem ser vistas como uma função complexa, que pode ser programada para fornecer uma configuração de saída, em resposta a uma certa configuração de entrada. A habilidade de uma rede neural de ser 'treinada' e 'aprender' pode ser mensurada por sua capacidade de generalizar além dos exemplos que foram fornecidos durante o procedimento de treinamento. A utilização de redes para classificação de objetos é muito atraente porque a decisão a respeito de quais componentes da definição são mais importantes para a classificação, é feita automaticamente [Blackburn et al.,1998].

Para que uma rede perceba um objeto, ela deve ser suprida com uma definição do formato. Os dados crus da imagem contêm muitos graus de liberdade para uma definição simples. É vantajoso ter uma definição onde há um número constante de parâmetros, para simplificar o formato. A melhor maneira de alcançar isto é utilizar a transformada de Fourier, que converte dados espaciais, na forma de pares de coordenadas ou matrizes de intensidade, em amplitudes espaciais, frequências e fases. Isto separa as informações relacionadas à riqueza de detalhes. Pode ser utilizado um sub-conjunto do espectro de potência da transformada de Fourier bidimensional, com imagens binarizadas, para definir certas espécies de fitoplâncton e protozoários. Além disso, o formato simplificado de cada objeto pode ser reconstruído com uma transformada inversa e pode ser impresso para fornecer uma visão de como a rede classificatória percebe a definição do objeto. Definições de contorno, todavia, possuem limitações [Blackburn et al.,1998].

Uma definição mais sofisticada é necessária para espécies que são identificadas pela cor ou textura, mas a abordagem acima poderia ser considerada o primeiro passo em um procedimento multiníveis, para se conseguir uma boa descrição. Procedimentos de coloração com corantes químicos, ajudam a segregar classes maiores, como por exemplo: organismos que contêm DNA espalhados, organismos heterotróficos, autotóxicos e detritos, especialmente em conjunto com filtros especiais que realçam as cores específicas. Microscopia confocal pode ainda melhorar o contraste e resolução, eliminando a luz de objetos que estão fora de foco e esta técnica funciona bem com corantes específicos, que enfatizam objetos de interesse (por ex. bactérias coradas com 'laranja de acridina') [Blackburn et al.,1998].

Wilkins et al.,1999 descrevem a aplicação de rede neural para identificação de 34 espécies de microalgas mantidas em cultivo, incluindo espécies de água doce e marinhas. As análises foram feitas com base em 11 parâmetros de cada espécie, extraídos de uma análise em Citômetro de Fluxo, que mede características de fluorescência, e espalhamento da luz de cada partícula (no caso, microalgas). Além disto, o equipamento era dotado de uma série de fotodiodos, que registram a difração da luz pelas partículas, a pequenos ângulos em relação ao feixe, fornecendo informações sobre o formato das mesmas. A porcentagem de identificações corretas, após treinamento e otimização da rede, ficou em 91,5% em média, para as 34 espécies testadas. Dentre estas, 6 espécies foram reconhecidas com 98% de sucesso. Os autores atentam para a dificuldade que poderá ser encontrada no uso da metodologia para amostras do ambiente, já que estas conterão inúmeras espécies 'desconhecidas' pela rede.

O trabalho de Frankel et al.,1989 também descreve a utilização de redes neurais na análise de parâmetros extraídos de Citômetro de Fluxo, para análises quali e quantitativas de populações de fitoplâncton no ambiente marinho. Os autores enfatizam a rapidez e exatidão do método no reconhecimento de padrões, o que permite uma análise das amostras quase em tempo real, ao contrário das análises convencionais de dados de citometria de fluxo.

Os métodos citados exibem grande potencial para utilização dentro dos propósitos do Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos (FURG). Embora o laboratório não conte com um citômetro de fluxo, outros parâmetros igualmente objetivos, sobre o formato e cor dos organismos, podem ser extraídos de imagens adequadas dos mesmos.

Outros trabalhos relacionam a utilização de redes neurais na identificação de microorganismos. Noble et al., 1997 utilizaram dados genéticos de bactérias para analisar a composição da comunidade bacteriana no estuário de Chesapeake Bay (EUA). Para isto, foram analisadas imagens de autoradiografias de RNA, material genético celular, que produzem complexos padrões de bandas em gel de eletroforese, os quais são característicos para determinadas espécies e tipos de bactérias. Através destas análises, foi possível identificar as variações espaciais e sazonais na composição de bactérias no referido estuário.

Noble et al., 2000 também utilizaram métodos computacionais neurais no reconhecimento de comunidades microbianas em sedimentos de praias arenosas. Neste caso, as análises foram realizadas em perfís de substâncias que compõem as membranas biológicas, os 'ácidos graxos de fosfolipídeos', extraídos de medidas em cromatógrafos a gás e espectrômetros de massa. A composição (ou perfil) destes ácidos graxos permitem identificar os diferentes grupos de bactérias e outros microorganismos, como protozoários e fungos, presentes nos

sedimentos de praias. No entanto, esta identificação se torna difícil devido aos resultados complexos fornecidos pelo aparelho, já que são numerosas as combinações de tipos e proporções entre os diferentes ácidos graxos, que caracterizam cada grupo de microorganismo.

Para complementar, Gonzalez e Woods, 1993, apresentam inúmeras referências sobre utilização de redes neurais para reconhecimento de padrões e ensina, com exemplos, a sua utilização.

As principais contribuições do trabalho proposto são destacadas a seguir:

a) O trabalho propõe a utilização dos níveis de intensidade da imagem em padrão RGB como característica para reconhecimento de padrões. Nos trabalhos referenciados, (Blackburn et al., 1998, Wilkins et al., 1999, Frankel et al., 1989 e Noble et al., 1997 e 2000) foram utilizadas imagens binárias, o que permite apenas reconhecimento de formas, e parâmetros físicos, químicos e biológicos, que dependem de manuseio e reações sobre as amostras, além do uso de microscópio confocal e outros equipamentos de difícil aquisição;

b) O conjunto proposto de características das microalgas, do ponto de vista da geometria e da cor, levou à construção de indicadores que permitem o reconhecimento de padrões;

#### 1.2.4. VELOCIMETRIA POR PROCESSAMENTO DE IMAGENS DE PARTÍCULAS

Velocimetria por processamento de imagens de partículas é a medida simultânea de vetores velocidades de fluidos ou partículas contidas num plano do campo do fluido, usando imagens obtidas por técnicas óticas. Exatidão e resolução espacial são comparáveis à Anemometria Laser Doppler e Anemometria de fio quente [Fingerson et al., 1991].

Câmaras de vídeo, microcomputadores e processamento digital de imagens a um custo acessível estão transformando a visualização de escoamentos de uma técnica qualitativa para uma técnica quantitativa com grande eficiência. Esforços têm sido concentrados em técnicas óticas que usam planos de luz laser pulsada ou contínua e equipamentos fotográficos ou eletrônicos [Schalkoff, 1989] para o registro das imagens de partículas traçadoras distribuídas no fluido.

Os principais elementos que compõem estas técnicas de medição de velocidade são: o fluido, as partículas, o sistema de iluminação, o sistema de aquisição das imagens, e o sistema de processamento das imagens, o qual determina o campo de velocidades.

A técnica de velocimetria de luz em sua versão bidimensional está descrita por Adrian, 1996 e Almeida, 1997.

Adotando-se a nomenclatura proposta por Adrian,1991, podemos classificar os modos de operação dos sistemas de velocimetria de luz em: Velocimetria por padrões de laser (Laser Speckel Velocimetry - LSV), Velocimetria por acompanhamento de partículas (Particle Tracking Velocimetry – PTV ) e Velocimetria de alta densidade de imagem de partículas (Particle Image Velocimetry – PIV).

Para imagens com alta densidade de partículas, o campo de escoamento é obtido através do método de correlação espacial das imagens, (autocorrelação ou correlação cruzada) ou do método das franjas de Young, resultado da transformada ótica de Fourier da imagem [Adrian, 1991].

A aplicação do algoritmo da correlação cruzada normalizada, bidimensional, permite determinar o módulo, a direção e o sentido da velocidade [Englart et al.,1989 e Willert e Gharib, 1991].

O método de velocimetria por acompanhamento de partículas está descrito por Bonna et al., 1990, Wernet, 1993, Riethmuller, 1996 e Gutkoski, 1999, 2001, que desenvolveu um sistema de velocimetria especialmente para baixas velocidades de partículas em movimento num fluido.

Através do uso do método de velocimetria por acompanhamento de partículas, o trabalho proposto mostra que é possível quantificar rapidamente a velocidade de natação das microalgas e traçar paralelos entre suas movimentações, servindo também como parâmetro para sua caracterização.

## 2. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS PARA AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DE IMAGENS DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS

### 2.1. VISUALIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS E DAS MICROALGAS

A fig. 2.1 mostra esquematicamente o arranjo adotado neste trabalho, sugerido por Sieracki et al., 1985 e utilizado por Wilkinson, 1995.

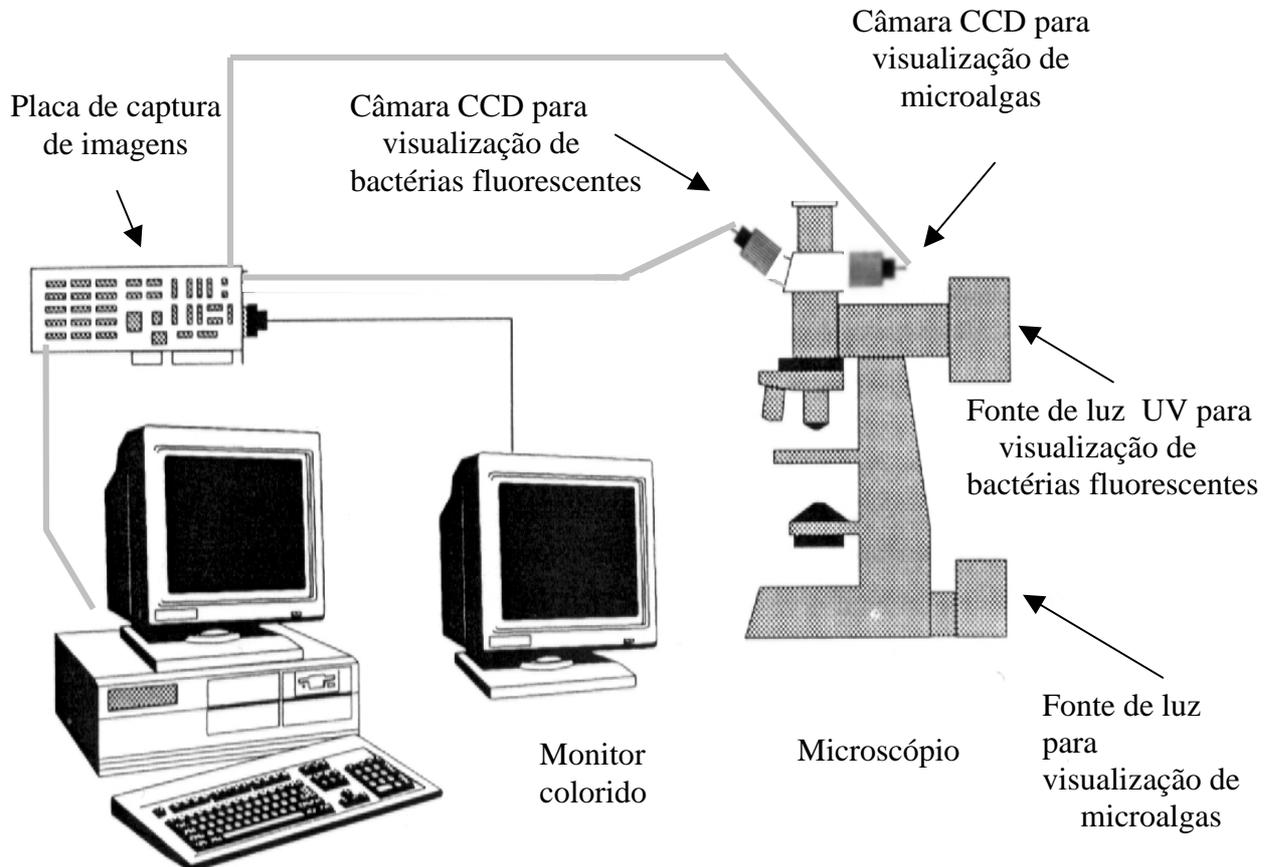


Figura 2.1 Arranjo dos equipamentos utilizados para aquisição de imagens em microscópio.

-Para a observação das imagens das bactérias aquáticas e das microalgas, foram utilizados os seguintes equipamentos: microscópio ótico, câmaras de vídeo CCD acopladas a monitor de vídeo de 14 polegadas, placa de aquisição de imagens com resolução máxima de 640 x 480 pixels, microcomputador Pentium II 400 MHz, e gravador digital.

### 2.2. AQUISIÇÃO DE IMAGENS DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS NO MICROSCÓPIO EPIFLUORESCENTE

Usa-se fluorocromos para observação das bactérias aquáticas porque elas não podem ser observadas no espectro visível. Chama-se fluorocromo qualquer substância que tem a capacidade de ser excitada por luz ultravioleta, e emitir uma energia de comprimento de onda maior (fluorescência) quando suas moléculas retornam a níveis de energia normais. Alguns

fluorocromos podem se ligar ao material genético (DNA ou RNA), à parede celular ou a outros compostos orgânicos das células. Desta forma estes elementos são absorvidos pelas células que, quando expostas à luz ultravioleta, tornam-se visíveis devido à emissão de fluorescência. Os fluorocromos mais utilizados em amostras de bactérias aquáticas são DAPI, laranja de acridina e acriflavina.

O diagrama da fig 2.2 mostra a origem da radiação fluorescente.

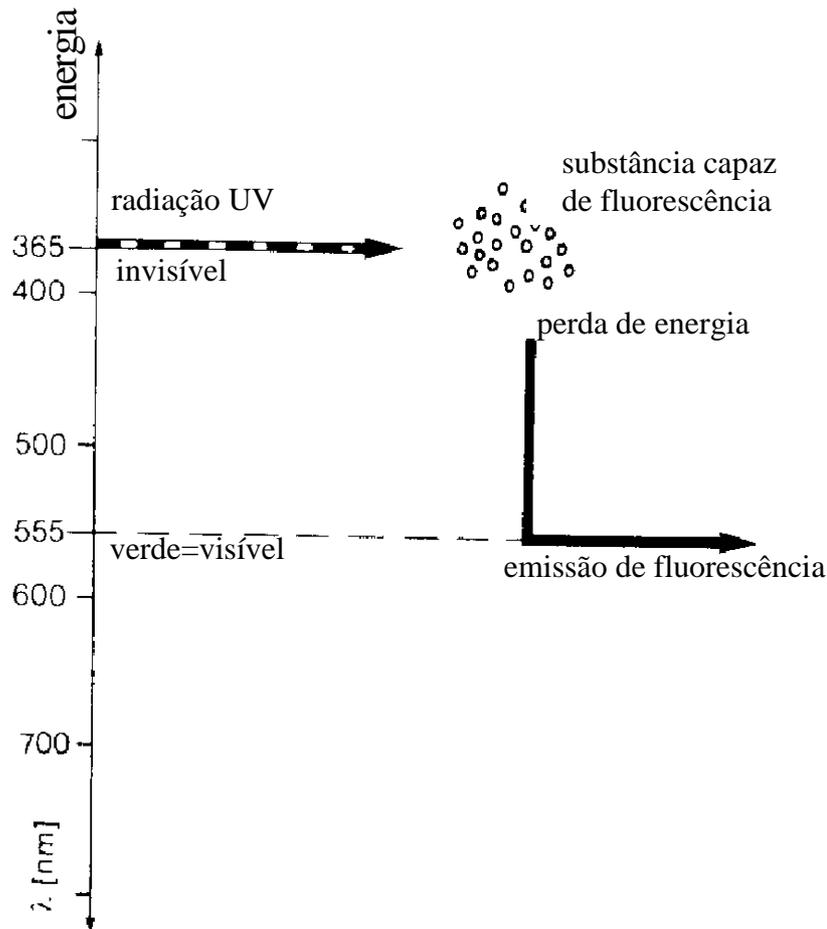


Figura 2.2 Origem da radiação fluorescente [ Holz, 1982 ].

Para aquisição de imagens fluorescentes de bactérias aquáticas foi utilizado um microscópio com as seguintes características: Microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan equipado com filtro azul 487709 (BP450-490; FT 510; LP 520) sendo BP filtro de excitação, LP filtro de barreira e FT filtro divisor. Uma lâmpada de mercúrio de alta pressão é utilizada como fonte de luz UV no microscópio.

A fig. 2.3 mostra os processos de excitação e de emissão de fluorescência ocorridos no microscópio epifluorescente.

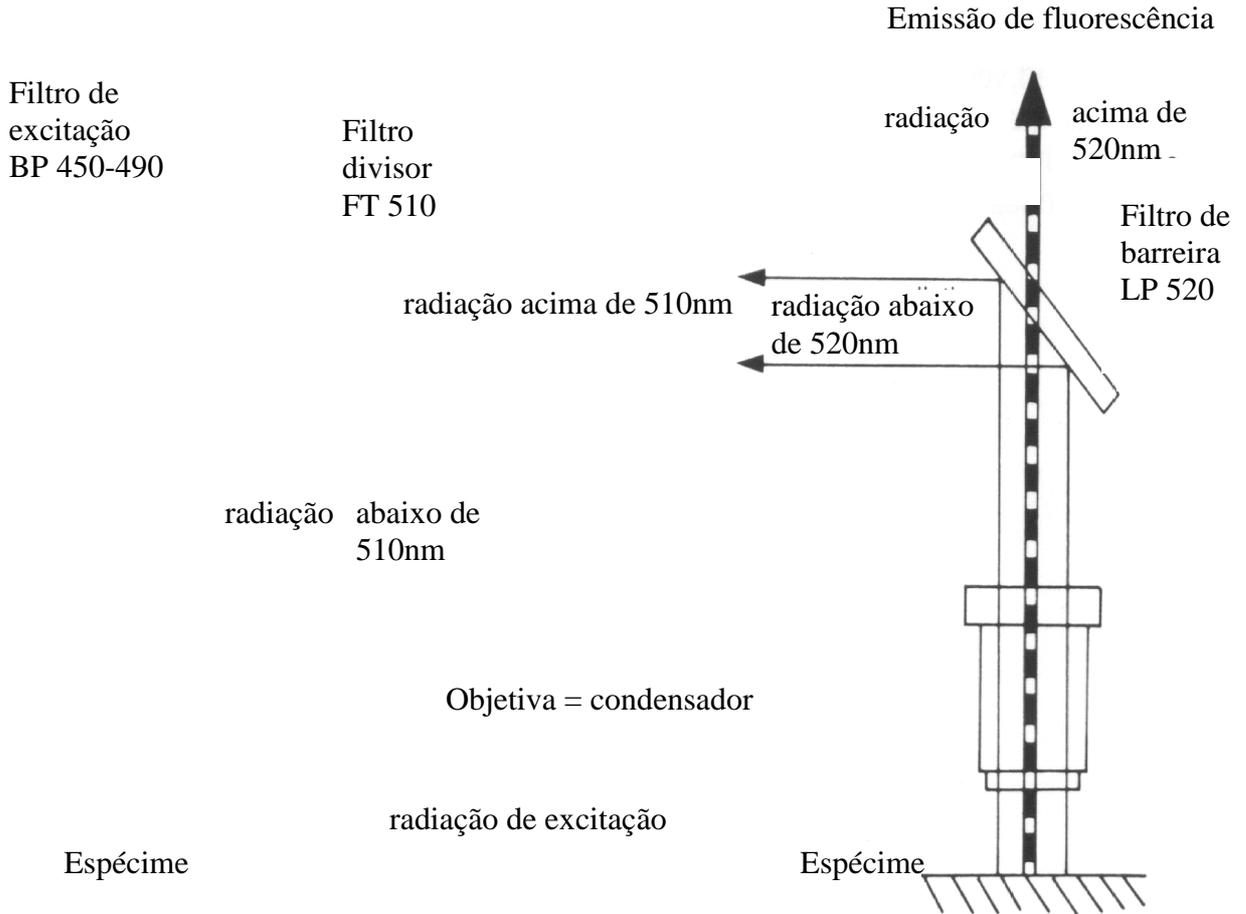


Figura 2.3 Processos de excitação e de emissão de fluorescência [ Holz, 1982 ].

A fig. 2.4 mostra as curvas de transmitância dos filtros divisores (observe FT 510).

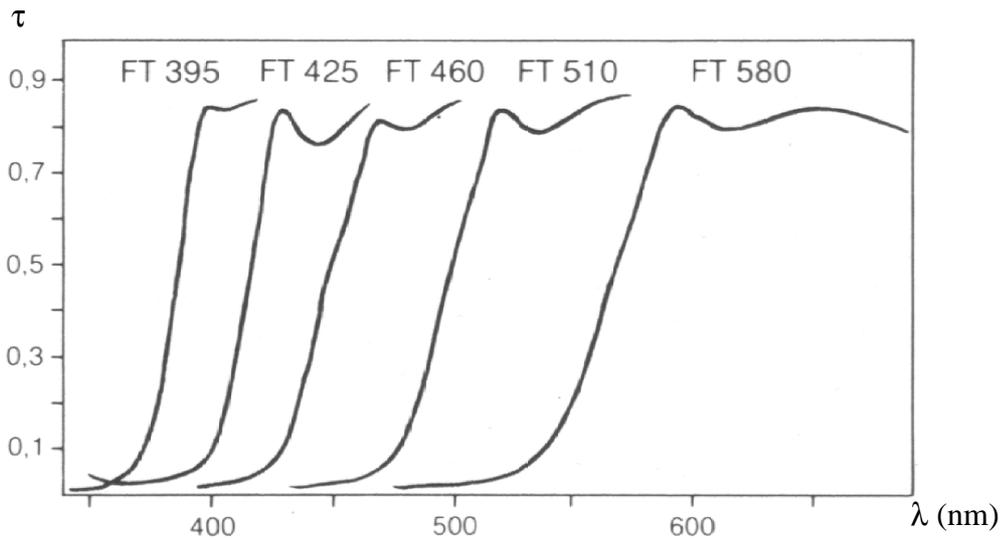


Figura 2.4 Curvas de transmitância dos filtros divisores [ Holz, 1982 ].

A fig. 2.5 mostra o corte feito pelos filtros de excitação (observe BP450-490) e de barreira (observe LP 520).

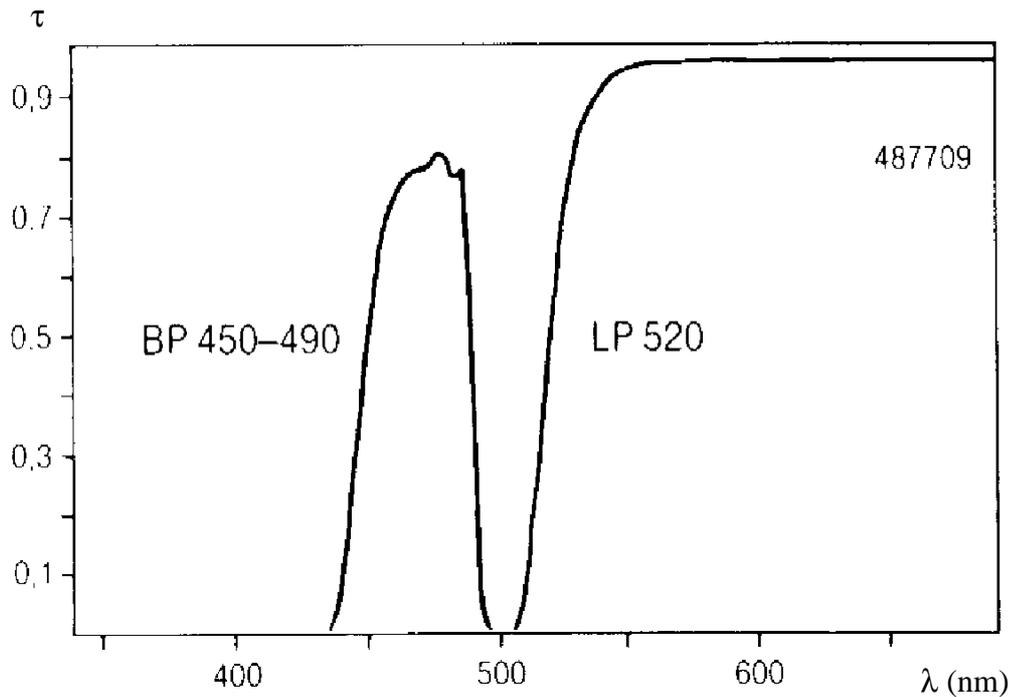


Figura 2.5 Curvas de transmitância dos filtros de excitação e de barreira [ Holz, 1982 ].

O comprimento de onda desejado para produzir fluorescência é obtido pelo filtro de excitação (BP450-490). Este filtro transmite somente a radiação requerida para a fluorescência do corante ligado às bactérias aquáticas. Alguma luz excessiva espalhada pela excitação também poderia penetrar na objetiva.

Conforme a fig. 2.3, o filtro divisor (FT 510), usado sob um ângulo de  $45^{\circ}$ , reflete certas faixas espectrais, enquanto outras são completamente transmitidas. Somente a radiação abaixo de 510nm penetra na objetiva e atinge as bactérias aquáticas observadas. A luz espalhada é cortada pelo filtro de barreira (LP 520) e somente a luz fluorescente emitida pelas bactérias aquáticas é vista contra um fundo escuro.

A fig. 2.6 mostra imagens de bactérias aquáticas adquiridas em microscópio epifluorescente, utilizando fluorocromos, que se ligam aos ácidos nucleicos das células bacterianas, distinguindo-se as bactérias do fundo da imagem.

A fig. 2.7 mostra com mais detalhes o destaque dado às bactérias pela fluorescência, observando-se bactérias de diversos formatos e tamanhos.

Ambas as imagens foram adquiridas no Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos (FURG).

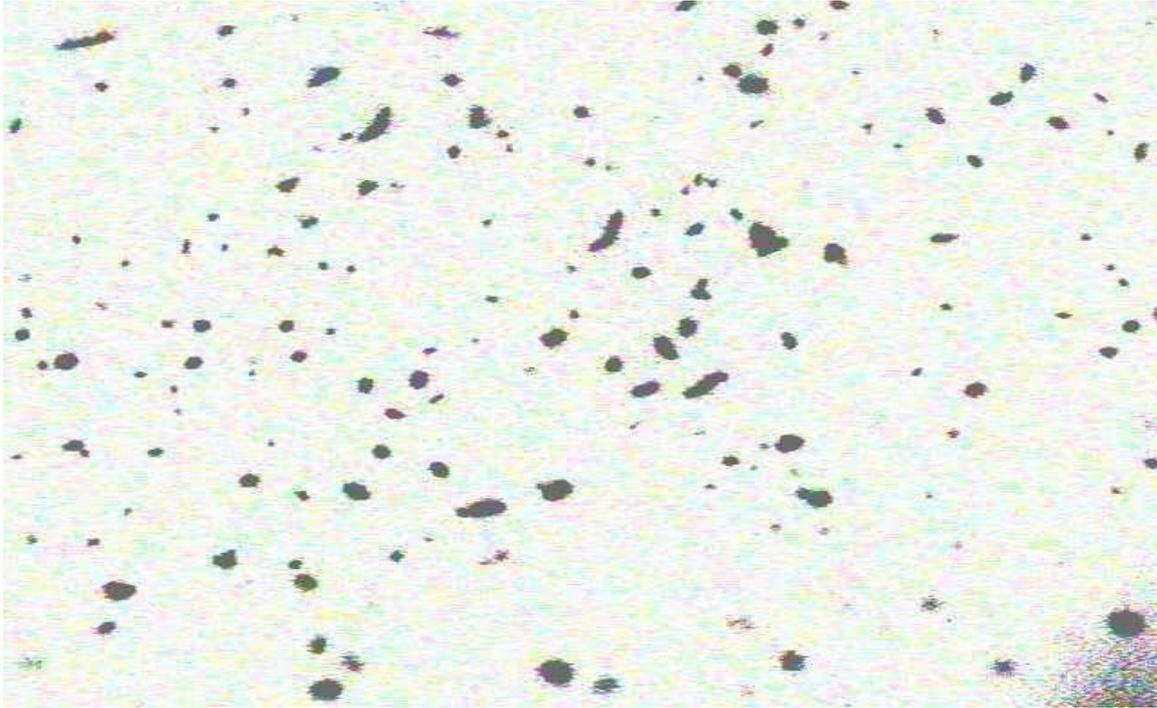


Figura 2.6 Imagens de bactérias aquáticas em microscópio epifluorescente

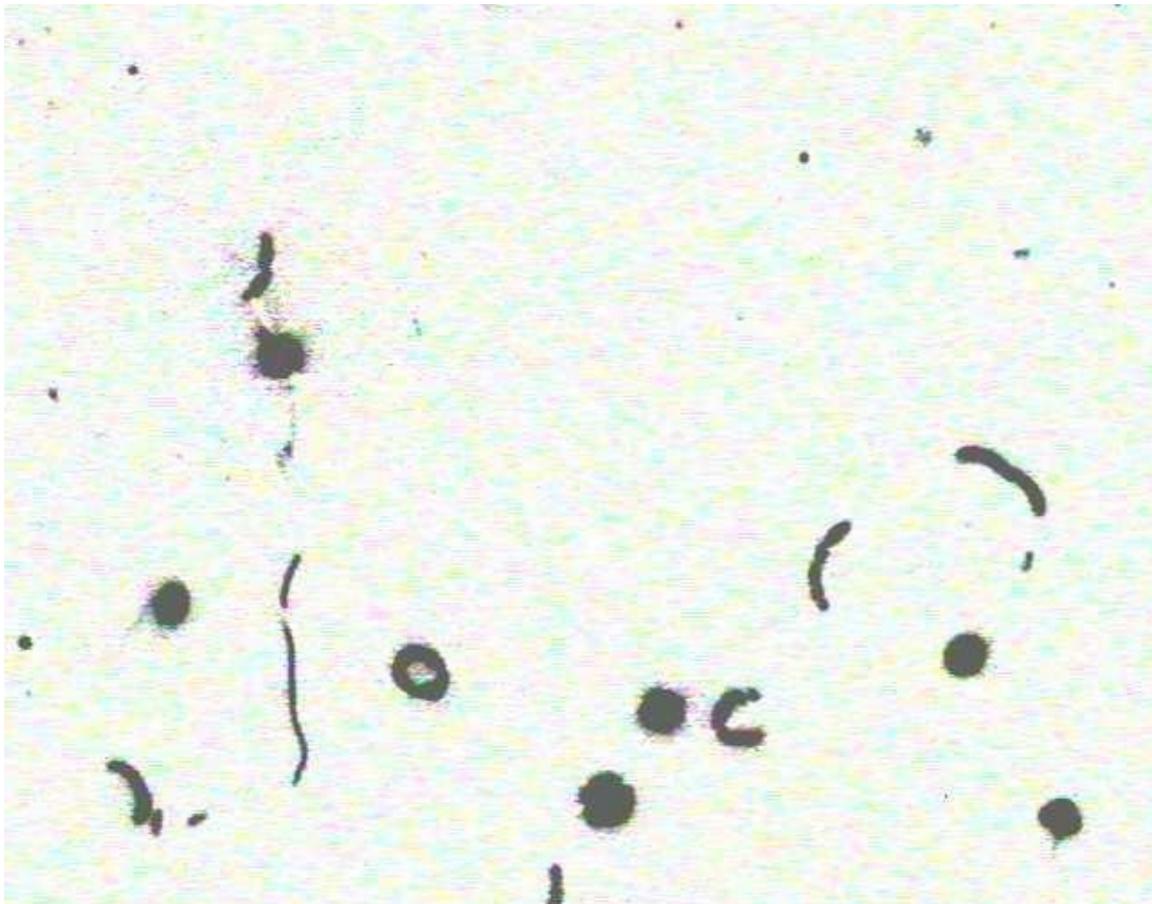


Figura 2.7 Detalhes visíveis das bactérias devido à fluorescência

### 2.3. TRATAMENTO DA IMAGEM E APLICAÇÃO DE OPERADORES MORFOLÓGICOS

A morfologia matemática concentra seus esforços no estudo da estrutura geométrica das entidades presentes numa imagem. Esta técnica pode ser aplicada em várias áreas de processamento e análise de imagens, com objetivos tão distintos como realce, filtragem, segmentação, detecção de bordas, esqueletização, afinamento, entre outros. O princípio básico da morfologia matemática consiste em extrair as informações relativas à geometria e à topologia de um conjunto desconhecido (uma imagem) pela transformação através de outro conjunto completamente definido, chamado elemento estruturante. Portanto, a base da morfologia matemática é a teoria dos conjuntos.

Para análise das imagens das bactérias aquáticas foram utilizados operadores morfológicos e filtros.

Operadores morfológicos podem ser descritos a partir de dois operadores elementares, chamados dilatação e erosão. As operações dilatação e erosão adicionam e removem pixels, respectivamente, às bordas de objetos contidos numa imagem binária, permitindo detecção dos objetos da imagem.

Exemplificando, dilatação adiciona pixels em A (conjunto desconhecido, imagem) onde há intersecção dos pixels da imagem A com elementos não zerados do elemento estruturado B. Na erosão, permanecem como 1 somente os pixels das bordas de A onde há intersecção dos pixels da imagem A com elementos não zerados do elemento estruturado B.

Filtragem é a operação de convolução entre duas matrizes (imagem e filtro) utilizada para melhorar a definição dos detalhes da imagem. Os filtros Laplace, Gauss, médio e outros, assim como os operadores morfológicos estão descritos por Marr e Hildreth,1980, Gonzalez e Woods,1993, Wilcox *et al.*,1997 e Thompson e Shure,1995.

O filtro Laplace, utiliza a segunda derivada da intensidade da imagem, procurando o máximo gradiente dos níveis de intensidade, assumido coincidir com as bordas das bactérias. O filtro Laplace aplicado é descrito pela matriz:

$$\begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & 24 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & -1 \end{bmatrix}$$

No filtro de Gauss (5x5),  $h(x,y)$ , eq. 2.1, é aplicada à intensidade da imagem a função Gaussiana  $h_g(x,y)$  descrita na eq. 2.2:

$$h(x, y) = \frac{h_g(x, y)}{\sum_x \sum_y h_g} \quad (2.1)$$

$$h_g(x, y) = e^{-(x^2+y^2)/(2\sigma^2)} \quad (2.2)$$

onde:

$x$  e  $y$  variam de 1 a  $M$  e de 1 a  $N$ , respectivamente, sendo  $M \times N$  as dimensões da matriz intensidade da imagem e  $\sigma$  é o desvio padrão da intensidade da imagem. O filtro gaussiano aplicado é descrito pela matriz:

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 2 & 1 & 1 \\ 1 & 2 & 4 & 2 & 1 \\ 2 & 4 & 8 & 4 & 2 \\ 1 & 2 & 4 & 2 & 1 \\ 1 & 1 & 2 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

O filtro gaussiano é usado para permitir a segmentação da imagem, ajudando através da aplicação de um limiar a separar a porção desejada da imagem do fundo escuro.

No filtro médio (3x3), o pixel central da matriz é a média aritmética de seus 8 pixels vizinhos. O filtro médio aplicado é descrito pela matriz:

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

Para análise das imagens das bactérias aquáticas foi utilizada a seqüência ideal para detecção de bordas descrita por Massana et al.,1997, envolvendo a aplicação do filtro de Gauss (5x5), filtro Laplace (5x5) e um filtro médio (3x3), este último aplicado três vezes sucessivas.

A seguir, a imagem é transformada em imagem binária (partículas pretas sobre um fundo branco ou vice-versa).

Este processo é feito interativamente pela detecção das bordas da imagem com aplicação de equação de limiar à intensidade da imagem e o critério é obter as maiores células sem selecionar objetos que não sejam bactérias. Os objetos indesejados são removidos comparando-se a imagem binária com a imagem original.

Finalmente, os parâmetros de interesse (área, perímetro, comprimento e largura) são automaticamente medidos para cada bactéria por operadores morfológicos.

O fluxograma da fig. 2.8 apresenta o processo para aquisição, processamento de imagens e medição de bactérias aquáticas.

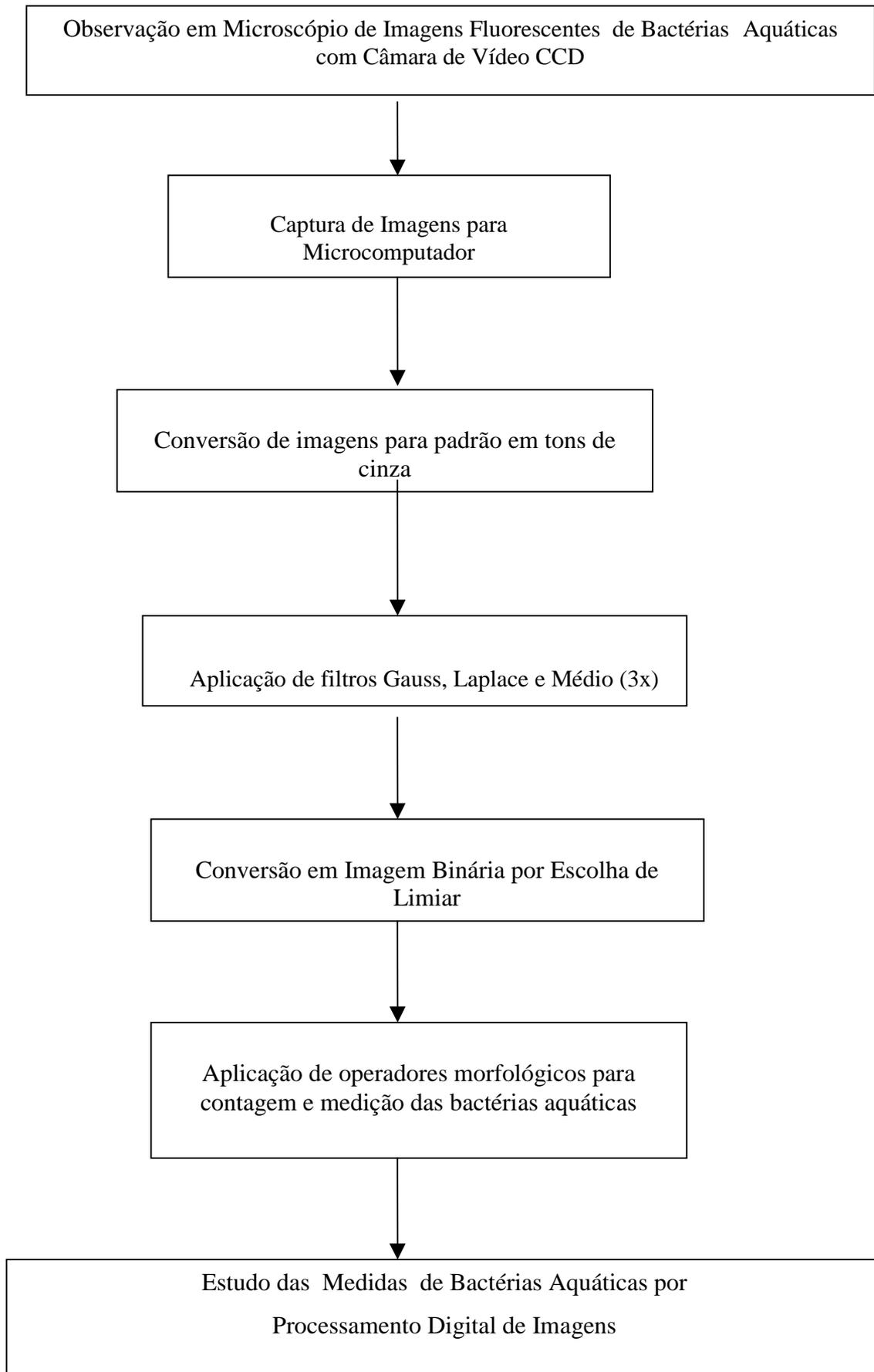


Figura 2.8 Processo para aquisição, processamento de imagens e medição de bactérias aquáticas.

### 3. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DE MICROALGAS

As microalgas estudadas, *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, *Fibrocapsa japonica*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii* apresentam diferenças e semelhanças de forma, filamentos tipo antenas, cor e tamanho entre amostras de mesma espécie e de espécies diferentes [Nézan,1997].

As características analisadas que podem formar o padrão de cada imagem de microalga devido à diversidade de geometria e do nível de intensidade da imagem são:

#### 3.1. HISTOGRAMAS

Traçado de histograma RGB e CINZA de todos os pixels do objeto, de acordo com Thompson e Shure,1995;

#### 3.2. GRANDEZAS CARACTERÍSTICAS

Cálculo das seguintes grandezas, descritas por Wilcox et al.,1997:

- Valores mínimo, médio, máximo e desvio padrão da intensidade das imagens em padrão de cinza;
- Área do objeto medida como o número de pixels internos ao polígono que o envolve e tem como unidade pixels;
- Perímetro do objeto medido como o perímetro, em pixels, do polígono que o envolve;
- Esfericidade  $Esf$ , variando de 0 a 1 (círculo), computada pela eq. 3.1 como :

$$Esf = \frac{4 * \Pi * \text{área}}{\text{perímetro}^2} \quad (3.1)$$

- $X_{max}$  e  $X_{min}$ , maior e o menor comprimento de eixo do objeto;
- Elongação  $E$ , definida pela eq. 3.2 como:

$$E = \frac{X_{max}}{X_{min}} \quad (3.2)$$

Se  $E$  vale 1 o objeto é redondo ou quadrado.

- Diâmetro de Feret,  $DF$ , diâmetro de um círculo, em pixels, tendo a mesma área do objeto, sendo determinado pela eq. 3.3:

$$DF = \sqrt{\frac{4 * \text{área}}{\Pi}} \quad (3.3)$$

- Compactação,  $C$ , variando de 0 a 1 (circular) definida pela eq. 3.4:

$$C = \frac{DF}{X \max} \quad (3.4)$$

Para calcular-se estas variáveis a imagem da microalga é lida em padrão RGB, convertida para padrão em tons de cinza e aplicado um limiar que destaca cada uma das microalgas na amostra.

### 3.3. MOMENTOS DE PRIMEIRA, SEGUNDA, TERCEIRA E N-ÉSIMA ORDEM:

A forma de contornos de objetos é descrita quantitativamente utilizando momentos [Gonzalez e Woods,1993].

Seja  $v_i$  a amplitude da intensidade da imagem em padrão CINZA ou RGB dos pixels da imagem e  $p(v_i)$  o histograma destas amplitudes, ( $i= 1,2,3,\dots,K$ , onde  $K$  é o número de incrementos discretos da amplitude). Então o  $n$ -ésimo momento  $\mu_n$  de  $v$  sobre sua média é dado pelas eqs. 3.5 e 3.6:

$$\mu_n = \sum_{i=1}^k (v_i - m)^n \cdot p(v_i) \quad (3.5)$$

onde:

$$m = \sum_{i=1}^k v_i \cdot p(v_i) \quad (3.6)$$

Em geral, somente os primeiros momentos são requeridos para diferenciação de formas.

### 3.4. TRANSFORMADAS

Para complementar a análise da diversidade de cor e forma das microalgas foram aplicadas as transformadas FFT, transformada rápida de Fourier bidimensional do objeto, e a transformada Radon [Thompson e Shure,1995].

A transformada de Fourier de uma imagem representa a distribuição das diversas frequências espaciais que a compõem. Assim, uma imagem com variações suaves de intensidade no espaço será predominantemente composta por baixas frequências espaciais (módulo do espectro da FFT da ordem de *zero*).

Em contraposição, uma imagem com bordas bem contrastadas, ou com ruído localizado, terá contribuição de frequências espaciais altas (módulo do espectro da FFT da ordem de  $6 \times 10^4$ ). A ordem de grandeza se refere às espécies analisadas.

A transformada de Fourier de uma função real é uma função complexa. A partir de uma imagem real, esta operação gera duas imagens, representando as partes real e imaginária da transformada.

Em processamento de imagens costuma-se calcular o módulo da Transformada de Fourier, *espectro de Fourier*, ou o módulo quadrado da Transformada de Fourier, *espectro de potência de Fourier*, e apresentá-los como imagens. Estas imagens correspondem a um mapeamento das frequências espaciais da imagem original [Gonzalez e Woods,1993] .

Este mapeamento é feito de forma que as frequências altas (espectro de potência da FFT da ordem de  $1 \times 10^9$ ) sejam representadas no centro da imagem, ao passo que as frequências mais baixas (espectro de potência da FFT da ordem de *zero*) são apresentadas afastadas do centro.

A transformada de Fourier bidimensional do objeto, é calculada de acordo com a eq.3.7 :

$$\mathfrak{F}(u, v) = \frac{1}{M \cdot N} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) \exp \left[ -2 \pi j \left( \frac{u \cdot x}{M} + \frac{v \cdot y}{N} \right) \right] \quad (3.7)$$

onde :

$f(x,y)$  é a intensidade de cada pixel da imagem;

$u = 0 \dots \dots \dots M-1$ ;  $v = 0 \dots \dots \dots N-1$ , sendo  $M \times N$  as dimensões da imagem, sendo  $u$  e  $v$  denominadas frequências nas direções das variáveis  $x$  e  $y$ , respectivamente.

A eq. 3.7 pode ser resolvida com menor tempo computacional aplicando-se o algoritmo da transformada rápida de Fourier, FFT [Gonzalez e Woods,1993].

A transformada Radon é uma propriedade da Transformada de Fourier e é a base da tomografia computadorizada.

A transformada Radon, projeção da soma da intensidade do objeto num ângulo dado  $\theta$ , representada na fig. 3.1 é dada pelas eqs. 3.8 a 3.10 [Lin, 1990, Thompson e Shure,1995] :

$$p_{\theta} = \sum_{t=0}^m \sum_{u=0}^n f(t_1, t_2) \quad (3.8)$$

$$t_1 = t \cos\theta - u \sin\theta \quad (3.9)$$

$$t_2 = t \sin\theta + u \cos\theta \quad (3.10)$$

onde:

$t = 0, \dots, m-1$  e  $u = 0, \dots, n-1$ , sendo  $m \times n$  as dimensões da imagem no plano  $t$ - $u$ .

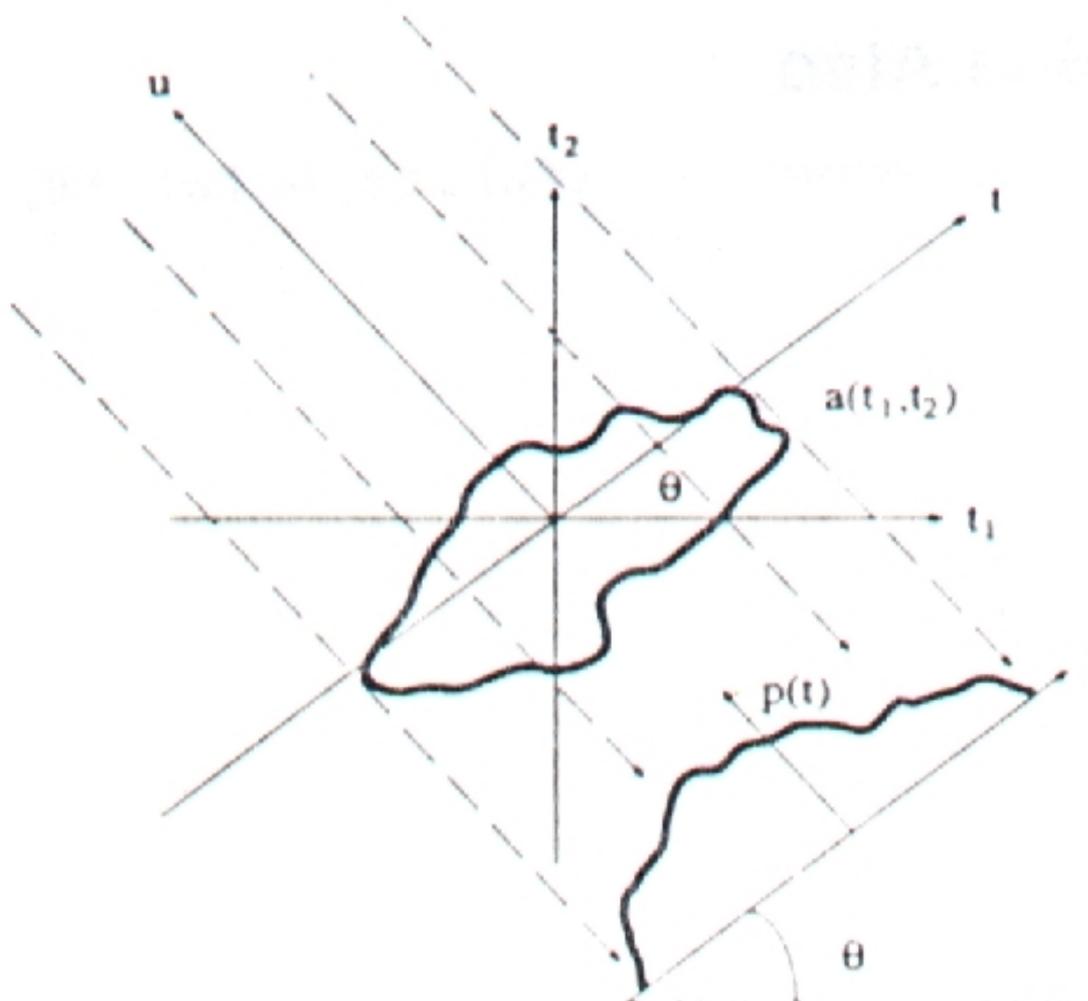


Figura 3.1 Representação da transformada Radon de uma imagem [ Thompson e Shure, 1995 ].

### 3.5. FUNÇÃO DENSIDADE DE PROBABILIDADE DAS GRANDEZAS CARACTERÍSTICAS

A partir dos resultados das grandezas características das amostras das 5 espécies estudadas pode-se traçar a função densidade de probabilidade para cada uma destas grandezas.

A função densidade de probabilidade de uma distribuição normal (fdp), segundo Gonzalez e Woods, 1993, é dada pela eq. 3.11:

$$fdp(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot \left[ -\frac{1}{2} \left[ \frac{x-\mu}{\sigma} \right]^2 \right] \quad (3.11)$$

onde:

$\mu$  é a média e  $\sigma$  é o desvio padrão da grandeza característica nas amostras de cada espécie;

Para verificar se uma amostra tem distribuição normal aplica-se testes de significância. Estes testes são relativos às hipóteses estatísticas.

Supõe-se que a média de uma população com distribuição normal seja  $\bar{X}$  e admite-se a hipótese de que uma amostra tenha uma média  $\bar{M}$ . Esta hipótese implica em que a discrepância entre  $\bar{X}$  e  $\bar{M}$  tenda para zero.

Calcula-se a probabilidade de que haja discrepância entre  $\bar{X}$  e  $\bar{M}$  maior do que a desejada. Esta probabilidade deve ser pequena. Usualmente toma-se um valor de 5%, denominado nível de significância, como o valor crítico desta probabilidade.

Para determinar-se esta probabilidade, calcula-se  $t$ , da distribuição de probabilidade *Student*, pois esta distribuição tende à normal quando o número  $N$  de elementos da amostra é grande, sendo  $t$  dado pela eq. 3.12.

$$|t| = \left| \frac{\bar{X} - \bar{M}}{s_{\bar{X}}} \right| \quad (3.12)$$

onde  $s_{\bar{X}}$ , é a estimativa amostral do desvio padrão  $\sigma_{\bar{X}}$  da distribuição normal, dada pela eq. 3.13.

$$s_{\bar{X}} = \frac{\sigma_{\bar{X}}}{\sqrt{N}} \quad (3.13)$$

Conhecido o valor de  $t$  entra-se na tabela de distribuição  $t$  e determina-se a probabilidade  $p$  da discrepância entre  $\bar{X}$  e  $\bar{M}$  tender para zero dentro do nível de significância estabelecido.

Se  $p \leq \text{nível de significância}$ , então pode-se dizer que a amostra estudada tem uma distribuição normal.

Para calcular a probabilidade  $p$  foi usado o programa computacional MatLab (Thompson e Shure,1995).

### 3.6. TABELA DE INDICADORES

Conhecendo-se a média ( $\mu_p$ ) e o desvio padrão ( $\sigma_p$ ) das grandezas características, descritas nas seções 3.1 a 3.4, para um conjunto de amostras de cada espécie de microalga, monta-se Tabelas de Indicadores. É verificado se cada valor ( $V_i$ ) das grandezas da amostra a ser testada encontra-se dentro do intervalo ( $Int$ ) =  $\mu_p \pm 2\sigma_p$ . Em caso afirmativo, o indicador ( $I$ ) assume o valor '1', caso contrário, assume o valor '0'. A amostra pertencerá à espécie com maior valor do  $\sum I$ .

## 4. REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS PARA RECONHECIMENTO DE PADRÕES DE MICROALGAS: FUNDAMENTOS E REDES PROPOSTAS

### 4.1. FUNDAMENTOS

Para utilizar-se um sistema automático de reconhecimento de padrões é preciso extrair atributos das imagens analisadas. Os atributos das imagens das microalgas que foram considerados para o reconhecimento são as propriedades geométricas descritas no capítulo 3, propriedades de luminância: nível de cinza médio de cada microalga (1<sup>o</sup> momento da distribuição), desvio padrão do nível de cinza (2<sup>o</sup> momento da distribuição), nível de cinza mínimo e máximo e nível de intensidade da imagem padrão RGB.

Conhecidos os atributos da imagem, passa-se à sua classificação. Classificar microalgas nas imagens consiste em agrupá-las de acordo com os atributos medidos. Como são necessários vários atributos para uma classificação adequada, a técnica utilizada denomina-se segmentação multivariável, que usa recursos gráficos e estatísticos para analisar as diversas distribuições de populações nos diversos atributos e estabelecer correlações que permitam uma classificação.

Em princípio, quanto mais atributos melhor. No entanto, o aumento do número de atributos implica num aumento da dimensão do problema matemático, gerando uma crescente complexidade e custo computacional.

Desta forma, é importante realizar uma seleção adequada dos atributos disponíveis visando otimizar o processo.

Os processos de classificação para redes neurais artificiais, RNAs, podem ser separados em supervisionados e não supervisionados.

Uma classificação supervisionada inicia com uma fase de treinamento, na qual se fornece ao programa atributos ou imagens cujos objetos já foram classificados independentemente, a partir do julgamento de um operador experimentado. Desta forma, pode-se gerar uma função de discriminação ótima.

Esta função é obtida modificando-se sucessivamente os valores calculados, de maneira a gerar uma resposta o mais próximo possível do resultado desejado a partir de resultados conhecidos. No caso da classificação das microalgas, o resultado desejado é o vetor com valores +1 (pertence à espécie) e -1 (não pertence à espécie), valores estes escolhidos devido à função de ativação aplicada (fig. 4.2 e eq. 4.1, descritas na seção 4.3).

A resposta se aproximará do resultado desejado de acordo com o gradiente descendente do erro entre valores calculados e desejados e parará quando se alcançar o erro mínimo estipulado.

Em seguida, imagens de mesmo tipo, não previamente classificadas, são fornecidas ao sistema que tentará reconhecer os diversos objetos de acordo com a função discriminante obtida.

#### 4.2. A REDE COM RETROPROPAGAÇÃO

Rede multiníveis com Retropropagação (*Backpropagation*) é um modelo de rede neural artificial com ativação do tipo propagação para frente (*feed-forward*), não recorrente, e com aprendizado supervisionado por retropropagação do erro. Esta técnica, assim como os modelos derivados desta, são os mais utilizados atualmente para as mais variadas aplicações.

No caso das redes de propagação para frente o fluxo de informação é unidirecional. Neurônios que recebem a informação simultaneamente agrupam-se em *camadas*. Camadas que não estão ligadas às entradas e nem às saídas da rede chamam-se *camadas escondidas*.

A técnica de *Retropropagação* permite o aprendizado das redes neurais baseadas no *Perceptron* com qualquer número de níveis [Rumelhart et al.,1986].

A figura 4.1 mostra uma rede multinível totalmente conectada.

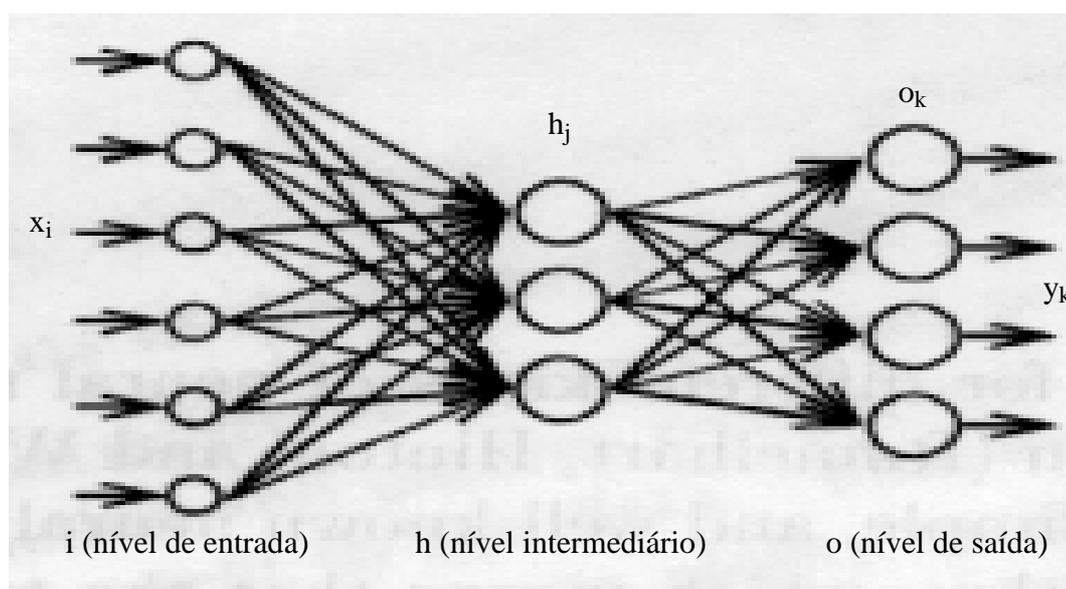


Figura 4.1 – Rede multinível totalmente conectada

Uma rede que utiliza o modelo de *Retropropagação* é uma rede com neurônios em três ou mais níveis: um nível de entrada (*input layer*), um ou mais níveis intermediários ou ocultos (*hidden layers*) e um nível de saída (*output layer*). A função transferência é uma função do tipo sigmoideal (tem forma de um ‘S’ deformado), e a regra de aprendizado é a Regra Delta aplicável a uma rede multinível [Raubert, 1998]. A figura 4.2 mostra a representação da função sigmoideal, dada pela eq. 4.1.

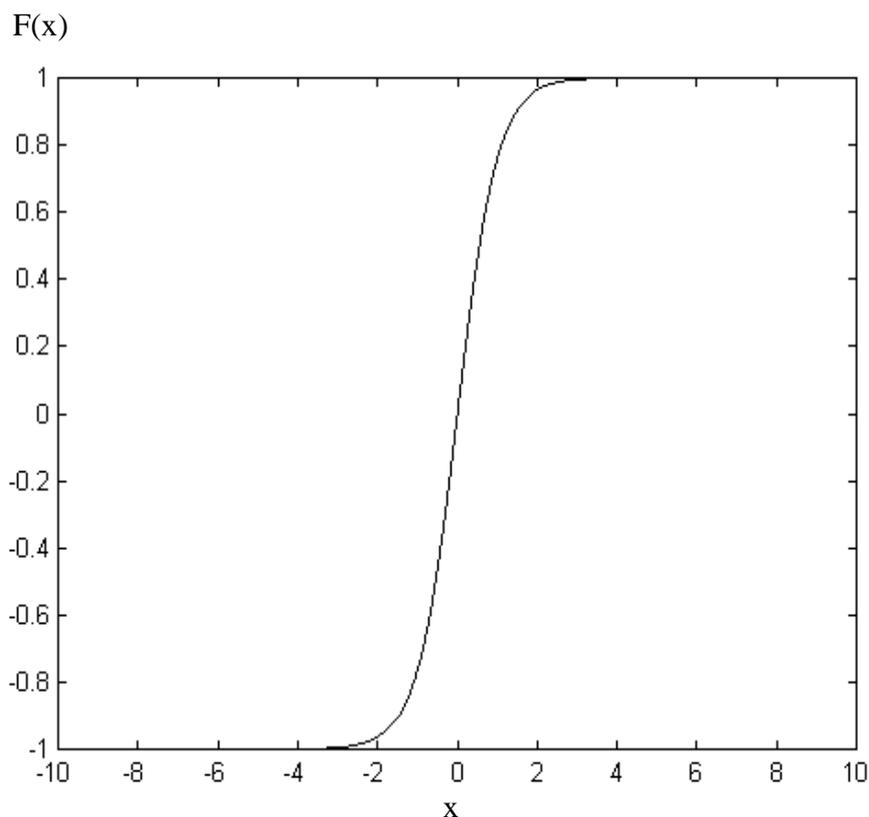


Figura 4.2 - Função de transferência sigmoideal

#### 4.3. PASSOS DE UMA RNA COM RETROPROPAGAÇÃO

O funcionamento de Retropropagação (*Backpropagation*) pode ser descrito da seguinte forma:

Apresenta-se um exemplo à rede e obtém-se a saída correspondente;

Calcula-se o vetor de erro que consiste na diferença entre a saída obtida e a esperada;

Calcula-se o gradiente do vetor de erro e atualiza-se os pesos da camada de saída usando a regra delta;

Propaga-se para trás os valores desejados de modo a atualizar os pesos das demais camadas.

Como o algoritmo de retropropagação requer o cálculo do vetor gradiente do erro, é necessário que a função de ativação seja derivável em todos os pontos. Isto explica o sucesso da função sigmoide como função de ativação, pois ela apresenta esta propriedade.

São mostrados a seguir os passos que uma rede neural artificial com Retropropagação utiliza:

Dado um conjunto de vetores de entrada ( $x_i$ ) e de saída desejada ( $y_k$ ), para cada par ( $x_i, y_k$ ) computa-se um conjunto de pesos e deslocamentos (*bias*) para uma rede de 3 camadas que mapeia entradas nas saídas correspondentes.

1. Seja A o número de unidades da camada de entrada, conforme determinado pelo comprimento dos vetores de entrada de treinamento. Seja C o número de unidades da camada de saída. Agora escolhe-se B, o número de unidades da camada oculta. Denota-se os níveis de ativação das unidades de entrada por  $x_i$ , da camada oculta por  $h_j$  e da camada de saída por  $o_k$ . Os pesos que conectam a camada de entrada à camada oculta são denotados  $w_{1ij}$ , onde o subscrito  $i$  indexa as unidades de entrada e o  $j$  as unidades ocultas. Da mesma maneira, os pesos que conectam a camada oculta à camada de saída são denotados por  $w_{2jk}$ , com o subscrito  $j$  indexando as unidades ocultas e o  $k$  as unidades de saída.

2. Inicializa-se os pesos da rede ( $w_{1ij}$  e  $w_{2jk}$ ) aleatoriamente entre  $-0,1$  e  $+0,1$ .

3. Inicializa-se os deslocamentos- *bias* ( $b_1$  e  $b_2$ ) aleatoriamente entre  $-0,1$  e  $+0,1$ .

4. Atribui-se níveis de ativação às unidades de entrada  $x_i$ .

5. Propaga-se a ativação das unidades de entrada para as unidades da camada oculta (eq. 4.2) usando-se a função de ativação  $F(x)$  dada pela eq. 4.1:

$$F(x) = \frac{2}{1 + e^{-2(x)}} - 1 \quad (4.1)$$

$$h_j = \frac{2}{1 + e^{-2SPOND(j)}} - 1 \quad (4.2)$$

onde  $SPOND(j)$ , dado pela eq.4.3, é a soma ponderada das entradas, ou seja, o somatório dos pesos multiplicados pelas entradas. O valor de  $SPOND$  é o resultado deste somatório, antes de aplicar a função de transferência.

$$SPOND(j) = \sum_{i=0}^A (w_{1ij} * x_{ij} + b_{1j}) \quad \text{para } j = 1, \dots, B \quad (4.3)$$

6. Propaga-se as ativações das unidades da camada oculta para as unidades da camada de saída (eq 4.4) aplicando-se a função de ativação dada pela eq. 4.1:

$$o_k = \frac{2}{1 + e^{-2SPOND(k)}} - 1 \quad (4.4)$$

onde SPOND ( $k$ ) é dado pela eq.4.5:

$$SPOND(k) = \sum_{j=0}^B (w_{2jk} * h_{jk} + b_{2k}) \quad \text{para } k = 1, \dots, C \quad (4.5)$$

7. Computa-se os gradientes dos erros das unidades da camada de saída (eq 4.6), denotado por  $\Delta Erro_{oj}$ . Os erros baseiam-se na saída real da rede ( $o_k$ ) e na saída desejada  $y_k$ .

$$\Delta Erro_{ok} = F'[ SPOND_k] * EY_k \quad (4.6)$$

onde:

$F'$  é a derivada da função de transferência;

$EY_k$  é o erro estimado do neurônio  $k$ .

$F'$  para o caso da função sigmóide é dada pela eq. 4.7:

$$F'(k) = e^{-2 \cdot \text{spond}(k)} * [1 + F(k)]^2 \quad (4.7)$$

O erro estimado do neurônio  $k$ ,  $EY_k$ , é dado pela eq. 4.8:

$$EY_k = (y_k - o_k) \quad (4.8)$$

Substituindo-se as eqs. 4.7 e 4.8 na eq. 4.6 obtém-se o  $\Delta Erro_{ok}$ , dado pela eq. 4.9:

$$\Delta Erro_{ok} = [1 + o_k]^2 \cdot e^{-2 \cdot \text{spond}(k)} \cdot (y_k - o_k) \quad (4.9)$$

8. Computa-se os gradientes dos erros das unidades da camada oculta,  $\Delta Erro_{hj}$ , dado pela eq. 4.10:

$$\Delta Erro_{hj} = [1 + h_j]^2 \cdot e^{-2 \cdot \text{spond}(j)} \cdot \sum_{k=1}^C \Delta Erro_{ok} \cdot w_{2jk} \quad \text{para } j = 1, \dots, B \quad (4.10)$$

onde:

$\Delta Erro_{ok}$  é o erro do neurônio  $k$  (nível seguinte);  $w_{2jk}$  é o peso do neurônio  $j$  da camada oculta que está conectado ao neurônio de saída  $k$ ; e  $h_j$  é o valor da função de ativação aplicada ao neurônio  $j$  da camada oculta.

O erro estimado em um neurônio da camada intermediária não possui o valor "desejado" como nos neurônios de saída, por isso, usa-se a sua "culpa" no erro do neurônio ao qual ele está conectado. Em razão disto, o algoritmo é chamado de Retropropagação (*Backpropagation*), porque se calculam em primeiro lugar os erros das saídas, e só depois é que o algoritmo vai “retropropagando” para os níveis superiores, em direção à entrada.

9. Ajusta-se os pesos entre a camada oculta e a camada de saída, usando-se a eq. 4.11 (Regra Delta Generalizada):

$$\Delta w_{2jk}(t) = \eta * \Delta Erro_{ok} * h_j + \text{Momento} * \Delta w_{2jk}(t-1) \quad (4.11)$$

para:  $j = 1, \dots, B$  e  $k = 1, \dots, C$

onde:

$\eta$  é a velocidade de convergência do aprendizado (regula o tamanho do passo em direção ao mínimo global da curva de erro - mudanças bruscas dos pesos podem passar o mínimo global da curva e ir parar em uma outra depressão qualquer da curva - ver fig. 4.3);

*Momento (Momentum)* é a inércia da alteração dos pesos (como este algoritmo é lento, isto permite manter uma certa velocidade na descida da curva de erro, uma vez que se está indo sempre na mesma direção, ou seja, o *momentum* é baseado na etapa anterior de correção dos pesos, por isso chama-se de inércia);

$\Delta w_{2jk}(t)$  é a variação do peso do neurônio  $j$  da camada oculta que está conectado ao neurônio  $k$  da camada de saída, no instante  $t$ ;

$\Delta Erro_{ok}$  é o gradiente do erro do neurônio  $k$  da camada de saída (calculado pela eq. 4.9);

$\Delta w_{2jk}(t-1)$  é a variação anterior (instante  $t-1$ ) do peso do neurônio  $j$  da camada oculta que está conectado ao neurônio  $k$  da camada de saída .

$h_j$  é o valor da função de ativação aplicada ao neurônio  $j$  da camada oculta.

10. Ajusta-se os pesos entre a camada de entrada e a camada oculta, usando-se a eq. 4.12:

$$\Delta w_{1ij}(t) = \eta * \Delta \text{Erro}_{hj} * x_i + \text{Momento} * \Delta w_{1ij}(t-1) \quad (4.12)$$

para:  $i = 1, \dots, A$  e  $j = 1, \dots, B$

onde:

$\eta$  e momento foram definidos na eq. 4.11;

$\Delta w_{1ij}(t)$  é a variação do peso do neurônio  $i$  da camada de entrada que está conectado ao neurônio  $j$  da camada oculta, no instante  $t$ ;

$\Delta \text{Erro}_{hj}$  é o gradiente do erro do neurônio  $j$  da camada oculta (calculado pela eq. 4.10);

$\Delta w_{1ij}(t-1)$  é a variação anterior (instante  $t-1$ ) do peso do neurônio  $i$  da camada de entrada que está conectado ao neurônio  $j$  da camada oculta.

$x_i$  é o valor da função de ativação aplicada ao neurônio  $i$  da camada de entrada.

11. Calcula-se o novo peso da entrada do neurônio, de acordo com a eq. 4.13:

$$w_{1ij}(t) = w_{1ij}(t-1) + \Delta w_{1ij}(t) \quad (4.13)$$

onde:

$w_{1ij}(t)$  é o novo valor do peso do neurônio  $i$  da camada de entrada conectado ao neurônio  $j$  da camada oculta;  $w_{1ij}(t-1)$  é o peso do neurônio  $i$  da camada de entrada conectado ao neurônio  $j$  da camada oculta no instante  $(t-1)$ ;  $\Delta w_{1ij}(t)$  é o valor da variação que o peso do neurônio  $i$  da camada de entrada conectado ao neurônio  $j$  da camada oculta deve sofrer.

12. Calcula-se os novos pesos que conectam os neurônios da camada oculta com a camada de saída, de acordo com a eq. 4.14:

$$w_{2jk}(t) = w_{2jk}(t-1) + \Delta w_{2jk}(t) \quad (4.14)$$

onde:

$w_{2jk}(t)$  é o novo valor do peso do neurônio  $j$  da camada oculta conectado ao neurônio  $k$  da camada de saída;  $w_{2jk}(t-1)$  é o peso do neurônio  $j$  da camada oculta conectado ao neurônio  $k$  da camada de saída no instante  $(t-1)$ ;  $\Delta w_{2jk}(t)$  é o valor da variação que o peso do neurônio  $j$  da camada oculta conectado ao neurônio  $k$  da camada de saída deve sofrer.

13. Vai-se para a etapa 4 até apresentar-se todos os pares de vetores  $x_i, y_k$ . Neste instante, uma época terá sido completada. O algoritmo é encerrado quando se atinge um número de épocas estipulado ou um erro estipulado para os neurônios da camada de saída, de todos os padrões apresentados.

O número de neurônios do nível de entrada é dependente das variáveis a serem reconhecidas e os de saída do número de padrões do problema. Já o número de neurônios do nível intermediário, assim como o número de níveis intermediários têm de ser estabelecidos de uma maneira intuitiva, não havendo uma técnica precisa para a estimativa destes dados (Caudill, 1990). Isto se deve ao fato que neste modelo há uma generalização do conhecimento; agora não existe mais um neurônio encarregado de aprender especificamente um padrão, e desta forma, o número de neurônios não pode ser estabelecido de forma exata. Se o nível intermediário tiver um pequeno número de neurônios, a rede pode não ter capacidade de memorização para todos os padrões e, se o nível intermediário tiver muitos neurônios, pode ocorrer o efeito de especialização extrema (*grandmothering* ou *overfitting*), ou seja, a criação de neurônios especializados para reconhecer cada padrão.

Uma das principais características das redes neurais artificiais é a generalização de conhecimentos, ou seja, quando apresenta-se à rede neural artificial entradas novas, isto é, entradas que não fizeram parte do conjunto de exemplos usados durante o seu treinamento, esta mesmo assim é capaz de dar respostas corretas para estas entradas. Em outras palavras, a rede usando como base os conhecimentos adquiridos dos exemplos apresentados, pode presumir a resposta correta para as novas entradas. A generalização pode ser considerada como um método de aproximação (interpolação) de uma função a partir de amostras (exemplos), mas não se deve assumir que todas as redes são capazes de extrapolar seus conhecimentos para casos completamente desconhecidos.

#### 4.4. TREINAMENTO DA RNA COM RETROPROPAGAÇÃO

A adaptação dos pesos visa garantir que a saída da rede se comporte exatamente como a saída desejada indicada juntamente com os exemplos fornecidos para a aprendizagem de uma tarefa. Desta forma o comportamento da rede imita o comportamento apresentado pelo sistema estudado, e que é representado através de exemplos. Uma rede é capaz de aprender a:

- reproduzir um comportamento;
- classificar dados (informações, imagens, etc);
- aproximar e reproduzir funções;
- realizar previsões do "futuro" baseada nas suas experiências "passadas".

Uma vez encerrada a fase de aprendizado, ou até mesmo durante a realização deste, é realizada usualmente uma etapa de testes que permite medir o grau de generalização da rede. Existem métodos que decidem o bom momento de parar a aprendizagem; eles são baseados na evolução da curva de resposta sobre o conjunto de teste.

#### 4.5. DEFICIÊNCIAS DO ALGORITMO DE RETROPROPAGAÇÃO

Mesmo com o aparente sucesso do algoritmo, existem alguns aspectos que fazem com que este não possa ser utilizado em todo o tipo de aplicações. O maior problema é o longo processo de treinamento. Ele pode também resultar em taxas de sucesso do aprendizado e de generalização ruins, pois não há garantias de que os mínimos globais de erro sejam encontrados (ver fig.4.3). Em outras palavras, algumas vezes, dependendo dos pesos iniciais, da curva de aprendizado e dos dados de entrada, a rede neural artificial pode até não aprender.

Vários algoritmos avançados baseados em retropropagação otimizaram e aprimoraram o processo de treinamento, mas as falhas no aprendizado ainda ocorrem, e normalmente tem duas fontes: a paralisação da rede e os mínimos locais.

##### **Paralisação da rede**

Durante o treinamento da rede os pesos podem ser ajustados para valores muito altos. As entradas ou saídas da camada oculta podem alcançar valores muito altos (positivos ou negativos), e em decorrência da função sigmóide a rede vai ter um valor de ativação muito próximo de zero ou de um, conseqüentemente, o processo de treinamento pode virtualmente ficar paralisado. Isto ocorre porque um neurônio que aprendeu alguma coisa (saída com valor elevado) tende a se acomodar e não mudar seus pesos.

Esta “acomodação” da rede é proposital; sua função é evitar que os neurônios fiquem mudando os seus pesos a todo o momento. A rede nunca se estabilizaria, não haveria convergência, pois ao apresentar um novo exemplo a rede sobreporia a aprendizagem do exemplo anterior.

A implementação desta “acomodação” é feita pela função sigmoidal. Na inicialização da rede os neurônios têm pesos baixos bem próximos a zero (por ex.  $\pm 0.1$ ), com isto a saída da função de transferência, eq. 4.1, fica em torno de 0 (nem -1 nem +1), e a derivada da função sigmóide (usada no cálculo do erro – eq. 4.7) tem seu valor mais alto (tendendo a +1), resultando em uma “grande” modificação dos pesos (depende também da velocidade de aprendizado).

Quando o valor dos pesos (somatório) chega a um valor alto (por ex.  $\pm 10$ ), a função de transferência gera saídas próximas de  $\pm 1$ , e a derivada da sigmoidal gera valores baixos (tendendo a 0), diminuindo assim o ritmo de alteração dos pesos. Com efeito, o neurônio fica menos suscetível ao aprendizado.

### Mínimos locais

A superfície de erro de uma rede complexa é cheia de picos e depressões, como mostra a figura 4.3. A rede pode se concentrar em uma depressão mínima local, deixando de se concentrar em uma depressão próxima muito mais profunda, onde o erro final seria mais reduzido. Existem alguns métodos para tentar fugir deste problema e alguns deles serão comentados a seguir.

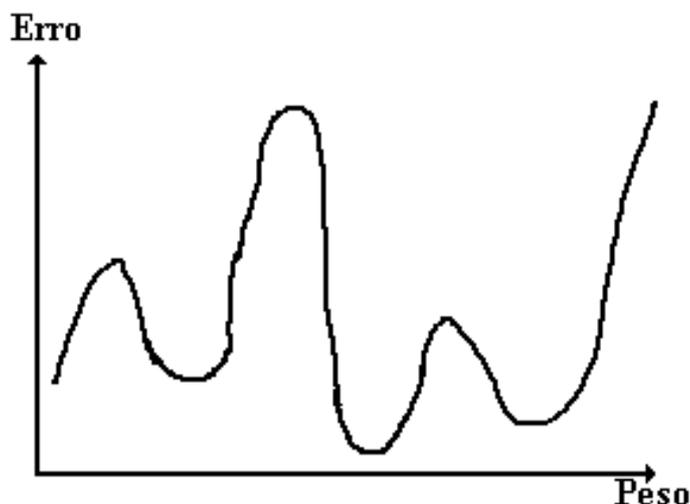


Figura 4.3. Superfície de erro de uma RNA.

## 4.6. CORREÇÕES DAS DEFICIÊNCIAS DO ALGORITMO DE RETROPROPAGAÇÃO

### Momento (momentum)

O *momento* é uma técnica que tenta escapar dos mínimos locais pela inércia da alteração dos pesos na direção do mínimo mais global, baseada na etapa anterior de correção dos pesos, permitindo usar-se velocidades de aprendizado maiores, sem, no entanto correr-se o risco do algoritmo ignorar o mínimo global (ver eqs. 4.11 e 4.12).

### Enfraquecimento do peso (Weight decay)

Este método tenta impedir que os pesos tenham valores muito altos pela atenuação dos valores obtidos no cálculo dos erros em função dos valores dos próprios pesos. O enfraquecimento do peso (*weight decay*) soma um termo de penalidade à função de erro, e esta penalidade é obtida pela eq. 4.15:

$$\text{Penalidade} = \sum (P_i^2) * c \quad (4.15)$$

onde:

$\sum (P_i^2)$  é o somatório dos pesos ao quadrado;

$c$  é a constante de enfraquecimento (*decay*);

## Temperatura

A *temperatura* (também denominada de *ganho*) é caracterizada pelo uso de um parâmetro adicional junto à função da sigmóide, que assim vai ter definida mais precisamente a inclinação da curva (afetando a derivada desta e a velocidade de correção dos pesos). A idéia do uso da *temperatura* consiste em alterar progressivamente o valor deste parâmetro durante o aprendizado, de maneira a lentamente ir estabilizando a rede (fazendo ajustes menores dos pesos). A eq. 4.16 representa a função sigmóide com o uso da temperatura:

$$F(x) = \frac{2}{1 + e^{(-2SPOND * T)}} - 1 \quad (4.16)$$

onde:

T é o valor da “temperatura”. A equação 4.16 é a mesma equação 4.1 da sigmóide (função de transferência) colocando-se um parâmetro T (temperatura) que multiplica o valor SPOND.

## 4.7. OUTRAS DEFICIÊNCIAS DO ALGORITMO DE RETROPROPAGAÇÃO

### Tamanho e topologia da rede

Este problema é de difícil solução porque ele depende diretamente da aplicação e utilização da rede, não existindo uma regra para determinar uma boa topologia de rede. A topologia depende do treinamento, da quantidade de ruído e da complexidade do que a rede está tentando aprender.

Existem problemas em que é utilizado apenas um neurônio de entrada e um de saída, mas que requerem milhares de neurônios no nível intermediário, e ainda problemas com milhares de neurônios de entradas e saídas, que requerem apenas um neurônio no nível intermediário, ou até mesmo nenhum.

Atualmente este é um dos problemas mais estudados na área das redes neurais: como determinar o tamanho ideal de uma rede, assim como as conexões entre seus elementos. Vários trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de criar redes que possam modificar as suas estruturas durante a fase de aprendizado (Fahlman e Lebiere, 1990, Fiesler, 1994 e Balakrishnan e Honavar, 1995), possibilitando que estas possam achar automaticamente uma boa configuração.

### Inicialização aleatória dos pesos

A inicialização dos pesos da rede é importante, porque dependendo dos valores da inicialização a rede pode até não conseguir aprender, porque atingiria mínimos locais em vez de mínimos globais. Como não há uma maneira de se saber quais são os pesos ideais para cada entrada dos neurônios, normalmente se opta por inicializá-los aleatoriamente. Claro que isto não

resolve o problema, e muitas vezes pode ser necessário iniciar o treinamento novamente, com outros pesos.

### **Parâmetros de aprendizagem**

Outro problema é a estimativa dos parâmetros de aprendizagem (velocidade de convergência, momento e etc). Estes parâmetros influenciam tanto a velocidade de aprendizado, quanto à própria capacidade de aprendizado da rede. A maior parte destes parâmetros é determinada na prática, ou seja, usam-se valores iniciais padrão, e depois vai se alterando estes parâmetros empiricamente.

### **Quando parar o treinamento**

Descobrir o momento em que o treinamento deve parar, também é um problema sério. Como determinar que a rede já aprendeu o suficiente sobre os padrões de treinamento? Como medir a capacidade de generalização da rede?

Também é possível usar a regra de treinar a rede um número de vezes equivalente ao número de possibilidades de casos do treinamento, mas este método possui uma complexidade demasiadamente grande. Outro método é a técnica chamada de *early stopping*, que consiste no seguinte:

- dividir os dados disponíveis para treinamento em dois grupos, o de treinamento e o de validação;

- usar um grande número de neurônios na camada intermediária;
- usar pesos iniciais randômicos muito pequenos;
- usar uma baixa taxa de aprendizado;
- calcular periodicamente a taxa de erro de validação durante o treinamento;
- parar o treinamento quando a taxa de erro de validação começar a crescer.

As vantagens deste método são as seguintes:

- é rápido;
- ele pode ser aplicado com sucesso a redes em que o número de pesos seja bem maior que o número de exemplos;

- requer apenas uma parametrização do usuário, que é qual a proporção entre os casos de treinamento e de validação.

As desvantagens são:

- Quantos casos usar para os grupos de validação e treinamento;
- Que sistemática deve ser usada para separar os dados nos dois grupos;
- Só sabe-se que o erro de validação está aumentando após ter-se passado do ponto ótimo de generalização.

#### 4.8. REDES NEURAIAS PROPOSTAS

Foram selecionadas para estudo 5 espécies de microalgas aquáticas (*Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, *Fibrocapsa japonica*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*) de um total de aproximadamente 1000 espécies identificadas no ambiente marinho no RS [Seeliger et al.,1998].

Foram testados 2 modos de identificação das espécies dos microorganismos estudados.

No 1º modo- REDE IMAGEM - utilizou-se imagens padrão RGB de 32x32 pixels de amostras de microalgas de cada espécie convertendo-as em matrizes de mesmo tamanho com valores discretos de 0 a 255 (Thompson e Shure, 1995), que caracterizam o nível de intensidade dos pixels das imagens.

No 2º modo -REDE GEOMETRIA - utilizou-se 8 variáveis que caracterizam a geometria das microalgas, a saber: área, perímetro, eixo maior, eixo menor, diâmetro de Feret, compactação, esfericidade e alongação.

No 1º modo utilizou-se uma rede contendo 1024 neurônios de entrada, um para cada pixel da imagem e no 2º modo a rede continha 8 neurônios de entrada, um para cada variável geométrica. Na camada intermediária foram usados 16 neurônios na REDE GEOMETRIA e 64 na REDE IMAGEM. Nas 2 redes foram usados 5 neurônios de saída indicando as 5 espécies, com valores +1 (corresponde à espécie) ou -1 (não corresponde à espécie).

O método de treinamento utilizado foi o de *retropropagação com momento*, descrito nas seções 4.2 a 4.7.

Os dados geométricos, área, perímetro, Xmax, Xmin, alongação, esfericidade, diâmetro de Feret e compactação, foram calculados de acordo com as eqs. 3.1 a 3.4 do cap.3.

Foi usada a função *tansig* - tangente hiperbólica da função sigmóide de transferência - entre o nível de entrada e o nível intermediário e entre o nível intermediário e o nível de saída, de acordo com as seções 4.2 e 4.3.

Os valores das funções de transferência e o erro de cada neurônio foram calculados de acordo com as eqs. 4.1 a 4.14, da seção 4.3.

Foram desenvolvidos 2 programas, um para a REDE GEOMETRIA e outro para a REDE IMAGEM, de acordo com Thompson e Shure, 1995, que lêem os neurônios de entrada e de saída e acionam uma função de treinamento.

Esta função treina a rede de *retropropagação com momento*. Seus parâmetros de entrada são os vetores  $w_1, b_1, w_2, b_2$  (com valores atribuídos por uma função de inicialização, de acordo com a seção 4.3) e os vetores P, T e TP, que correspondem a:

vetor  $w_1$  = pesos de entrada dos neurônios intermediários da rede.

vetor  $w_2$  = pesos de saída dos neurônios intermediários da rede.

vetor  $b_1$  = deslocamento (*Bias*) do neurônio intermediário

vetor  $b_2$  = deslocamento (*Bias*) do neurônio de saída

vetor  $P$  = neurônios de entrada

vetor  $T$  = neurônios de saída

vetor  $TP$  = parâmetros de treinamento:

$TP(1)$  =  $n^0$  de intervalos (épocas) em que é mostrado o erro do treinamento da rede;

$TP(2)$  =  $n^0$  máximo de épocas a serem treinadas;

$TP(3)$  = meta a ser atingida da soma quadrada dos erros entre o valor desejado e o obtido dos neurônios de saída ;

$TP(4)$  = taxa de aprendizagem;

$TP(5)$  = acréscimo da taxa de aprendizagem;

$TP(6)$  = decréscimo da taxa de aprendizagem;

$TP(7)$  = momento constante;

$TP(8)$  = máxima taxa de erro.

Os parâmetros de saída da função de treinamento são os *novos* vetores  $w_1$ ,  $b_1$ ,  $w_2$ ,  $b_2$  e os vetores  $TE$  e  $TR$ .

O vetor  $TE$  corresponde ao  $n^0$  real de épocas treinadas e o vetor  $TR$  corresponde ao registro de treinamento (linhas de erros).

A função de inicialização tem como parâmetros de entrada os vetores  $P$  (neurônios de entrada),  $T$  (neurônios de saída),  $S_1$  ( $n^0$  de neurônios intermediários) e as funções de transferência aplicadas entre os níveis da rede,  $F_1$  ('*tansig*') e  $F_2$  ('*tansig*').

Os parâmetros de saída da função de inicialização são os valores iniciais de  $w_1$ ,  $b_1$ ,  $w_2$  e  $b_2$ .

A fig. 4.4 mostra a evolução do treinamento da REDE GEOMETRIA até atingir-se  $\sum(\text{erros})^2$  assumido ser  $TP(3) = 0,00002$  correspondendo a um  $n^0$  de épocas testadas de  $TE=115851$ . Os parâmetros de treinamento otimizados foram:

$TP(1)$  =  $n^0$  de intervalos (épocas) em que é mostrado o erro do treinamento da rede = 500;

$TP(2)$  =  $n^0$  máximo de épocas a serem treinadas = 500.000;

$TP(3)$  = meta a ser atingida da soma quadrada dos erros = 0,00002;

$TP(4)$  = taxa de aprendizagem = 0,01;

$TP(5)$  = acréscimo da taxa de aprendizagem = 1,05;

$TP(6)$  = decréscimo da taxa de aprendizagem = 0,7;

TP(7) = momento constante= 0,9;

TP(8) = máxima taxa de erro=1,04.

O tempo de treinamento da REDE GEOMETRIA para 25 amostras testadas foi de 10 minutos usando-se um microcomputador Pentium II, 400MHz, 128MB de memória RAM e disco rígido de 8.5 GB e MATLAB 5.1 versão estudante.

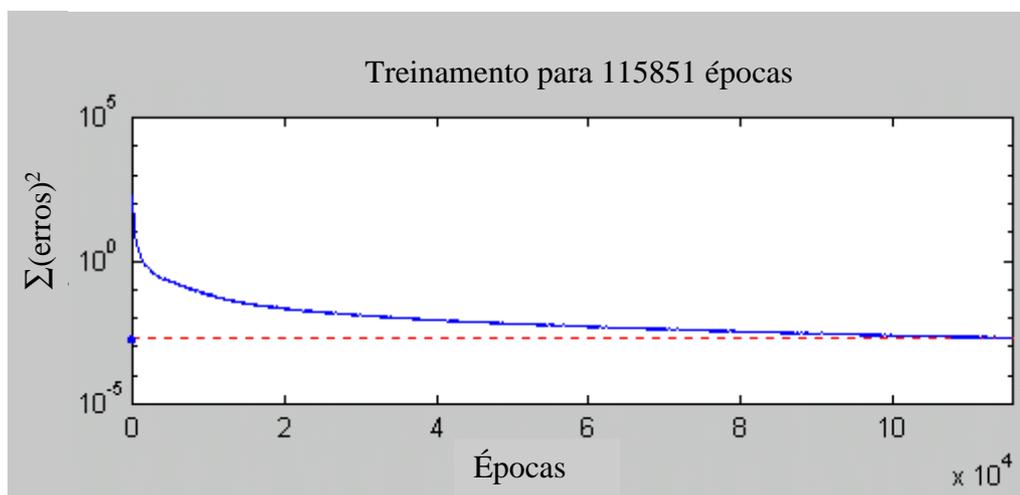


Figura 4.4 Evolução do treinamento da REDE GEOMETRIA

A fig. 4.5 mostra a evolução do treinamento da REDE IMAGEM até atingir-se  $\Sigma(\text{erros})^2$  assumido ser TP(3) = 0,00001 correspondendo a um n<sup>o</sup> de épocas testadas de TE=3264.

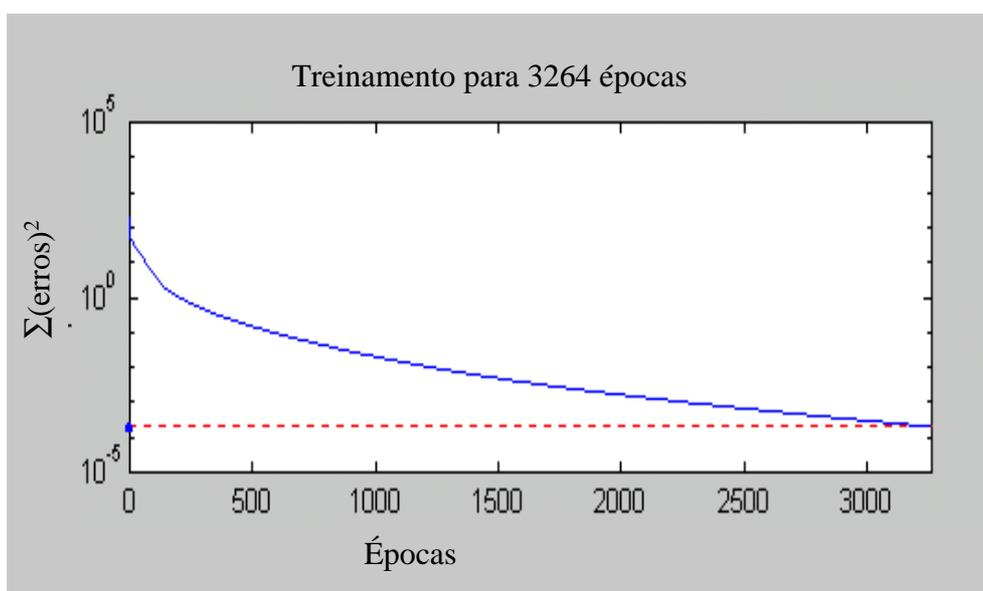


Figura 4.5 Evolução do treinamento da REDE IMAGEM

O tempo de treinamento da REDE IMAGEM para as 65 amostras testadas foi de 5 minutos. Nas duas redes, o tempo de reconhecimento das amostras testadas após a fase de treinamento é desprezível.

#### 4.9. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DAS REDES PROPOSTAS

##### ENSAIOS REDE GEOMETRIA

Para a rede geometria, executa-se uma função de simulação que chama os arquivos de pesos e deslocamentos  $w1, b1, w2, b2$  (saídas da função de treinamento da rede geometria) e o arquivo texto com os dados das 8 variáveis geométricas das amostras a serem testadas.

Como saída, obtém-se o arquivo texto com valores próximos ao intervalo entre  $-1$  e  $+1$ , conforme foi montado o arquivo dos neurônios de saída para treinamento da rede geometria.

##### ENSAIOS REDE IMAGEM

Para a rede imagem, executa-se uma função de simulação que chama os arquivos de pesos e deslocamentos  $w1, b1, w2, b2$  (saídas da função de treinamento da rede imagem) e o arquivo texto com os dados das imagens de  $32 \times 32$  pixels das amostras a serem testadas.

Como saída, obtém-se o arquivo texto com valores próximos ao intervalo entre  $-1$  e  $+1$ , conforme foi montado o arquivo dos neurônios de saída para treinamento da rede imagem.

Em ambas as redes, a condição de reconhecimento corresponde a 0% quando se obtém  $-1$  como valor de saída para a função de simulação e 100% quando a saída é  $+1$ .

## 5. DETERMINAÇÃO DOS CAMPOS DE VELOCIDADES DE MICROALGAS EM IMAGENS MICROSCÓPICAS POR PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS

O movimento das microalgas que possuem flagelos (filamentos que impulsionam a natação) é acompanhado através do processamento digital de imagens adquiridas por meio de um microscópio conectado a uma câmara de vídeo CCD, monitor e microcomputador com placa de aquisição de dados, sendo arquivadas para posterior processamento. A velocidade de cada microalga é obtida por meio de velocimetria por processamento de imagens de partículas, usando-se o método de acompanhamento das partículas (PTV). São medidas também as dimensões das microalgas e estabelecida a contagem em cada amostra. O campo completo de velocidades corresponde ao conjunto de vetores velocidades das microalgas da amostra.

Este campo dá uma visão do estado fisiológico das microalgas.

### 5.1. VISUALIZAÇÃO DAS MICROALGAS

Para a observação das imagens das microalgas, conforme fig.2.1 (cap.2), foram utilizados os seguintes equipamentos: microscópio ótico, câmara de vídeo colorida CCD com luminosidade mínima de 2 lux, 30 quadros por segundo, com resolução de 510 (H) x 492 (V) pixels acoplada a monitor de vídeo de 14 polegadas, placa de aquisição de imagens com resolução máxima de 640 x 480 pixels, microcomputador Pentium II 400 MHz, e vídeogravador digital.

A fig. 2.1 mostra o esquema do caminho ótico da luz no microscópio utilizado para aquisição das imagens das microalgas.

### 5.2. MEDIÇÃO DA VELOCIDADE DAS MICROALGAS – VELOCIMETRIA POR ACOMPANHAMENTO DE PARTÍCULAS

A velocimetria por acompanhamento de partículas (PTV) possui uma sutil diferença na forma de análise das imagens das partículas quando comparada com os sistemas de alta densidade de partículas (PIV). Ao invés de ser analisada uma sub-região com diversas partículas, esta metodologia caracteriza-se pela busca do deslocamento individual de cada partícula ao longo do tempo [Bonna et al.,1990 e Wernet, 1993 e Riethmuller, 1996].

Deste modo, a concentração das partículas deve ser muito inferior à técnica do PIV, e as partículas não podem estar agrupadas nas sub-regiões de análise mas sim serem as únicas em cada uma delas. Para se determinar o deslocamento da partícula, sua posição individual deve ser determinada em dois ou mais instantes subseqüentes e desta forma sua velocidade pode ser encontrada a partir do seu traçado.

Comparado com o sistema PIV, no sistema PTV, as partículas podem ser maiores, desde que mantenham a premissa de seguirem adequadamente o escoamento, e mais esparsas, ou seja, com menores concentrações.

### **Programa *FlowViewer*:**

Para o processamento das imagens obtidas com microscópio foi utilizado o programa *FlowViewer* desenvolvido por Gutkoski, 1999; 2001, especialmente para baixas velocidades de partículas em movimento num fluido.

O programa tem sua estrutura baseada na análise de duas imagens em seqüência de um mesmo campo de escoamento e o cálculo do deslocamento das partículas relacionadas entre estes dois campos.

As medidas de velocidade podem ser feitas de duas formas, *ON-LINE*, onde o processamento acontece ao longo do ensaio, ou seja: a cada duas imagens capturadas, vetores velocidades instantâneos são obtidos para cada microalga e os valores médios acumulados são disponibilizados na tela do computador, não havendo a necessidade de gravador intermediário, tornando o processo extremamente ágil.

Entretanto, nada impede que, com o auxílio de um gravador, haja uma posterior escolha qualitativa das imagens de captura e processamento, constituindo-se então num processo *OFF-LINE*.

O programa conta com uma estrutura básica que consiste em pré-processamento, processamento e pós-processamento.

No pré-processamento, o sistema é configurado para o tipo de equipamento, ou seja, define-se o tipo de câmara a ser utilizado, os pontos onde o brilho é excessivo e que poderia prejudicar as medidas. Estes pontos são excluídos para todas as imagens definindo-se assim um limiar de brilho (nível de cinza) para a identificação das partículas.

O processamento é a geração dos campos de vetores através de algoritmos elaborados para o acompanhamento das partículas através das imagens.

Neste método, a velocidade de cada partícula no plano de iluminação é determinada pela razão entre o deslocamento  $\Delta x$  e  $\Delta y$  da partícula registrada em vídeo e o intervalo de tempo  $\Delta t$  correspondente à sua exposição. A velocidade assim medida é uma média no tempo e no espaço. Pode-se aproximá-la da velocidade instantânea local da partícula diminuindo-se  $\Delta t$  e  $\Delta x$  para que a variação de velocidade no tempo e no espaço sejam desprezíveis.

Os deslocamentos das partículas são obtidos a partir de uma imagem contendo as partículas obtidas num determinado instante. Esta imagem é comparada com outra obtida no

tempo  $\Delta t$  seguinte. O tempo  $\Delta t$  deve permitir deslocamentos cujos módulos sejam da ordem de alguns diâmetros das partículas. O resultado será formado por um conjunto de vetores velocidade.

O pós-processamento consiste na geração de relatório indicando coordenadas de posição das partículas na imagem, componentes das velocidades médias e flutuações de velocidades.

#### ETAPAS DO PROGRAMA *FlowViewer*

O fluxograma da fig. 5.1 mostra as etapas do programa *FlowViewer*.

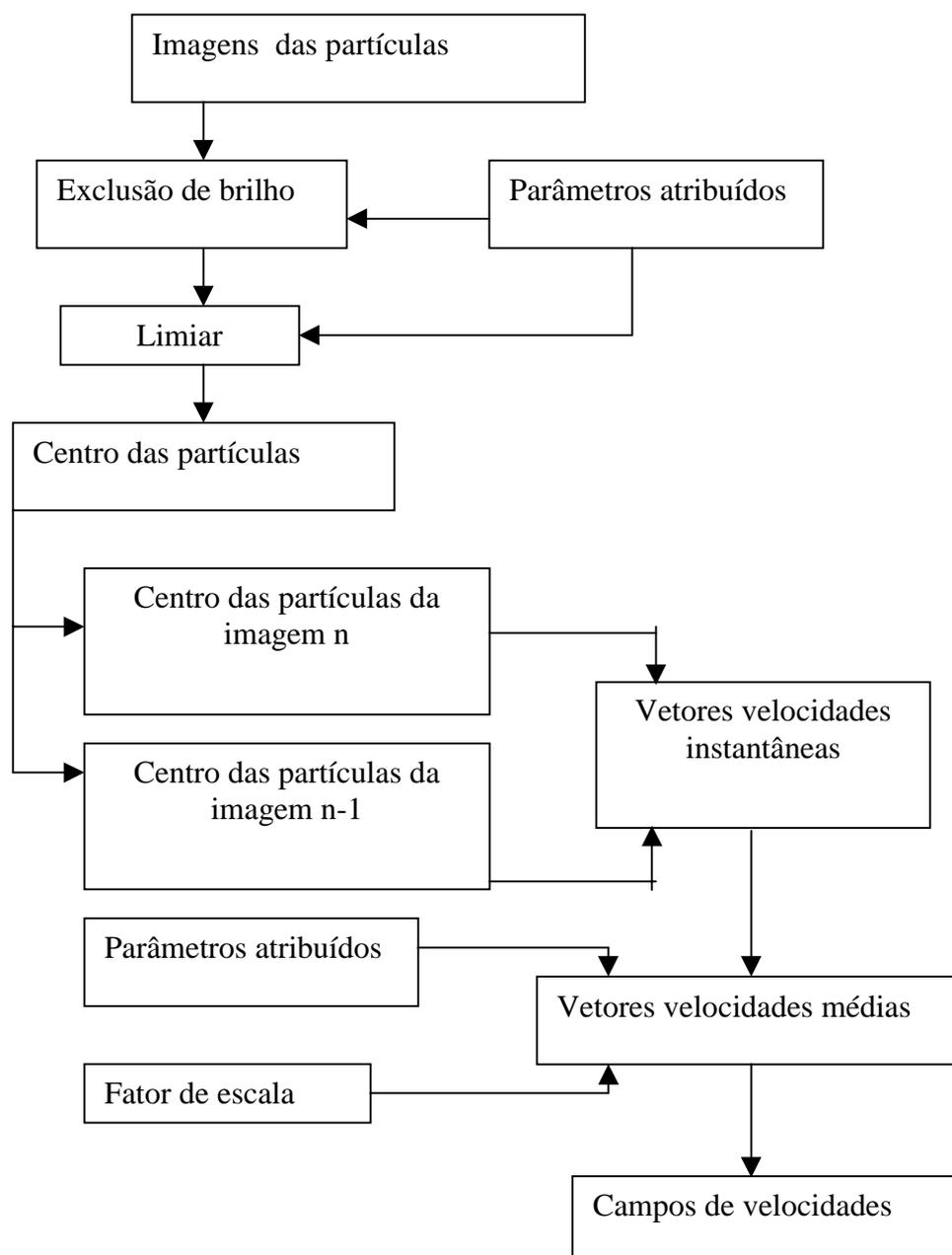


Figura 5.1 – Fluxograma das etapas do programa *FlowViewer*.

O algoritmo utilizado foi desenvolvido orientado, basicamente, pelas seguintes etapas descritas a seguir [Gutkoski, 1999; 2001]:

- a) Tratamento da imagem como matriz;
- b) Aplicação de limiar;
- c) Determinação do centro da partícula;
- d) Determinação dos vetores velocidades;
- e) Contagem e dimensão das partículas;
- f) Fator de escala das dimensões das partículas e dos vetores velocidade.

#### a) TRATAMENTO DA IMAGEM COMO MATRIZ

O formato de trabalho de uma imagem é do tipo bitmap e contém todas as informações relativas à imagem. Os algoritmos usados tratam um conjunto de pixels de uma imagem, como uma matriz bidimensional de  $n$  linhas por  $m$  colunas passando as informações obtidas para o arquivo da imagem. Usualmente são empregadas três matrizes, uma para o vermelho (*Red*), uma para o verde (*Green*) e uma para o azul (*Blue*) que correspondem a uma imagem RGB 24 bits.

No presente caso, o processamento e os algoritmos trabalham com uma matriz de imagem somente em código de cinza, que corresponde a 256 diferentes níveis de *cinza* variando do puro branco (255) ao puro preto (0).

A aquisição das imagens é feita em 24 bits devido a placa de captura utilizada. Cada 8 bits geram 256 níveis de sua respectiva cor e a combinação destas geram a cor visualizada no monitor, muito próxima do real. Para que os algoritmos possam manipular esta imagem, necessita-se repassá-lo para o código de *cinza*, o que é feito de acordo com a eq.5.1:

$$Matriz\_cinza[n,m] = \frac{(Matriz\_azul[n,m] + Matriz\_verde[n,m] + Matriz\_vermelha[n,m])}{3} \quad (5.1)$$

#### b) APLICAÇÃO DE LIMIAR

Após a captura de uma imagem, o primeiro processamento é a identificação unívoca de uma verdadeira partícula (microalga) distinguindo de outros objetos que aparecem eventualmente e que poderiam confundir o processamento. Trata-se de eliminar pontos ou áreas de brilho excessivo ocasionado pela incidência de reflexões da luz. Isto é feito identificando-se os brilhos excessivos que permanecem em imagens consecutivas ocasionados por reflexões externas, pela lâmina do microscópio, etc..... Como não se movimentam de uma imagem para outra, são relativamente fáceis de serem identificados numa imagem e caracterizados pelos respectivos pixels que os compõem, sendo assim, eliminados do processamento. Depois que o brilho excessivo foi excluído da imagem de processamento, a próxima etapa é obter a separação das partículas iluminadas do fundo.

Desta forma é aplicada na imagem uma equação de limiar, de acordo com a eq. 5.2:

$$\text{Se } M[n,m] \leq \text{limiar} \Rightarrow M[n,m] = 255 \quad (5.2)$$

$$\text{Senão } M[n,m] = 0$$

O resultado desta formulação aplicada a uma imagem, na realidade inverte o fundo dando um valor 0 (preto) para as partículas, parte mais brilhante e de interesse, e um valor 255 (branco) para as demais regiões. Com isso a imagem pode ser interpretada como “partícula” e “não partícula”.

A fig. 5.2 mostra a imagem das microalgas depois e antes da exclusão de brilho e da aplicação do limiar.

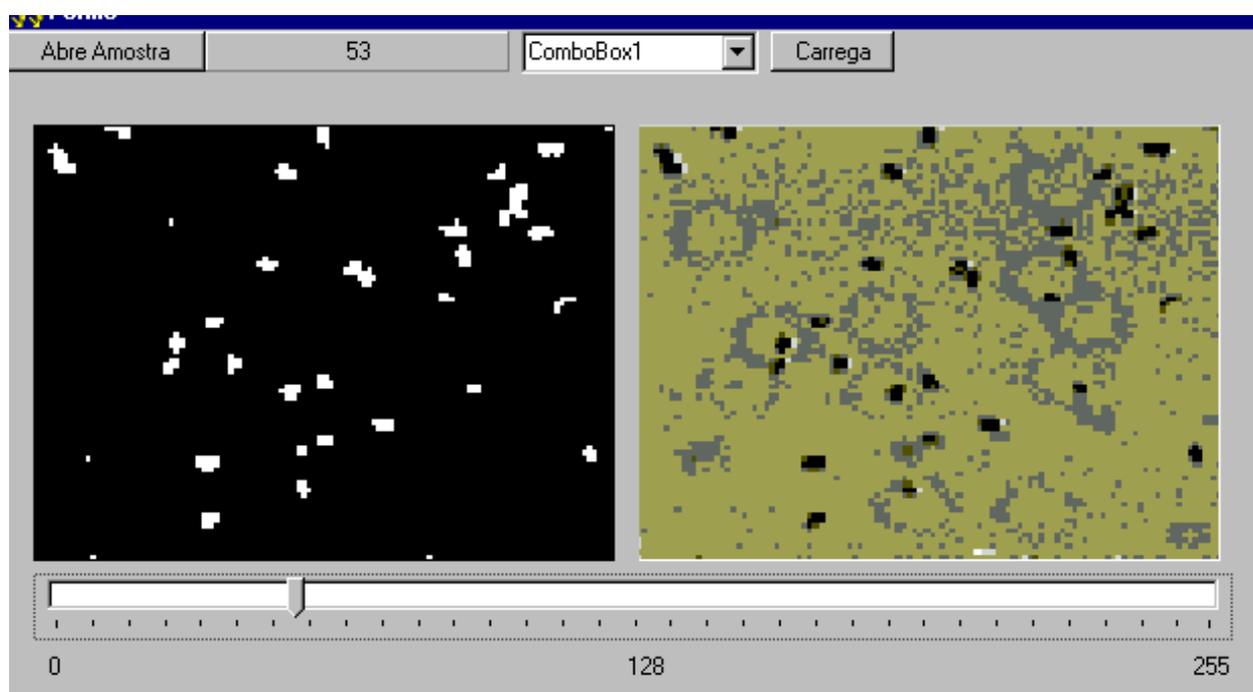


Figura 5.2 Aplicação do limiar à imagem das microalgas

### c) DETERMINAÇÃO DO CENTRO DA PARTÍCULA

Para determinar a velocidade de uma partícula, deve-se conhecer a real posição do centro de sua imagem. A determinação deste centro é feita em função da forma da imagem com que cada partícula foi adquirida. A exatidão deste método, quando usado para a medição de velocidade de partículas, está intimamente relacionada com a exata determinação do centro da partícula. A fig. 5.3, mostra uma representação gráfica de uma partícula iluminada. A partícula é mostrada em três ângulos diferentes conforme seu nível de cinza (Z) e posição espacial (X,Y).

Conhecendo-se este nível pode-se determinar o centro da partícula usando-se a média das coordenadas dos pontos com maior intensidade de cinza, que são selecionados pela região de corte comandadas pelo limiar.

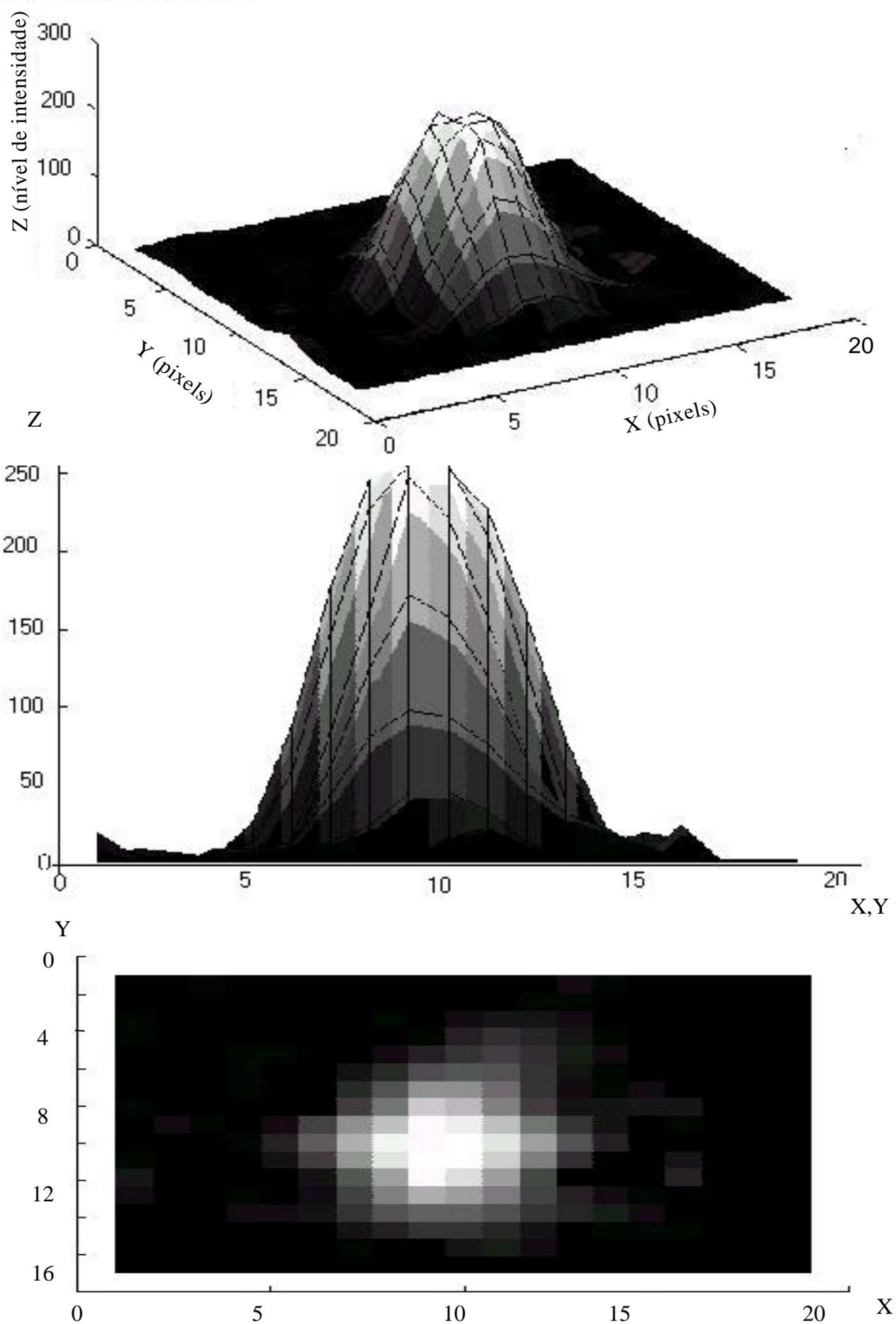


Figura 5.3 Representação gráfica de uma partícula iluminada

#### d) DETERMINAÇÃO DOS VETORES VELOCIDADES

O método de busca do traçado das partículas foi utilizado devido à instrumentação de captura de imagens disponível e a concentração de partículas (microalgas) existente na amostra. O ponto de partida deste método está na identificação de uma partícula em duas imagens subsequentes (instantes diferentes) com a finalidade de medir seu deslocamento. Levando em consideração a densidade de partículas, foi possível definir uma área de busca ( $\eta \times \epsilon$  pixels, submatriz da imagem total  $n \times m$ ) onde uma partícula será identificada na imagem atual e na subsequente. Assim, se num determinado instante  $t_1$  existir uma partícula, busca-se a sua identificação na imagem subsequente, instante  $t_2$ , numa nova região de busca aumentada de 10 pixels ou seja  $(\eta+10) \times (\epsilon+10)$  pixels. A escolha de 10 pixels é devido à movimentação das microalgas nas imagens estudadas.

A nova posição da partícula é determinada, identificando-se seus deslocamentos  $\Delta x$  e  $\Delta y$ , bem como são calculadas as componentes da sua velocidade  $u$  e  $v$  de acordo com as eqs. 5.3 e 5.4, sendo  $F_x$  e  $F_y$  fatores de escala:

$$u = F_x \frac{\Delta x}{\Delta t} \quad (5.3)$$

$$v = F_y \frac{\Delta y}{\Delta t} \quad (5.4)$$

Caso não seja encontrada a segunda imagem da mesma partícula na nova região de busca ou ainda, existir mais de uma partícula na mesma área, descarta-se a primitiva área de busca e nenhuma componente do vetor velocidade é calculada. O processo de busca continua até que toda a matriz imagem ( $n \times m$ ) seja varrida.

#### e) CONTAGEM DAS PARTÍCULAS

Determinado o centro de cada partícula, conta-se a quantidade de centros existentes no quadro total (matriz  $n \times m$ ).

#### f) FATOR DE ESCALA DAS DIMENSÕES DAS PARTÍCULAS E DOS VETORES VELOCIDADE

Para obtenção do fator de escala deve ser traçada uma linha, utilizando-se o mouse, sobre um comprimento de referência conhecido. Assim, é feita a conversão das dimensões de pixels para  $\mu\text{m}$  e dos vetores velocidade de pixels/s para  $\mu\text{m/s}$ . Tal procedimento é suscetível à resolução do mouse e do monitor de vídeo. O processo de calibração para obtenção do fator de escala em imagens observadas em microscópio está descrito no APÊNDICE I.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. APLICAÇÕES DE OPERADORES MORFOLÓGICOS À CONTAGEM E MEDIÇÃO DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS

Para monitoramento das bactérias aquáticas é feito uma contagem na amostra e um levantamento de suas grandezas geométricas.

A medição de bactérias com e sem filamentos foi feita usando-se operadores morfológicos descritos na sessão 2.3. A seqüência é apresentada nas imagens 6.1 a 6.11.

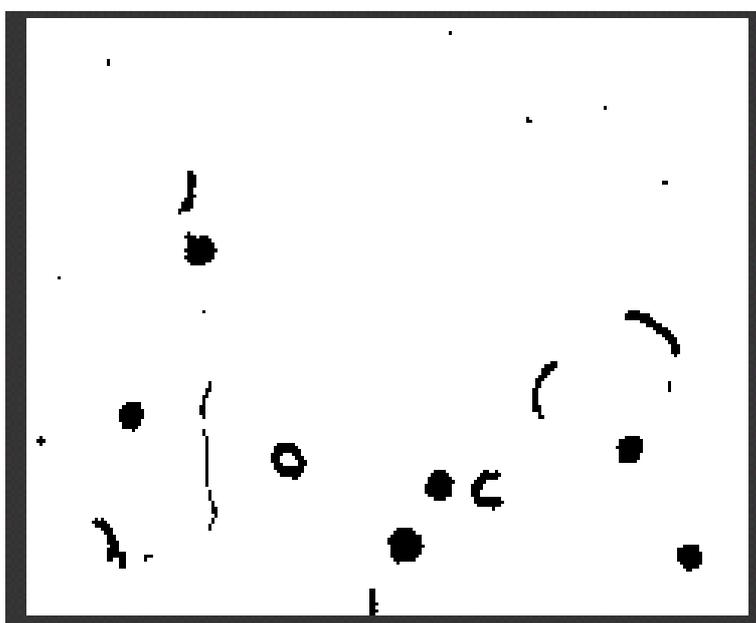


Figura 6.1 Imagem original monocromática

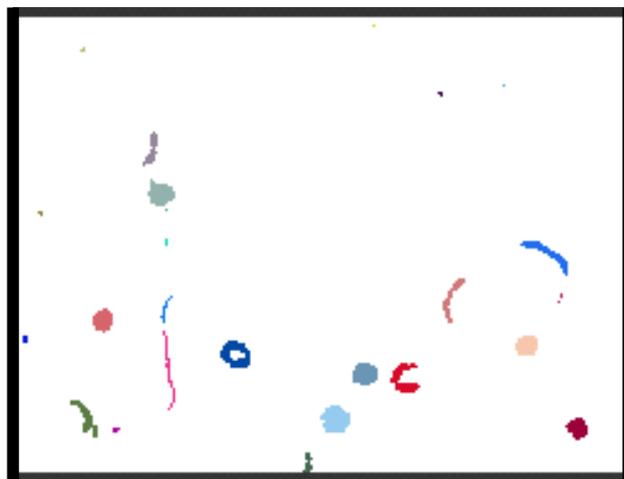


Figura 6.2 -Imagem com objetos etiquetados

Na fig. 6.2, todo pixel que pertence ao mesmo objeto recebe o mesmo número e a mesma cor.

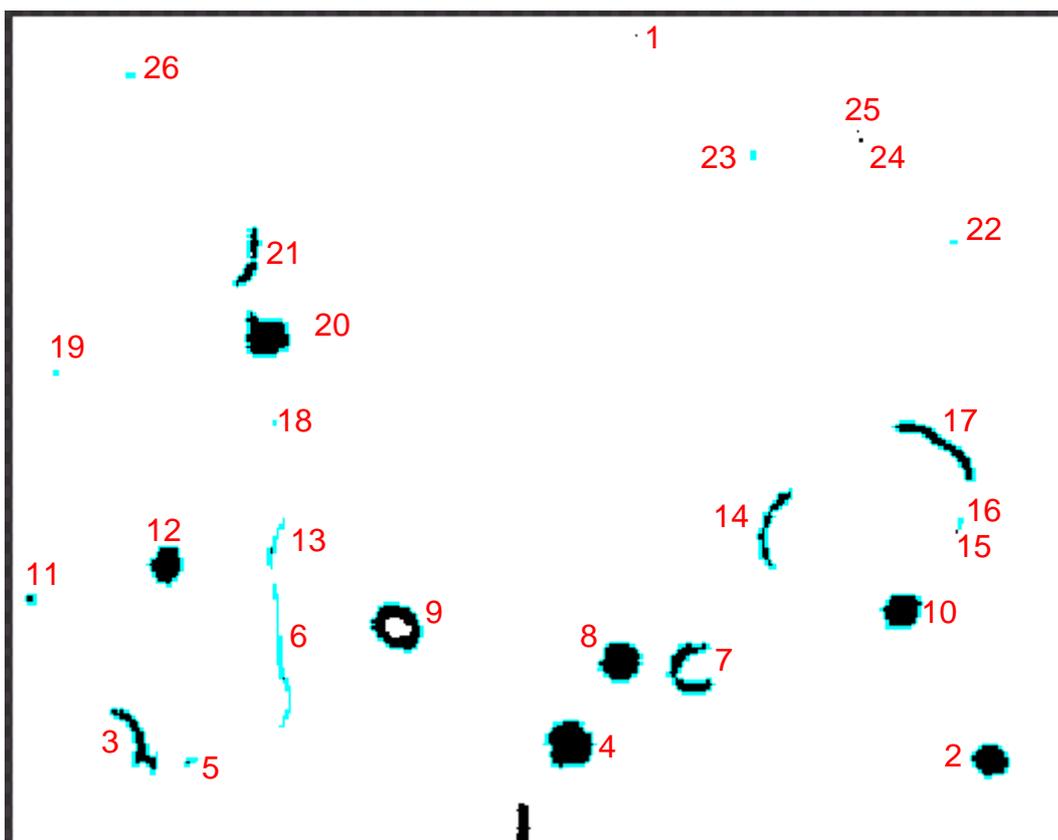


Figura 6.3 - Numeração dos objetos (26 bactérias).

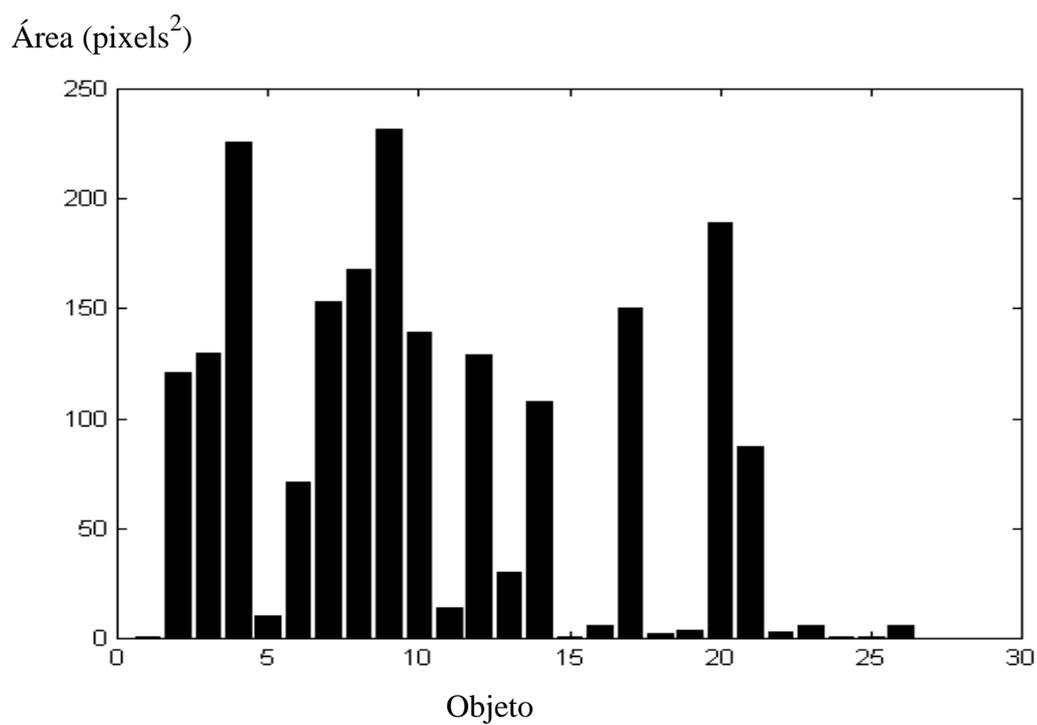


Figura 6.4 Área de cada objeto (de 1 até 26 objetos)

Perímetro  
(pixels)

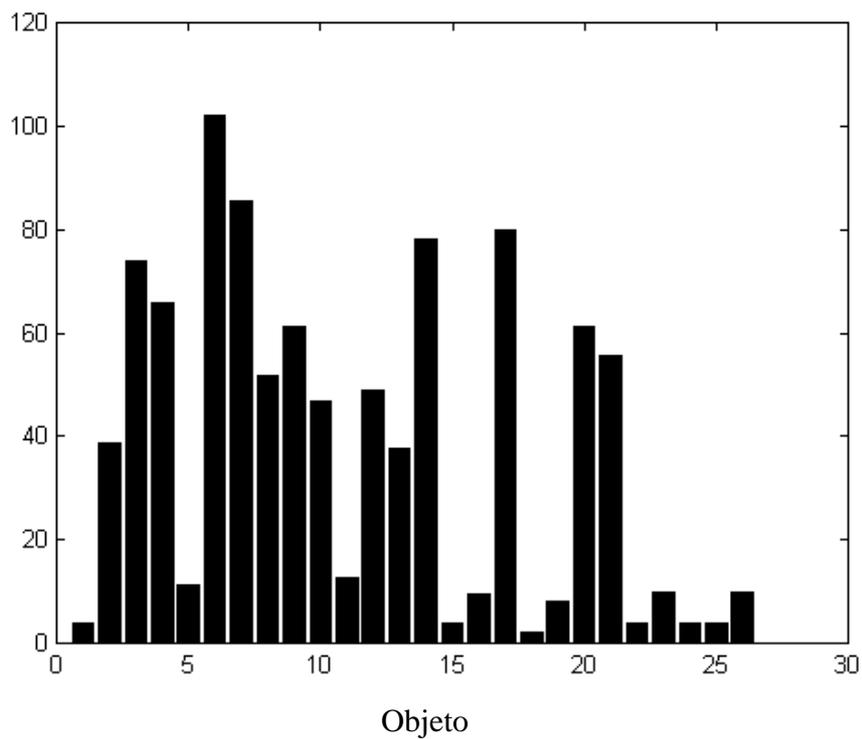


Figura 6.5 Perímetro de cada objeto (de 1 até 26 objetos)

Xmax (pixels)

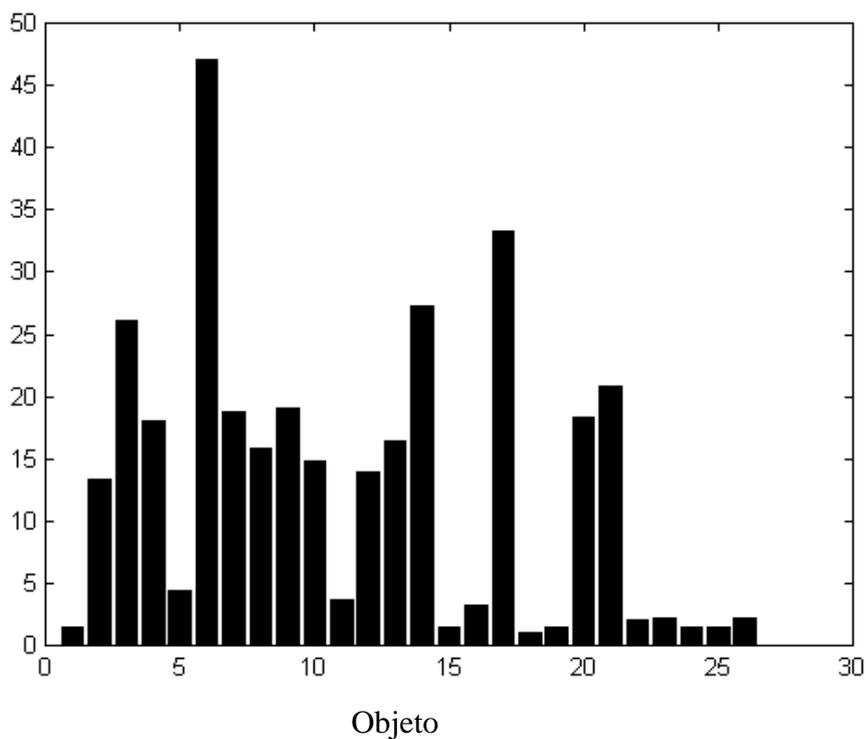


Figura 6.6 Xmax de cada objeto (de 1 até 26 objetos)

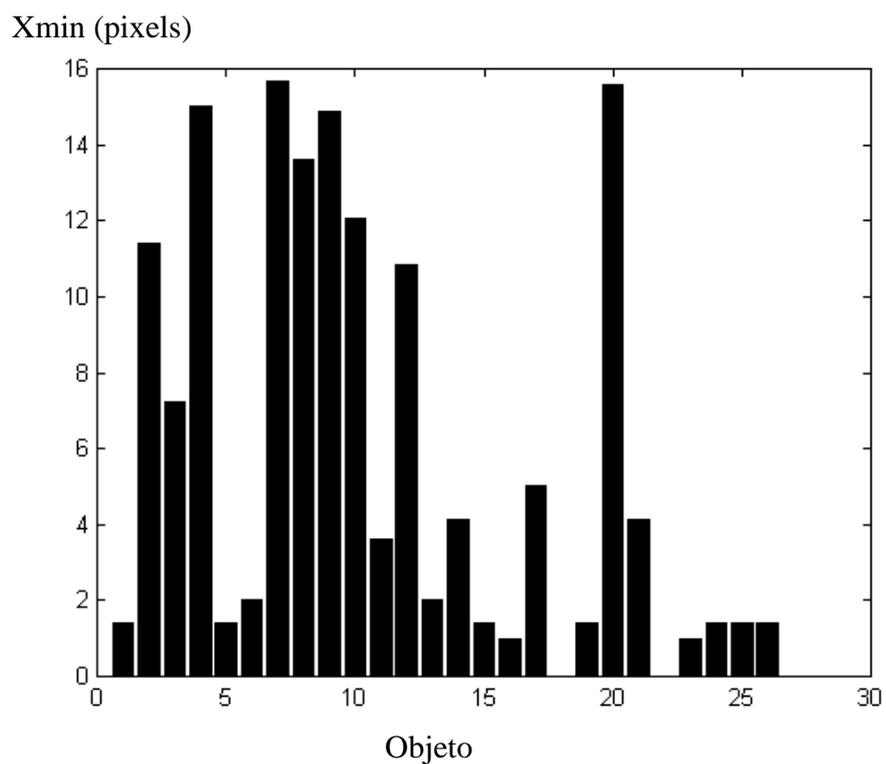


Figura 6.7 Xmin de cada objeto (de 1 até 26 objetos)

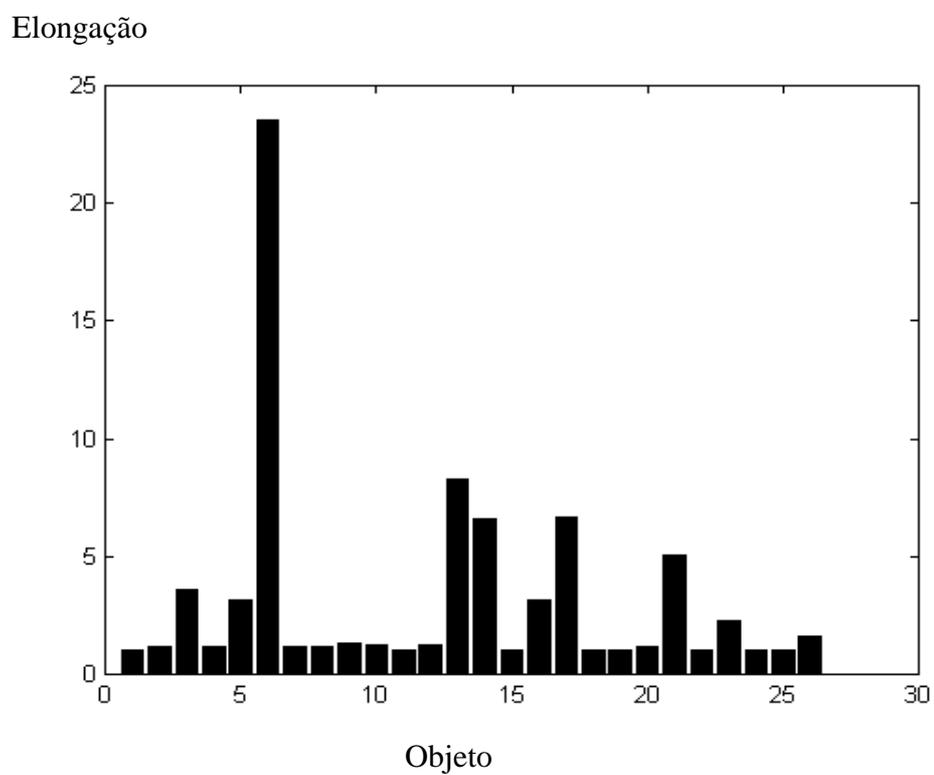


Figura 6.8 Elongação de cada objeto (de 1 até 26 objetos)

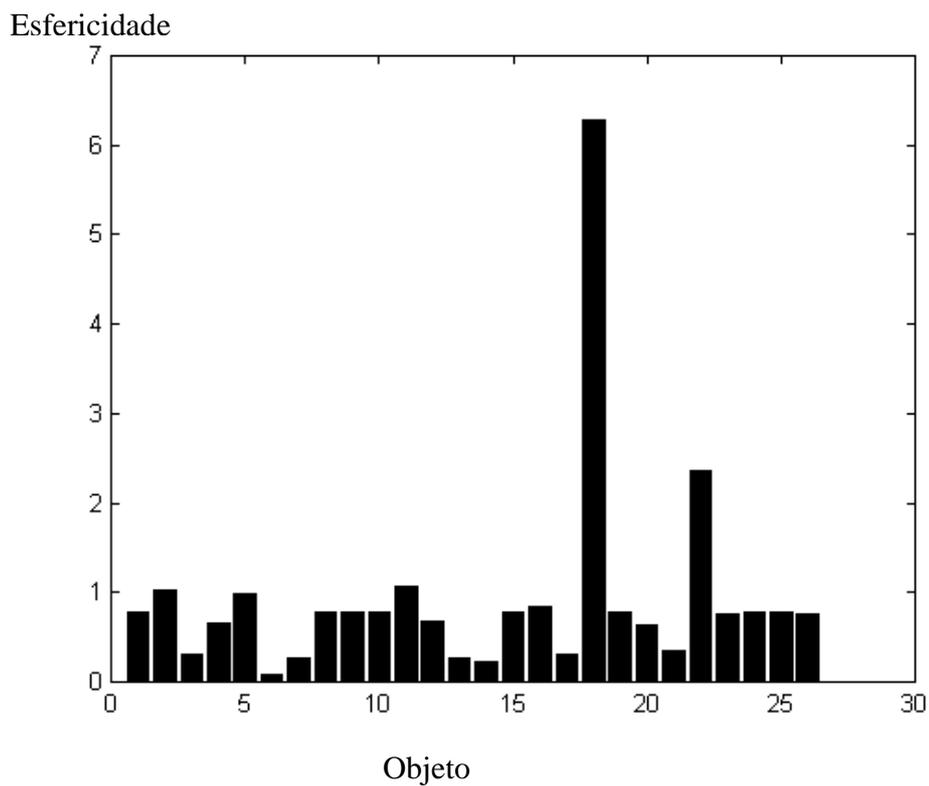


Figura 6.9 Esfericidade de cada objeto (de 1 até 26 objetos)

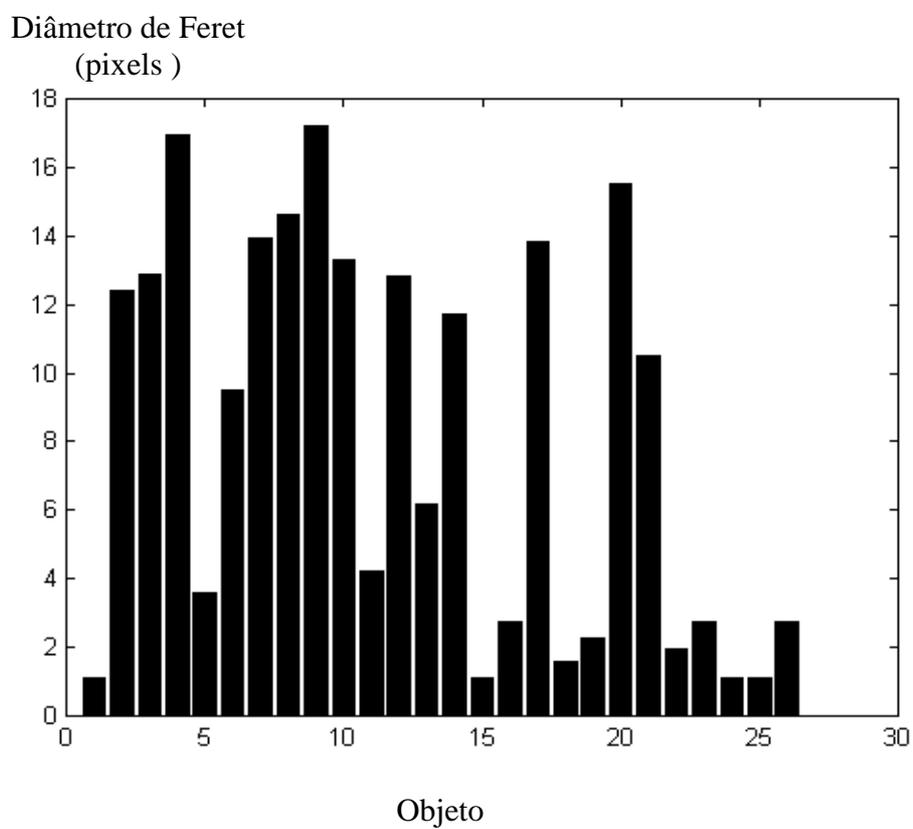


Figura 6.10 Diâmetro de Feret de cada objeto (de 1 até 26 objetos)

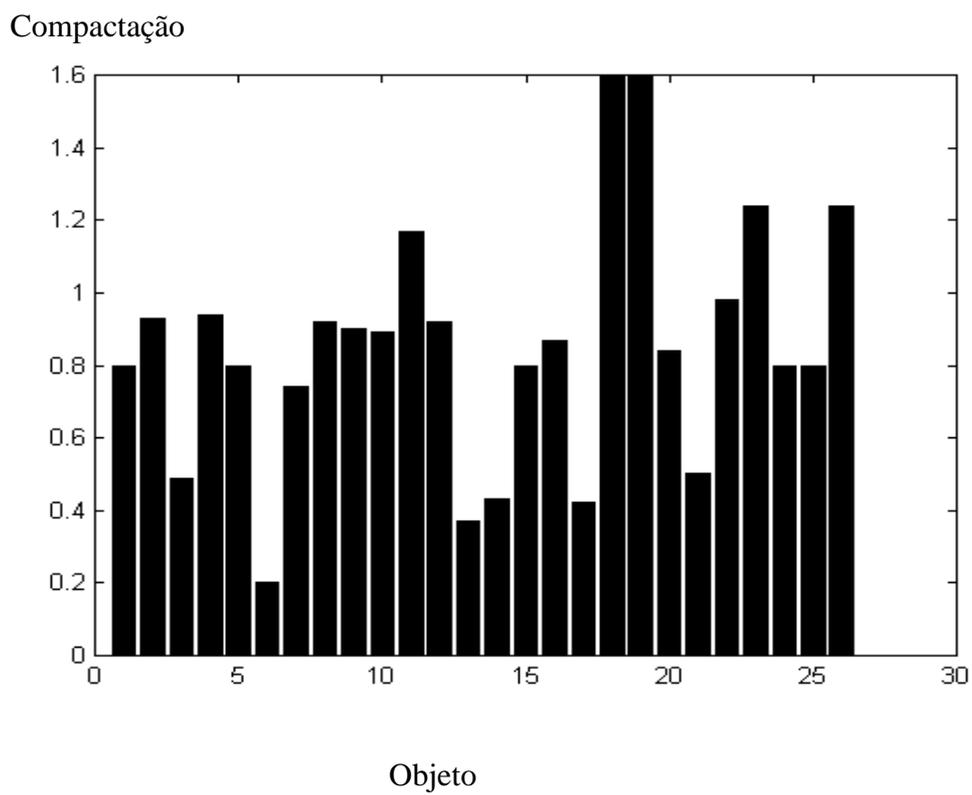


Figura 6.11 Compactação de cada objeto (de 1 até 26 objetos)

## 6.2. APLICAÇÕES DE TÉCNICAS DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES PARA CLASSIFICAÇÃO DE MICROALGAS: MÉTODOS NÃO AUTOMATIZADOS

Os métodos não automatizados para reconhecimento de padrões de microalgas se referem à caracterização das espécies por observação visual dos resultados e análise de funções densidade de probabilidade, resultando numa tabela de indicadores que permite o reconhecimento das microalgas.

A fig 6.12 apresenta amostra da microalga *Tetraselmis chuii* após a escolha do limiar, onde 15µm correspondem a 20 pixels e a fig. 6.13 apresenta imagens das 5 microalgas estudadas, *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, *Fibrocapsa japonica*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*, com aumentos de 100x, 100x, 40x, 100x e 100x, respectivamente.

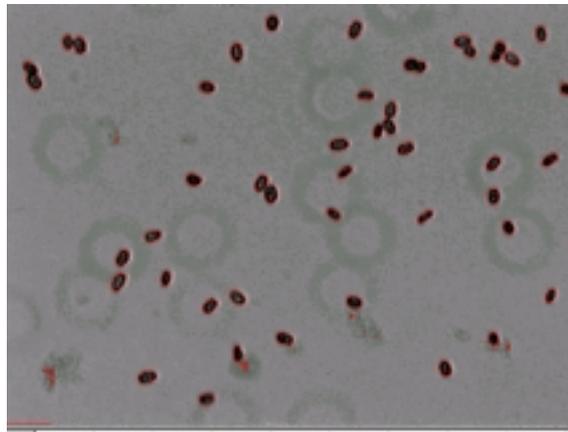


Figura 6.12 Amostra de microalgas *Tetraselmis chuii* após a escolha do limiar.

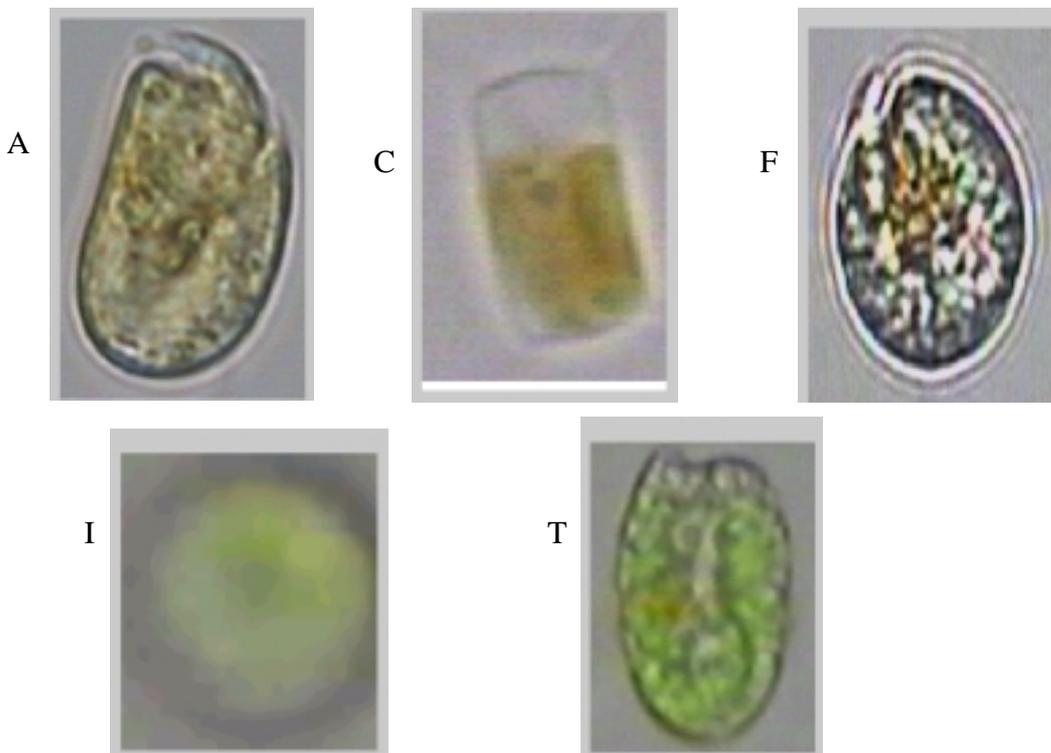
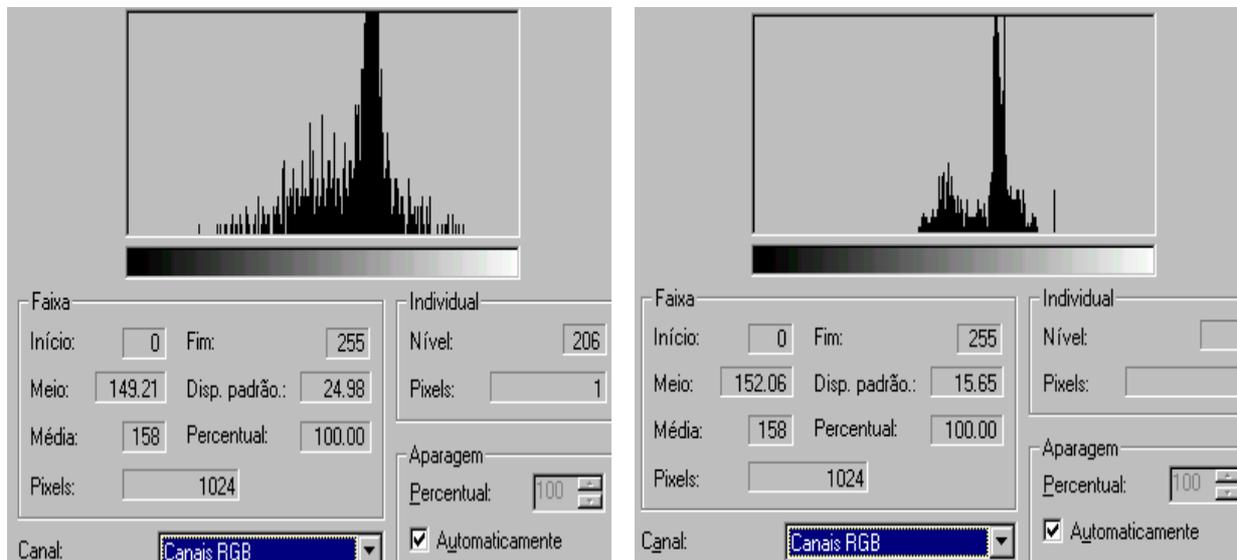


Figura 6.13 Imagens das cinco microalgas estudadas: *Amphidinium operculatum* (A), *Chaetoceros sp.* (C), *Fibrocapsa japonica* (F), *Isochrysis galbana* (I) e *Tetraselmis chuii* (T)

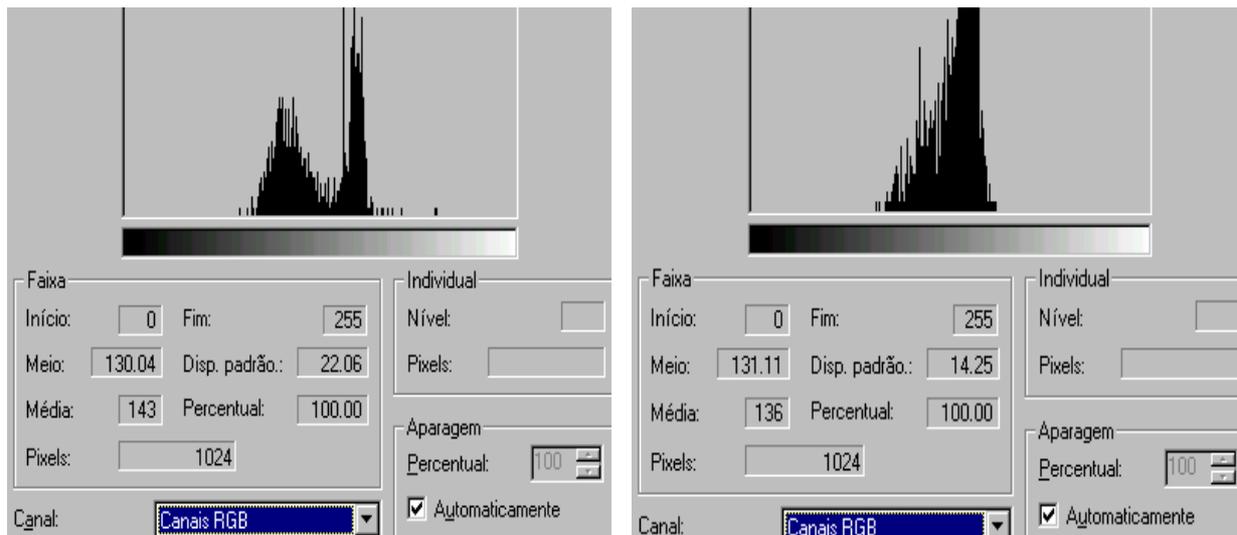
### 6.2.1. HISTOGRAMAS DA INTENSIDADE DA IMAGEM

A fig. 6.14 apresenta os histogramas padrões RGB típicos das microalgas da fig. 6.13. Para o traçado foi contornada a imagem da microalga, **sem considerar o fundo**.



a) Histograma *Amphidinium operculatum*

b) Histograma *Chaetoceros sp.*



c) Histograma *Fibrocapsa japonica*

d) Histograma *Isochrysis galbana*



e) Histograma *Tetraselmis chuii*.

Figura 6.14 Histogramas padrões RGB típicos das microalgas estudadas sem considerar o fundo.

A fig. 6.15 apresenta histogramas típicos das 5 espécies **considerando o fundo da imagem.**

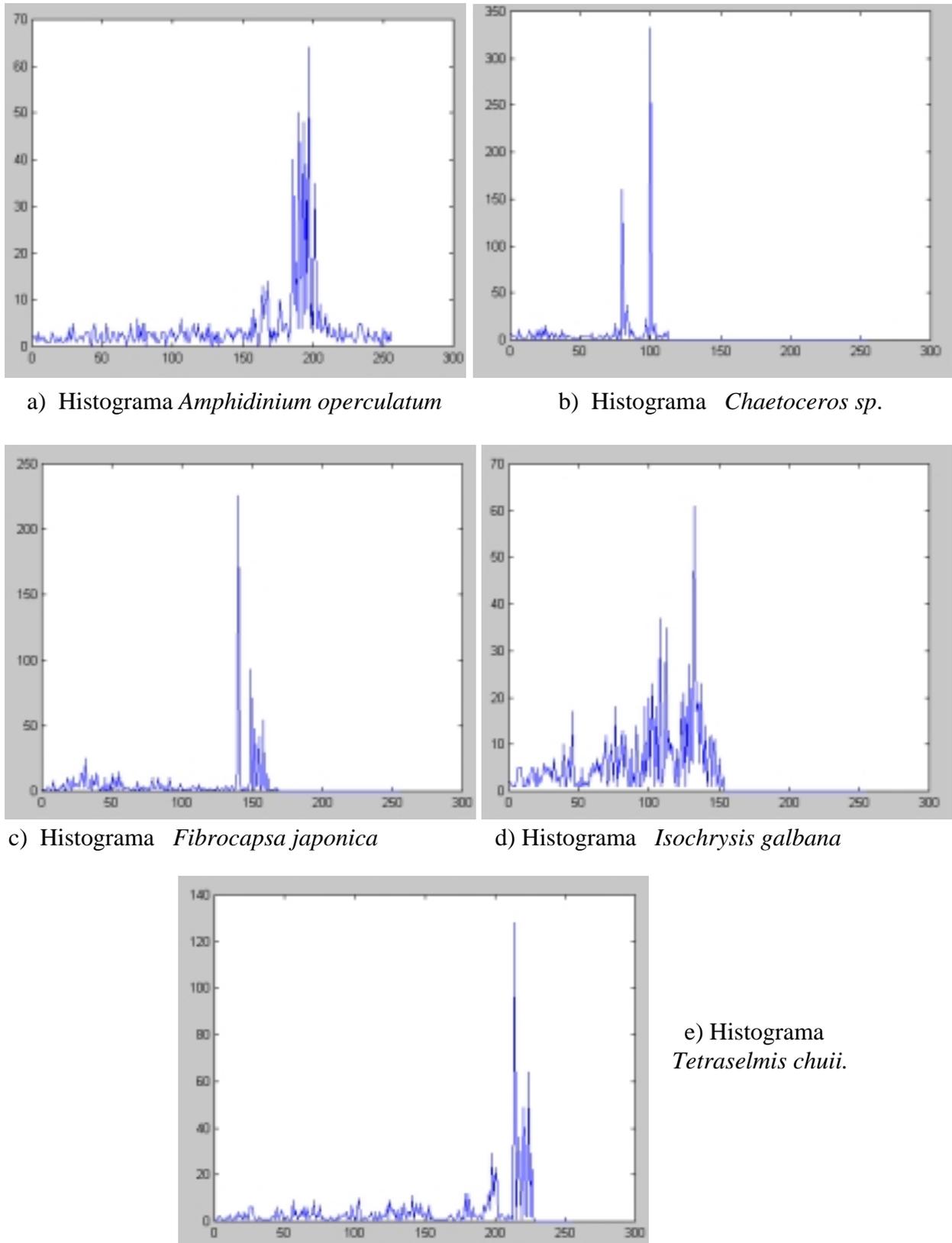
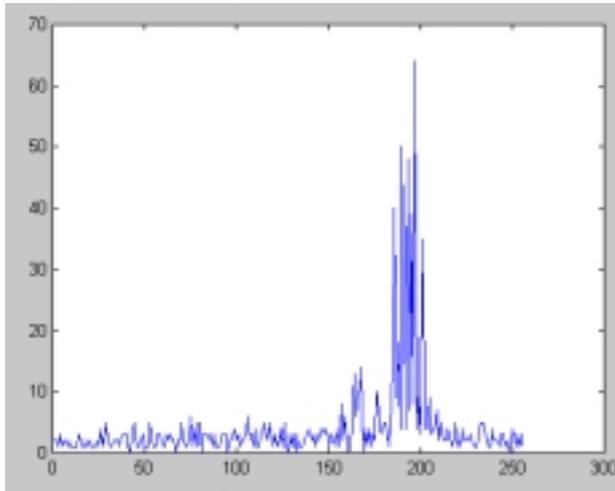
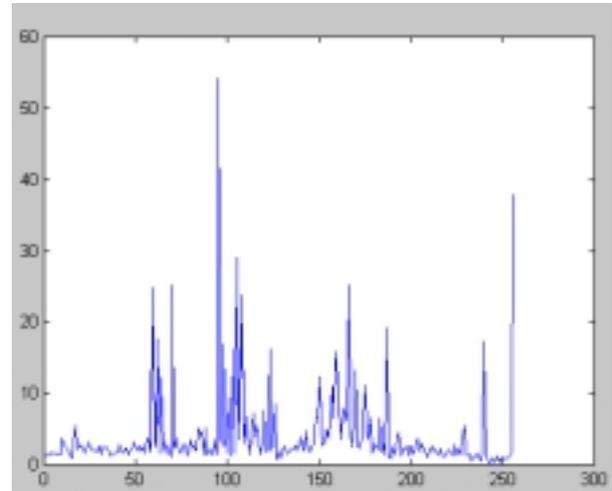


Figura 6.15 - Histogramas típicos padrões RGB das microalgas estudadas considerando o fundo da imagem.

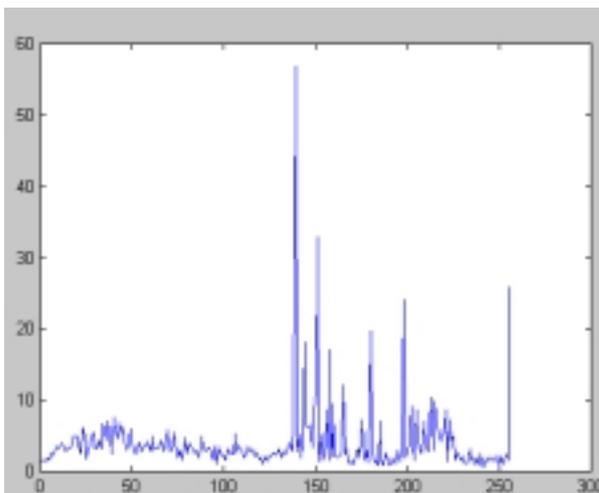
A fig. 6.16 apresenta histogramas **médios** típicos das 5 espécies, para 9 amostras de cada espécie, considerando o fundo da imagem.



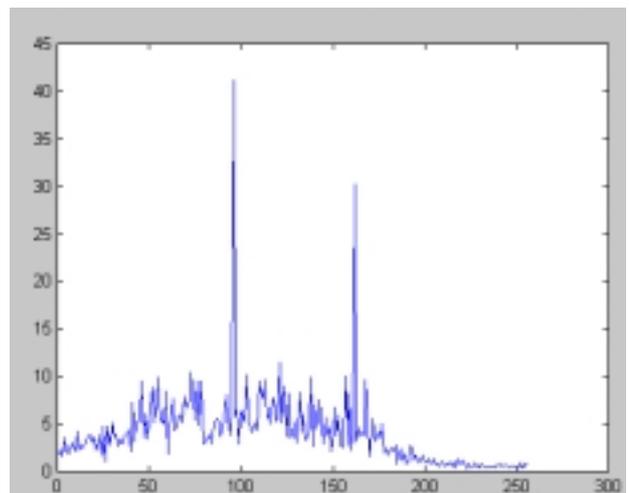
a) Histograma *Amfidinium operculatum*



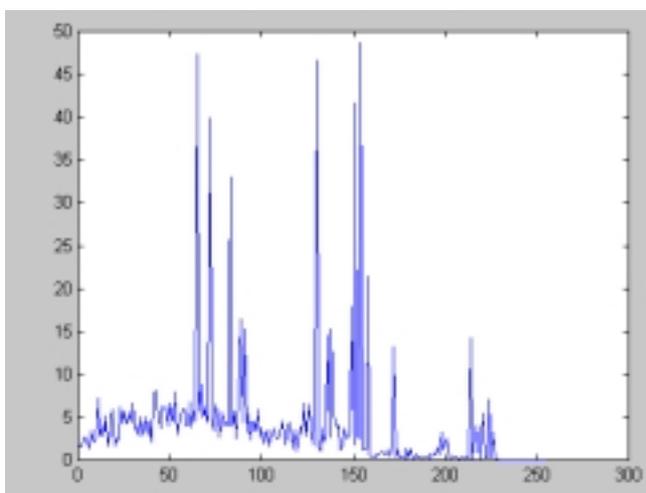
b) Histograma *Chaetoceros sp.*



c) Histograma *Fibrocapsa japonica*



d) Histograma *Isochrysis galbana*



e) Histograma *Tetraselmis chuii*.

Figura 6.16 - Histogramas padrões RGB **médios** das microalgas estudadas considerando o fundo da imagem.

A fig. 6.17 apresenta a função densidade de probabilidade normal dos histogramas das 5 espécies, para 9 amostras de cada espécie, considerando toda a imagem, **sem excluir o fundo**.

Estes são os histogramas padrões RGB típicos de um conjunto de amostras de cada espécie das 5 microalgas estudadas e representa um dos indicadores para caracterização destas microalgas.

Nesta figura e nas subseqüentes com a mesma legenda **A** = *Amphidinium operculatum*; **C** = *Chaetoceros sp.*; **F** = *Fibrocapsa japonica*; **I** = *Isochrysis galbana* e **T** = *Tetraselmis chuii*.

Para as amostras com os dados do nível de intensidade da imagem foi testado o tipo de função densidade de probabilidade de acordo com a eq. 3.12 seção 3.5, verificando-se que a distribuição é normal.

Conforme este teste, também é normal a distribuição das variáveis Área, Perímetro, Xmin, Elongação, Dferet, Esfericidade, Xmax, Compactação,  $p(\theta,t)$  e FFT apresentadas sequencialmente neste capítulo.

fdp (nível de intensidade)

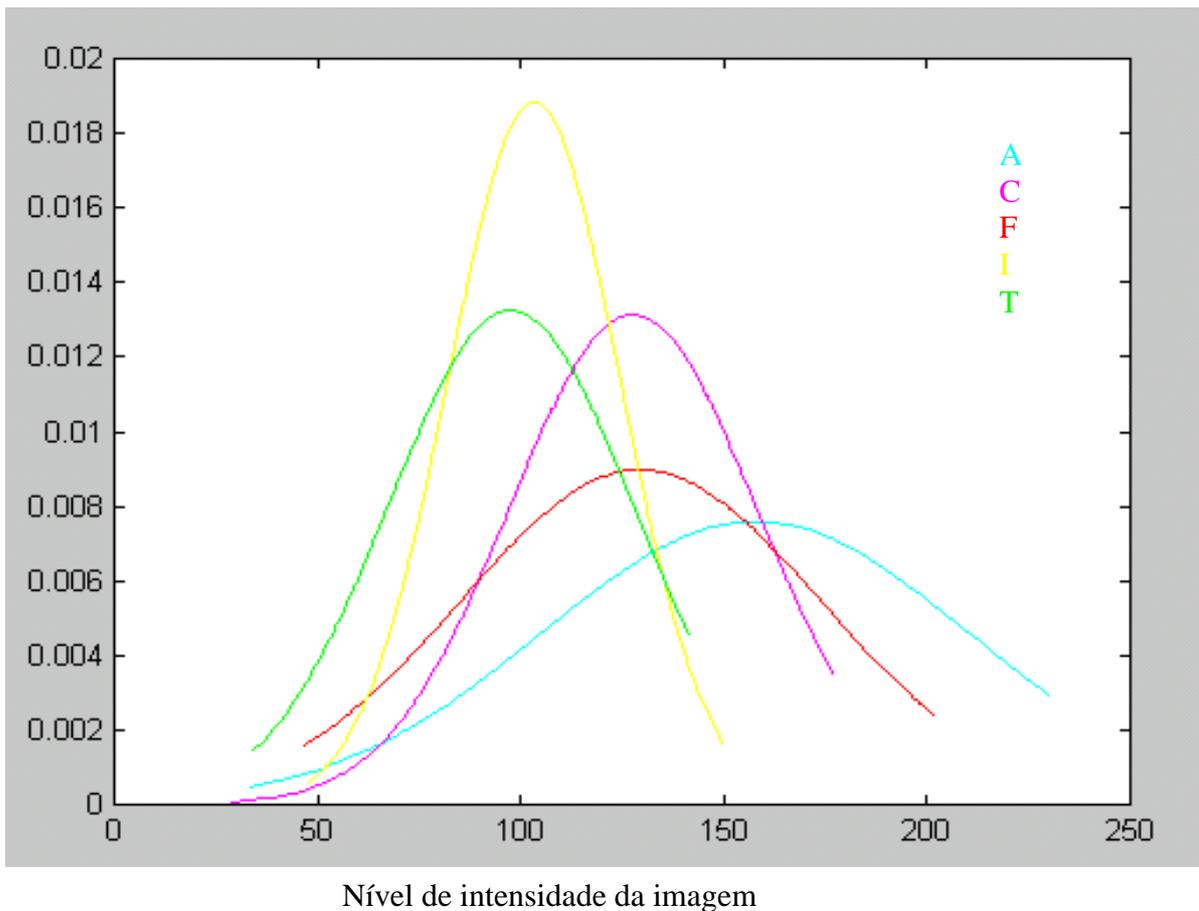


Figura 6.17 Função densidade de probabilidade normal (fdp) dos histogramas padrão RGB das 5 espécies

### 6.2.2. MOMENTOS DE 2ª E DE 4ª ORDEM DA INTENSIDADE DA IMAGEM

Quando as imagens das espécies são muito semelhantes, pode-se calcular momentos da intensidade da imagem para várias amostras de cada uma destas espécies (eqs. 3.5 e 3.6 cap. 3).

As figs. 6.18 e 6.19 apresentam a representação dos momentos de 2ª ordem,  $M_2(I)$ , e de 4ª ordem,  $M_4(I)$ , para 6 amostras de *Amphidinium operculatum* e 5 amostras de *Fibrocapsa japonica*, para imagens de 282x210 pixels.

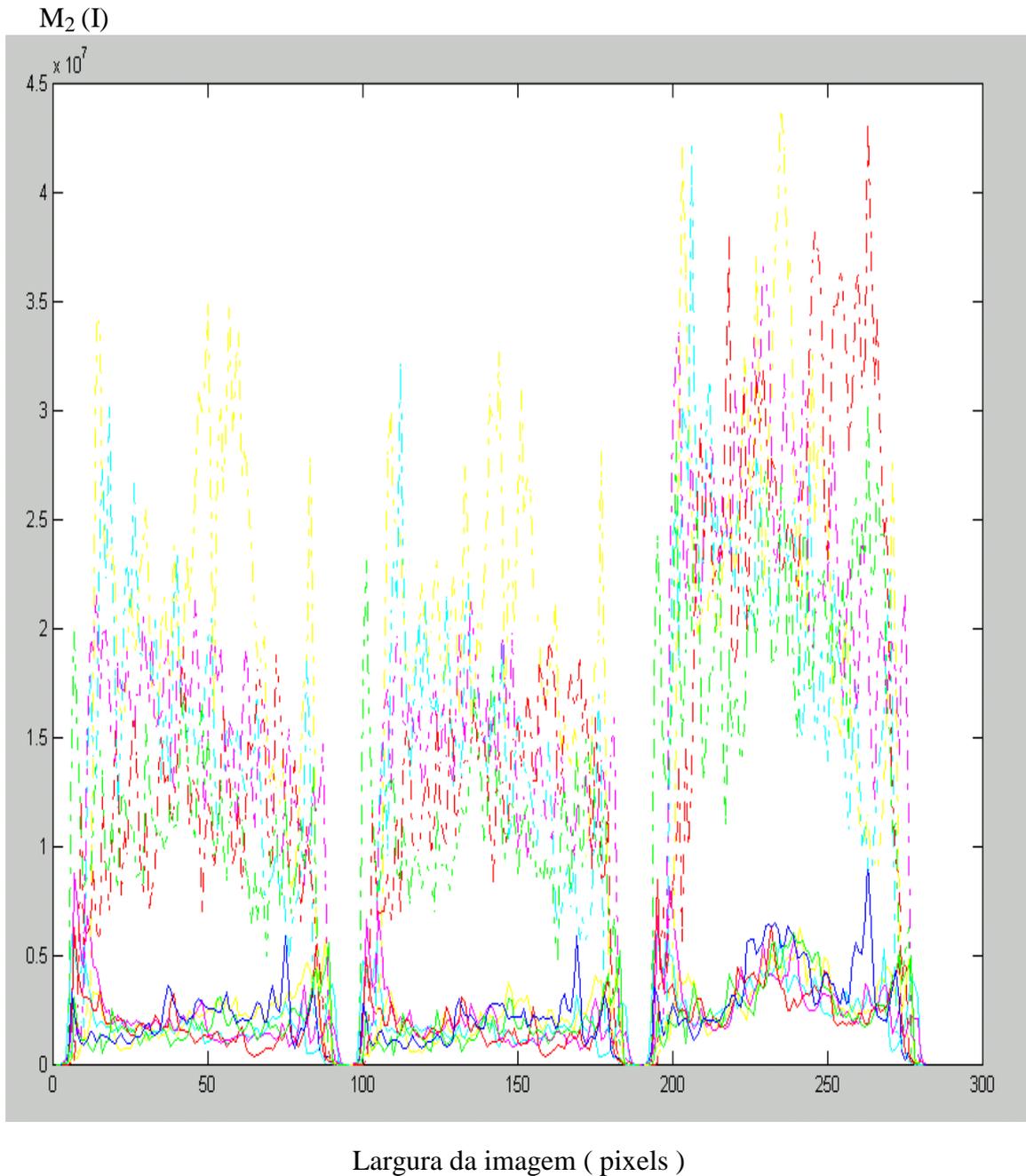
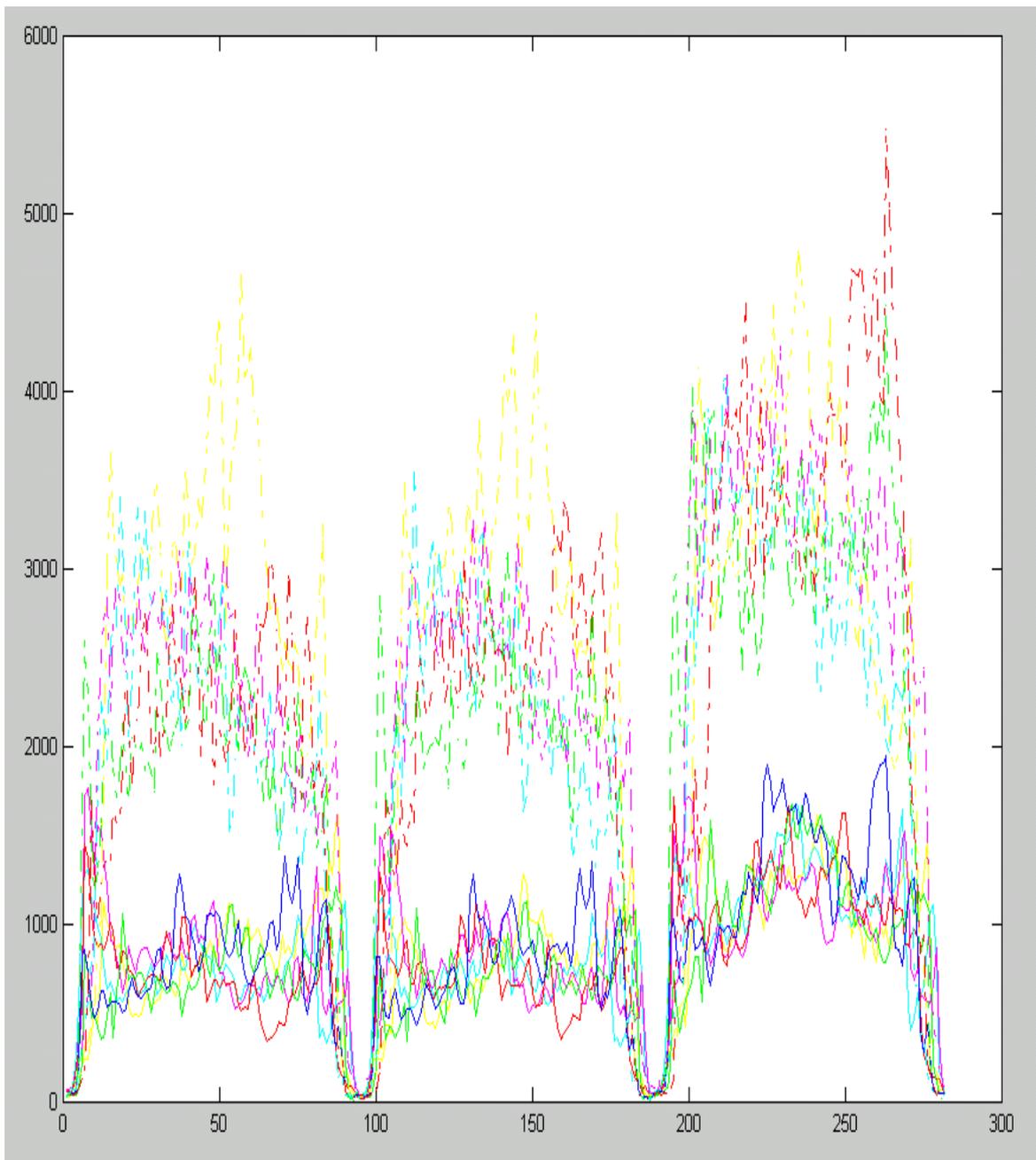


Figura 6.18 - Momentos 2ª ordem da imagem,  $M_2(I)$ .

Linha cheia *Amphidinium operculatum* -Linha pontilhada *Fibrocapsa japonica*

$M_4(I)$ 


Largura da imagem (pixels)

Figura 6.19 - Momentos de 4ª ordem da imagem,  $M_4(I)$ .

Linha cheia *Amphidinium operculatum* -Linha pontilhada *Fibrocapsa japonica*

### 6.2.3 GRANDEZAS GEOMÉTRICAS CARACTERÍSTICAS

As figs 6.20 a 6.26 apresentam a distribuição das 8 variáveis geométricas agrupadas de diferentes maneiras. Estes agrupamentos foram usados na seção 6.3 para reconhecimento de padrões de microalgas.

Perímetro (pixels)

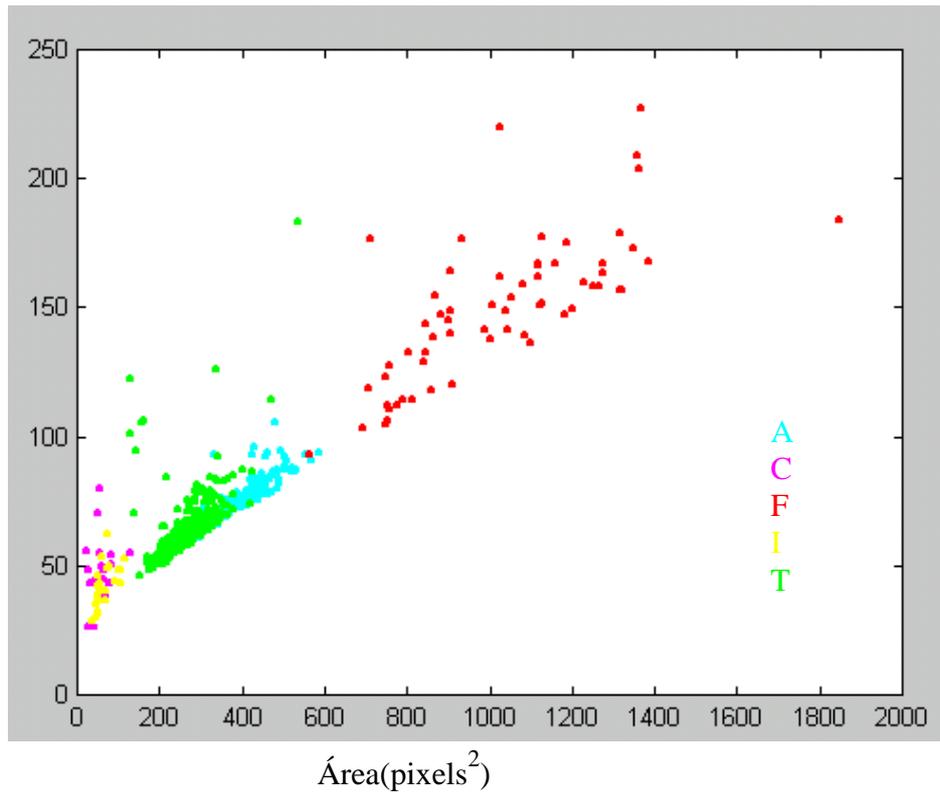


Figura 6.20 – Perímetro como função de Área das microalgas

Xmax ( pixels)

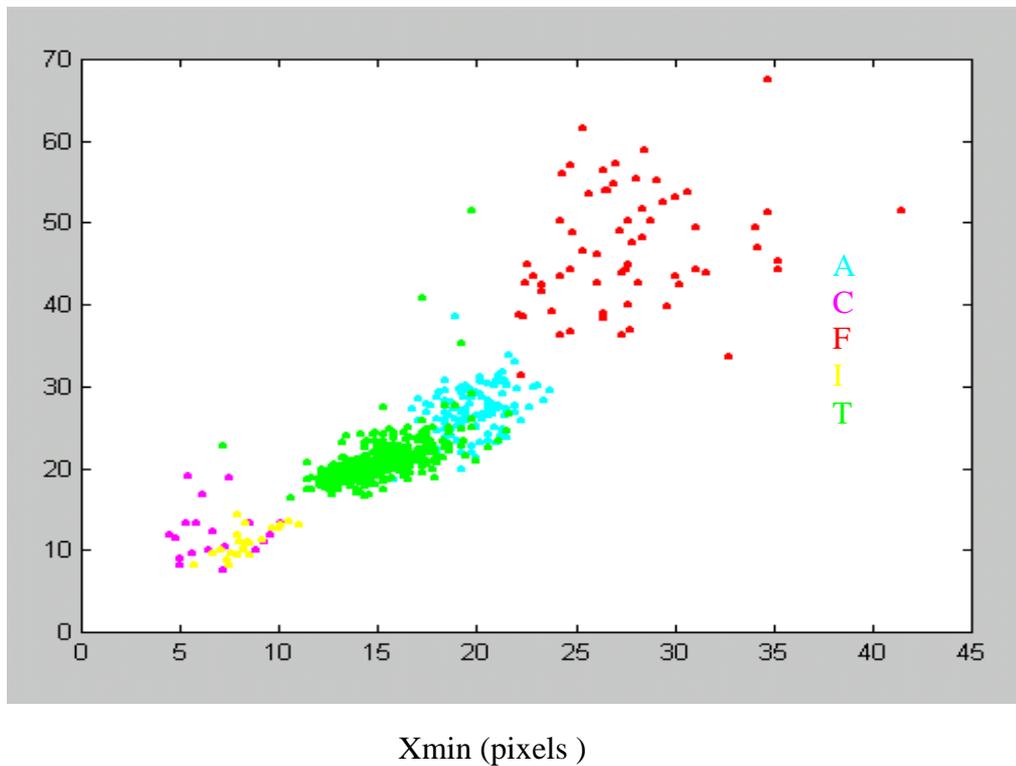
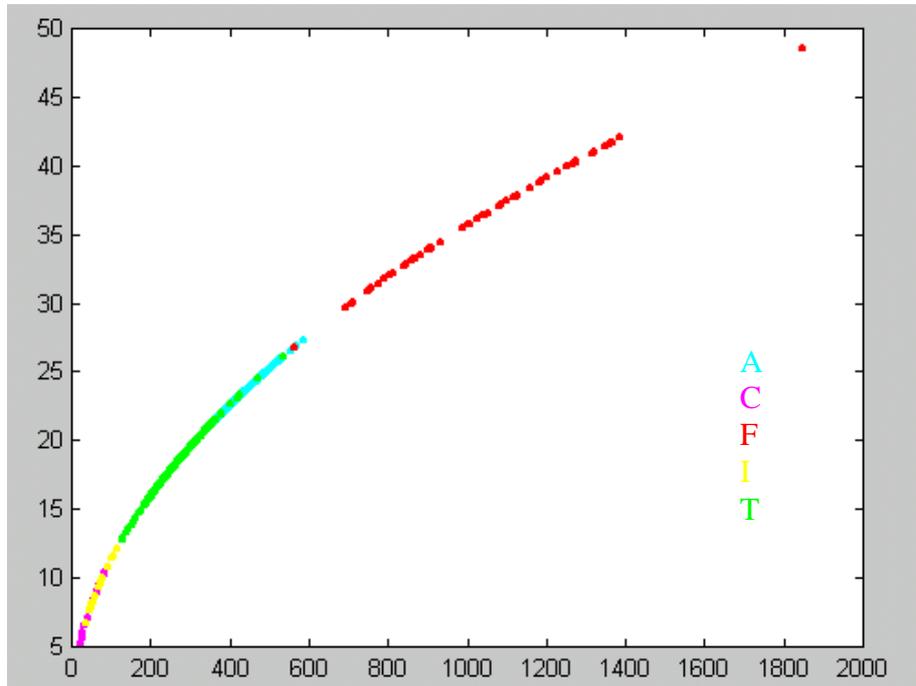


Figura 6.21 Xmax como função de Xmin das microalgas

Diâmetro de Feret ( pixels )



Área(pixels<sup>2</sup>)

Figura 6.22 Diâmetro de Feret como função da Área das microalgas

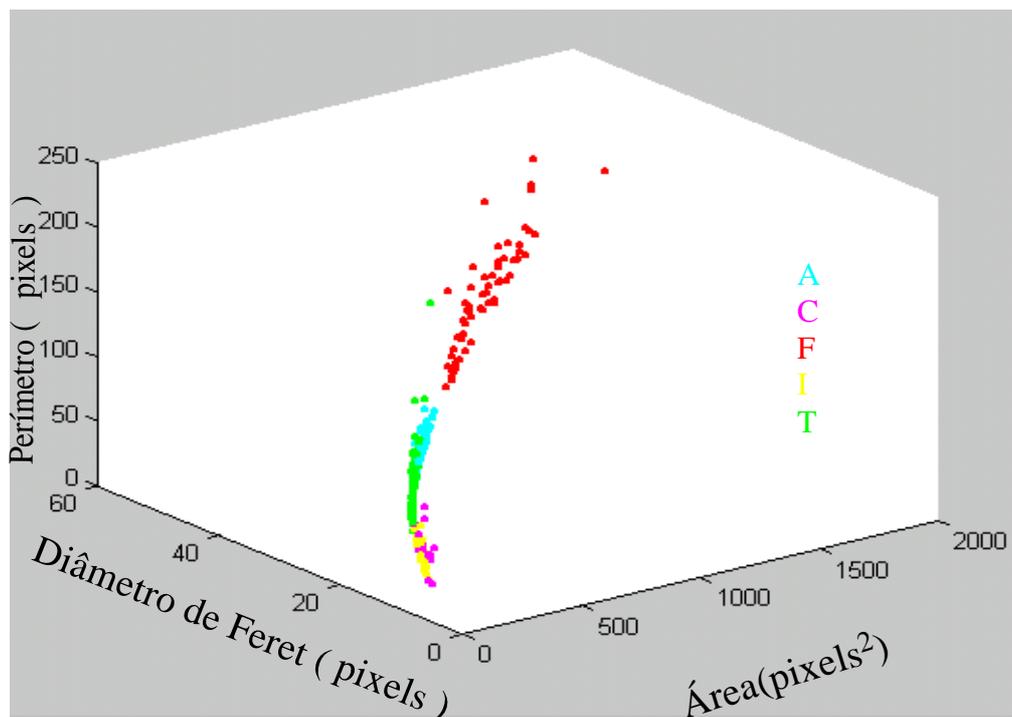


Figura 6.23 Perímetro como função da área e diâmetro de Feret das microalgas

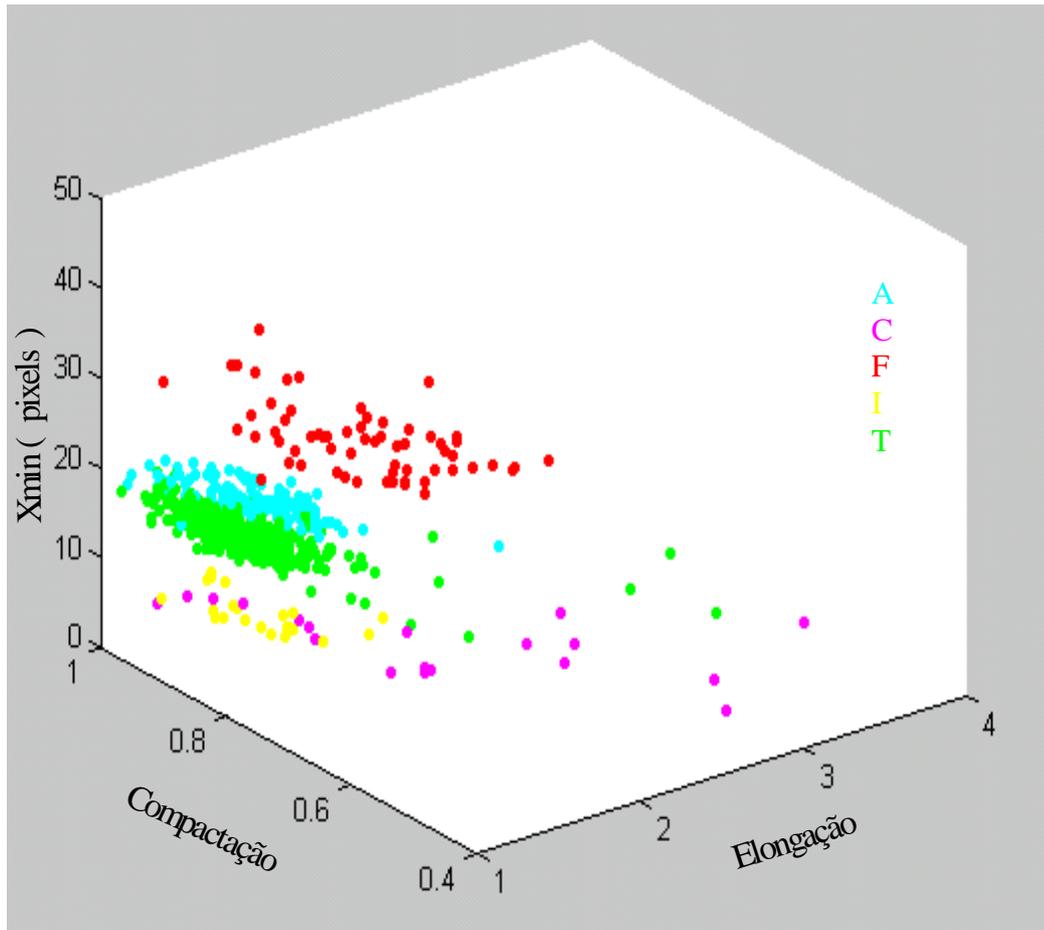


Figura 6.24 Xmin como função de Elongação e Compactação das microalgas

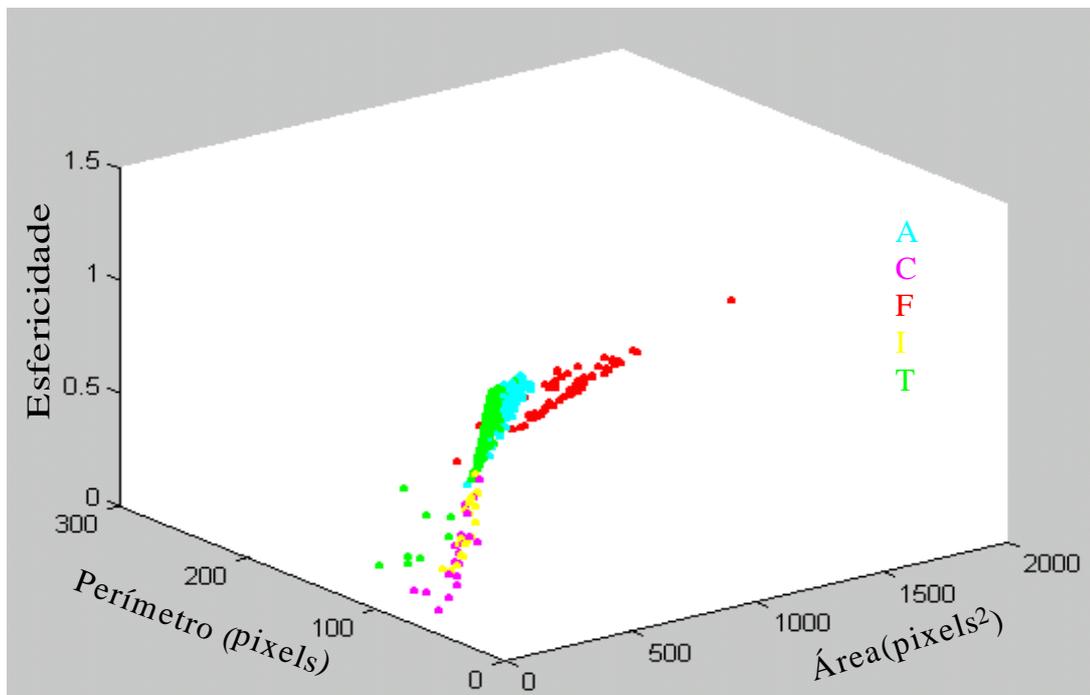


Figura 6.25 Esfericidade como função da área e perímetro das microalgas

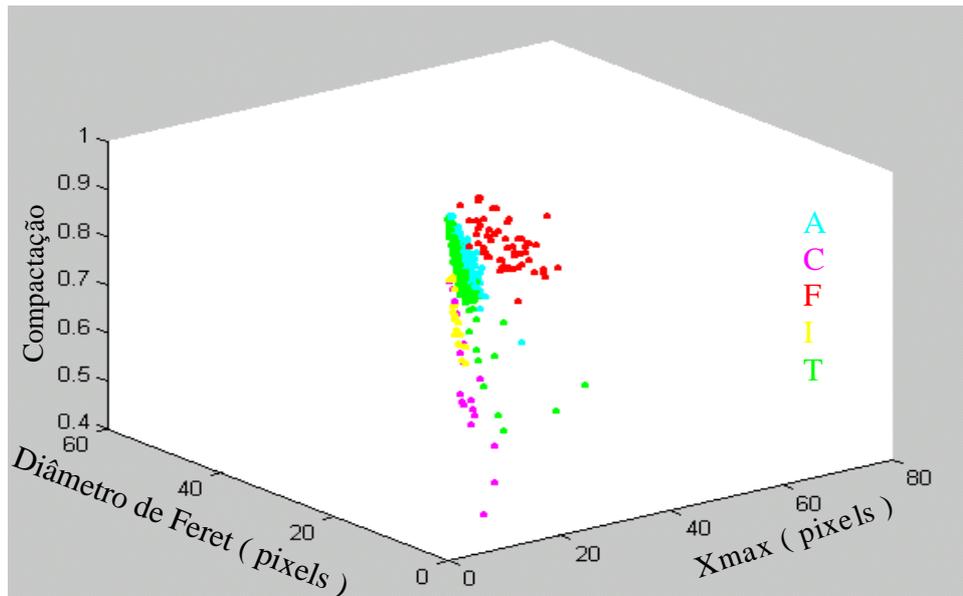


Figura 6.26 Compactação como função do diâmetro de Feret e de Xmax das microalgas

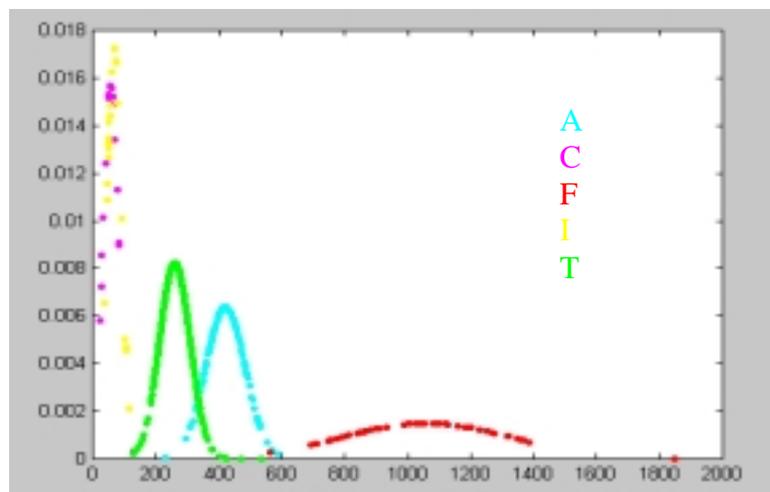
O número diferente de amostras testadas de cada espécie se deve à sua maior ou menor abundância nas amostras observadas no microscópio.

A partir dos resultados das grandezas características das amostras das 5 espécies estudadas pode-se traçar a função densidade de probabilidade para cada uma das grandezas características.

As figs. 6.27 a 6.34 apresentam os gráficos das funções densidade de probabilidade para uma distribuição normal, conhecidas a média e o desvio padrão de cada grandeza das amostras, sendo 122 amostras de *Amphidinium operculatum*, 19 de *Chaetoceros sp.*, 62 de *Fibrocapsa japonica*, 22 de *Isochrysis galbana* e 499 de *Tetraselmis chuii*.

A função densidade de probabilidade de uma distribuição normal (fdp), segundo Gonzalez e Woods, 1993, é dada pela eq. 3.11, seção 3.5.

fdp (Área)



Área (pixels<sup>2</sup>)

Figura 6.27 Função densidade de probabilidade normal da grandeza característica Área.

fdp ( perímetro )

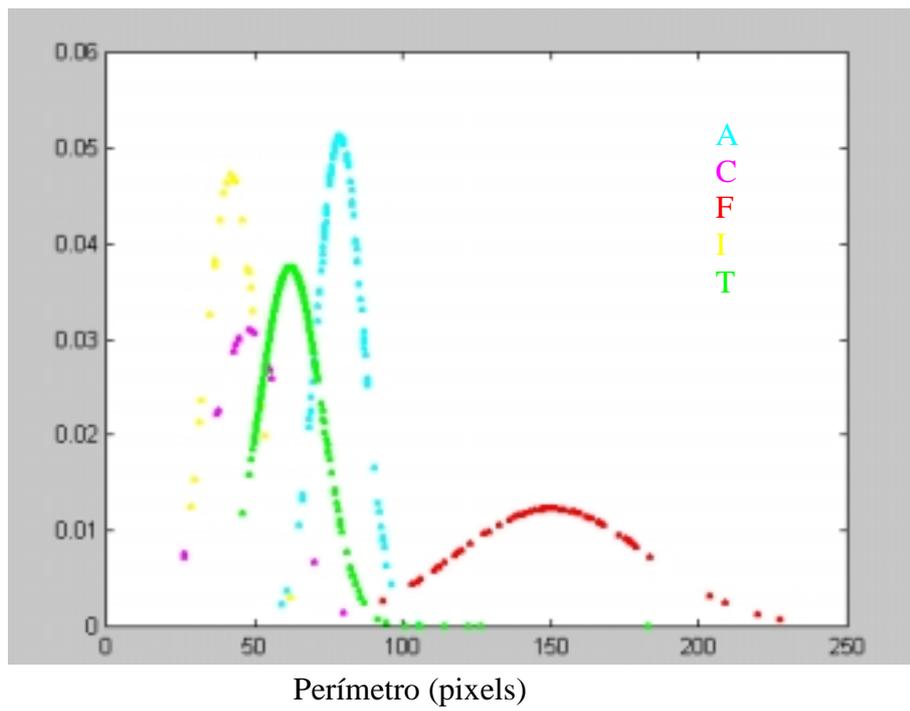


Figura 6.28 Função densidade de probabilidade normal da grandeza característica Perímetro

fdp ( Xmin )

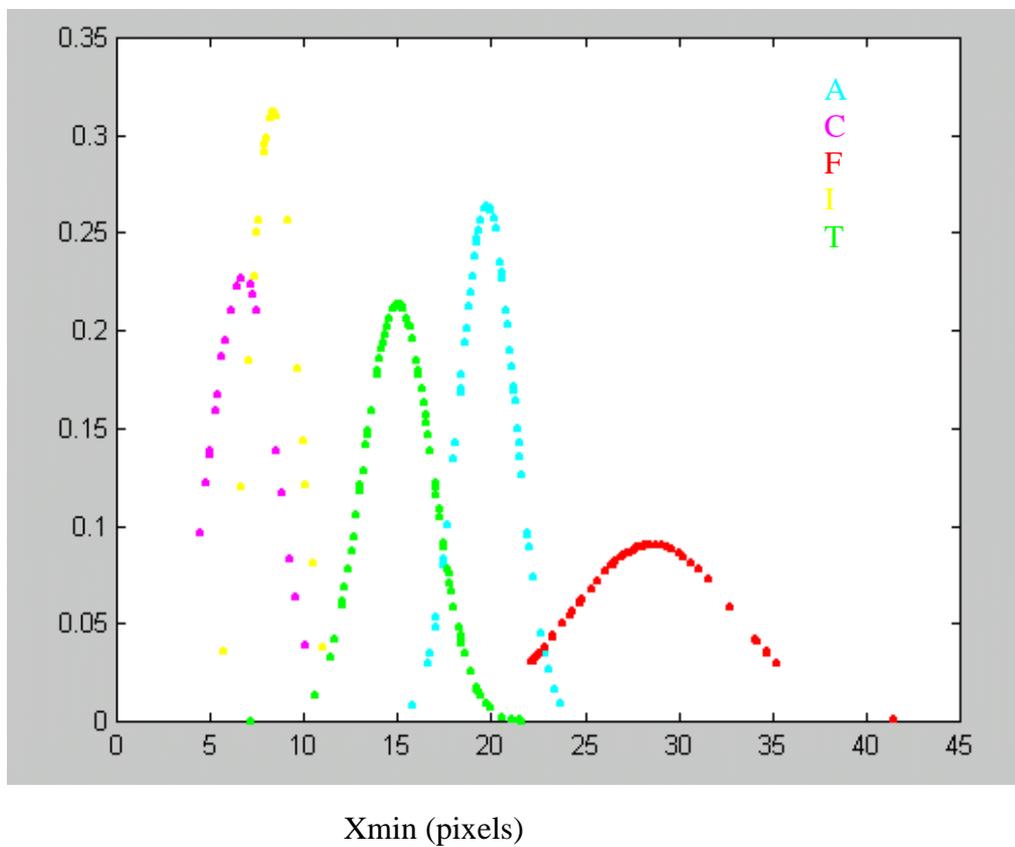


Figura 6.29 Função densidade de probabilidade normal da grandeza característica Xmin

fdp ( Elongação )

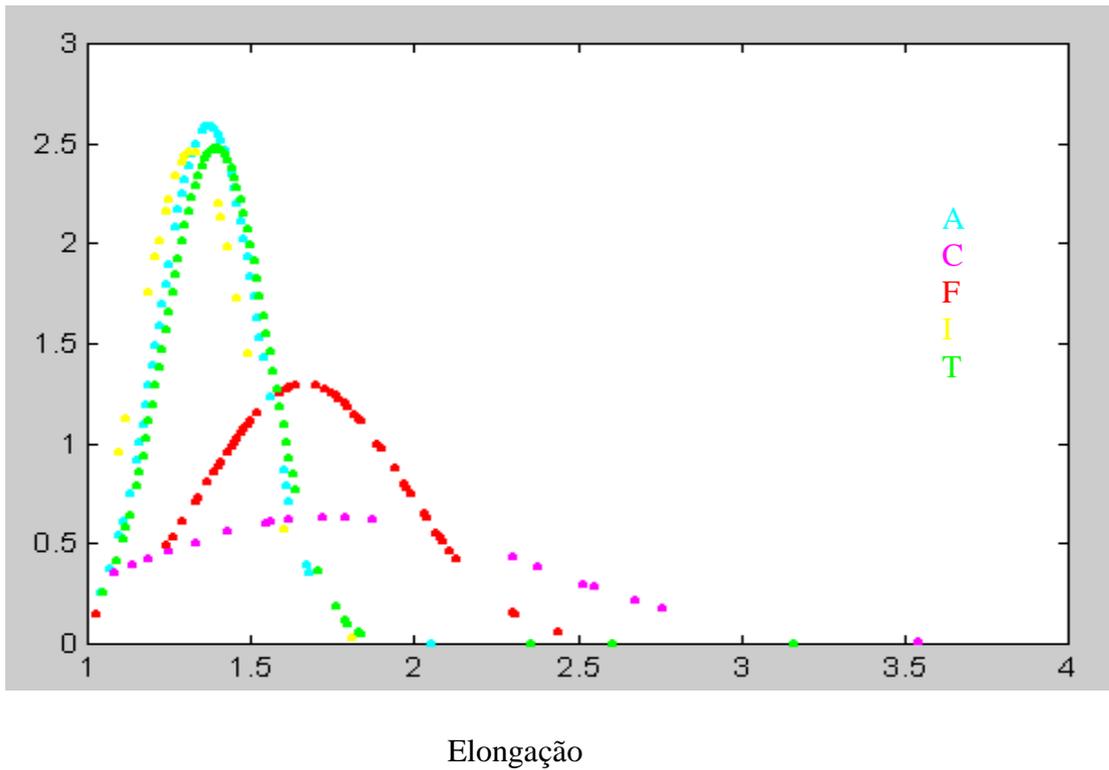


Figura 6.30 Função densidade de probabilidade normal da grandeza característica Elongação

fdp ( DFeret )

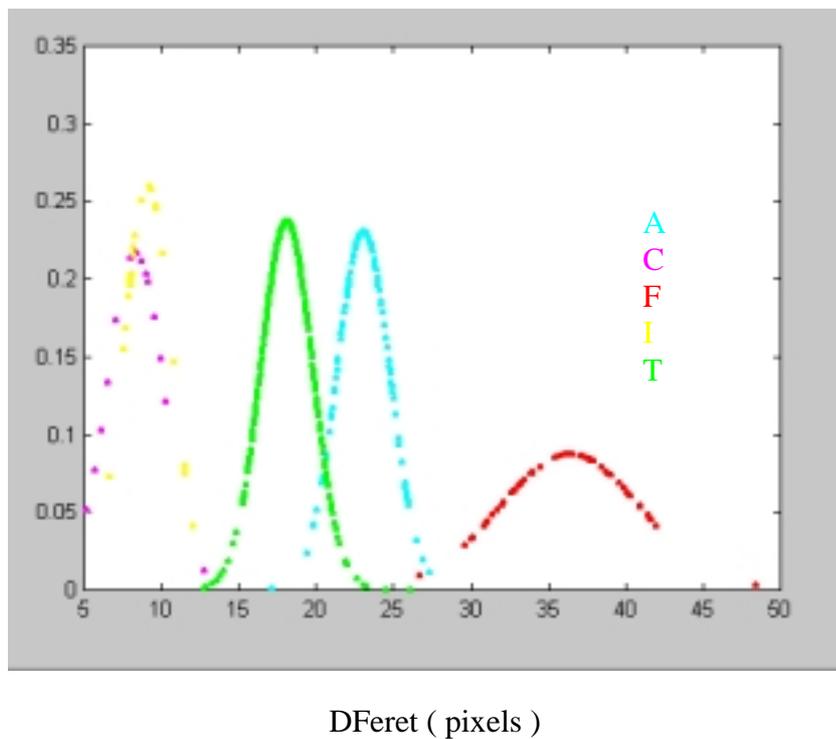


Figura 6.31 Função densidade de probabilidade normal da grandeza característica DFeret

fdp ( Esfericidade )

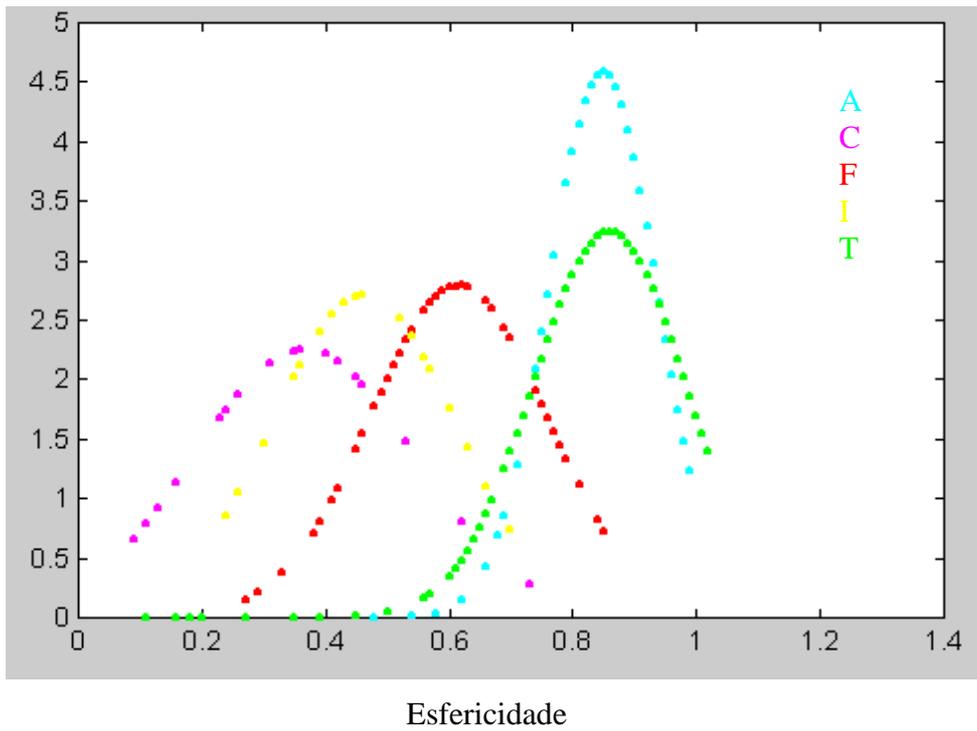


Figura 6.32 Função densidade de probabilidade normal da grandeza característica Esfericidade

fdp ( Xmax )

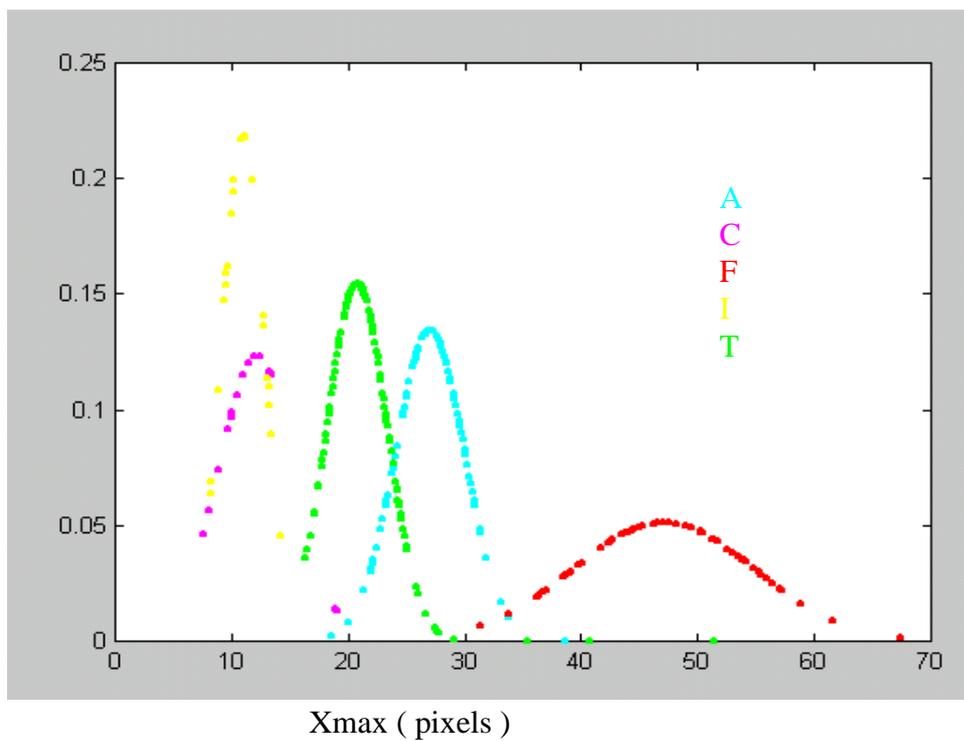


Figura 6.33 Função densidade de probabilidade normal da grandeza característica Xmax

fdp ( Compactação )

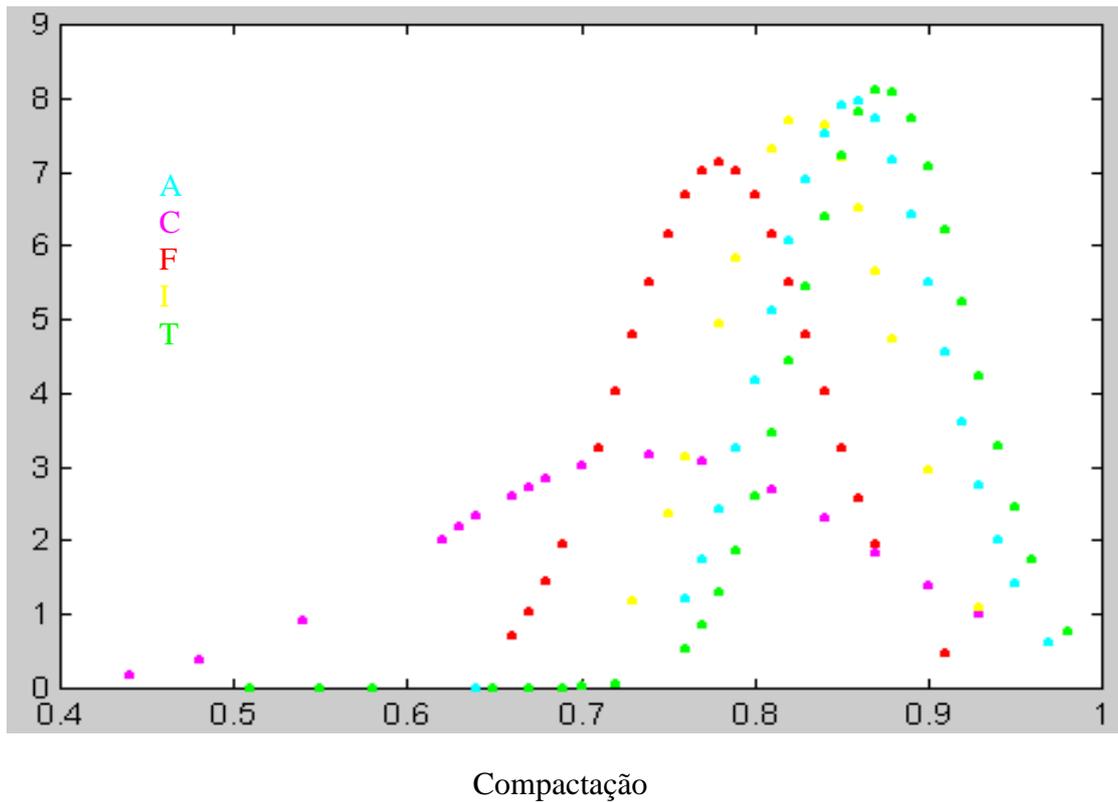


Figura 6.34 Função densidade de probabilidade normal da grandeza característica Compactação

#### 6.2.4. TRANSFORMADAS RADON

Na fig. 6.35 são mostradas as imagens (32x32) das 5 espécies de microalgas estudadas sobre as quais foi aplicada a transformada RADON.

As figs. 6.36 a 6.38 mostram o resultado da aplicação da transformada RADON às 5 imagens da fig. 6.35, alinhadas verticalmente, para um ângulo  $\theta$  escolhido variando de  $0^{\circ}$  a  $180^{\circ}$ . As transformadas foram calculadas de acordo com as eqs. 3.8 a 3.10 da seção 3.4, cap. 3.



Figura 6.35 Imagens (32x32) das cinco microalgas estudadas, *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, *Fibrocapsa japonica*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*.

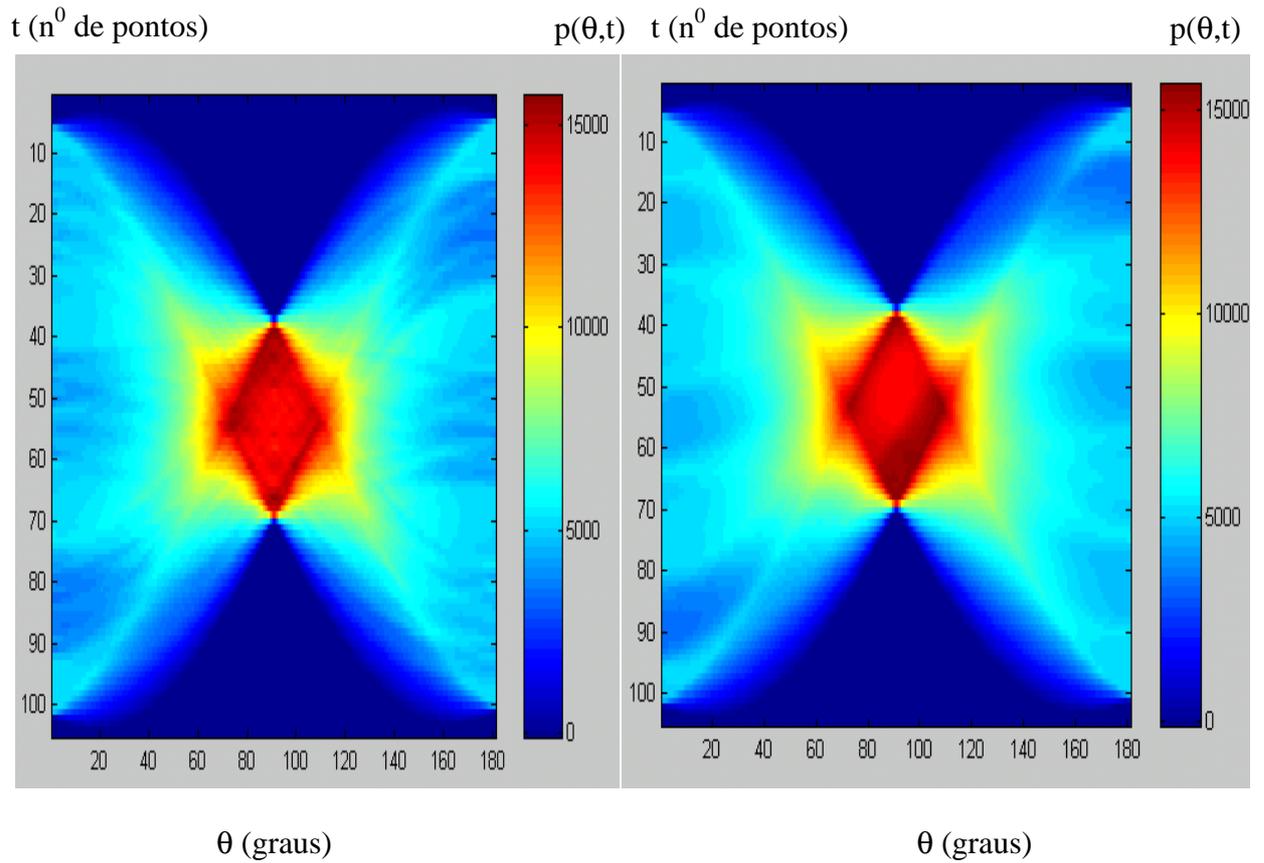


Figura 6.36 Transformada RADON,  $p(\theta, t)$  das microalgas *Amphidinium operculatum* (esq.) e *Chaetoceros sp.* (dir.) -  $\theta=0^\circ$  a  $180^\circ$

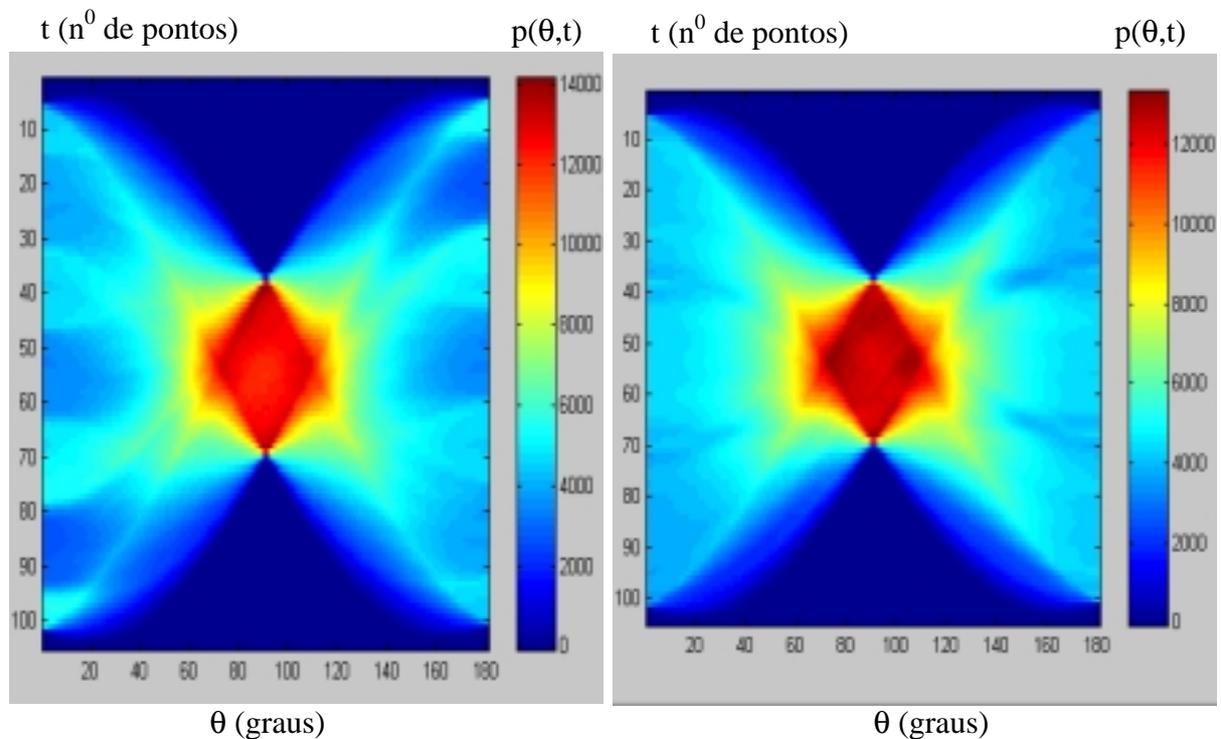


Figura 6.37 Transformada RADON,  $p(\theta, t)$  das microalgas e *Fibrocapsa japonica* (esq.) e *Isochrysis galbana* (dir.)-  $\theta=0^\circ$  a  $180^\circ$

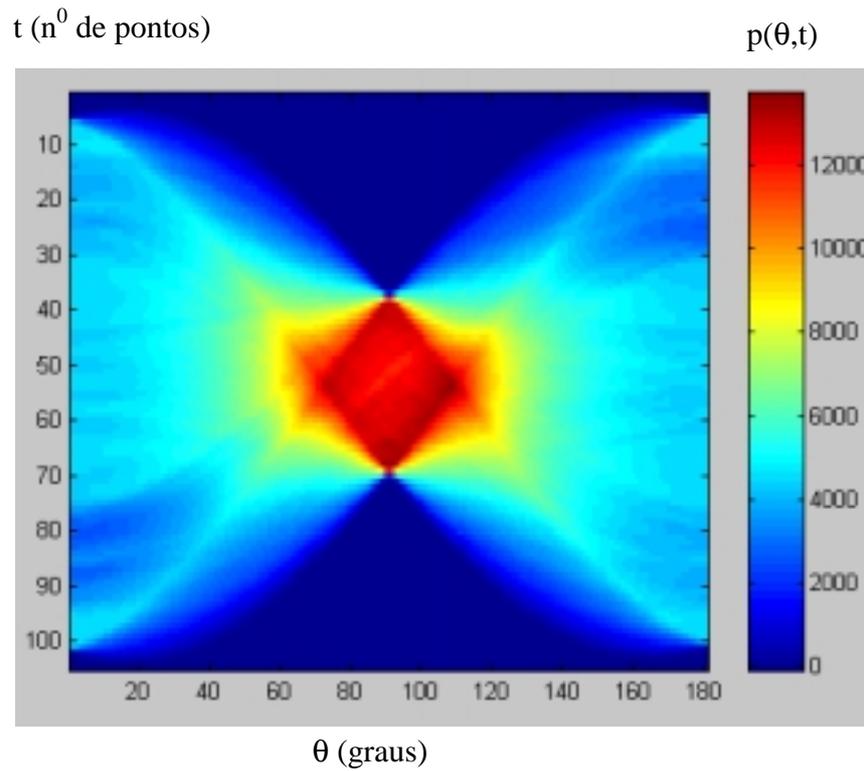


Figura 6.38 Transformada RADON,  $p(\theta,t)$  da microalga *Tetraselmis chuii* -  $\theta=0^{\circ}$  a  $180^{\circ}$

A fig. 6.39 apresenta as funções densidade de probabilidade normal (fdp) aplicada a  $p(\theta,t)$ ,  $\theta = 0^{\circ}$  a  $180^{\circ}$ , para 9 amostras de cada espécie.

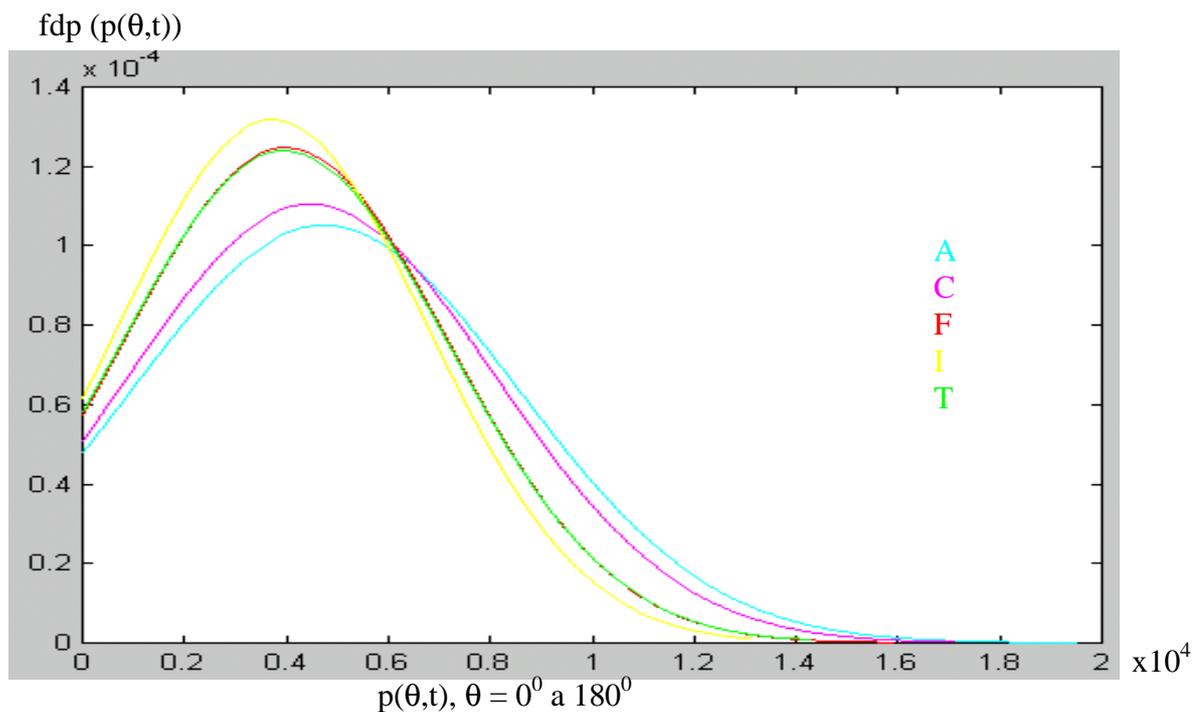


Figura 6.39. Funções densidade de probabilidade normal (fdp) aplicada a  $p(\theta,t)$ ,  $\theta = 0^{\circ}$  a  $180^{\circ}$

Para diferenciar as espécies, usa-se a transformada RADON aplicada a ângulos específicos escolhidos por observação das figs. 6.36 a 6.38. As figs. 6.40 a 6.42 mostram a aplicação da transformada RADON para as 5 espécies estudadas para um ângulo  $\theta=0^0$ .

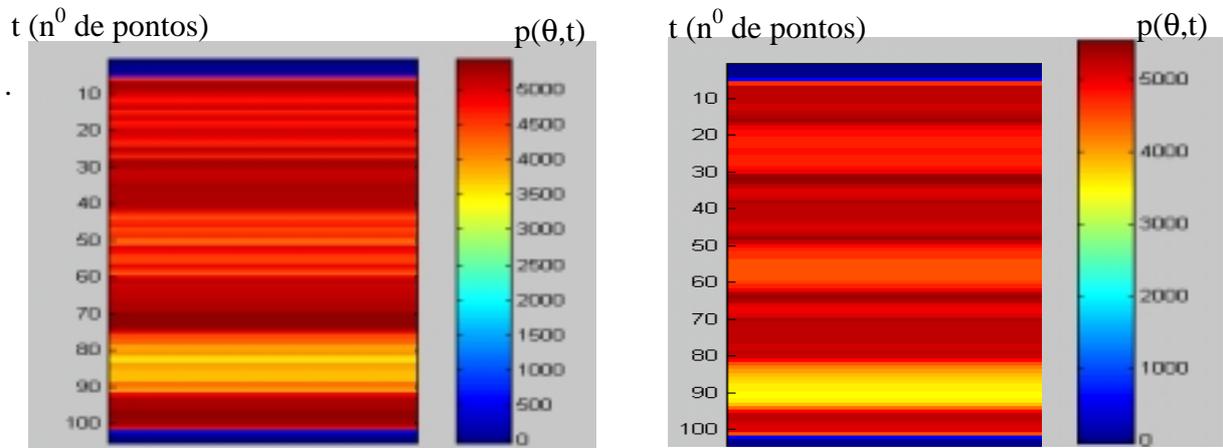


Figura 6.40 Transformada RADON,  $p(\theta,t)$ , das microalgas *Amphidinium operculatum* (esq.) e *Chaetoceros sp.* (dir.)-  $\theta=0^0$

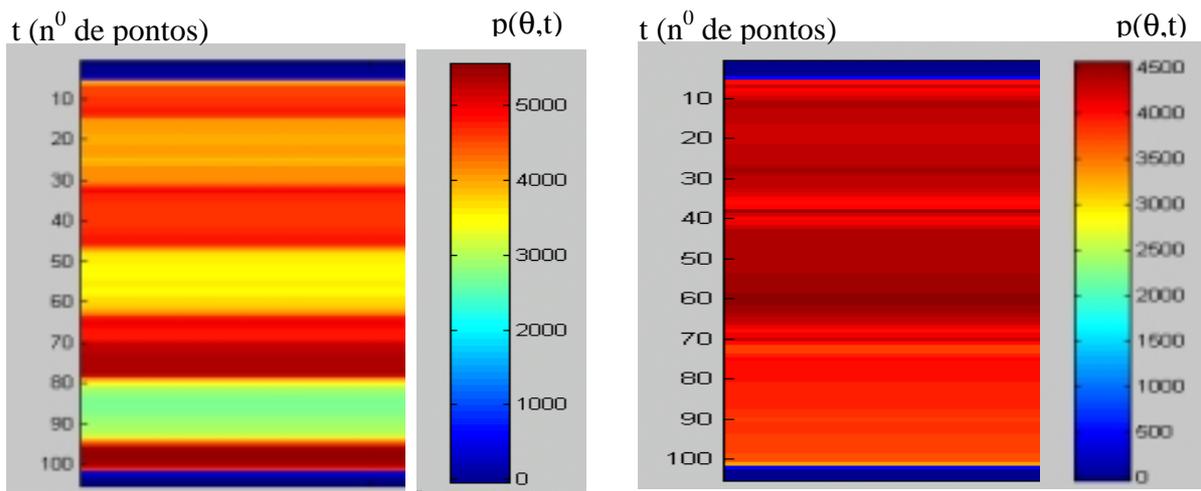


Figura 6.41 Transformada RADON das microalgas *Fibrocapsa japonica* (esq.) e *Isochrysis galbana* (dir.) -  $\theta=0^0$

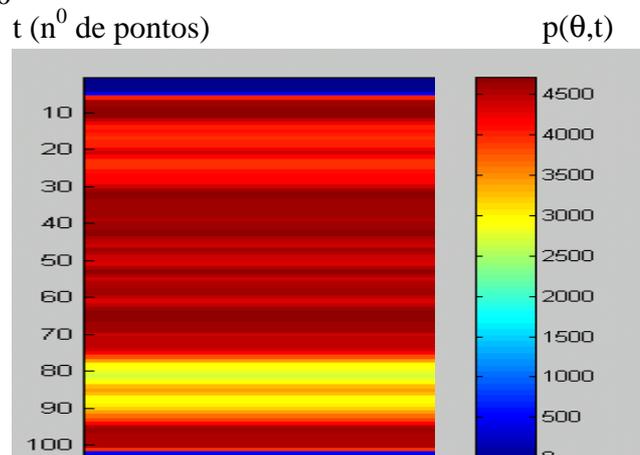


Figura 6.42 Transformada RADON,  $p(\theta,t)$ , da microalga *Tetraselmis chuii* -  $\theta=0^0$

A fig. 6.43 apresenta as funções densidade de probabilidade normal (fdp) aplicada a  $p(\theta,t)$ ,  $\theta = 0^0$ , para 9 amostras de cada espécie.

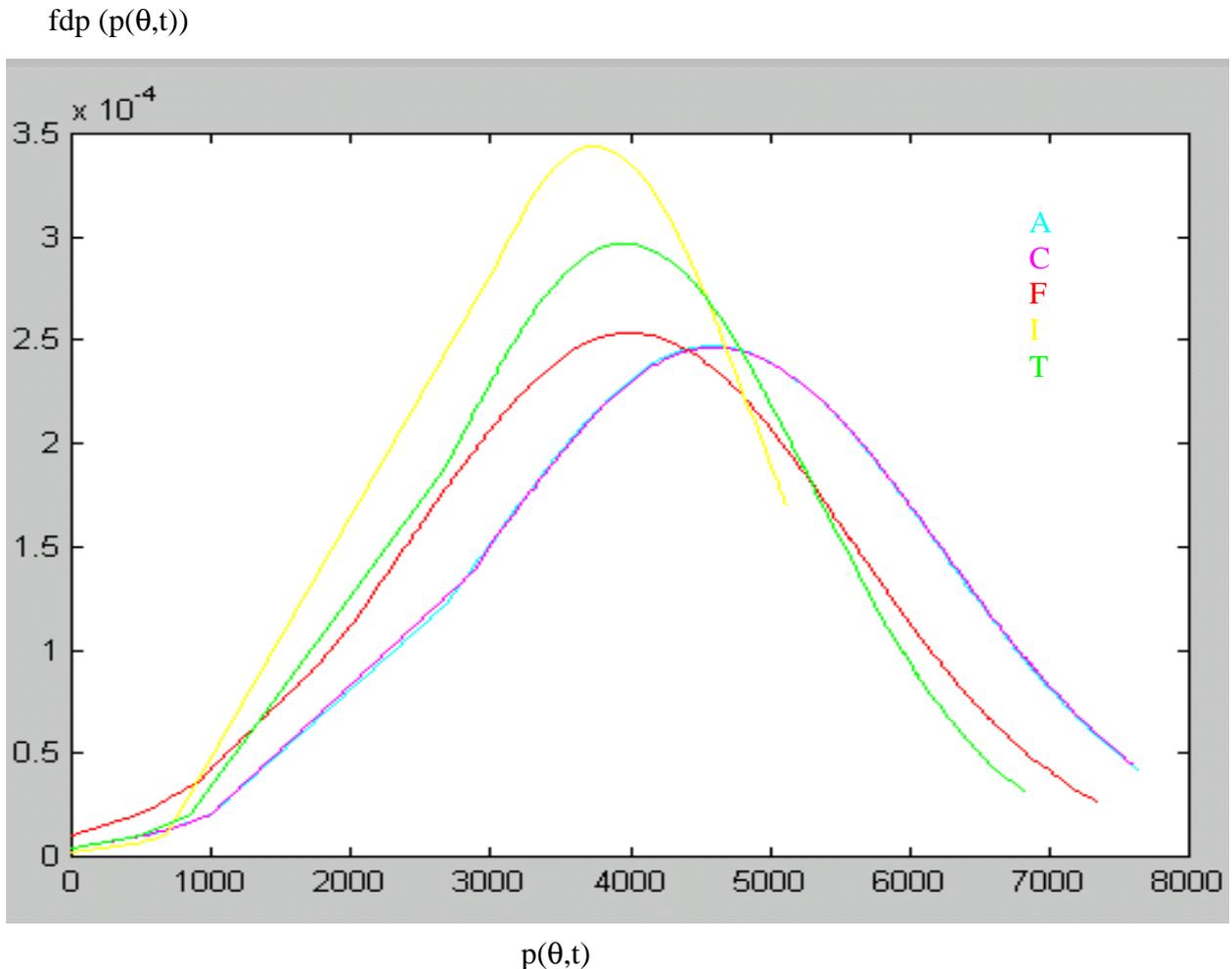


Figura 6.43 Função densidade de probabilidade normal , fdp,  $p(\theta,t)$ ,  $\theta = 0^0$  -  
9 amostras de cada espécie.

### 6.2.5. TRANSFORMADAS DE FOURIER

As figs. 6.44 a 6.46 mostram o resultado da aplicação às imagens das 5 espécies de microalgas estudadas (fig. 6.13) da transformada FFT. As transformadas foram calculadas de acordo com o algoritmo da FFT a partir da eq. 3.7 da seção 3.4.

Foi calculado o módulo quadrado da Transformada de Fourier, *espectro de potência de Fourier* que corresponde a um mapeamento das frequências espaciais da imagem original. As maiores frequências estão concentradas no centro das imagens [Gonzalez e Woods,1993]. A transformada FFT foi aplicada a imagens 282x210 pixels.

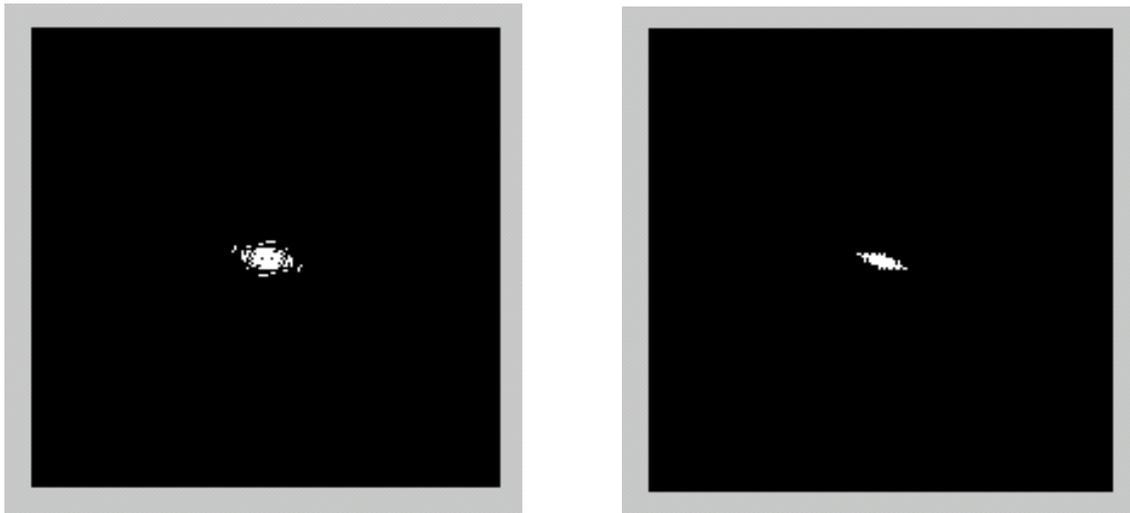


Figura 6.44 . Transformada FFT das microalgas *Amphidinium operculatum* (esq.) e *Chaetoceros sp.* (dir.)

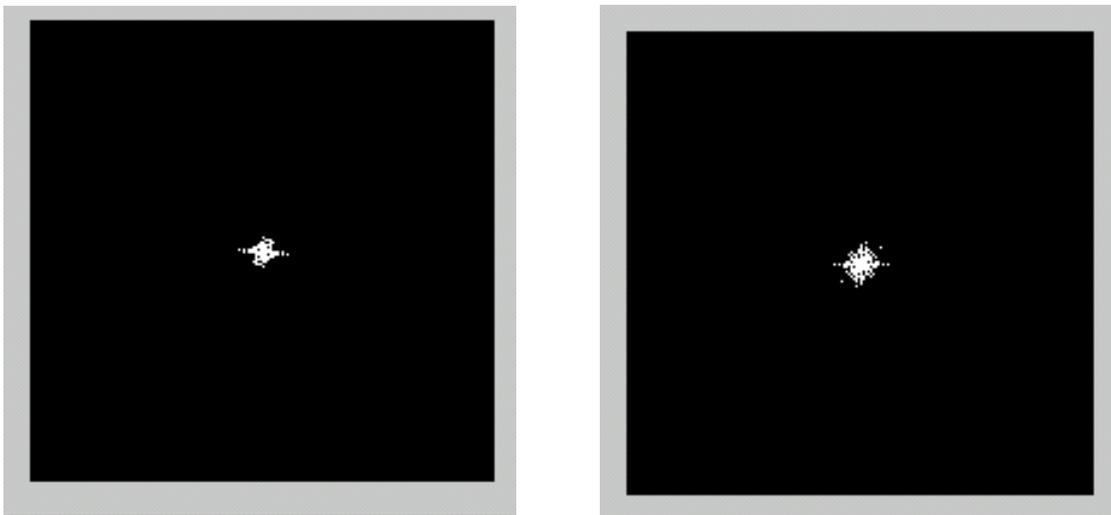


Figura 6.45 Transformada FFT das microalgas e *Fibrocapsa japonica* (esq.) e *Isocriasis galbana* (dir.)

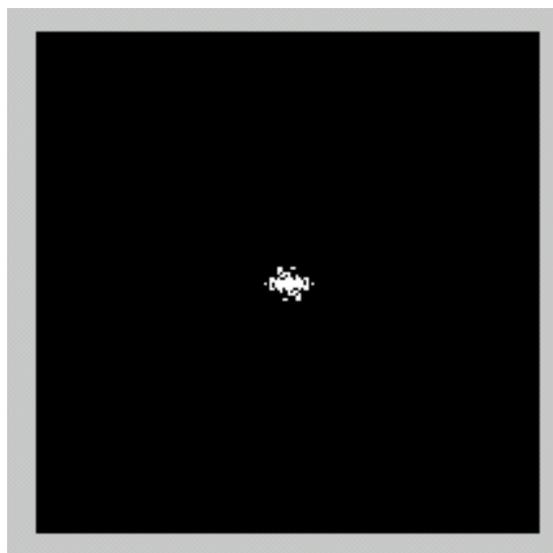


Figura 6.46 Transformada FFT da microalga *Tetraselmis chuii*

As figs. 6.47 a 6.49 mostram a quantificação do espectro de potência de Fourier (E) para imagens 32x32 das 5 espécies de microalgas estudadas.

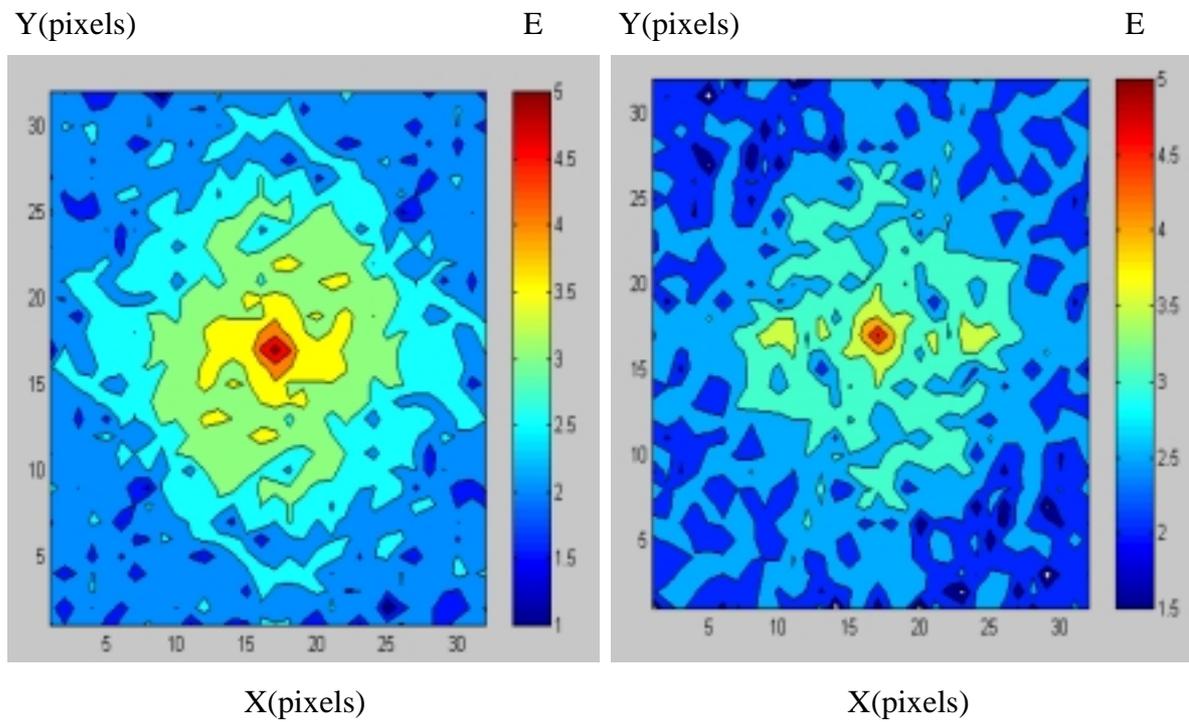


Figura 6.47 Quantificação do espectro de potência de Fourier (E) das microalgas *Amphidinium operculatum* (esq.) e *Chaetoceros sp.* (dir.)

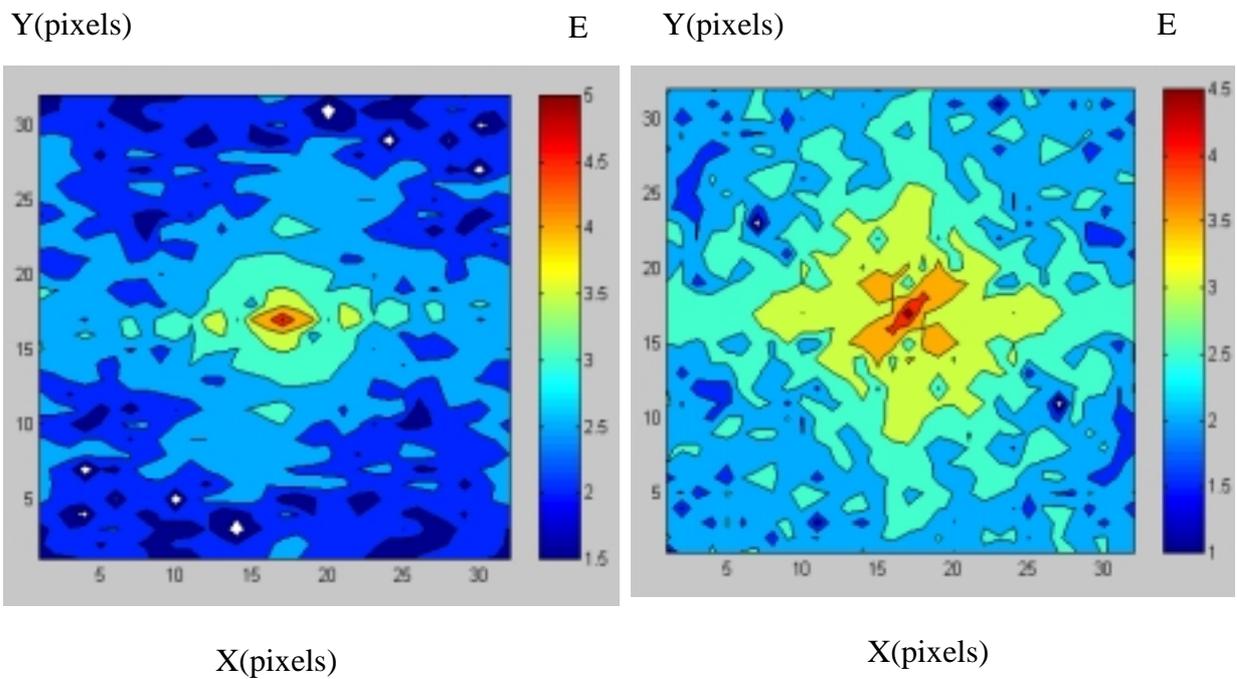


Figura 6.48 Quantificação do espectro de potência de Fourier (E) das microalgas *Fibrocapsa japonica* (esq.) e *Isocrisis galbana* (dir.)

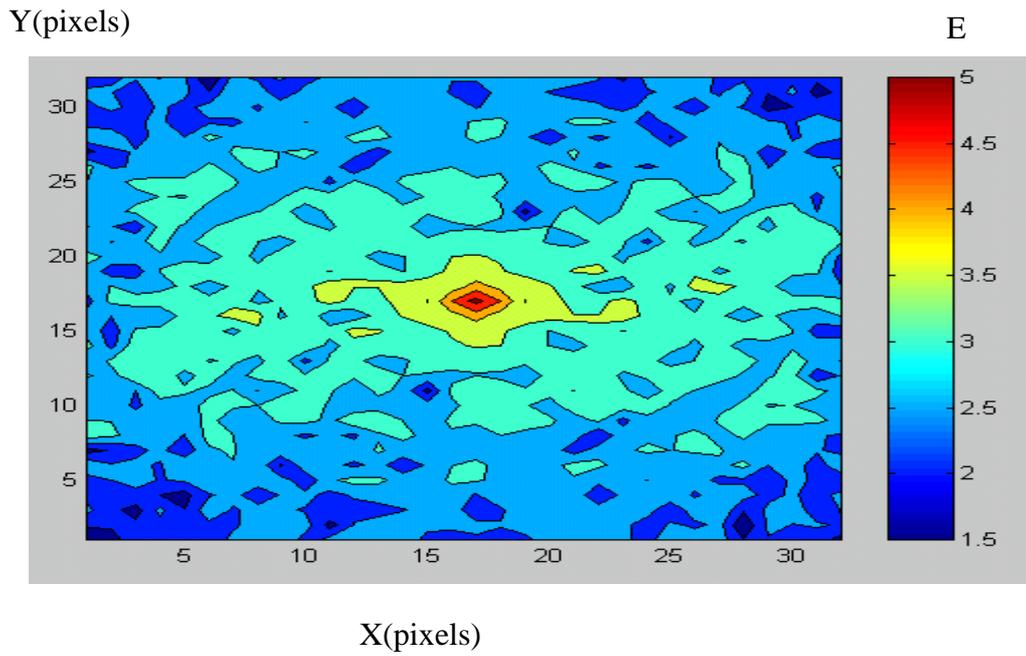


Figura 6.49 Quantificação do espectro de potência de Fourier da microalga *Tetraselmis chuii*

A fig. 6.50 apresenta a função densidade de probabilidade normal (fdp) do espectro de potência de Fourier (E), aplicada a 9 amostras de cada espécie.

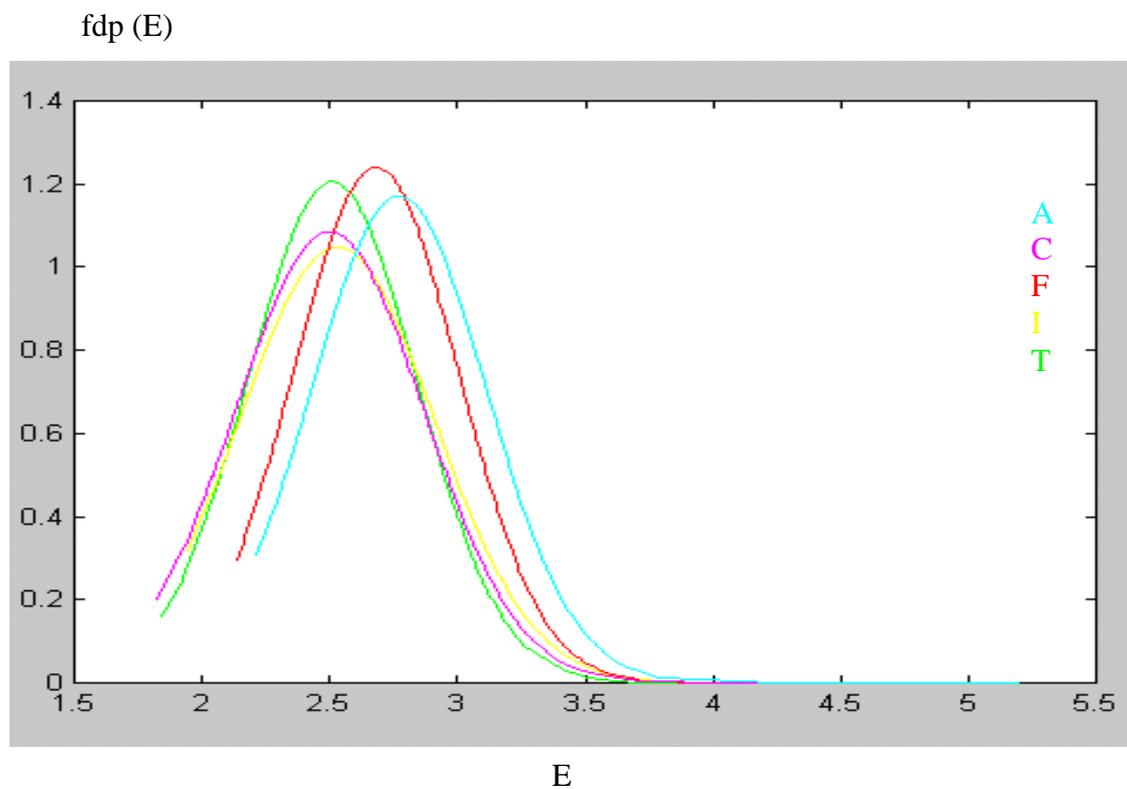


Figura 6.50 Função densidade de probabilidade normal (fdp) do espectro de potência de Fourier (E) das microalgas estudadas

### 6.2.6. TABELAS DE INDICADORES

Conhecendo-se a média ( $\mu_p$ ) e o desvio padrão ( $\sigma_p$ ) das grandezas características para um conjunto de amostras de cada espécie de microalga, monta-se as Tabelas 6.1 a 6.3. É verificado se cada valor ( $V_{tg}$ ) das grandezas da amostra a ser testada encontra-se dentro do intervalo  $(Int) = \mu_p \pm 2\sigma_p$  para as grandezas geométricas e se o valor ( $V_{timédio}$ ) encontra-se dentro do intervalo  $= \mu_p \pm \frac{\sigma_p}{2}$  para as grandezas relacionadas à intensidade da imagem. Em caso afirmativo, o indicador (I) assume o valor '1', caso contrário, assume o valor '0'. A amostra pertencerá à espécie com maior valor do  $\sum I$ . Pode-se comparar também  $\sum I_g = \sum I$  para as grandezas geométricas e  $\sum I_m = \sum I$  para as grandezas relacionadas à intensidade da imagem.

Como exemplo de cálculo dos indicadores escolheu-se a microalga assinalada na fig. 6.51.

As figs. 6.52 a 6.54 mostram, respectivamente, a imagem girada da microalga 32x32 padrão RGB escolhida para teste, o histograma do nível de intensidade da imagem e a aplicação das transformadas FFT e RADON.



Figura 6.51 Imagem com teste de caracterização para microalga da espécie *Fibrocapsa japonica*.

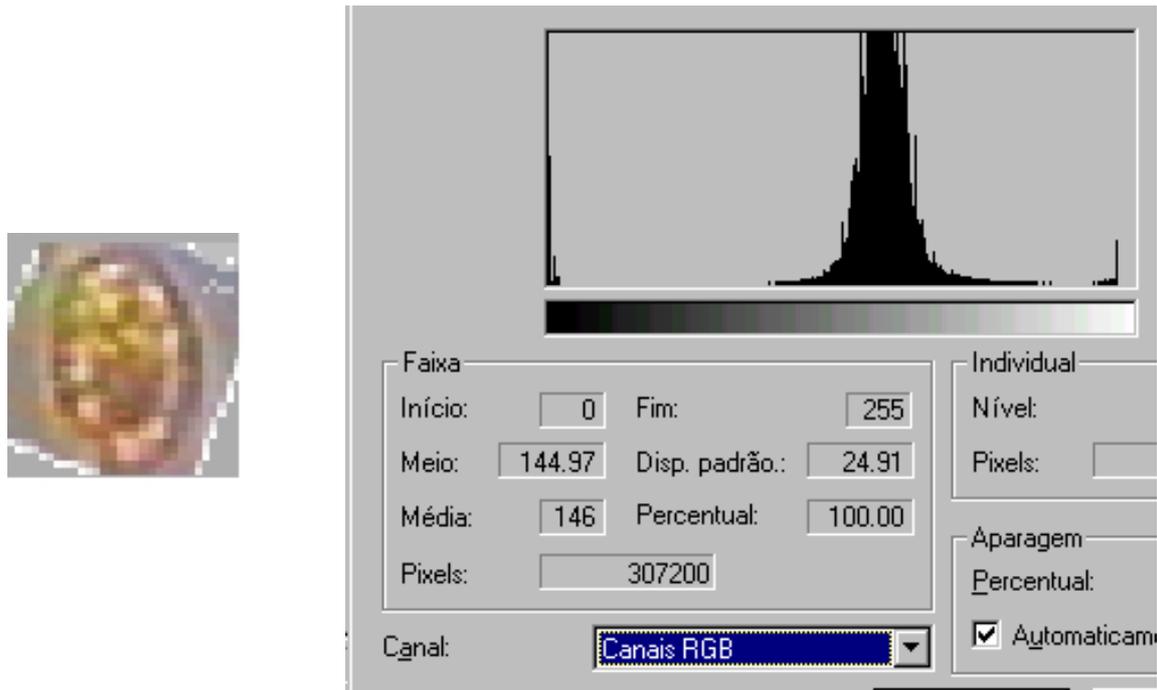


Figura 6.52 Imagem girada da microalga teste e histograma do nível de intensidade da imagem.

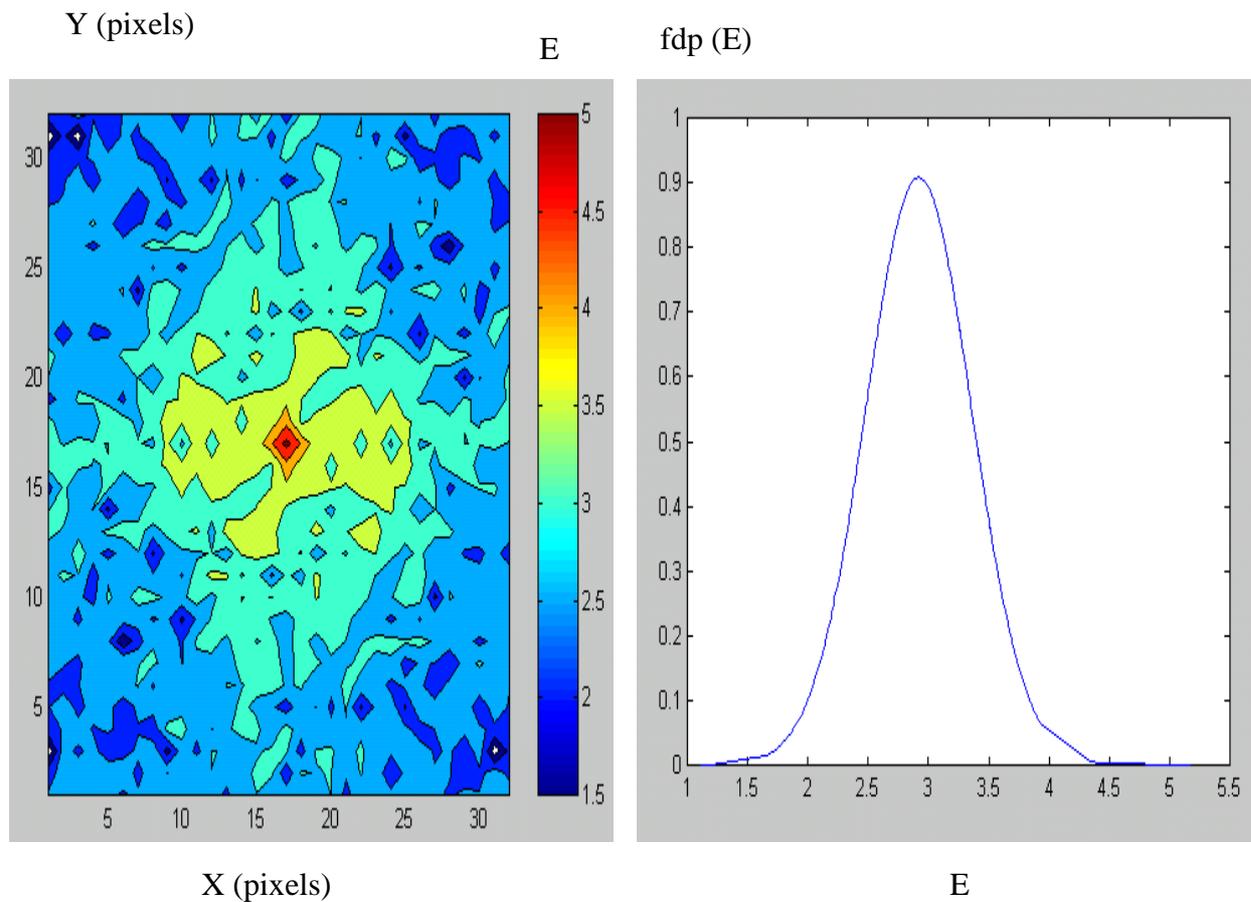


Figura 6.53 Quantificação do espectro de Fourier e Função densidade de probabilidade normal (fdp) do espectro de potência de Fourier (E).

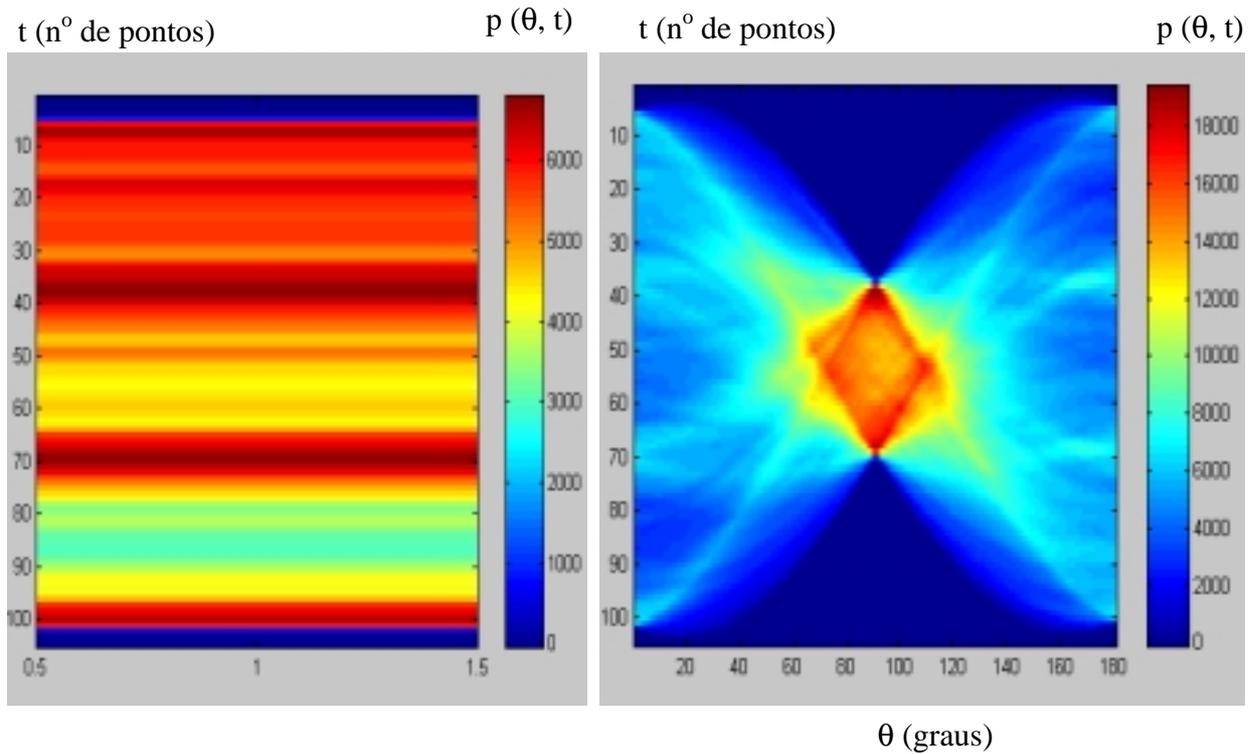


Figura 6.54 Transformada RADON ( $p(\theta)$ ) da microalga teste:  $\theta = 0^\circ$  e  $\theta = 0^\circ : 180$

Tabela 6.1 – Indicadores das grandezas geométricas (teste *Fibrocapsa japonica*)

Espécie	Área			Perímetro			Xmax			Xmin		
	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	$V_{tg}$	I									
<i>Amphidinium operculatum</i>	421.06± 125.26	■	0	79.07± 15.56	■	0	27.07± 5.94	■	0	19.79± 3.02	■	0
<i>Chaetoceros sp.</i>	57.36± 50.84		0	48.23± 25.72		0	12.21± 6.46		0	6.77± 3.50		0
<i>Fibrocapsa japonica</i>	1058.86± 531.76	1325.00	1	150.37± 64.98	202.75	1	47.10± 15.56	51.08	1	28.64± 8.80	34.93	1
<i>Isochrysis galbana</i>	67.47± 46.24		0	42.42± 16.94		0	11.04± 3.64		0	8.37± 2.56		0
<i>Tetraselmis chuii</i>	260.27± 97.12		0	62.35± 21.24		0	20.81± 5.16		0	15.03± 3.74		0

Tabela 6.1 continuação – Indicadores das grandezas geométricas (teste *Fibrocapsa japonica*)

Espécie	Elongação			Esfericidade			DFeret			Compactação			ΣIg
	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	
<i>Amphidinium operculatum</i>	1.372± 0.308	1.46	1	0.849± 0.174		0	23.09± 3.46		0	0.857± 0.100	0.80	1	2
<i>Chaetoceros sp.</i>	1.751± 1.254	1.46	1	0.367± 0.354	0.41	1	8.36± 3.68		0	0.739± 0.252	0.80	1	3
<b><i>Fibrocapsa japonica</i></b>	1.669± 0.616	1.46	1	0.616± 0.286	0.41	1	36.44± 9.16	41.07	1	0.780± 0.112	0.80	1	<b>8</b>
<i>Isochrysis galbana</i>	1.323± 0.324	1.46	1	0.463± 0.294	0.41	1	9.15± 3.06		0	0.829± 0.102	0.80	1	3
<i>Tetraselmis chuii</i>	1.394± 0.322	1.46	1	0.860± 0.246		0	18.13± 3.36		0	0.874± 0.098	0.80	1	2

Tabela 6.2 – Indicadores relacionados à intensidade da imagem (teste *Fibrocapsa japonica*)

Espécie	Nível de Intensidade			Transformada Radon p (0°)			Transformada Radon p (0°: 180°)			FFT Log <sub>10</sub> (abs(FFT))			Σ I <sub>m</sub>
	Intervalo $\mu_p \pm \frac{\sigma_p}{2}$	V <sub>ti</sub> médio	I	Intervalo $\mu_p \pm \frac{\sigma_p}{2}$	V <sub>ti</sub> médio	I	Intervalo $\mu_p \pm \frac{\sigma_p}{2}$	V <sub>ti</sub> médio	I	Intervalo $\mu_p \pm \frac{\sigma_p}{2}$	V <sub>ti</sub> médio	I	
<i>Amphidinium operculatum</i>	157.81± 26.27	146	1	4595± 806	4722	1	4752± 1896	4722	1	2.77± 0.17	2.83	1	4
<i>Chaetoceros sp.</i>	127.58± 15.18		0	4606± 809	4722	1	4488± 1805	4722	1	2.50± 0.18		0	2
<b><i>Fibrocapsa japonica</i></b>	129.48± 22.21	146	1	4001± 786	4722	1	3987± 1599	4722	1	2.68± 0.16	2.83	1	<b>4</b>
<i>Isochrysis galbana</i>	103.26± 10.58		0	3739± 580		0	3727± 561		0	2.53± 0.19		0	0
<i>Tetraselmis chuii</i>	97.52± 15.05		0	3960± 672		0	3960± 636		0	2.51± 0.16		0	0

Tabela 6.3 – Indicadores das grandezas geométricas e relacionadas à intensidade da imagem (teste *Fibrocapsa japonica*)

Espécie	$\Sigma I_g$	$\Sigma I_m$	$\frac{\Sigma I =}{\Sigma I_g + \Sigma I_m}$
<i>Amphidinium operculatum</i>	2	4	6
<i>Chaetoceros sp.</i>	3	2	5
<b><i>Fibrocapsa japonica</i></b>	8	4	<b>12</b>
<i>Isochrysis galbana</i>	3	0	3
<i>Tetraselmis chuii</i>	2	0	2

Com base nas tabelas de indicadores apresentadas (tabs. 6.1 a 6.3) se verifica com o exemplo o reconhecimento da microalga *Fibrocapsa japonica*.

Da mesma forma, para as outras espécies, foram testados os indicadores. As figs. 6.55 a 6.57 mostram as microalgas selecionadas e as tabelas 6.4 a 6.9 apresentam o resultado do reconhecimento para os indicadores geométricos.



Figura 6.55 Imagem com teste de caracterização para microalga da espécie *Tetraselmis chuii*

Tabela 6.4 – Indicadores das grandezas geométricas (teste *Tetraselmis chuii*)

Espécie	Área			Perímetro			Xmax			Xmin		
	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I
<i>Amphidinium operculatum</i>	421.06± 125.26	█	0	79.07± 15.56	█	0	27.07± 5.94	█	0	19.79± 3.02	█	0
<i>Chaetoceros sp.</i>	57.36± 50.84		0	48.23± 25.72	53.44	1	12.21± 6.46	18.32	1	6.77± 3.50		0
<i>Fibrocapsa japonica</i>	1058.86± 531.76		0	150.37± 64.98		0	47.10± 15.56		0	28.64± 8.80		0
<i>Isochrysis galbana</i>	67.47± 46.24		0	42.42± 16.94	53.44	1	11.04± 3.64		0	8.37± 2.56		0
<b><i>Tetraselmis chuii</i></b>	260.27± 97.12	175.53	1	62.35± 21.24	53.44	1	20.81± 5.16	18.32	1	15.03± 3.74	11.96	1

Tabela 6.4 – Indicadores das grandezas geométricas (teste *Tetraselmis chuii*)-continuação

Espécie	Elongação			Esfericidade			DFeret			Compactação			ΣI <sub>g</sub>
	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	
<i>Amphidinium operculatum</i>	1.372± 0.308	1.53	1	0.849± 0.174	0.770	1	23.09± 3.46	█	0	0.857± 0.100	0.820	1	3
<i>Chaetoceros sp.</i>	1.751± 1.254	1.53	1	0.367± 0.354		0	8.36± 3.68		0	0.739± 0.252	0.820	1	4
<i>Fibrocapsa japonica</i>	1.669± 0.616	1.53	1	0.616± 0.286	0.770	1	36.44± 9.16		0	0.780± 0.112	0.820	1	3
<i>Isochrysis galbana</i>	1.323± 0.324	1.53	1	0.463± 0.294		0	9.15± 3.06		0	0.829± 0.102	0.820	1	3
<b><i>Tetraselmis chuii</i></b>	1.394± 0.322	1.53	1	0.860± 0.246	0.770	1	18.13± 3.36	14.95	1	0.874± 0.098	0.820	1	<b>8</b>



Figura 6.56 Imagem com teste de caracterização para microalga da espécie *Amphidinium operculatum*

Tabela 6.5 – Indicadores das grandezas geométricas (teste *Amphidinium operculatum*)

Espécie	Área			Perímetro			Xmax			Xmin		
	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I
<i>Amphidinium operculatum</i>	421.06± 125.26	351.00	1	79.07± 15.56	87.01	1	27.07± 5.94	25.00	1	19.79± 3.02	20.00	1
<i>Chaetoceros sp.</i>	57.36± 50.84		0	48.23± 25.72		0	12.21± 6.46		0	6.77± 3.50		0
<i>Fibrocapsa japonica</i>	1058.86± 531.76		0	150.37± 64.98	87.01	1	47.10± 15.56		0	28.64± 8.80	20.00	1
<i>Isochrysis galbana</i>	67.47± 46.24		0	42.42± 16.94		0	11.04± 3.64		0	8.37± 2.56		0
<i>Tetraselmis chuii</i>	260.27± 97.12	351.00	1	62.35± 21.24		0	20.81± 5.16	25.00	1	15.03± 3.74		0

Tabela 6.5 – Indicadores das grandezas geométricas (teste *Amphidinium operculatum*)-contin.

Espécie	Elongação			Esfericidade			DFeret			Compactação			Σ Ig
	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	
<b><i>Amphidinium operculatum</i></b>	1.372± 0.308	1.25	1	0.849± 0.174	0.68	1	23.09± 3.46	21.14	1	0.857± 0.100	0.85	1	8
<i>Chaetoceros sp.</i>	1.751± 1.254	1.25	1	0.367± 0.354	0.68	1	8.36± 3.68		0	0.739± 0.252	0.85	1	3
<i>Fibrocapsa japonica</i>	1.669± 0.616	1.25	1	0.616± 0.286	0.68	1	36.44± 9.16		0	0.780± 0.112	0.85	1	5
<i>Isochrysis galbana</i>	1.323± 0.324	1.25	1	0.463± 0.294	0.68	1	9.15± 3.06		0	0.829± 0.102	0.85	1	3
<i>Tetraselmis chuii</i>	1.394± 0.322	1.25	1	0.860± 0.246	0.68	1	18.13± 3.36	21.14	1	0.874± 0.098	0.85	1	6

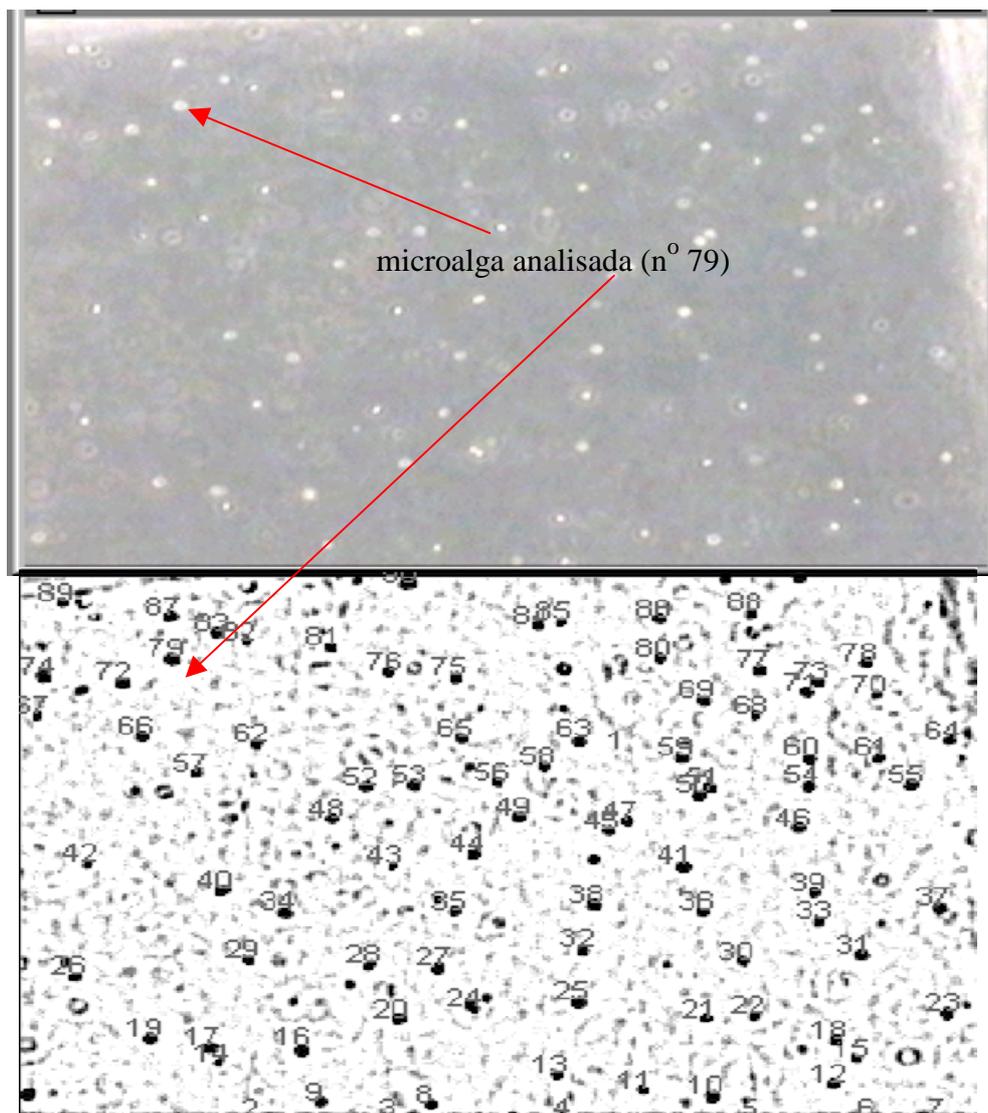


Figura 6.57 Imagens com teste de caracterização para microalga da espécie *Isochrysis galbana*

Espécie	Área			Perímetro			Xmax			Xmin		
	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I
<i>Amphidinium operculatum</i>	421.06± 125.26	■	0	79.07± 15.56	■	0	27.07± 5.94	■	0	19.79± 3.02	■	0
<i>Chaetoceros sp.</i>	57.36± 50.84	30.00	1	48.23± 25.72	33.31	1	12.21± 6.46	7.4	1	6.77± 3.50	5.81	1
<i>Fibrocapsa japonica</i>	1058.86± 531.76		0	150.37± 64.98		0	47.10± 15.56		0	28.64± 8.80		0
<i>Isochrysis galbana</i>	67.47± 46.24	30.00	1	42.42± 16.94	33.31	1	11.04± 3.64	7.4	1	8.37± 2.56	5.81	1
<i>Tetraselmis chuii</i>	260.27± 97.12		0	62.35± 21.24		0	20.81± 5.16		0	15.03± 3.74		0

Espécie	Elongação			Esfericidade			DFeret			Compactação			ΣIg
	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	Intervalo $\mu_p \pm 2\sigma_p$	V <sub>tg</sub>	I	
<i>Amphidinium operculatum</i>	1.372± 0.308	1.274	1	0.849± 0.174	■	0	23.09± 3.46	■	0	0.857± 0.100	0.835	1	2
<i>Chaetoceros sp.</i>	1.751± 1.254	1.274	1	0.367± 0.354	0.34	1	8.36± 3.68	6.18	1	0.739± 0.252	0.835	1	8
<i>Fibrocapsa japonica</i>	1.669± 0.616	1.274	1	0.616± 0.286	0.34	1	36.44± 9.16		0	0.780± 0.112	0.835	1	3
<i>Isochrysis galbana</i>	1.323± 0.324	1.274	1	0.463± 0.294	0.34	1	9.15± 3.06	6.18	1	0.829± 0.102	0.835	1	8
<i>Tetraselmis chuii</i>	1.394± 0.322	1.274	1	0.860± 0.246		0	18.13± 3.36		0	0.874± 0.098	0.835	1	2

Tabela 6.6 – Indicadores das grandezas geométricas (teste *Isochrysis galbana*)Tabela 6.6 – Indicadores das grandezas geométricas (teste *Isochrysis galbana*) cont.

Os resultados da tabela 6.6 mostram que as espécies *Chaetoceros sp.* e *Isochrysis galbana* se confundem geometricamente, devido à dispersão dos dados da espécie *Chaetoceros sp.*, conforme se observa nos gráficos da função densidade de probabilidade normal (fdp) das grandezas geométricas (figs. 6.27 a 6.34).

No entanto, estas espécies podem ser facilmente separadas apenas com o nível de intensidade da imagem, conforme mostram os gráficos da função densidade de probabilidade normal (fdp) da fig. 6.17.



### 6.3 RECONHECIMENTO DE PADRÕES DE MICROALGAS POR REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS: MÉTODOS AUTOMATIZADOS

Os métodos automatizados se referem à caracterização das espécies por aplicação de redes neurais artificiais a características geométricas e nível de intensidade de imagens padrão RGB.

#### 6.3.1. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DAS REDES GEOMETRIA PROPOSTAS

Conforme sessão 4.8, as redes neurais são treinadas e ensaiadas.

##### 1<sup>o</sup> ENSAIO REDE GEOMETRIA

No caso estudado os arquivos *entgeo* (arquivo texto com os neurônios de entrada) e *testegeo* (arquivo texto com os dados das variáveis geométricas das amostras a serem testadas) contém 50 linhas (50 amostras, 10 de cada espécie) e 8 colunas (8 características geométricas).

O sucesso da classificação das 5 espécies de microalgas pode ser medido comparando-se os valores desejados do arquivo texto *saigeo* contendo os valores esperados (-1 ou +1) e os valores obtidos no arquivo *sgeo* (arquivo texto com os neurônios de saída).

A tabela 6.7 mostra os resultados obtidos para as 50 amostras ensaiadas.

Em todas as tabelas A= *Amphidinium operculatum*- C=*Chaetoceros sp.*- F=*Fibrocapsa japonica* – I=*Isochrysis galbana* – T=*Tetraselmis chuii*.

Observe-se que na condição de reconhecimento, -1 corresponde a 0% e +1 a 100%. Os valores intermediários foram interpolados por interpolação linear.

A diminuição dos erros calculados é possível aumentando-se o n<sup>o</sup> de amostras ensaiadas e conseqüentemente o tempo de treinamento da rede exigindo o uso de um microcomputador mais rápido.

A observação das figs. 6.20 a 6.26 seção 6.2.3 justifica os resultados da tabela 6.7, já que mostram a dificuldade de conhecer-se funções de decisão com o conjunto de dados estudados (5 espécies de microalgas e 8 características geométricas). Com base nesta observação, foram testados agrupamentos das 8 características geométricas. A seleção dos agrupamentos foi feita a partir das figs. 6.27 a 6.34 da seção 6.2.3, que mostram a função distribuição de probabilidade (fdp) das grandezas geométricas características para um conjunto de amostras de cada espécie. O objetivo é procurar aumentar a % de acertos de cada espécie de microalgas.

Tabela 6.7. – 1<sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA - 8 variáveis geométricas

amostra	espécie	Arquivo saigeo.txt					Arquivo sgeo.txt					Condição de reconhecimento
		Valor desejado					Valor obtido					
1	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.9985</b>	-0.9996	-1.0000	-1.0000	-0.9985	sim 99.93%
2	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>1.0000</b>	-0.9998	-0.9996	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
3	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.9998</b>	-1.0000	-1.0000	-1.0000	-0.9998	sim 99.99%
4	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.9986</b>	-0.4382	-0.8610	-1.0000	-1.0000	sim 99.93%
5	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.0519</b>	-1.0000	-1.0000	-1.0000	0.0116	sim 52.60%
6	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.9619</b>	-0.9406	-0.2581	-1.0000	-1.0000	n
7	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.9993</b>	-1.0000	-1.0000	-1.0000	-0.9993	sim 99.97%
8	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>1.0000</b>	-0.9617	-0.9994	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
9	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>1.0000</b>	-0.9927	-0.9999	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
10	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>1.0000</b>	-0.9941	-0.9992	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
11	C	-1	1	-1	-1	-1	-0.9970	<b>1.0000</b>	-1.0000	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
12	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.0000	<b>1.0000</b>	-0.9098	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
13	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.0000	<b>1.0000</b>	-0.9999	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
14	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.0000	<b>-0.8656</b>	0.9993	-0.9998	-1.0000	n
15	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.0000	<b>0.9987</b>	-0.9292	-1.0000	-1.0000	sim 99.94%
16	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.0000	<b>1.0000</b>	-0.9984	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
17	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.0000	<b>-1.0000</b>	0.9941	-0.9998	-1.0000	n
18	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.0000	<b>-1.0000</b>	-0.9965	0.9998	-1.0000	n
19	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.0000	<b>1.0000</b>	-0.9988	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
20	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.0000	<b>-0.9996</b>	-0.9997	0.7508	-1.0000	n
21	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.9999	-0.9974	<b>0.9249</b>	-0.9993	-1.0000	sim 96.25%
22	F	-1	-1	1	-1	-1	-1.0000	-0.9205	<b>1.0000</b>	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
23	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.9995	-0.5105	<b>1.0000</b>	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
24	F	-1	-1	1	-1	-1	-1.0000	-0.9534	<b>-1.0000</b>	0.5326	-1.0000	n
25	F	-1	-1	1	-1	-1	-1.0000	-0.9930	<b>1.0000</b>	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
26	F	-1	-1	1	-1	-1	-1.0000	-1.0000	<b>0.7224</b>	-0.9812	-1.0000	sim 86.12%
27	F	-1	-1	1	-1	-1	-1.0000	-0.9968	<b>1.0000</b>	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
28	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.9999	-0.9927	<b>1.0000</b>	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
29	F	-1	-1	1	-1	-1	-1.0000	-0.9906	<b>1.0000</b>	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
30	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.9991	-0.4362	<b>1.0000</b>	-1.0000	-1.0000	sim 100.00%
31	I	-1	-1	-1	1	-1	-0.9989	1.0000	-1.0000	<b>-1.0000</b>	-1.0000	n
32	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.0000	1.0000	0.3050	<b>-1.0000</b>	-1.0000	n
33	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.0000	-0.9588	1.0000	<b>-1.0000</b>	-1.0000	n
34	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.0000	-1.0000	-1.0000	<b>0.9995</b>	-1.0000	sim 99.98%
35	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.0000	0.7090	0.7682	<b>-1.0000</b>	-1.0000	n
36	I	-1	-1	-1	1	-1	-0.9999	1.0000	0.9999	<b>-1.0000</b>	-1.0000	n
37	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.0000	-0.9970	-1.0000	<b>0.9283</b>	-1.0000	sim 96.42%
38	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.0000	0.9914	0.5624	<b>-0.9999</b>	-1.0000	n
39	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.0000	0.9997	-0.7171	<b>-0.9999</b>	-1.0000	n
40	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.0000	-1.0000	-1.0000	<b>0.9999</b>	-1.0000	sim 100.00%
41	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.9998	-0.9999	-1.0000	-1.0000	<b>0.9998</b>	sim 99.99%
42	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.9960	-1.0000	-1.0000	-1.0000	<b>0.9955</b>	sim 99.78%
43	T	-1	-1	-1	-1	1	-1.0000	-0.9975	-1.0000	-1.0000	<b>1.0000</b>	sim 100.00%
44	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.9824	-1.0000	-1.0000	-1.0000	<b>0.9800</b>	sim 99.00%
45	T	-1	-1	-1	-1	1	-1.0000	-0.9895	-1.0000	-1.0000	<b>1.0000</b>	sim 100.00%
46	T	-1	-1	-1	-1	1	-1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000	<b>1.0000</b>	sim 100.00%
47	T	-1	-1	-1	-1	1	-1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000	<b>1.0000</b>	sim 100.00%
48	T	-1	-1	-1	-1	1	-1.0000	-1.0000	-1.0000	-1.0000	<b>1.0000</b>	sim 100.00%
49	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.8923	-1.0000	-1.0000	-1.0000	<b>0.8743</b>	sim 93.72%
50	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.9999	-0.9586	-1.0000	-1.0000	<b>1.0000</b>	sim 100.00%

74% ACERTOS das amostras ( 90% A, 60% C, 90% F, 30% I, 100% T ).

2<sup>o</sup> ENSAIO REDE GEOMETRIA

A tabela 6.8 apresenta os resultados da **REDE GEOMETRIA**, agrupamento **Área**, **Perímetro**, **Esfericidade**, para reconhecimento das **5 espécies**.

Tabela 6.8 2<sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA - Agrupamento **Área**, **Perímetro**, **Esfericidade**

amostra	espécie	Arquivo saigeo.txt					Arquivo sgeo.txt					Condição de reconhecimento
		Valor desejado					Valor obtido					
1	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.9492</b>	-1	-1	-1	-0.9525	sim 97.46%
2	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	-0.9996	-1	-1	sim 100%
3	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.9759</b>	-1	-1	-1	-0.9811	sim 98.80%
4	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	-0.9991	-1	-1	sim 100%
5	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.9993</b>	-1	-1	-1	0.9989	n
6	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.9997</b>	-0.9336	-0.0471	-1	-1	n
7	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.4990</b>	-1	-1	-1	-0.4729	sim 74.95%
8	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	-1	-1	-1	sim 100%
9	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	-1	-1	-1	sim 100%
10	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	-1	-1	-1	sim 100%
11	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	-1	-1	sim 100%
12	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.9838</b>	-1	0.9998	-1	n
13	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-1</b>	-1	1	-1	n
14	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-1</b>	0.1401	0.4966	-1	n
15	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-1</b>	-1	1	-1	n
16	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.9995</b>	-1	0.9988	-1	n
17	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-1</b>	0.9964	-1	-1	n
18	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-1</b>	0.9885	-0.7778	-1	n
19	C	-1	1	-1	-1	-1	-0.9996	<b>1</b>	-1	-0.9771	-1	sim 100%
20	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.9994</b>	-0.5546	-0.9945	-1	n
21	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	-1	sim 100%
22	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.9765</b>	-0.9609	-1	sim 98.83%
23	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-0.9931	<b>0.6015</b>	-0.9146	-1	sim 80.05%
24	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-0.9999	<b>0.9990</b>	-0.9999	-1	sim 99.95%
25	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.7194</b>	0.9995	-1	n
26	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.0236</b>	-1	-1	sim 51.18%
27	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.9999</b>	0.9862	-1	n
28	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-1</b>	1	-1	n
29	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-1</b>	1	-1	n
30	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.9991</b>	-0.995	-1	sim 99.96%
31	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	0.8953	-1	<b>-0.5977</b>	-1	n
32	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	<b>-0.9998</b>	-1	n
33	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-0.8424	<b>-1</b>	-1	n
34	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	0.1037	-1	<b>1</b>	-1	sim 100%
35	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	0.9988	<b>-1</b>	-1	n
36	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-0.0888	-0.9872	<b>-0.9676</b>	-1	n
37	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	<b>-0.8436</b>	-1	n
38	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-0.0015	<b>0.9623</b>	-1	sim 98.12%
39	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-0.9996	-0.9882	<b>0.9748</b>	-1	sim 98.74%
40	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	0.4146	-1	<b>1</b>	-1	sim 100%
41	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	sim 100%
42	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.9988	-1	-1	-1	<b>0.9988</b>	sim 99.94%
43	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	sim 100%
44	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	sim 100%
45	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-0.9999	-1	-1	<b>1</b>	sim 100%
46	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	sim 100%
47	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	sim 100%
48	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	sim 100%
49	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.9999	-1	-1	-1	<b>0.9999</b>	sim 100%
50	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	sim 100%

60% ACERTOS das amostras ( 80% A, 20% C, 60% F, 40%I, 100% T)

## 3º ENSAIO REDE GEOMETRIA

A tabela 6.9 apresenta os resultados da REDE GEOMETRIA, **agrupamento Área, Perímetro, Diâmetro de Feret**, para reconhecimento das **5** espécies.

Tabela 6.9- 3º ensaio REDE GEOMETRIA - **Agupamento Área, Perímetro, Diâmetro de Feret**

amostra	espécie	Arquivo saigeo.txt Valor desejado					Arquivo sgeo.txt Valor obtido					Condição de reconhecimento
		1	-1	-1	-1	-1						
1	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999974</b>	-1.000000	-0.999952	-1.000000	-1.000000	Sim 99.99%
2	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999568</b>	-1.000000	-0.999370	-1.000000	-1.000000	Sim 99.98%
3	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999958</b>	-1.000000	-0.999894	-1.000000	-1.000000	Sim 99.99%
4	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.998523</b>	-1.000000	-0.997524	-1.000000	-1.000000	Sim 99.93%
5	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999852</b>	-1.000000	-0.999781	-1.000000	-1.000000	Sim 99.99%
6	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.000000	<b>0.999856</b>	-1.000000	-0.999881	-1.000000	Sim 99.99%
7	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.000000	<b>-1.000000</b>	-1.000000	1.000000	-1.000000	Não
8	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.000000	<b>1.000000</b>	-1.000000	-1.000000	-1.000000	Sim 100%
9	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.000000	<b>1.000000</b>	-1.000000	-1.000000	-1.000000	Sim 100%
10	C	-1	1	-1	-1	-1	-1.000000	<b>-1.000000</b>	-1.000000	1.000000	-1.000000	Não
11	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.999732	-1.000000	<b>0.999692</b>	-0.999999	-0.999999	Sim 99.98%
12	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.999989	-1.000000	<b>0.999995</b>	-0.999987	-0.999976	Sim 99.99%
13	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.999998	-1.000000	<b>0.999998</b>	-1.000000	-0.999999	Sim 99.99%
14	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.998528	-1.000000	<b>0.998926</b>	-0.999999	-0.999995	Sim 99.95%
15	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.999998	-1.000000	<b>0.999996</b>	-1.000000	-1.000000	Sim 99.99%
16	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.000000	-1.000000	-1.000000	<b>1.000000</b>	-1.000000	Sim 100%
17	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.000000	-1.000000	-1.000000	<b>1.000000</b>	-1.000000	Sim 100%
18	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.000000	1.000000	-1.000000	<b>-1.000000</b>	-1.000000	Não
19	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.000000	0.999032	-1.000000	<b>-0.999239</b>	-1.000000	Não
20	I	-1	-1	-1	1	-1	-1.000000	-1.000000	-1.000000	<b>1.000000</b>	-1.000000	Sim 100%
21	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.999999	-1.000000	-0.999999	-1.000000	<b>0.792618</b>	Sim 89.63%
22	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.999989	-1.000000	-0.999999	-1.000000	<b>0.267882</b>	Sim 63.39%
23	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.999999	-1.000000	-0.999999	-1.000000	<b>0.913739</b>	Sim 95.69%
24	T	-1	-1	-1	-1	1	0.991613	-1.000000	-0.999992	-1.000000	<b>-1.000000</b>	Não
25	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.999999	-1.000000	-0.999999	-1.000000	<b>0.155593</b>	Sim 57.78%

80% ACERTOS das amostras ( 100% A, 60% C, 100% F, 60% I, 80%T)

4<sup>o</sup> ENSAIO REDE GEOMETRIA

A tabela 6.10 apresenta os resultados da REDE GEOMETRIA, **agrupamento Xmin, Elongação e Compactação**, para reconhecimento das 5 espécies.

Tabela 6.10 - 4<sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA - **Agupamento Xmin, Elongação e Compactação**

amostra	espécie	Arquivo saigeo.txt					Arquivo sgeo.txt					Condição de reconhecimento
		Valor desejado					Valor obtido					
1	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999995</b>	-1	-0.99999	-1	-1	Sim 100%
2	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999998</b>	-1	-1	-1	-1	Sim 100%
3	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999997</b>	-1	-0.99999	-1	-0.99999	Sim 100%
4	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999999</b>	-1	-0.99998	-1	-1	Sim 100%
5	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999999</b>	-1	-0.99999	-1	-1	Sim 100%
6	C	-1	1	-1	-1	-1	-0.99997	<b>0.993236</b>	-1	-0.98412	-1	Sim 99.66%
7	C	-1	1	-1	-1	-1	-0.99999	<b>1</b>	-1	-1	-1	Sim 100%
8	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.99999</b>	-1	0.999994	-1	Não
9	C	-1	1	-1	-1	-1	-0.99989	<b>1</b>	-1	-1	-1	Sim 100.00%
10	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.9999</b>	-1	0.999967	-1	Não
11	F	-1	-1	1	-1	-1	0.999514	-1	<b>-0.99772</b>	-1	-1	Não
12	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.99953	-1	<b>0.999604</b>	-1	-1	Sim 99.98%
13	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.99996	-1	<b>0.999976</b>	-1	-1	Sim 100%
14	F	-1	-1	1	-1	-1	0.999255	-1	<b>-0.99669</b>	-1	-1	Não
15	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.99913	-1	<b>0.999566</b>	-1	-1	Sim 99.98%
16	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	0.939239	-1	<b>-0.86731</b>	-1	Não
17	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	0.985614	-1	<b>-0.97029</b>	-1	Não
18	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-0.99998	-1	<b>0.999991</b>	-1	Sim 100%
19	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-0.9993	-1	<b>0.99977</b>	-1	Sim 99.99%
20	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-0.9998	-1	<b>0.999959</b>	-1	Sim 100%
21	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-0.99939	-1	-1	<b>0.999993</b>	Sim 100%
22	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-0.99992	-1	-1	<b>0.999995</b>	Sim 100%
23	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-0.99813	-1	-1	<b>0.999931</b>	Sim 100%
24	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.99981	-0.99997	-1	-1	<b>0.998913</b>	Sim 99.95%
25	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.99999	-0.99989	-1	-0.99988	<b>-0.54201</b>	Sim 22.90%

76% ACERTOS das amostras ( 100% A, 60% C, 60% F, 60% I, 100%T)

5<sup>o</sup> ENSAIO REDE GEOMETRIA

Uma forma de aumentar a % de reconhecimento das amostras é apresentar as amostras das espécies alternativamente, para que no treinamento da rede as espécies anteriormente apresentadas “não sejam esquecidas”.

A tabela 6.11 apresenta os resultados da REDE GEOMETRIA, **agrupamento Área, Perímetro, Diâmetro de Feret**, para reconhecimento das **5** espécies. Neste ensaio, as amostras das espécies apresentadas **alternadamente** no treinamento e no ensaio.

Tabela 6.11 - 5<sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA -**Agrupamento Área, Perímetro, Diâmetro de Feret** – Espécies alternadas

amostra	espécie	Arquivo saigeo.txt Valor desejado					Arquivo sgeo.txt Valor obtido					Condição de reconhecimento
		1	-1	-1	-1	-1	0.999987	-1	-0.99964	-1	-1	
1	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999987</b>	-1	-0.99964	-1	-1	Sim 100%
2	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999999</b>	-0.99999	-1	-1	Sim 100%
3	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.998	-1	<b>0.998808</b>	-0.99991	-0.99998	Sim 99.94%
4	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-0.99998	1	-1	Sim 100%
5	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.99997	-1	-0.99999	-1	<b>0.035419</b>	Sim 51.77%
6	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999843</b>	-1	-0.99591	-1	-1	Sim 99.99%
7	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999973</b>	-0.99999	-1	-1	Sim 100%
8	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.99986	-1	<b>0.999896</b>	-0.99969	-0.99994	Sim 99.99%
9	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-0.99998	1	-1	Sim 100%
10	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.99918	-1	-0.99998	-1	<b>0.32821</b>	Sim 66.41%
11	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999975</b>	-1	-0.99919	-1	-1	Sim 100%
12	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999995</b>	-0.99998	-0.99999	-1	Sim 100%
13	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.9999	-1	<b>0.999908</b>	-0.9999	-0.99997	Sim 100%
14	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	<b>0.999994</b>	-0.99999	-0.99999	-1	Não
15	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.99997	-1	-0.99999	-1	<b>0.908482</b>	Sim 95.42%
16	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999393</b>	-1	-0.98688	-1	-1	Sim 99.97%
17	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999995</b>	-0.99999	-1	-1	Sim 100%
18	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.99186	-1	<b>0.996495</b>	-0.99991	-0.99998	Sim 99.82%
19	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-0.99999	-1	-1	Não
20	T	-1	-1	-1	-1	1	<b>0.982747</b>	-1	-0.99995	-1	-0.99973	Não
21	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999949</b>	-1	-0.99844	-1	-1	Sim 100%
22	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	-0.98966	-0.99998	<b>0.963595</b>	-1	Não
23	F	-1	-1	1	-1	-1	-0.99846	-0.99998	<b>0.999951</b>	-1	-1	Sim 100%
24	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-0.99999	-0.99998	<b>0.999987</b>	-1	Sim 100%
25	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.99968	-1	-0.99998	-1	<b>-0.97893</b>	Sim 1.05%

84% ACERTOS das amostras (100% A, 80% C, 100% F, 60% I, 80% T)

6<sup>o</sup> ENSAIO REDE GEOMETRIA

A tabela 6.12 apresenta os resultados da REDE GEOMETRIA, **agrupamento Área, Perímetro, Esfericidade**, para reconhecimento das 5 espécies. Neste ensaio, as amostras das espécies apresentadas **alternadamente** no treinamento e no ensaio.

Tabela 6.12 - 6<sup>o</sup> ensaio REDE GEOMETRIA - **Agupamento Área, Perímetro, Esfericidade**  
**Espécies alternadas**

amostra	espécie	Arquivo saigeo.txt Valor desejado					Arquivo sgeo.txt Valor obtido					Condição de reconhecimento
		1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.999035	-0.09735	-1	
1	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.99996</b>	-1	0.999035	-0.09735	-1	Não
2	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-0.99995</b>	-1	0.999958	-1	Não
3	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999999</b>	-0.99999	-1	Sim 100%
4	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	Sim 100%
5	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-0.99998	<b>0.999998</b>	Sim 100%
6	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999714</b>	-1	-1	-1	-0.99966	Sim 99.99%
7	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>-1</b>	-1	0.999757	-0.64599	Não
8	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-0.99999	-1	Sim 100%
9	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-0.99998	-1	<b>0.999954</b>	-1	Sim 100%
10	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.99998	-1	-1	-0.99999	<b>0.999985</b>	Sim 100%
11	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999997</b>	-1	-0.99999	-1	-1	Sim 100%
12	C	-1	1	-1	-1	-1	-0.99997	<b>-0.99963</b>	-1	0.998039	-0.99993	Não
13	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-0.99999	-1	Sim 100%
14	I	-1	-1	-1	1	-1	-0.99999	0.99977	-1	<b>-0.99967</b>	-1	Não
15	T	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-0.99999	<b>0.999997</b>	Sim 100%
16	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999998</b>	-1	-0.99999	-1	-1	Sim 100%
17	C	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999798</b>	-0.99993	-0.99968	-1	Sim 99.99%
18	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-0.99998	-1	Sim 100%
19	I	-1	-1	-1	1	-1	-1	-0.99998	-1	<b>0.999984</b>	-1	Sim 100%
20	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.44434	-1	-1	-1	<b>0.590515</b>	Sim 79.53%
21	A	1	-1	-1	-1	-1	<b>0.999999</b>	-1	-1	-1	-1	Sim 100%
22	C	-1	1	-1	-1	-1	-0.99998	<b>0.999773</b>	-1	-0.99982	-1	Sim 99.99%
23	F	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-0.99996	-1	Sim 100%
24	I	-1	-1	-1	1	-1	-0.99998	0.999055	-1	<b>-0.99974</b>	-1	Não
25	T	-1	-1	-1	-1	1	-0.99999	-1	-1	-0.99999	<b>0.999993</b>	Sim 100%

76% ACERTOS das amostras ( 80% A, 40% C, 100% F, 60% I, 100%T)

Para 50 amostras com espécies **alternadas**, o ensaio da REDE GEOMETRIA, **agrupamento Área, Perímetro, Esfericidade para 5 espécies** apresentou **68% ACERTOS das amostras (60% A, 30% C, 90% F, 60% I, 100%T)**. Esta variação da % de acertos se deve à maior dispersão dos valores das grandezas características, quando são apresentadas à rede um maior número de amostras.

### 6.3.2. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DAS REDES IMAGEM PROPOSTAS

#### 1<sup>o</sup> ENSAIO REDE IMAGEM

##### ENSAIO DE RECONHECIMENTO DE 5 ESPÉCIES

Com o arquivo *entimagem* foram ensaiadas 70 amostras sendo 18 amostras de *Amphidinium operculatum*, 21 de *Chaetoceros sp.*, 11 de *Fibrocapsa japonica*, 11 de *Isochrysis galbana* e 9 de *Tetraselmis chuii*.

Os arquivos *entimagem* e *testeimagem* contém 2240 linhas e 32 colunas (70 imagens de 32x32 pixels).

Para a montagem do arquivo *testeimagem* as 5 primeiras imagens do arquivo *entimagem* de amostras de *Amphidinium operculatum* foram substituídas por imagens **diferentes** de amostras de *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, *Fibrocapsa japonica*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*. Na seqüência, o arquivo *testeimagem* contém as **mesmas** imagens do arquivo *entimagem*: 13 amostras de *Amphidinium operculatum*, 21 de *Chaetoceros sp.*, 11 de *Fibrocapsa japonica*, 11 de *Isochrysis galbana* e 9 de *Tetraselmis chuii*.

O objetivo de manter um conjunto de imagens iguais no treinamento e no ensaio é verificar se a rede foi bem treinada. Para as imagens repetidas no treinamento e no ensaio o valor esperado no arquivo *simagem* é +1.

Para calcular-se o erro na classificação das amostras compara-se os arquivos *saiimagem* e *simagem*. O sucesso da classificação das 5 espécies de microalgas pode ser medido comparando-se os valores desejados do arquivo *saiimagem* contendo os valores esperados (-1 ou +1) e os valores obtidos no arquivo *simagem*.

Observe-se que na condição de reconhecimento, -1 corresponde a 0% e +1 a 100%. Os valores intermediários foram interpolados por interpolação linear.

A tabela 6.13 mostra a condição de reconhecimento para as 5 amostras **diferentes** ensaiadas.

Tabela 6.13 1<sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 5 espécies

A= *Amphidinium operculatum*- C=*Chaetoceros sp.*- F=*Fibrocapsa japonica* – I=*Isochrysis galbana* – T=*Tetraselmis chuii*

espécie	Arquivo saimagem.txt (valor esperado)					Arquivo simagem.txt (valor obtido)					Condição de reconhecimento
	A	<b>1</b>	-1	-1	-1	-1	-0.9904	-0.9996	-0.9999	-0.9998	
C	-1	<b>1</b>	-1	-1	-1	-0.9999	<b>0.9677</b>	-0.9218	-1.0000	-1.0000	Sim 98.39%
F	-1	-1	<b>1</b>	-1	-1	-0.9935	-0.9960	<b>0.1940</b>	-1.0000	-0.9984	Sim 59.70%
I	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	-1.0000	-0.9999	-0.9850	<b>0.9911</b>	-1.0000	Sim 99.56%
T	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	<b>0.9951</b>	-1.0000	-0.9998	-0.9895	-0.9999	não

## 2<sup>o</sup> ENSAIO REDE IMAGEM

### ENSAIO DE RECONHECIMENTO DE 4 ESPÉCIES

Com o arquivo *entimagem.txt* foram ensaiadas 59 amostras sendo 18 amostras de *Amphidinium operculatum*, 21 de *Chaetoceros sp.*, 11 de *Fibrocapsa japonica* e 9 de *Tetraselmis chuii*.

Os arquivos *entimagem* e *testeimagem* contém 1288 linhas e 32 colunas (59 imagens de 32x32 pixels).

Para a montagem do arquivo *testeimagem* as 4 primeiras imagens do arquivo *entimagem* de amostras de *Amphidinium operculatum* foram substituídas por imagens **diferentes** de amostras de *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, *Fibrocapsa japonica* e *Tetraselmis chuii*. Na seqüência, o arquivo *testeimagem* contém as **mesmas** imagens do arquivo *entimagem*: 14 amostras de *Amphidinium operculatum*, 21 de *Chaetoceros sp.*, 11 de *Fibrocapsa japonica*, e 9 de *Tetraselmis chuii*.

A tabela 6.14 mostra a condição de reconhecimento para as 4 amostras **diferentes** ensaiadas.

A partir dos resultados das tabelas 6.13 e 6.14 foram testados conjuntos de amostras envolvendo agrupamentos de 3 espécies.

Tabela 6.14 - 2<sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 4 espécies

A= *Amphidinium operculatum*- C=*Chaetoceros sp.*- F=*Fibrocapsa japonica* –T=*Tetraselmis chuii*

Espécie	Arquivo saiiagem.txt (valor esperado)				Arquivo simagem.txt (valor obtido)				Condição de reconhecimento
	A	<b>1</b>	-1	-1	-1	<b>-0.5703</b>	-0.999	-1	
C	-1	<b>1</b>	-1	-1	-1	<b>0.3373</b>	-0.943	-0.9999	Sim 66.87%
F	-1	-1	<b>1</b>	-1	-0.9325	-1	<b>0.4388</b>	-1	Sim 71.94%
T	-1	-1	-1	<b>1</b>	<b>0.9973</b>	-1	-1	-0.9997	não

### 3<sup>o</sup> ENSAIO REDE IMAGEM

**ENSAIO DE RECONHECIMENTO DE 3 ESPÉCIES:** *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, e *Fibrocapsa japonica*.

Com o arquivo *entimagem* foram ensaiadas 50 amostras sendo 18 amostras de *Amphidinium operculatum*, 21 de *Chaetoceros sp.* e 11 de *Fibrocapsa japonica*.

Os arquivos *entimagem* e *testeimagem* contém 1600 linhas e 32 colunas (50 imagens de 32x32 pixels).

Para a montagem do arquivo *testeimagem* as 3 primeiras imagens do arquivo *entimagem* de amostras de *Amphidinium operculatum* foram substituídas por imagens **diferentes** de amostras de *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.* e *Fibrocapsa japonica*.. Na seqüência, o arquivo *testeimagem* contém as **mesmas** imagens do arquivo *entimagem.txt*: 15 amostras de *Amphidinium operculatum*, 21 de *Chaetoceros sp.* e 11 de *Fibrocapsa japonica*.

A tabela 6.15 mostra a condição de reconhecimento para as 3 amostras **diferentes** ensaiadas.

Tabela 6.15 3<sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 3 espécies

A= *Amphidinium operculatum*- C=*Chaetoceros sp.*- F=*Fibrocapsa japonica* –

espécie	Arquivo saigeo.txt (valor esperado)			Arquivo sgeo.txt (valor obtido)			Condição de reconhecimento
	A	<b>1</b>	-1	-1	<b>0.2793</b>	-0.9308	
C	-1	<b>1</b>	-1	-0.9994	<b>0.4184</b>	-0.8750	Sim 70.92%
F	-1	-1	<b>1</b>	-0.8125	-0.9996	<b>0.6971</b>	Sim 84.86%

4<sup>o</sup> ENSAIO REDE IMAGEM

**ENSAIO DE RECONHECIMENTO DE 3 ESPÉCIES:** *Chaetoceros sp.*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*

Com o arquivo *entimagem* foram ensaiadas 41 amostras sendo 21 amostras de *Chaetoceros sp.*, 11 de *Isochrysis galbana* e 9 de *Tetraselmis chuii*.

Os arquivos *entimagem* e *testeimagem* contém 1312 linhas e 32 colunas (41 imagens de 32x32 pixels ).

Para a montagem do arquivo *testeimagem* as 3 primeiras imagens do arquivo *entimagem* de amostras de *Chaetoceros sp* foram substituídas por imagens **diferentes** de amostras de *Chaetoceros sp.*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*. Na seqüência, o arquivo *testeimagem* contém as **mesmas** imagens do arquivo *entimagem*: 18 amostras de *Chaetoceros sp*, 11 de *Isochrysis galbana* e 9 de *Tetraselmis chuii*.

A tabela 6.16 mostra a condição de reconhecimento para as 3 amostras **diferentes** ensaiadas.

Tabela 6.16 - 4<sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 41 imagens

C=*Chaetoceros sp*– I=*Isochrysis galbana* – T=*Tetraselmis chuii*

Espécie	Arquivo saigeo.txt (valor esperado)			Arquivo sgeo.txt (valor obtido)			Condição de reconhecimento
C	<b>1</b>	-1	-1	<b>1</b>	-1	-0.99	Sim 100%
I	-1	<b>1</b>	-1	-1	<b>1</b>	-1	Sim 100%
T	-1	-1	<b>1</b>	-1	-0.46	<b>0.46</b>	Sim 73%

As figs. 6.58 a 6.62 apresentam as imagens (32x32) usadas para treinamento da REDE IMAGEM. Em todas estas figuras as imagens das microalgas foram capturadas na MESMA POSIÇÃO que se encontravam quando observadas ao microscópio.

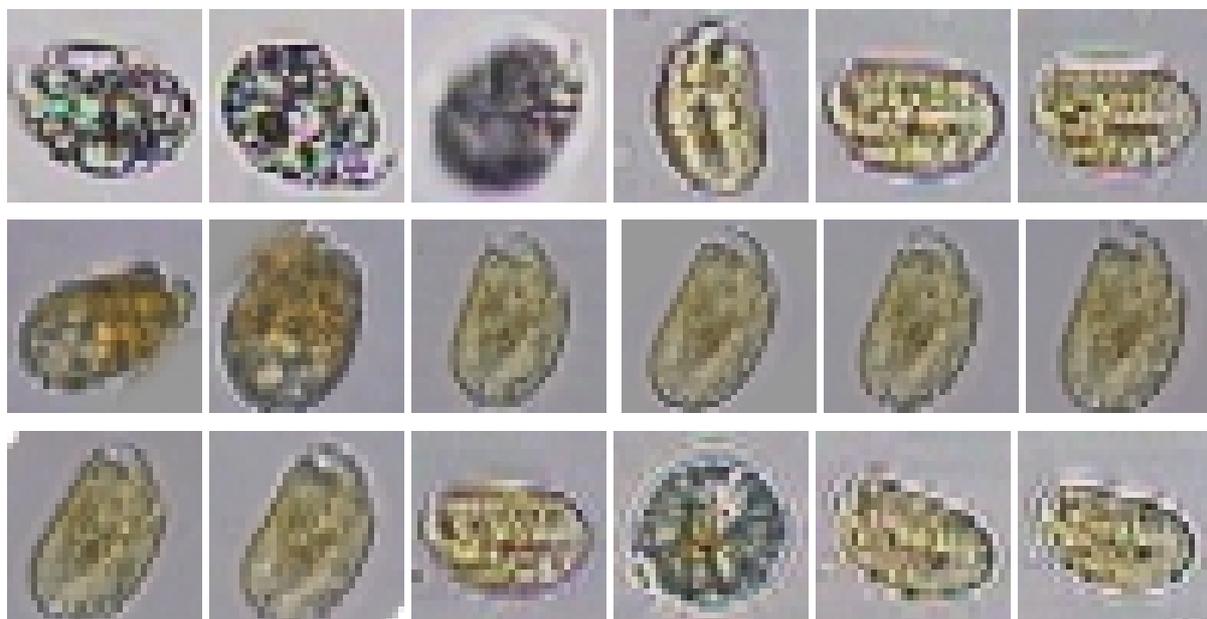


Figura 6.58 Imagens de microalgas da espécie *Amphidinium operculatum*

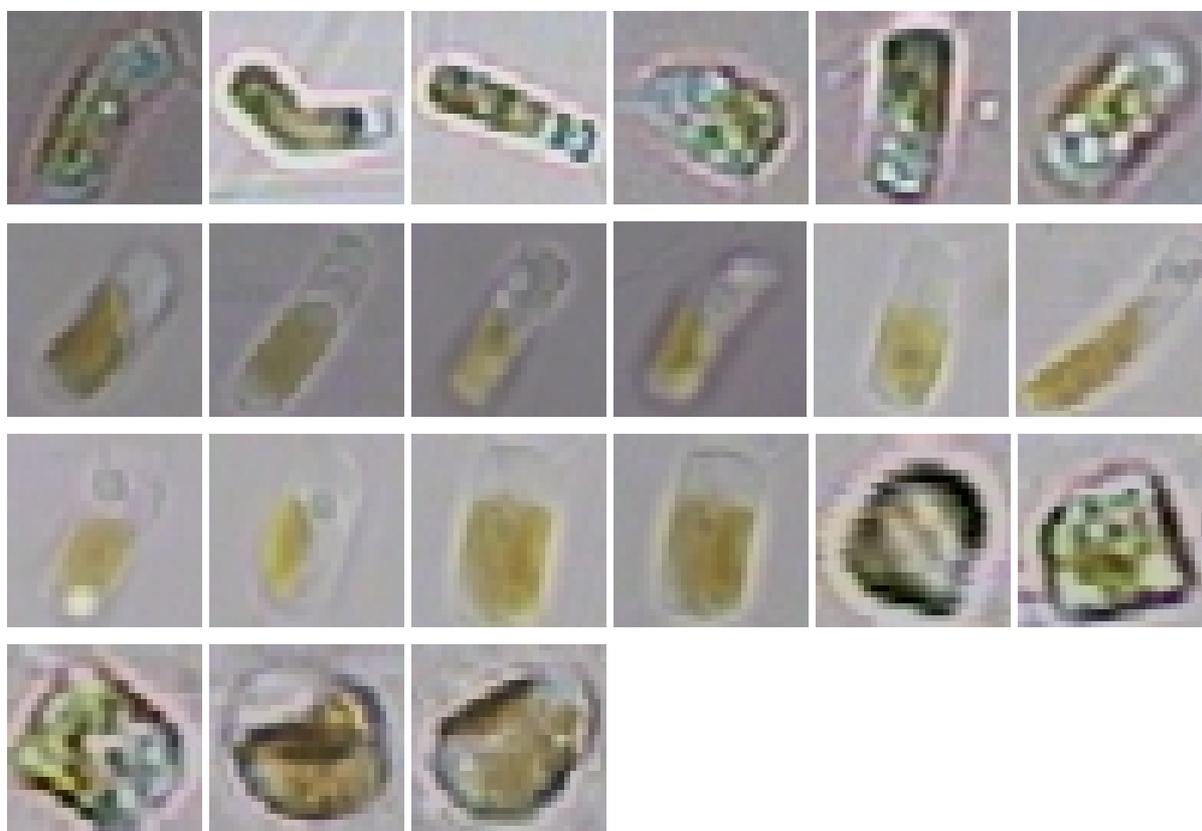


Figura 6.59 Imagens de microalgas da espécie *Chaetoceros sp.*

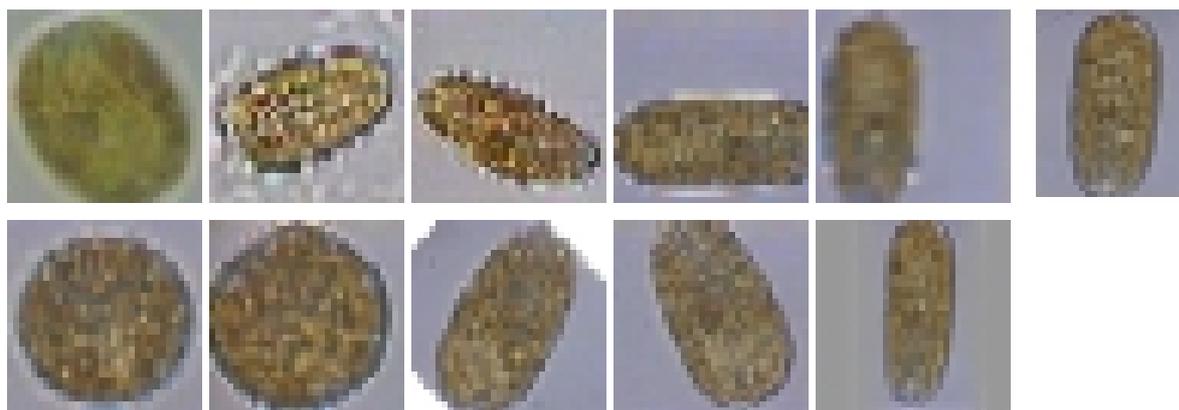


Figura 6.60 Imagens de microalgas da espécie *Fibrocapsa japonica*



Figura 6.61 Imagens de microalgas da espécie *Isochrysis galbana*

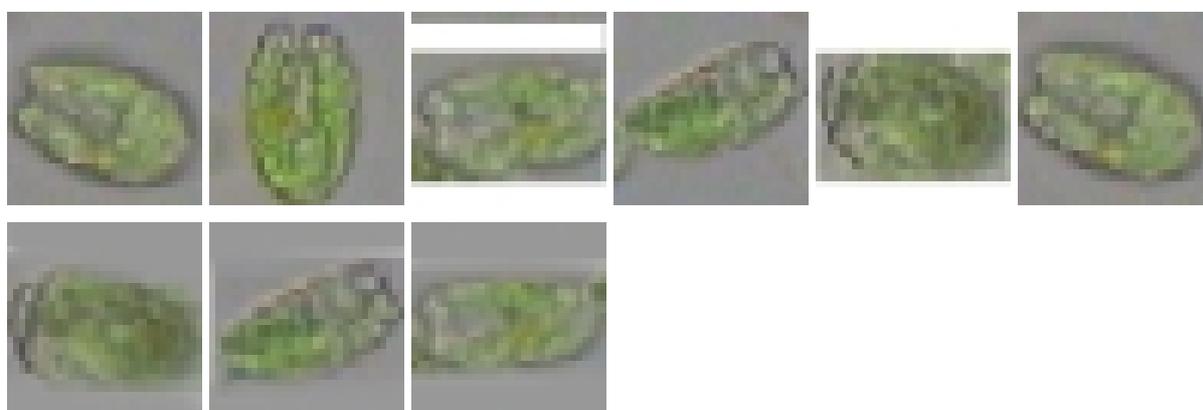


Figura 6.62 Imagens de microalgas da espécie *Tetraselmis chuii*

A fig. 6.63 apresenta as imagens (32x32) **diferentes** ensaiadas nos 4 ensaios da **REDE IMAGEM**.

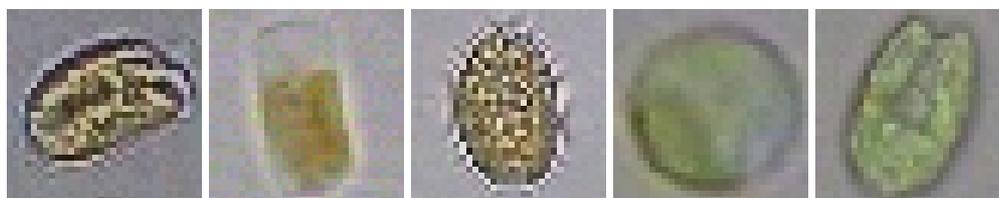


Figura 6.63 Imagens **diferentes** de microalgas da espécie *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp*, *Fibrocapsa japonica*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*

#### 5º ENSAIO REDE IMAGEM

#### ENSAIO DE RECONHECIMENTO DE 5 ESPÉCIES COM IMAGENS ROTACIONADAS

As figs. 6.64 a 6.68 apresentam as imagens ROTACIONADAS (32x32) usadas para treinamento da REDE IMAGEM.

A fig. 6.69 apresenta as imagens (32x32) **diferentes rotacionadas** utilizadas no 5º ensaio da REDE IMAGEM, conforme tabela 6.17.

Foram excluídas dos ensaios com imagens **rotacionadas** as 5 últimas imagens de microalgas da espécie *Chaetoceros sp.* da fig. 6.56, por terem sido observadas com aumento diferente em relação às outras imagens desta mesma figura.

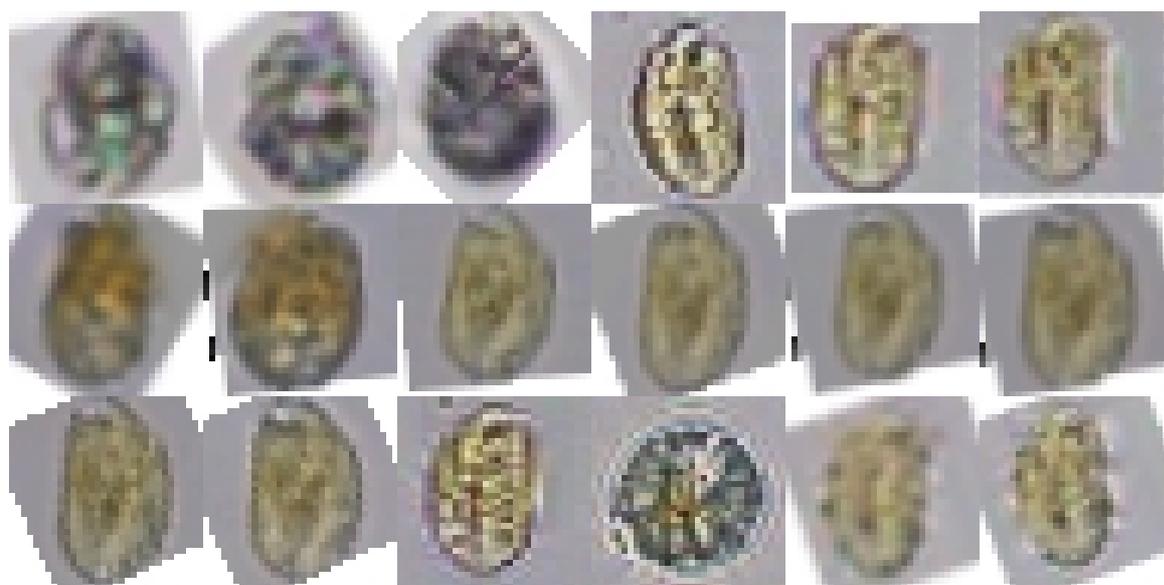


Figura 6.64 Imagens **rotacionadas** de microalgas da espécie *Amphidinium operculatum*



Figura 6.65 Imagens **rotacionadas** de microalgas da espécie *Chaetoceros sp.*



Figura 6.66 Imagens **rotacionadas** de microalgas da espécie *Fibrocapsa japonica*



Figura 6.67 Imagens **rotacionadas** de microalgas da espécie *Isochrysis galbana*

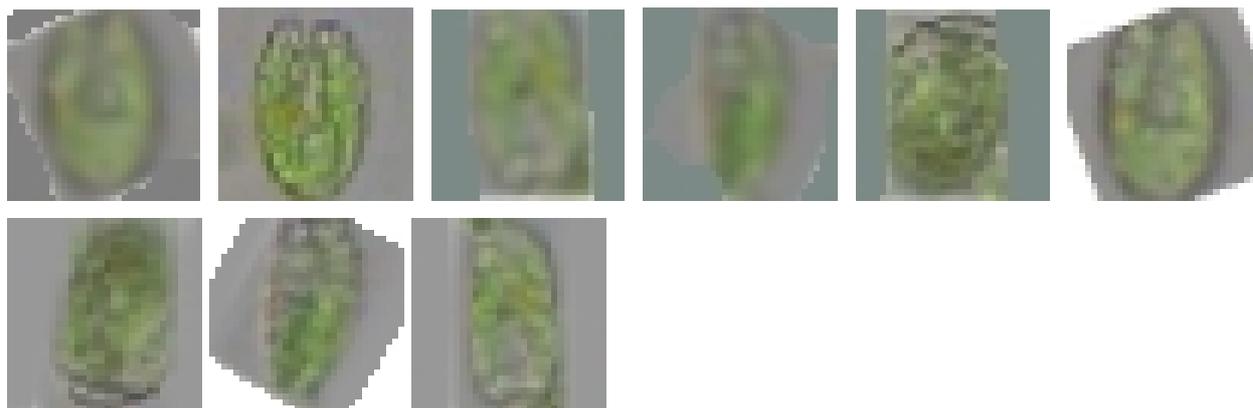


Figura 6.68 Imagens **rotacionadas** de microalgas da espécie *Tetraselmis chuii*

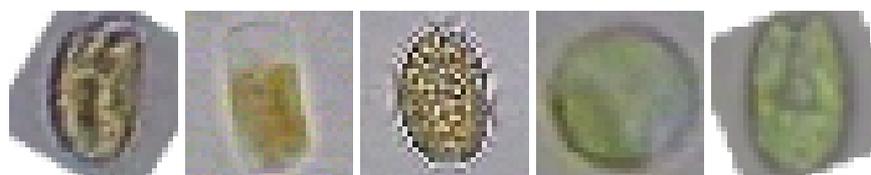


Figura 6.69 Imagens **rotacionadas diferentes** de microalgas da espécie *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, *Fibrocapsa japonica*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*

Com o arquivo *entimagem* foram ensaiadas 65 amostras **rotacionadas** sendo, pela ordem, 10 amostras de *Amphidinium operculatum*, 6 de *Chaetoceros sp.*, 3 de *Fibrocapsa japonica*, 5 de *Isochrysis galbana*, 8 de *Amphidinium operculatum*, 10 de *Chaetoceros sp.*, 8 de *Fibrocapsa japonica*, 6 de *Isochrysis galbana*, e 9 de *Tetraselmis chuii*.

Os arquivos *entimagem* e *testeimagem* contém 2080 linhas e 32 colunas (65 imagens de 32x32 pixels).

Para a montagem do arquivo *testeimagem* as 5 primeiras imagens do arquivo *entimagem* de amostras de *Amphidinium operculatum* foram substituídas por imagens **diferentes rotacionadas** de amostras de *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, *Fibrocapsa japonica*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*.

Na seqüência, o arquivo *testeimagem* contém as **mesmas** imagens do arquivo *entimagem*: 5 amostras de *Amphidinium operculatum*, 6 de *Chaetoceros sp.*, 3 de *Fibrocapsa japonica*, 5 de *Isochrysis galbana*, 8 de *Amphidinium operculatum*, 10 de *Chaetoceros sp.*, 8 de *Fibrocapsa japonica*, 6 de *Isochrysis galbana*, e 9 de *Tetraselmis chuii*.

A tabela 6.17 mostra a condição de reconhecimento para as 5 amostras **diferentes rotacionadas** ensaiadas. Para os resultados mostrados nesta tabela foram usados **4 neurônios intermediários**, tendo sido testados 2, 8, 16, 32 e 64 neurônios intermediários com piores resultados.

Tabela 6.17 5<sup>o</sup> ensaio REDE IMAGEM – Treinamento com 5 espécies

espécie	Arquivo saimagem.txt (valor esperado)					Arquivo sgeo.txt (valor obtido)					Condição de reconhecimento
	A	<b>1</b>	-1	-1	-1	-1	<b>0.99989</b>	-1.00000	-0.99940	-0.99997	
C	-1	<b>1</b>	-1	-1	-1	-1.00000	<b>0.99991</b>	-0.99835	-0.99997	-1.00000	Sim 100.00%
F	-1	-1	<b>1</b>	-1	-1	-0.95390	-0.99998	<b>0.89284</b>	-1.00000	-0.99995	Sim 94.64%
I	-1	-1	-1	<b>1</b>	-1	-0.99794	-0.97074	-1.00000	<b>0.99044</b>	-1.00000	Sim 99.52%
T	-1	-1	-1	-1	<b>1</b>	-0.96209	-1.00000	-1.00000	-0.89805	<b>0.93926</b>	Sim 96.96%

A partir dos resultados apresentados no 5<sup>o</sup> ensaio da **REDE IMAGEM** verifica-se a possibilidade de reconhecimento das **5** espécies de microalgas estudadas **rotacionando-as** de modo a serem treinadas e ensaiadas na mesma posição.

## 6.4. CAMPOS DE VELOCIDADES DE MICROALGAS EM IMAGENS MICROSCÓPICAS

### 6.4.1. DETERMINAÇÃO DOS CAMPOS DE VELOCIDADES

A fig. 6.70 apresenta a imagem de microalgas *Tetraselmis chuii* ( $\approx 15\mu\text{m}$ ) adquirida em microscópio com objetiva de 10X.

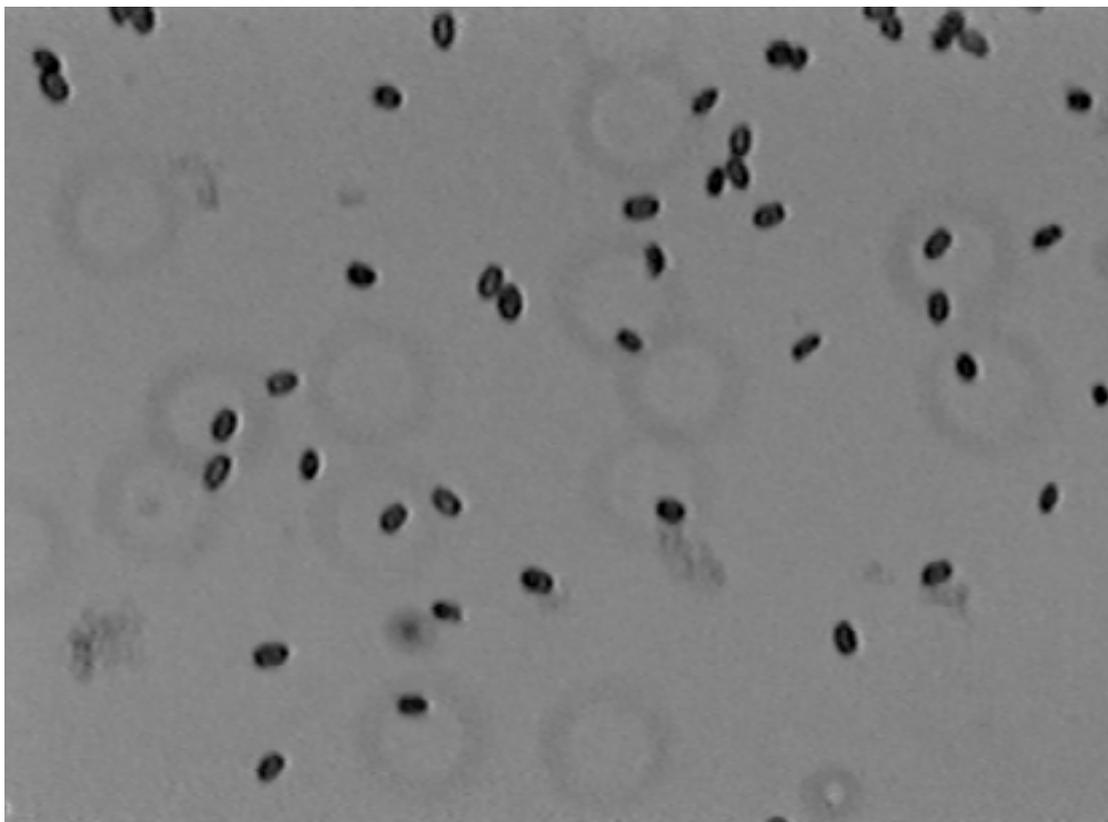


Figura 6.70 Imagem de microalgas *Tetraselmis chuii* observadas em microscópio

As figs. 6.71 a 6.75 mostram as imagens das microalgas em 5 instantes seqüenciais.

A fig. 6.76 apresenta os vetores velocidades de microalgas *Tetraselmis chuii*, durante um intervalo de tempo correspondente a estes 5 quadros (1,033 s).

A Tabela 6.18 lista as componentes dos vetores velocidades para as partículas consideradas válidas na região de busca (20x20 pixels) e as coordenadas do centro das partículas nestas regiões, calculadas pelo programa *FlowViewer* [Gutkoski, 2001]. Os valores das componentes  $u$  e  $v$  da velocidade em pixels/s, entre 2 imagens, são obtidos multiplicando-se por 30 os valores de  $\Delta x$  e  $\Delta y$ , respectivamente. Para obter-se  $u$  e  $v$  em  $\mu\text{m/s}$  multiplica-se os valores obtidos em pixels/s pelo fator de escala da imagem  $\mu\text{m/pixel}$ . No caso da imagem da fig.6.70,  $15\mu\text{m}$  correspondem a 20 pixels na direção horizontal e 26 pixels na direção vertical, conforme APÊNDICES I e II.

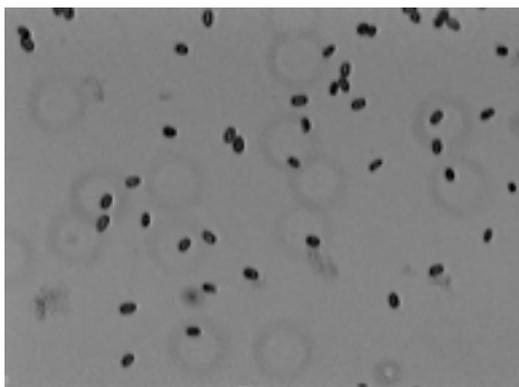


Figura 6.71 Tempo  $t_1=0.000s$

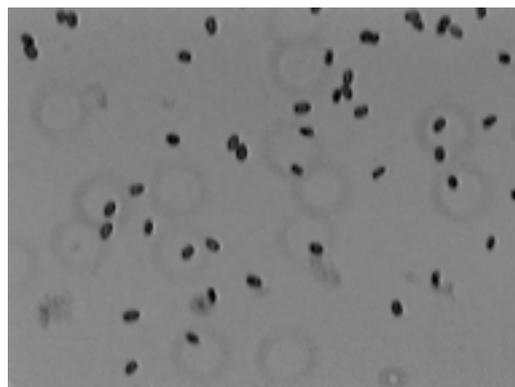


Figura 6.72-Tempo  $t_2=0,033s$

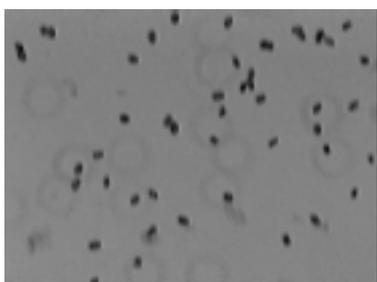


Figura 6.73 Tempo  $t_3=0.066s$

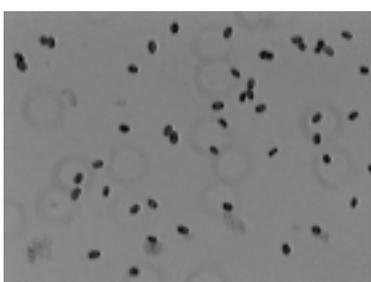


Figura 6.74 Tempo  $t_4=1.000s$

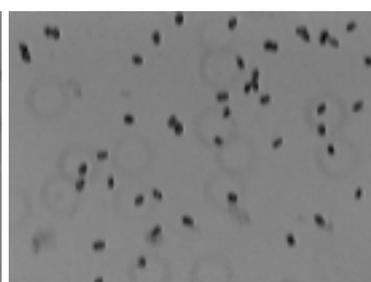


Figura 6.75 Tempo  $t_5=1.033s$

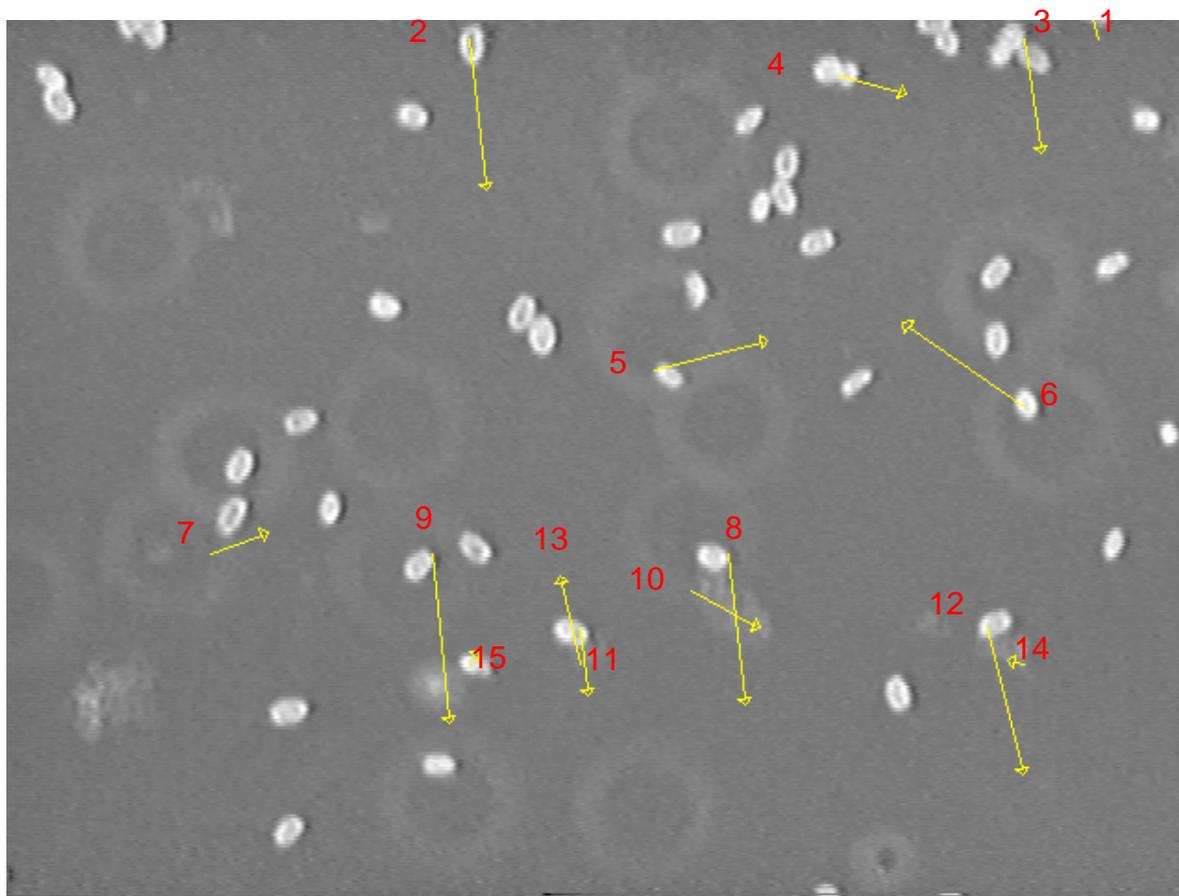


Figura 6.76 - Vetores velocidade das microalgas *Tetraselmis chuii*

Tabela 6.18 – Número de partículas válidas, deslocamentos, vetores velocidades e posição.

N <sup>o</sup> do vetor	Partículas válidas na região de busca no intervalo de 1.033s	$\Delta x$ (pixels)	$\Delta y$ (pixels)	$u$ (pixels/s)	$v$ (pixels/s)	Coordenadas do centro das partículas x (pixels)	Coordenadas do centro das partículas y (pixels)
1	1	-4	-13	-120	-390	594	0
2	2	3	16	90	480	251	13
		3	18	90	540	251	13
3	1	3	13	90	390	547	15
4	1	8	3	240	90	443	35
5	2	10	-20	300	-600	357	193
		16	12	480	360	357	193
6	1	-14	-10	-420	-300	551	208
7	2	9	-10	270	-300	119	281
		5	5	150	150	119	281
8	1	3	17	90	510	381	292
9	1	3	19	90	570	222	296
10	3	6	-2	180	-60	378	307
		1	8	30	240	378	307
		17	8	510	240	378	307
11	1	2	8	60	240	305	331
12	1	5	17	150	510	532	337
13	1	-3	-10	-90	-300	310	341
14	2	-10	-11	-300	-330	547	341
		6	11	180	330	547	341
15	1	2	-2	60	-60	253	349

De acordo com os resultados da Tabela 6.18, os valores absolutos das componentes da velocidade,  $u$  e  $v$ , variam de 60 a 600 pixels/s ou de 45 a 450  $\mu\text{m/s}$ , respectivamente. Para melhor observação dos resultados os vetores da tabela 6.18 estão numerados na fig. 6.76.

As figs. 6.77 a 6.79 apresentam o deslocamento das microalgas durante cada intervalo de tempo.

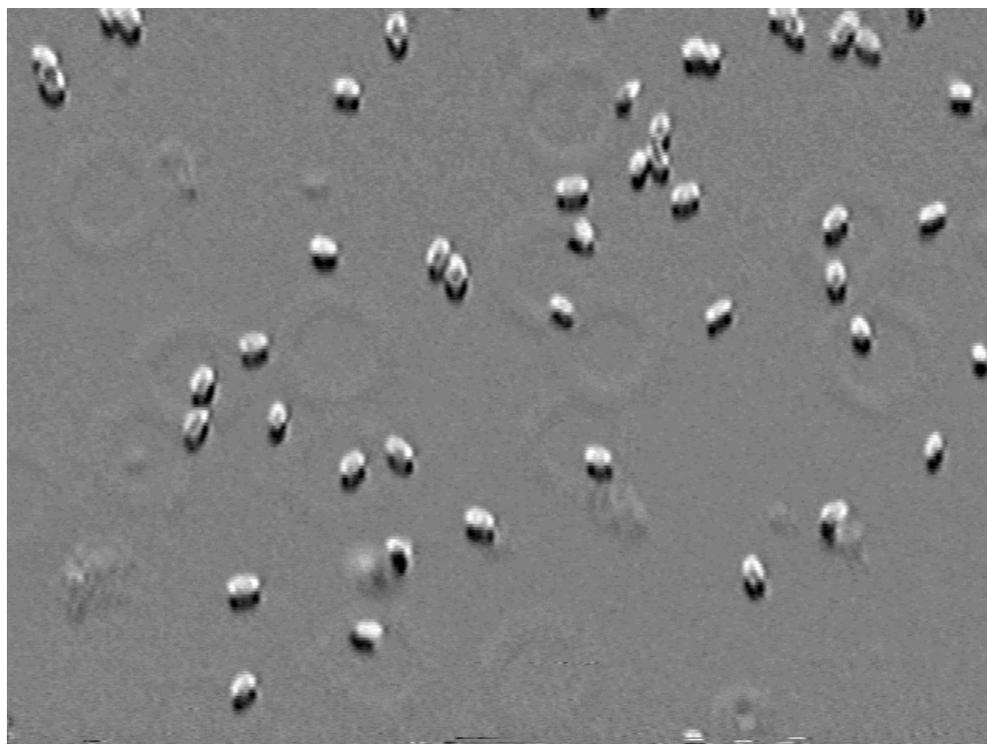


Figura 6.77 Deslocamento  $\Delta t=t_1-t_2$

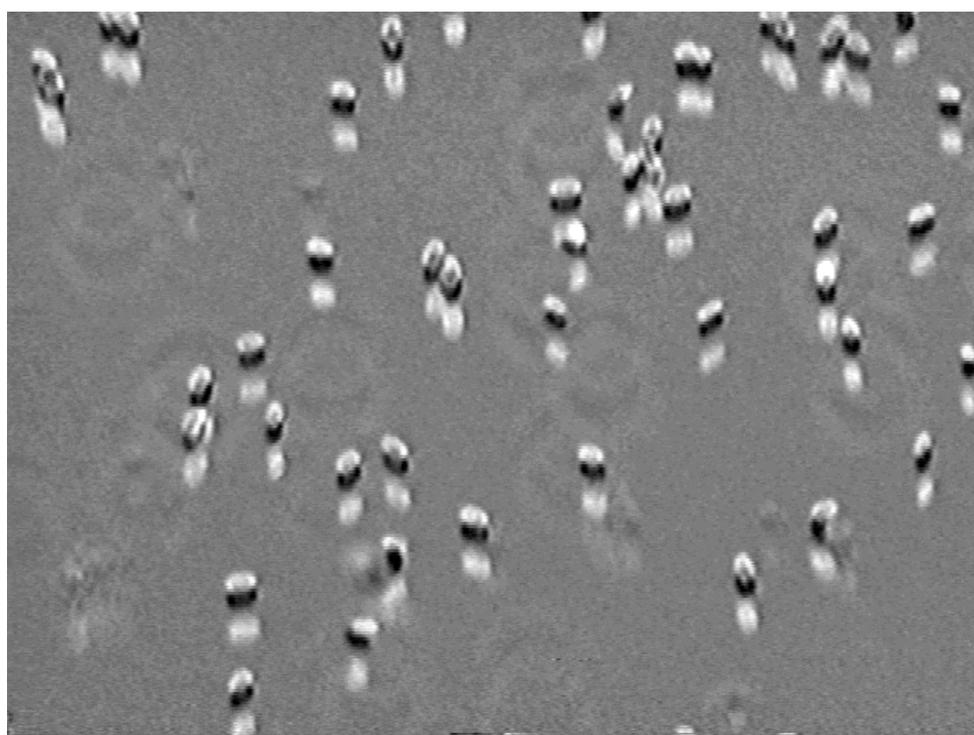


Figura 6.78 Deslocamento  $\Delta t=t_1-t_2-t_3$

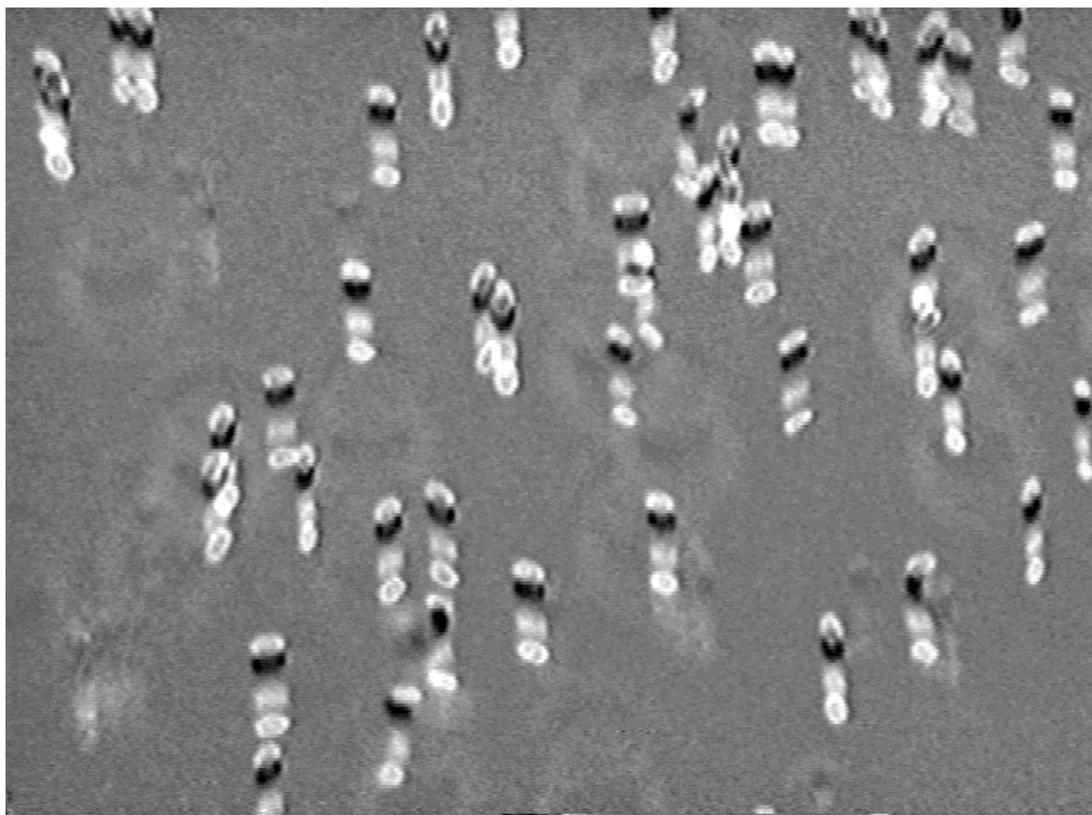


Figura 6.79 Deslocamento  $\Delta t=t_1-t_2-t_3-t_4$

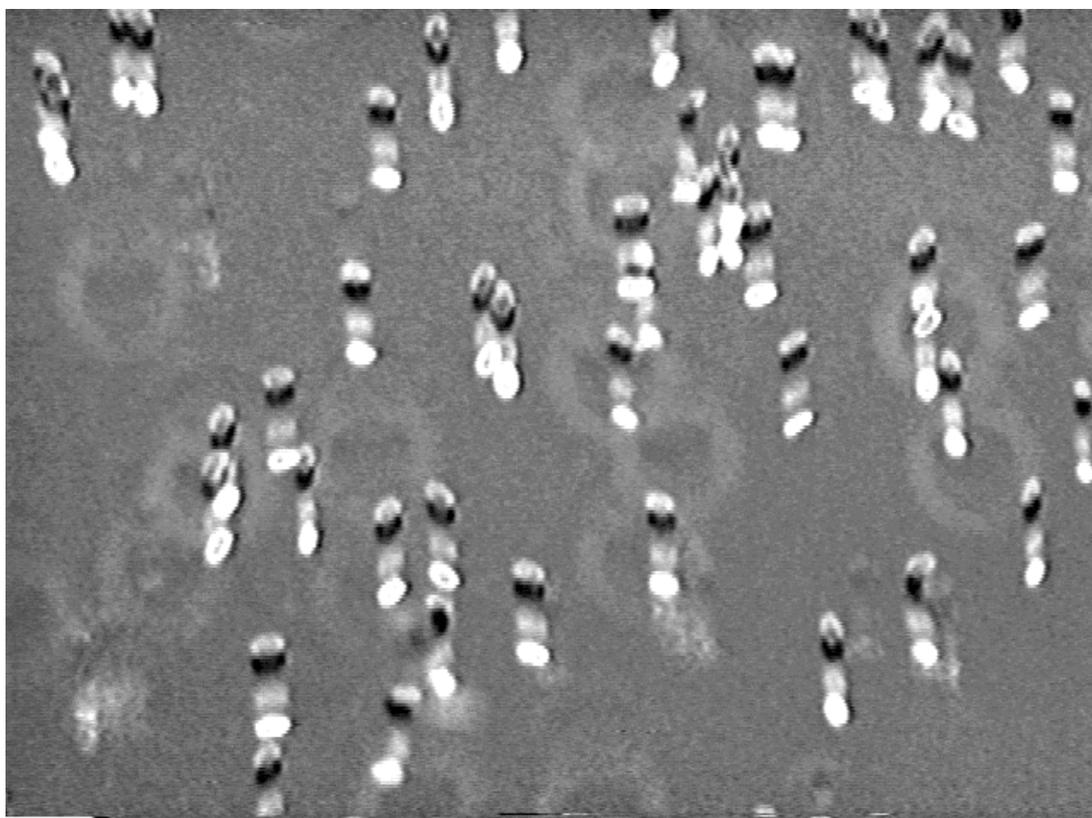


Figura 6.80 Deslocamento  $\Delta t=t_1-t_2-t_3-t_4-t_5$

#### 6.4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROALGAS POR SEUS CAMPOS DE VELOCIDADES

Foram analisados os campos de velocidades de 5 espécies de microalgas: *Fibrocapsa japonica*, *Pyramimonas* sp., *Heterosigma akashiwo*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*, mostradas nas figs. 6.81 a 6.85. Cada campo de velocidades foi produzido com a análise de 99 imagens.

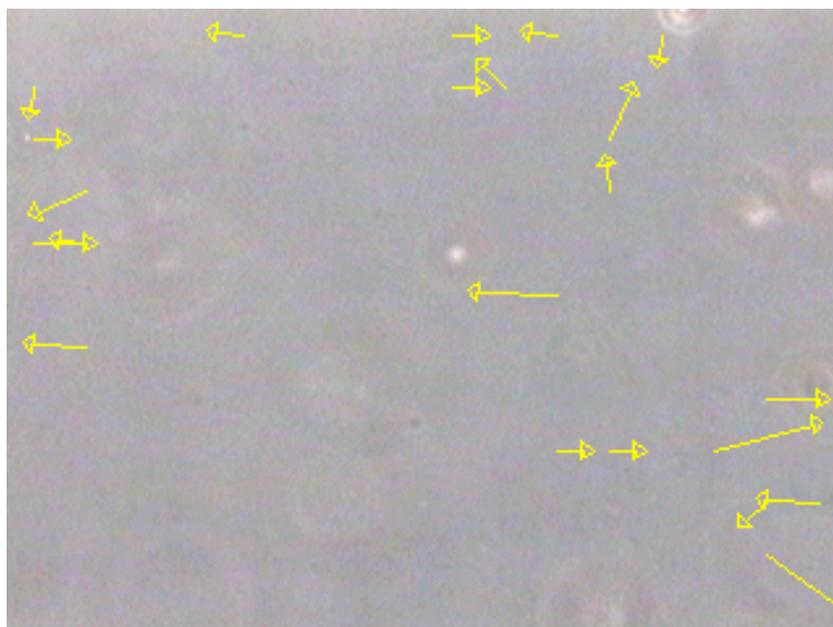


Figura 6.81 Campo de velocidades das microalgas da espécie *Heterosigma akashiwo*

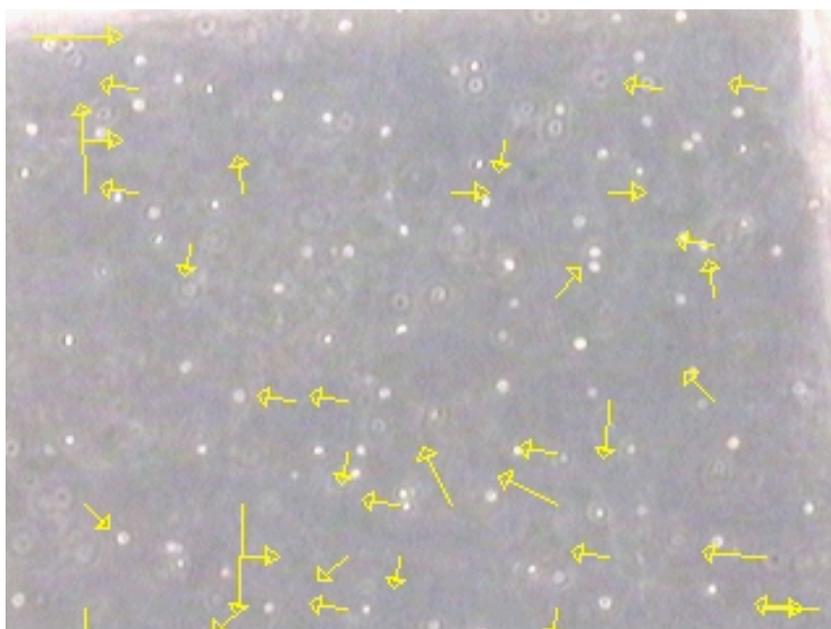


Figura 6.82 Campo de velocidades das microalgas da espécie *Isochrysis galbana*

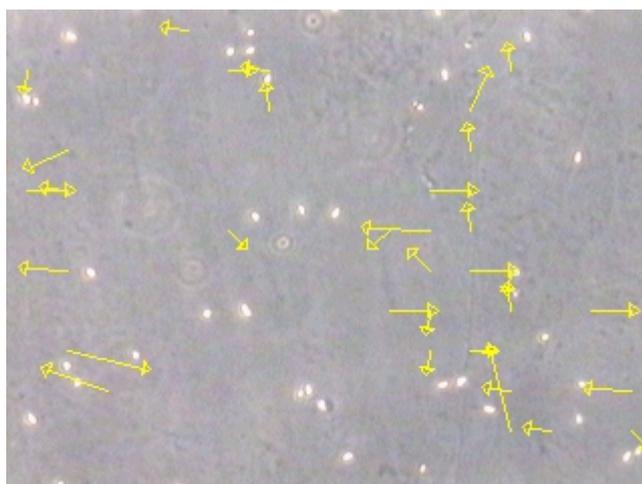


Figura 6.83 Campo de velocidades das microalgas da espécie *Pyramimonas sp.*

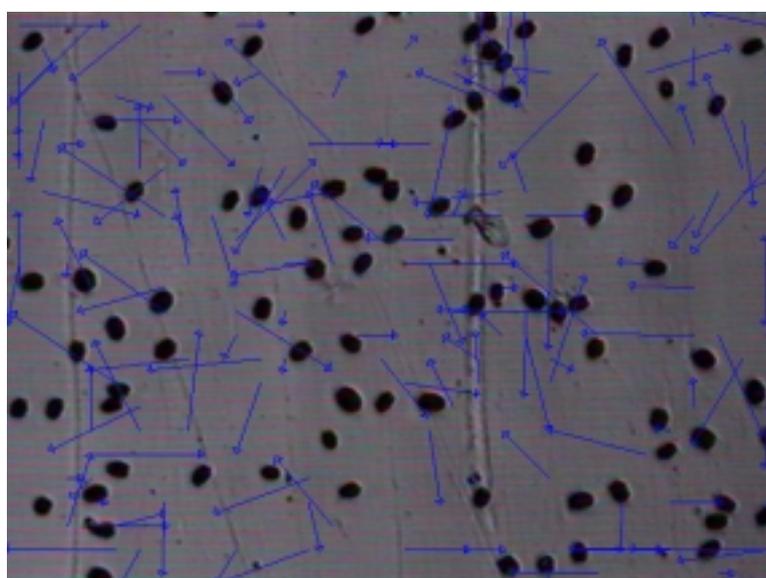


Figura 6.84 Campo de velocidades das microalgas da espécie *Tetraselmis chuii*

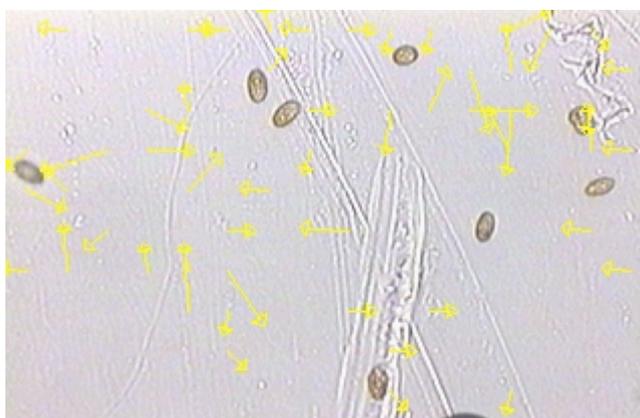


Figura 6.85 Campo de velocidades das microalgas da espécie *Fibrocapsa japonica*

Conhecendo-se as componentes da velocidade  $u$  e  $v$  para cada espécie semelhantes aos apresentados na tabela 6.18, é possível traçar funções densidade de probabilidade normal (fdp) para cada componente da velocidade, conforme figs. 6.86 e 6.87. Estas funções permitem caracterizar cada espécie por velocimetria.

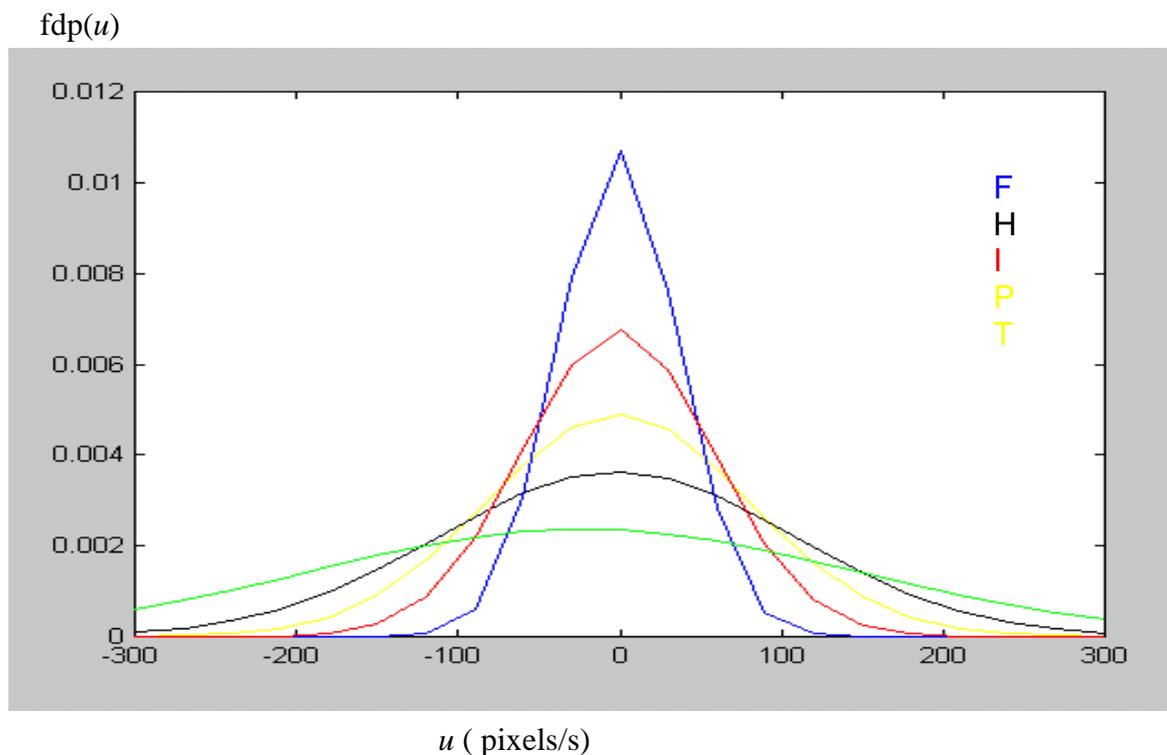


Figura 6.86 Função densidade de probabilidade normal da componente da velocidade  $u$  para 99 amostras de cada espécie.

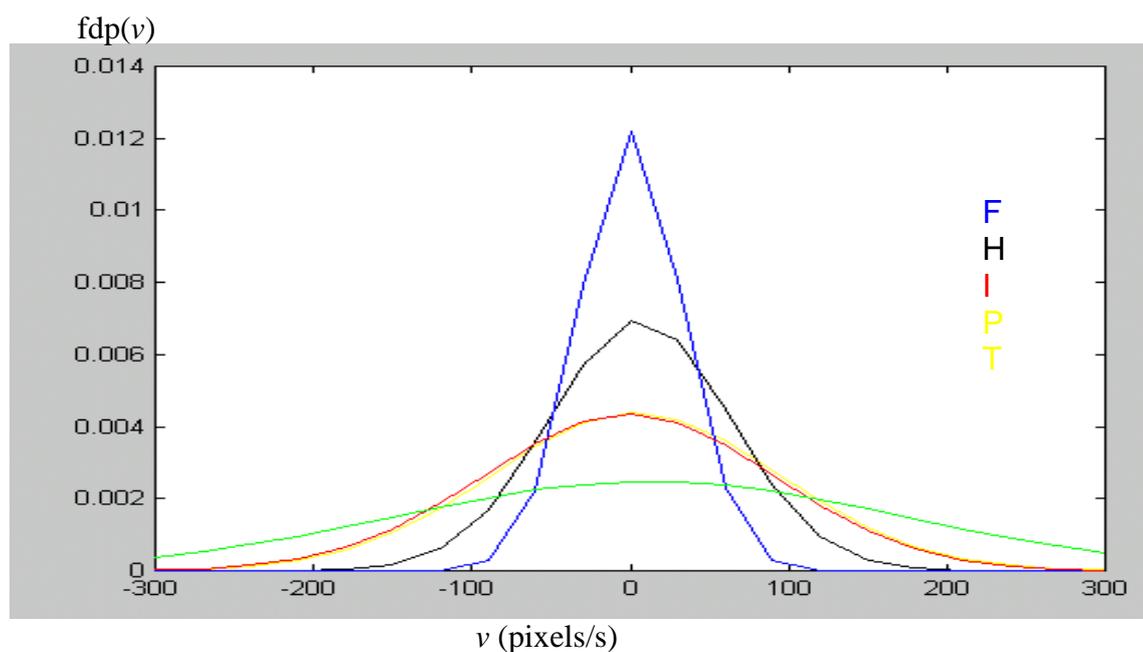


Figura 6.87 Função densidade de probabilidade normal da componente da velocidade  $v$  para 99 amostras de cada espécie.

A tabela 6.19 apresenta os valores médios e o desvio padrão das componentes da velocidade.

TABELA 6.19 Valores médios e desvio padrão das componentes da velocidade.

Espécie	$u_{\text{médio}}$ (pixels/s)	$v_{\text{médio}}$ (pixels/s)	$\sigma_u$	$\sigma_v$
<i>Fibrocapsa japonica</i>	-0,95	0,32	37,26	32,72
<i>Heterosigma akashiwo</i>	-1,90	6,24	109,86	57,09
<i>Isochrysis galbana</i>	-1,08	-1,2	59,04	91,68
<i>Pyramimonas sp.</i>	-1,08	3,64	81,36	91,13
<i>Tetraselmis chuii</i>	-23,13	12,19	168,20	161,22

## 7. ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 7.1. APLICAÇÕES DE OPERADORES MORFOLÓGICOS À CONTAGEM E MEDIÇÃO DE BACTÉRIAS AQUÁTICAS

A aplicação de operadores morfológicos mostrou-se adequada para os objetivos propostos, contando corretamente o número de bactérias nas imagens, destacando os detalhes de cada microorganismo, conforme figs. 6.1 e 6.2, o que permitiu calcular as grandezas geométricas (área, perímetro,  $X_{max}$ ,  $X_{min}$ , alongação, esfericidade, diâmetro de Feret e compactação).

Conforme discutido por Sieracki et al.,1989 e Blackburn et al.,1998, as bactérias visualizadas através de epifluorescência apareceram como objetos brilhantes rodeados por um halo de luz decrescente. Por isto, a detecção de seus eixos não é trivial e requer a aplicação de filtros. Os utilizados foram Gauss, Laplace e médio descritos em Gonzalez e Woods,1993, Thompson e Shure,1995, Wilcox et al., 1997 e Wilkinson, 1996, 1998 a e 1998 b.

A seqüência de análise de imagens fluorescentes de bactérias filamentosas descrita por Jürgens et al.,1999 utilizando uma câmera CCD e as etapas de processamento de imagens: detecção de eixos, aplicação de limiar à intensidade cinza da imagem e binarização, para cálculo de grandezas geométricas, apresentada no fluxograma da fig. 2.8, apresentou-se viável para estudo das amostras de bactérias aquáticas fluorescentes.

Um fator que contribuiu decisivamente para a visualização destas bactérias foi a utilização de câmara de vídeo CCD com sensibilidade à luz de 0,0003 lux, o que permitiu bem o destaque entre o fundo e os espécimes.

Inicialmente, as grandezas medidas nas bactérias no Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da FURG eram área, perímetro e biomassa. Com a metodologia apresentada, além da automatização da contagem, a medição de outras grandezas geométricas foi incorporada enriquecendo o conhecimento sobre o desenvolvimento destes microorganismos.

### 7.2. APLICAÇÕES DE TÉCNICAS DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES PARA CLASSIFICAÇÃO DE MICROALGAS: MÉTODOS NÃO AUTOMATIZADOS

As variáveis geométricas calculadas e os histogramas traçados permitem estabelecer diferenças nas dimensões das microalgas, além de fornecer informações características relativas ao nível de intensidade das imagens em padrão RGB.

Como o número de espécies de microalgas existentes no mundo é da ordem de 10000 e no ecossistema costeiro em estudo é da ordem de 1000, todas as variáveis são úteis para distinguir-se uma espécie da outra.

Comparando-se os histogramas apresentados nas figs. 6.14 e 6.15, observa-se que mesmo não recortando as microalgas nas imagens, isto é, considerando o fundo da imagem, é possível estabelecer histogramas característicos de cada espécie, tanto em forma como em relação à média e desvio padrão da intensidade da imagem.

Com exceção da espécie *Amphidinium operculatum*, comparando-se o histograma típico da espécie para uma amostra e os histogramas médios (figs. 6.15 e 6.16), verifica-se uma dispersão de valores de nível de intensidade da imagem nos histogramas médios, o que leva à necessidade de um grande número de amostras para traçar um histograma característico de cada espécie.

Observando-se as funções densidade de probabilidade do nível de intensidade das imagens das 5 espécies (fig. 6.17), verifica-se que apenas não é possível separar as espécies *Chaetoceros sp.* e *Fibrocapsa japonica* utilizando-se o nível de intensidade, conforme pode ser visto também no exemplo da tabela 6.2 que apresenta os indicadores das grandezas relacionadas à intensidade da imagem.

Analisando-se as figs. 6.18 e 6.19, que mostram o traçado dos momentos de 2<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> ordem do nível de intensidade da imagem, observa-se que é possível reconhecer diferenças entre amostras muito semelhantes de espécies diferentes, no caso do exemplo. Esta metodologia pode ser aplicada no caso de dúvida para caracterização de uma espécie após a montagem da tabela de indicadores (tabelas 6.1 a 6.3).

Os gráficos de momentos de ordem ímpar não foram apresentados porque não permitiram a separação de características das espécies.

Observando-se os gráficos das figs. 6.20 a 6.26, ilustrativos do comportamento das grandezas geométricas medidas, constata-se uma sobreposição dos dados das espécies que dificulta delinear funções que separem cada espécie. Em vista disto, foram construídos gráficos das funções densidade de probabilidade (fdp) para cada grandeza geométrica aplicada a um conjunto de amostras de cada espécie.

A partir da visualização destas fdp (figs. 6.27 a 6.34) foi possível estabelecer agrupamentos de grandezas geométricas que foram utilizados para construção das redes neurais artificiais denominadas REDES GEOMETRIA. Detectou-se os agrupamentos Área x Perímetro x Diâmetro de Feret, Xmax x Xmin x Elongação e Xmin x Elongação x Compactação, que conseguem no conjunto identificar as 5 espécies estudadas.

Quando se estuda o reconhecimento das espécies a partir de diferenças no nível de intensidade da imagem registra-se maior dificuldade. Conforme pode-se observar nas figs. 6.36 a 6.38 há muita semelhança nas imagens das transformadas RADON na varredura de  $\theta = 0^0$  a  $180^0$ . Numa amostra maior, como na fig. 6.39, onde as funções densidade de probabilidade (fdp) são aplicadas a  $p(\theta,t)$ ,  $\theta = 0^0$  a  $180^0$ , para 9 amostras de cada espécie, já se pode estabelecer diferenças entre as espécies, havendo apenas superposição da fdp para as espécies *Fibrocapsa japonica* e *Tetraselmis chuii*.

Comparando-se as imagens das transformadas RADON a  $0^0$  para as 5 espécies (figs.6.40 a 6.42), numa análise qualitativa, nota-se diferenças bem nítidas que podem caracterizar cada espécie. Na amostra maior, como na fig. 6.43, onde as funções densidade de probabilidade (fdp) são aplicadas a  $p(\theta,t)$ ,  $\theta = 0^0$ , para 9 amostras de cada espécie, também se pode estabelecer diferenças entre as espécies, havendo apenas superposição da fdp para as espécies *Amphidinium operculatum* e *Chaetoceros sp.*

Na aplicação da transformada de Fourier para reconhecimento das espécies, numa observação qualitativa de uma amostra de cada espécie, conforme figs. 6.44 a 6.46 das imagens das FFTs e figs. 6.47 a 6.49 das imagens do espectro de potência de Fourier, é possível observar diferenças entre as espécies. No entanto, quando se aplica a transformada de Fourier a uma amostra maior, traçando-se a fdp para 9 amostras de cada espécie, é possível a separação das espécies, havendo apenas superposição da fdp para as espécies *Chaetoceros sp.* e *Isochrysis galbana*.

Pela análise apresentada, verificou-se que cada forma de caracterização consegue separar um conjunto de espécies entre as 5 estudadas. O agrupamento destes resultados levou à construção das tabelas de indicadores (tabelas 6.1 a 6.3) que permitem no seu conjunto reconhecer amostras de cada espécie **diferentes** das amostras usadas para construção dos gráficos das fdp de cada grandeza. Comparando-se o somatório de indicadores referentes à geometria e à imagem, constata-se que os indicadores geométricos permitem uma diferenciação maior das espécies.

### 7.3. RECONHECIMENTO DE PADRÕES DE MICROALGAS POR REDES NEURAIIS ARTIFICIAIS: MÉTODOS AUTOMATIZADOS

Com a rede neural proposta denominada REDE GEOMETRIA que utiliza como neurônios de entrada as grandezas geométricas foi possível testar vários agrupamentos destas grandezas, já que a observação das figs. 6.20 a 6.26 mostra a dificuldade de conhecer-se funções de decisão com o conjunto de dados estudados (5 espécies de microalgas e 8 características geométricas).

Observando-se os resultados dos ensaios do agrupamento Área x Perímetro x Diâmetro de Feret (tabelas 6.9 e 6.11) constata-se 80% de acertos das amostras (100% A, 60% C, 100% F, 60% I, 80%T) com espécies apresentadas em sequência para a rede e 84% de acertos das amostras (100% A, 80% C, 100% F, 60% I, 80%T) com espécies apresentadas de forma intercalada. Quando não houve reconhecimento das espécies, o erro ocorrido foi devido à semelhança de valores das grandezas do agrupamento analisado, confundindo-se as espécies *Chaetoceros sp.* com *Isochrysis galbana* e *Amphidinium operculatum* com *Tetraselmis chuii*, o que é possível ocorrer de acordo com a fig. 6.23.

Observando-se os resultados dos ensaios do agrupamento Área x Perímetro x Esfericidade (tabelas 6.8 e 6.12) constata-se 60% de acertos das amostras (80% A, 20% C, 60% F, 40%I, 100% T) com espécies apresentadas em sequência para a rede e 76% de acertos das amostras (80% A, 40% C, 100% F, 60% I, 100%T) com espécies apresentadas de forma intercalada. Quando não houve reconhecimento das espécies, o erro ocorrido foi devido à semelhança de valores das grandezas do agrupamento analisado, confundindo-se as espécies *Chaetoceros sp.* com *Isochrysis galbana*, *Amphidinium operculatum* com *Tetraselmis chuii* e *Amphidinium operculatum* com *Fibrocapsa japonica* o que é possível ocorrer de acordo com a fig. 6.25. No entanto, em 6 amostras foram confundidas as espécies *Fibrocapsa japonica* com *Isochrysis galbana* o que inviabiliza este agrupamento para o reconhecimento destas espécies.

Observando-se os resultados dos ensaios do agrupamento Xmin x Elongação x Compactação (tabela 6.10) constata-se 76% de acertos das amostras ( 100% A, 60% C, 60% F, 60% I, 100%T) com espécies apresentadas em sequência para a rede. Quando não houve reconhecimento das espécies, o erro ocorrido foi devido à semelhança de valores das grandezas do agrupamento analisado, confundindo-se as espécies *Chaetoceros sp.* com *Isochrysis galbana* e *Amphidinium operculatum* com *Fibrocapsa japonica* o que é possível ocorrer de acordo com a fig. 6.24.

A partir da análise dos resultados apresentados nos 6 ensaios da REDE GEOMETRIA verifica-se a possibilidade de reconhecimento das **5** espécies de microalgas estudadas, divididas em agrupamentos de 3 características: **Área x Perímetro x Diâmetro de Feret** e **Xmin x Elongação x Compactação**.

No 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> ensaios da REDE IMAGEM, analisando-se as tabelas 6.13 e 6.14 com imagens não rotacionadas, verifica-se que em 3 amostras a espécie *Amphidinium operculatum* foi confundida com *Tetraselmis chuii*, o que não é possível de acordo com as imagens da fig. 6.13.

No 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> ensaios da REDE IMAGEM, embora de acordo com as tabelas 6.15 e 6.16 com imagens não rotacionadas as espécies tenham sido todas reconhecidas, estes ensaios foram feitos com 3 espécies (3<sup>o</sup> ensaio: *Amphidinium opercolatum*, *Chaetoceros sp.* e *Fibrocapsa japonica*; 4<sup>o</sup> ensaio: *Chaetoceros sp.*, *Isocrisis galbana* e *Tetraselmis chuii*), o que possibilita apenas o seu reconhecimento em caso de dúvida para caracterizar estas 3 espécies testadas.

No 5<sup>o</sup> ensaio da REDE IMAGEM, de acordo com a tabela 6.17, verifica-se a possibilidade de reconhecimento das 5 espécies de microalgas estudadas desde que sejam **rotacionadas** de modo a serem treinadas e testadas na mesma posição.

Quanto ao tipo de rede neural utilizada, com topologia de rede multinível totalmente conectada, supervisionada, e com algoritmo de retropropagação, proposta para reconhecimento de microorganismos por Frankel *et al.*, 1989, Blackburn *et al.*, 1998, Wilkins *et al.*, 1999, e Noble *et al.*, 1997 e 2000, verificou-se que é possível reconhecer rapidamente (cerca de 10 minutos para o número de amostras testadas) as 5 espécies de microalgas estudadas com as redes propostas.

Foram testadas as funções de transferência sigmóide, linear e logarítmica entre os níveis de entrada, intermediário e de saída, verificando-se que a função sigmóide, apresentada na fig. 4.2, apresentou os melhores resultados de convergência para o erro máximo estipulado entre os neurônios de saída desejados e os obtidos.

Foram testadas topologias de redes com 2, 4, 6, 8, 16, 32 e 64 neurônios intermediários. Para a REDE IMAGEM obteve-se melhores resultados com 4 neurônios intermediários para imagens rotacionadas e 64 com imagens sem rotação. Para a REDE GEOMETRIA a melhor configuração foi de 16 neurônios intermediários.

#### 7.4. CAMPOS DE VELOCIDADES DE MICROALGAS EM IMAGENS MICROSCÓPICAS POR PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGENS

O programa *FlowViewer* desenvolvido para acompanhamento de partículas de baixa velocidade e pontuais (Gutkoski, 2001) e adaptado para contar e reconhecer partículas maiores através da procura do centro da partículas, mostrou-se viável para estudo da velocimetria de microalgas de tamanhos e quantidades diversas, conforme mostrado nas figs. 6.70 e 6.81 a 6.85. Estas figuras mostram também que podem ser analisadas imagens com fundos e microalgas de cores diversas.

Observando-se as imagens das microalgas em 5 instantes sequenciais (figs.6.71 a 6.75), as imagens que apresentam o deslocamento das microalgas durante cada intervalo de tempo (figs. 6.77 a 6.80) e o traçado dos vetores velocidades de microalgas da espécie *Tetraselmis*

*chuii*, durante um intervalo de tempo de 1,033 s correspondente a estes 5 quadros (fig 6.76), constata-se a validade dos deslocamentos (trackings) das partículas.

Conforme pode ser observado na fig. 6.70 não é possível focar apenas um plano no microscópio. Para eliminar as partículas dos planos inferiores ao plano estudado aplica-se a etapa de exclusão de brilho conforme mostrado na fig. 5.2 e no fluxograma da fig. 5.1.

Segundo Raven, 2000, a velocidade de natação das microalgas varia muito entre as diferentes espécies e pode também variar de acordo com sua condição fisiológica. A aplicação do método de velocimetria por acompanhamento de partículas - Particle Tracking Velocimetry- (PTV) mostrou que a velocidade de natação pode ser medida e utilizada, por exemplo, como um indicador para se avaliar o efeito de substâncias tóxicas ou fatores de estresse para as microalgas.

O método permite ainda, de acordo com as figs.6.86 e 6.87, que mostram o traçado das funções densidade de probabilidade normal (fdp) para cada componente da velocidade, caracterizar as microalgas que possuem estruturas para natação, em forma de fios (flagelos), que permitem sua movimentação na coluna d'água.

## 8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE PESQUISAS

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia que permite a determinação automatizada das dimensões e do número de bactérias aquáticas sob luz fluorescente, através de estudos morfológicos, bem como a caracterização, determinação das dimensões e do número de partículas sólidas (microalgas). Foi também estudado o campo de velocidades de microalgas em amostras observadas em microscópio, utilizando velocimetria por acompanhamento de partículas (Particle Tracking Velocimetry – PTV).

Quanto à contagem e medição de bactérias aquáticas, o sistema utilizado permite detectar diferenças sensíveis de forma e tamanho sendo possível a aplicação de operadores morfológicos para determinação de suas grandezas características, como, área, perímetro,  $X_{max}$ ,  $X_{min}$ , alongação, esfericidade, diâmetro de Feret e compactação, tornando possível acompanhar o seu crescimento.

O reconhecimento e interpretação de padrões onde são reunidas as características estudadas das imagens das microalgas, permite classificar seus diferentes tipos, com o auxílio de redes neurais artificiais. Saliente-se que as características das microalgas utilizadas para estudos neste trabalho são diferentes daquelas apresentadas nos trabalhos constantes na revisão bibliográfica. O trabalho propõe a utilização dos níveis de intensidade da imagem em padrão RGB e 8 grandezas geométricas como características para reconhecimento de padrões. Nos trabalhos referenciados, (Frankel *et al.*,1989, Blackburn *et al.*,1998, Wilkins *et al.*,1999, e Noble *et al.*,1997, 2000) foram utilizadas imagens binárias, o que permite apenas reconhecimento de formas, e parâmetros físicos, químicos e biológicos, que dependem de manuseio e reações sobre as amostras, além do uso de microscópio confocal e outros equipamentos de difícil aquisição.

O conjunto proposto de características das microalgas, do ponto de vista de grandezas geométricas e da cor (nível de intensidade da imagem e transformadas Fourier e Radon), levou à geração de indicadores que permitem o reconhecimento de padrões. Estes indicadores estão baseados nos gráficos das funções densidade de probabilidade normal (fdp) traçados para cada grandeza e aplicadas a um conjunto de amostras de cada espécie. O número de indicadores utilizado (12) se deve à dificuldade de delinear funções que separem cada espécie.

As redes neurais artificiais desenvolvidas com topologia de rede multinível totalmente conectada, supervisionada, e com algoritmo de retropropagação atingiram as metas de erro máximo estipuladas entre os neurônios de saída desejados e os obtidos e permitiram a caracterização das microalgas. A caracterização das microalgas com o reconhecimento de padrões por redes neurais artificiais através de uma classificação supervisionada inicia com uma fase de treinamento, na qual se fornece ao programa atributos ou imagens cujos objetos já foram

classificados independentemente, pelo julgamento de um operador experimentado. A partir do aprendizado o método passa a ser automatizado, testando mais rapidamente amostras e espécies.

Verifica-se a possibilidade de reconhecimento com a REDE IMAGEM das 5 espécies de microalgas estudadas, *Amphidinium operculatum*, *Chaetoceros sp.*, *Fibrocapsa japonica*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chunii*, desde que sejam rotacionadas de modo a serem treinadas e testadas na mesma posição.

Com a REDE GEOMETRIA proposta é possível o reconhecimento das 5 espécies divididas em agrupamentos de 3 características: Área x Perímetro x Diâmetro de Feret e Xmin x Elongação x Compactação, com acertos entre 60% e 100% das amostras.

Os agrupamentos testados referem-se às 5 espécies estudadas. Usando-se a mesma metodologia, à medida que mais espécies sejam agregadas devem ser analisados quais conjuntos de variáveis geométricas constituem um agrupamento que permite reconhecer as microalgas.

O número de espécies de microalgas no ecossistema costeiro em estudo é da ordem de 1000. A metodologia desenvolvida para caracterização destas microalgas poderá ser utilizada para distinguir conjuntos de espécies semelhantes em forma e/ou nível de intensidade da imagem, as quais podem gerar dúvidas para o pesquisador. Poderiam, ainda, ser definidas espécies-alvo, de importância ecológica (por ex. espécies reconhecidamente tóxicas), cujas características se diferem das demais. Assim, o reconhecimento automático de espécies de microalgas pode contribuir para o acompanhamento ou monitoramento das espécies em amostras do meio ambiente, tanto em estudos de diversidade, que pressupõe a identificação das espécies presentes e a variação de sua abundância ao longo do tempo, como para a detecção de espécies de microalgas tóxicas.

A metodologia automatizada para contar e medir microorganismos substitui a medição direta por observação visual com medidores calibrados, onde contava-se uma célula de cada vez, num método exaustivo pelo grande número de unidades necessárias a uma precisão estatisticamente aceitável. Obtinha-se uma fotografia de uma amostra, projetava-se e media-se sobre uma tela introduzindo uma etapa adicional no processo. Análise direta de uma imagem digitalizada de amostras obtidas em microscópio ótico tornou mais preciso e rápido o procedimento de laboratório.

Inicialmente, as grandezas medidas nas bactérias no Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da FURG eram área, perímetro e biomassa. Com a metodologia apresentada, além da automatização da contagem, a medição de outras grandezas geométricas foi incorporada enriquecendo o conhecimento sobre o desenvolvimento destes microorganismos.

Através do uso do método de velocimetria por acompanhamento de partículas, o trabalho mostra que é possível quantificar rapidamente a velocidade de natação das microalgas e traçar paralelos entre suas movimentações, servindo também como parâmetro para sua caracterização.

O processamento das imagens de microalgas que possuem estruturas para natação (flagelos) através do programa *FlowViewer* proporcionou suficiente contraste das partículas em relação ao fluido onde estão imersas e com sua adaptação foi possível a contagem de microalgas, partículas não pontuais, de tamanhos e quantidades variadas assim como a análise de imagens com fundos e microalgas de cores diversas.

O método de Velocimetria por Acompanhamento de Partículas (Particle Tracking Velocimetry-PTV) é apropriado para o tipo de partículas analisadas que têm pequenos deslocamentos em relação às suas dimensões pois após a aquisição de uma seqüência de imagens, a partícula acompanhada ainda permanece na imagem.

As várias ampliações possíveis no microscópio permitem acompanhar partículas mais lentas com imagens mais ampliadas e partículas mais velozes com imagens menos ampliadas, sem perder a partícula na seqüência de imagens, monitorando suas velocidades e trajetórias.

As técnicas de contagem e medição de bactérias contribuirão para o estudo da utilização de bactérias em aquacultura como fonte de alimento de larvas de animais marinhos (camarões, peixes, moluscos), e também como auxílio no acompanhamento da qualidade da água em cultivos ou no meio ambiente.

A metodologia para monitoramento e caracterização de microorganismos aquáticos por processamento digital de imagens otimizará os estudos realizados na Estação Marinha de Aquacultura- EMA, e no Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos (FURG), pela automatização dos processos de contagem e reconhecimento dos microorganismos marinhos, agregando tecnologia aos projetos dos dois laboratórios.

A metodologia de aquisição de imagens, contagem e medição de organismos aquáticos já foi implementada em outros laboratórios do Departamento de Oceanografia (FURG), abrindo-se assim excelentes oportunidades para o desenvolvimento de novos trabalhos.

Em fase inicial de desenvolvimento está o projeto de reconhecimento de cerca de 40 microalgas tóxicas do ambiente marinho e de aproximadamente 15 espécies de água doce, que possuem a capacidade de produzir toxinas potentes, podendo atingir outros animais e o homem.

Estudos sobre movimentação de microalgas em tanques de cultivo de camarão estão sendo desenvolvidos usando-se os métodos de velocimetria por acompanhamento de partículas e velocimetria de alta densidade de partículas, permitindo monitorar o comportamento de microalgas quando usadas como alimento de larvas de camarão.

O conhecimento da velocidade de natação por processamento digital de imagens poderá ser utilizado como um indicador para se avaliar o efeito de substâncias tóxicas ou fatores de estresse para as microalgas e, como consequência, para a saúde de um sistema aquático. Considerando estes fatores, a possibilidade de se quantificar rapidamente a velocidade de natação das microalgas poderá ser uma ferramenta que permite estudos de grande relevância para a ecologia destes microorganismos.

Também no Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos utilizando-se a metodologia apresentada estão sendo desenvolvidos trabalhos de iniciação científica e teses de mestrado e doutorado em Oceanografia Biológica sobre "Diversidade morfológica de bactérias em diferentes razões N:P na região estuarina da Lagoa dos Patos/RS-Brasil", " Dinâmica do bacterioplâncton e suas relações com nutrientes inorgânicos no estuário da Lagoa dos Patos", " Taxas de predação de bactérias pelo protozooplâncton da Lagoa dos Patos", " Influência de nutrientes e predação sobre a dinâmica do bacterioplâncton no estuário da Lagoa dos Patos", tendo ainda sido introduzida nas disciplinas de "Planctologia" – Graduação em Oceanologia e "Cadeias alimentares microbianas", oferecida ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica – FURG.

Em trabalhos futuros serão implementadas redes neurais artificiais não supervisionadas, permitindo-se assim uma comparação da eficiência com as redes supervisionadas testadas. Outros neurônios de entrada podem ser também introduzidos, como momentos do nível de intensidade da imagem e transformadas de Fourier e Radon da imagem. É possível ainda introduzir indicadores de textura de imagens para reconhecimento de padrões de microalgas, pela riqueza de detalhes nas imagens estudadas.

O uso de um computador mais rápido permitirá treinar mais amostras e melhorar o nível de reconhecimento das microalgas.

O conhecimento de características das microalgas através do uso de operadores morfológicos, além de medir grandezas geométricas pode permitir também o conhecimento do centro de massa, o que possibilita obter-se o deslocamento das microalgas a partir de imagens sucessivas, tornando-se um método que poderá ser aplicado para determinação das velocidades das microalgas em imagens microscópicas.

Outro trabalho que poderá contribuir para o estudo do desenvolvimento de microorganismos aquáticos é a composição de imagens tridimensionais a partir da aquisição de imagens bidimensionais simulando um microscópio confocal, utilizando-se um motor de passo para aquisição de imagens em diversos planos focados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrian, R. J., 1991. "**Particle Imaging Techniques for Experimental Fluid Mechanics**", Annual Review Fluid Mechanics, vol. 23, pp.261–304.

Almeida, J.A., 1997. "**Sistemas de Velocimetria por Imagens de Partículas**", Tese de Doutorado, PUC, Rio de Janeiro, RJ.

Balakrishnan, K., HONAVAR, V., 1995. "**Evolutionary Design of Neural Architectures: A Preliminary Taxonomy and Guide to Literature**". Tech. Report - Artificial Intelligence Research Group. Iowa State University - USA.

BIPM, 1997. "**Guia para Expressão da Incerteza de Medição**". International Bureau of Weights and Measures, Rio de Janeiro

Bjørnsen, P.K., 1986. "**Automatic Determination of Bacterioplankton Biomass by Image Analysis**", Applied and Environmental Microbiology, vol.51(6), pp.1199-1204.

Blackburn, N., Hagström, Å., Wikner, J., Chadros-Hansson R., Bjørnsen, P.K., 1998. "**Rapid Determination of bacterial Abundance, Biovolume, morphology, and Growth by Neural Network – based image Analysis**", Applied and Environmental Microbiology, vol.64(9), pp.3246-3255.

Bonna V.J., Braga, M.C.F., Cunha, C.M.P., Azevedo, L.F.A., 1990. "**Search Algorithms for Particle Tracking Velocimetry Systems**", III ENCIT – Itapema, SC, pp. 449-452.

Caudil, M., 1990. "**Neural Networks Primer**", AI Expert - Special Issue. San Francisco: Freeman Publications, 1990.

Englart, S. E., Sheng, Z., and Kirilin, R. L., 1989. "**Crosscorrelation of Synthesized Digital Image Pairs for Determination of Velocity Vectors Fields Associated with Fluid Flow about a Cylinder**", Flow visualization — Winter Annual Meeting of ASME, , pp. 3.

- Fahlman, S., Lebiere C., 1990. "**The Cascade-Correlation Learning Architecture**". Carnegie Mellon University, Technical Report CMU-CS-90-100. Pittsburgh, USA.
- Fiesler, E., 1994. "**Comparative Bibliography of Ontogenic Neural Networks**", Proceedings of the International Conference on Artificial Neural Networks - ICANN'94.
- Fingerson , L.M., Adrian, R.J., Menon, R.K., Kaufman, S.L., 1991." **Data Analysis Laser Doppler Velocimetry and Particle Image**", TSI Short Course Text, USA.
- Frankel, D.S., Olson, R. J., Frankel, S. L., Chisholm, S. W., 1989. "**Use of a neural net computer system for analysis of flow cytometric data of phytoplankton populations**", Cytometry, 10 (5), pp. 540-550.
- Fry, J.C., 1988."**Determination of Biomass**", Methods in Aquatic Bacteriology, Jhon Wiley & Sons Ltd. pp. 27-72.
- Gonzalez, R.C., Woods, R. E., 1993. "**Digital Image Processing**", Addison-Wesley Pub., New York.
- Govindu, V. Shekar, C., 1999."**Alignment Using Distributions of local Geometric Properties**", IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 21(10), pp.1031-1043.
- Gutkoski, L.L., 1999. "**FlowViewer - Medida de Fluxo através de Imagens**", Relatório de Pesquisa, LTMF, UFRGS, Porto Alegre, RS.
- Gutkoski, L.L., 2001."**Ferramenta computacional para a medição de campos de velocidade utilizando processamento digital de imagens**", Tese de Mestrado, PROMEC, UFRGS, Porto Alegre, RS.
- Hebb, D. O., 1949. "**The Organization of Behavior**". New York: John Wiley & Sons, New York.
- Holz, H.M., 1982, "**Worthwhile facts about fluorescence microscopy**", Ed. Carl Zeiss, Oberkochen, West Germany.

Hopfield, J. J., 1982, “**Neural Networks and Physical Systems with Emergent Collective Computational Abilities**”, Proceedings of National academy of Science, USA, v. 79, p. 2554-2558.

Jain, A.K., Duin, R.P.W., Mao, J., 2000. “ **Statistical Pattern Recognition: A Review**”, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 22(1), pp.4-37.

Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S., Amann, R., 1999.”**Morphological and Compositional Changes in a Planktonic Bacterial Community in Response to Enhanced Protozoan Grazing** “, Applied and Environmental Microbiology, vol.65(3), pp.1241-1250.

Kohonen, T.,1990. "**The self-organizing map**", Proc. of the IEEE, vol. 78, no. 9.

Leadbeater, B.S.C., Green,J.C., 2000. "**The flagellates: unity, diversity and evolution**", Taylor and Francis. 401 p.

Lin, J.S., 1990. “**Two- Dimensional Signal and Image Processing**”, Prentice hall Signal Processing Serie, New Jersey.

Marr, D., Hildreth, E.C., 1980.”**Theory of Edge Detection**”, Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci., vol. 207, pp.187-217.

Massana, R., Gasol, J.M., Bjørnsen, P.K, Blackburn, N., Hagström, Å, Hietanen, S., Hygum, B.H., Kuparinen, J., Pedrós-Alió, C., 1997.”**Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of most common problems**”, SCI. MAR., vol. 61(3), pp. 397-407.

McCulloch, W. S., Pitts, W., 1943. “**A logical Calculus of the ideas imminent in Nervous Activity**”, Bulletin of Mathematical Biophysics, v. 5, p 115-133.

Minsky, M., Papert, S., 1969. “**Perceptrons: An Introduction to Computational Geometry**”, Cambridge: MIT Press.

Möllring, F. K., 1981. "**Microscopy from the very beginning**". Ed. Carl Zeiss, Oberkochen, West Germany.

Nézan, E., et al, 1997. "**PhytoQuiz 1- Marine flagellates**", IFREMER, Service des Editions et Techniques, Plouzané, France.

Noble, P.A., Bidle, K.D., Fletcher, M., 1997. "**Natural microbial community compositions compared by a back-propagating neural network and cluster analysis of 5S rRNA**", Applied and Environmental Microbiology. 63 (5), 1762-1770.

Noble, P.A., Almeida, J.S., Lovell, C.R., 2000. "**Application of neural computing methods for interpreting phospholipid fatty acid profiles of natural microbial communities**", Applied and Environmental Microbiology. 66 (2), 694-699.

Randen, T., Husøy, J.H., 1999. "**Filtering for Texture Classification: A Comparative Study**", IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 21(4), pp.291-310.

Rauber, T.W., 1998. "**Redes Neurais Artificiais**", ERI 98, UFES, Vitória, ES

Raven, J.A., 2000. "**The flagellate condition**", In: The flagellates: unity, diversity and evolution. Barry S.C. Leadbeater and J.C. Green (eds.). Taylor and Francis. pp. 27-48.

Riethmuller, M.L., 1996. "**Particle Image Velocimetry**", Lecture Series 1996-03, von Karman Institute for Fluid Dynamics, Belgium.

Rosenblatt, F., 1962. "**Principles of Neurodynamics**", Washington: Spartan books.

Rumelhart, D.; Hinton, G., Williams, R., 1986. "**Learning Internal Representations by Error Propagation**", Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructure of Cognition - Vol. 1". Cambridge: MIT Press.

Schalkoff, R.J., 1989. "**Digital Image Processing and Computer Vision**", John Wiley & Sons, Inc., Singapore.

Seeliger, U., Odebrecht, C., Castello, J.P., 1998. **"Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil"**, Editora Ecoscientia, Rio Grande, RS.

Sieracki, M.E., Johnson, P.W., Sieburth, J.M., 1985. **"Detection, Enumeration, and Sizing of Planktonic Bacteria by Image-Analyzed Epifluorescent Microscopy"**, Applied and Environmental Microbiology, vol. 49(4), pp.789-810.

Sieracki, M.E., Viles, C.L., Webb, K.L., 1989. **"Algorithm to estimate cell biovolume using image analysed microscopy"**, Cytometry, vol.10, pp.551-557.

Thompson, C.M., Shure, L., 1995. **"Image Processing Toolbox"**, The Math Works Inc., USA.

Van der Laan, F., Ferreira, V.C.S., Elbern, A. W., 2001. **"Incertezas na Medida de Campos de Velocidade na Ordem de 10 m/s, por Processamento de Imagens de Partículas (PIV), Usando Técnicas Intraframe de Processamento de Imagens"**, COBEM 2001, Uberlândia, MG.

Wasilieski, W., 2000. **"Produção do Camarão Marinho *Penaeus paulensis* no Sul do Brasil: Cultivo em Estruturas Alternativas"**, Tese de Doutorado, FURG, RioGrande,RS.

Wernet, M.P., 1993. **"Fuzzy Logic Particle Tracking Velocimetry"**, SPIE Conference on Optical Diagnostics in Fluid and Thermal Flow, San Diego (NASA TM 106194).

Widrow, B., Winter, R., 1988. **"Neural Nets for Adaptive Filtering and Adaptive Pattern Recognition"**, IEEE Computer, New York, v.21, n.3, p.25-39.

Widrow, B. e Lehr, M., 1990. **"30 years of adaptive Neural Networks: Perceptron, Madaline, and Backpropagation"**, Proceedings of the IEEE, New York, v.78, n.9, p.1415-1441.

Widrow, B., 1992. **"Generalization and Information Storage In Networks of ADALINE Neurons"**, Self Organizations Systems, Washington: Spartan Books: p. 435-461.

Wilcox, D., Dove, B., McDavid, D., Greer, D., 1997. "**Image Tools version 2.0**", The University of Texas Health Science Center in Santo Antonio, UTHSCSA, USA.

Wilkins, M.F., Boddy, L., Morris, C.W., Jonker, R.R., 1999. "**Identification of phytoplankton from flow cytometry data by using radial basis function neural networks**". Applied and Environmental Microbiology. 65 (10), 4404-4410.

Wilkinson, M.H.F., 1995. "**Fluoro- Morphometry – Adding Fluorimetry to an Image Processing System for Bacterial Morphometry**", Tese de Doutorado, University of Groningen, The Netherlands.

Wilkinson, M.H.F., 1996. "**Rapid Automatic Segmentation of Fluorescent and Phase-Contrast Images of Bacteria**", Fluorescent Microscopy and Fluorescent Probes, Plenum Press, New York, pp. 261-266.

Wilkinson, M.H.F., 1998a. "**Quantitative measurements of Intestinal Ecology by Digital Image Analised Microscopy**", Bioscience Microflora, vol. 17(1) pp. 7-14.

Wilkinson, M.H.F., 1998b. "**Optimizing Edge Detectors for Robust Automatic Threshold Selection: Coping with Edge Curvature and Noise**", Graphical Models and Image Processing, vol. 60, pp. 385-401.

Willert, C. E., Gharib, M., 1991. "**Digital Particle Image Velocimetry**", Experiments in Fluids- Springer-Verlag, pp. 181-193.

## APÊNDICE I

## CALIBRAÇÃO DAS MEDIDAS DE COMPRIMENTO DAS IMAGENS DE MICROALGAS

Foram feitas calibrações das medidas de comprimento das imagens capturadas de microalgas com a câmara JVC TK1180U (sem lente), com espaçador, acoplada atrás do microscópio ótico, para objetivas com aumentos de 10x( $F=0,30$ ), 40x( $F=0,75$ ) e 100x( $F=1,30$ ), sendo  $F$  a abertura da lente (Ver fig. 2.1 cap.2).

Foram feitas calibrações das medidas de comprimento das imagens capturadas de bactérias com a câmara WATEC 902H, com espaçador e lente ( $f=16\text{mm}$  e  $F=1.6$ ), acoplada à ocular do microscópio epifluorescente, para objetiva com aumento de 40x e ocular de 10x e para objetiva com aumento de 100x e ocular de 10x.

Para calibração, foi colocada para observação no microscópio uma lâmina contendo uma régua calibrada pelo fabricante do microscópio ( Möllring, 1981), conforme fig. AI.1.

A menor subdivisão da régua calibrada é de  $10\mu\text{m}$ .

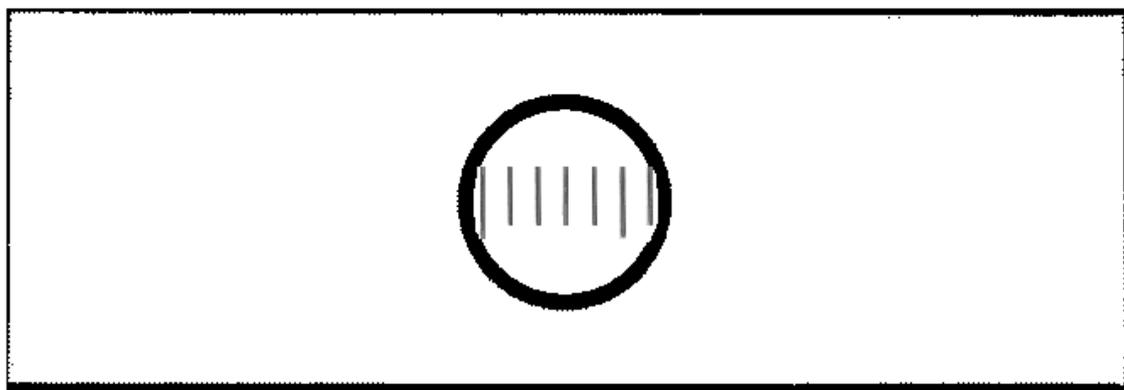


Figura AI.1 Régua calibrada - (Möllring, 1981)

A fig. AI.2 mostra a imagem obtida com a câmara JVC TK1180U, com espaçador, para objetiva de 10x. A menor divisão é de  $10\mu\text{m}$  na régua e  $5,4\text{mm}$  (13 pixels) na imagem, correspondendo a um aumento total de 540x com magnificação ( $M$ ) de 1,3 pixels/ $\mu\text{m}$ .

A fig. AI.3 mostra a imagem obtida com a câmara JVC TK1180U, com espaçador, para objetiva de 40x. A menor divisão é de  $10\mu\text{m}$  na régua e  $21,6\text{mm}$  (55 pixels) na imagem, correspondendo a um aumento total de 2160x com magnificação ( $M$ ) de 5,5 pixels/ $\mu\text{m}$ .

A fig. AI.4 mostra a imagem obtida com a câmara JVC TK1180U, com espaçador, para objetiva de 100x. A menor divisão é de  $10\mu\text{m}$  na régua e  $54,0\text{mm}$  (136 pixels) na imagem, correspondendo a um aumento total de 5400x com magnificação ( $M$ ) de 13,6 pixels/ $\mu\text{m}$ .

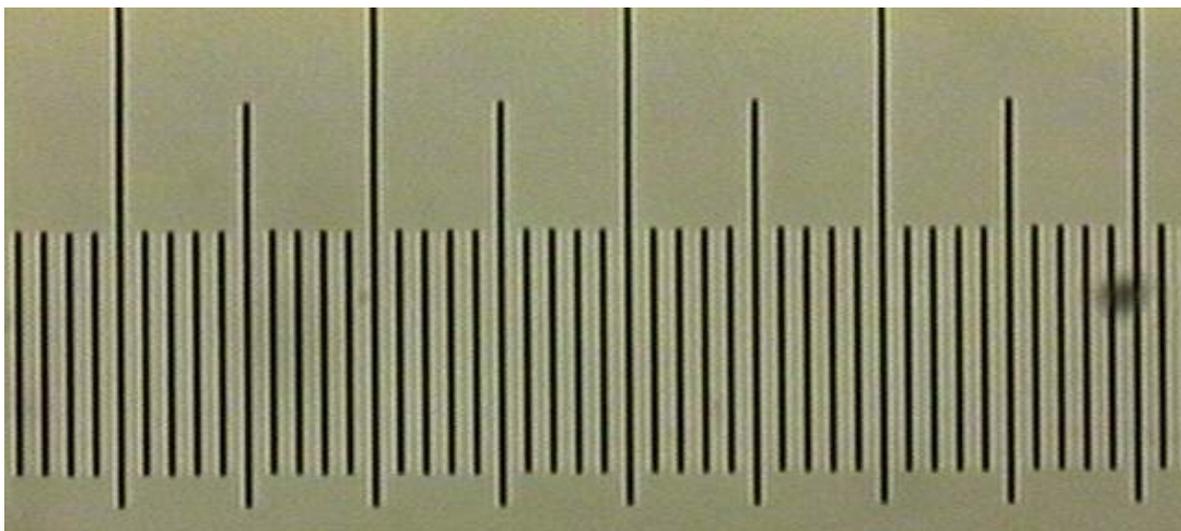


Figura AI.2 - Imagem com câmara JVC TK1180U, com espaçador, para objetiva de 10x.

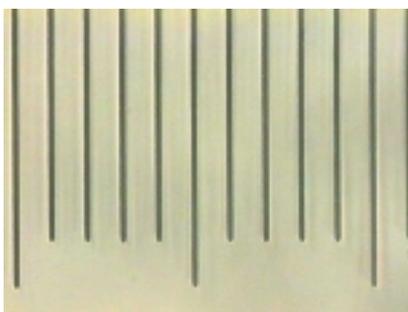


Figura AI.3- Imagem com câmara JVC TK1180U, com espaçador, para objetiva de 40x.

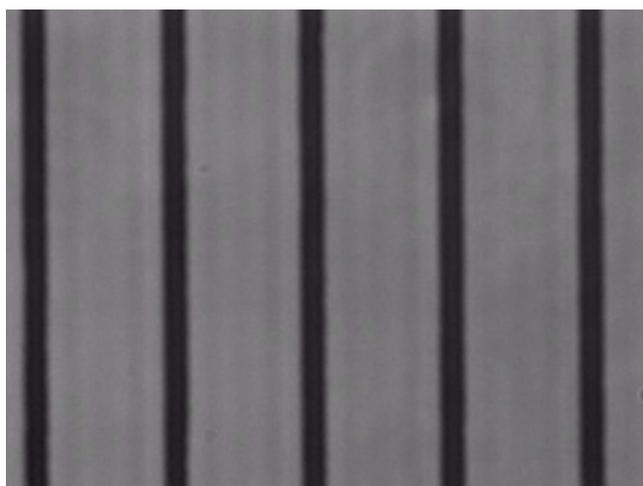


Figura AI.4 - Imagem com câmara JVC TK1180U, com espaçador, para objetiva de 100x.

Pelas medidas executadas, calculou-se um aumento de 54x produzido pelo espaçador da câmara JVC. A tabela AI.1 e a fig. AI.5 mostram a relação entre aumento e abertura das lentes. Assim, o espaçador da câmara JVC corresponde a uma lente de  $F \approx 0,9$ .

Tabela AI.1 – Determinação da abertura correspondente nas câmaras CCD

Aumento	Abertura da lente F
<b>2,5x lente +espaçador câmara Watec</b>	<b>0,11</b>
10x objetiva	0,30
40x objetiva	0,75
<b>54x espaçador da câmara JVC</b>	<b>0,90</b>
100x objetiva	1,30

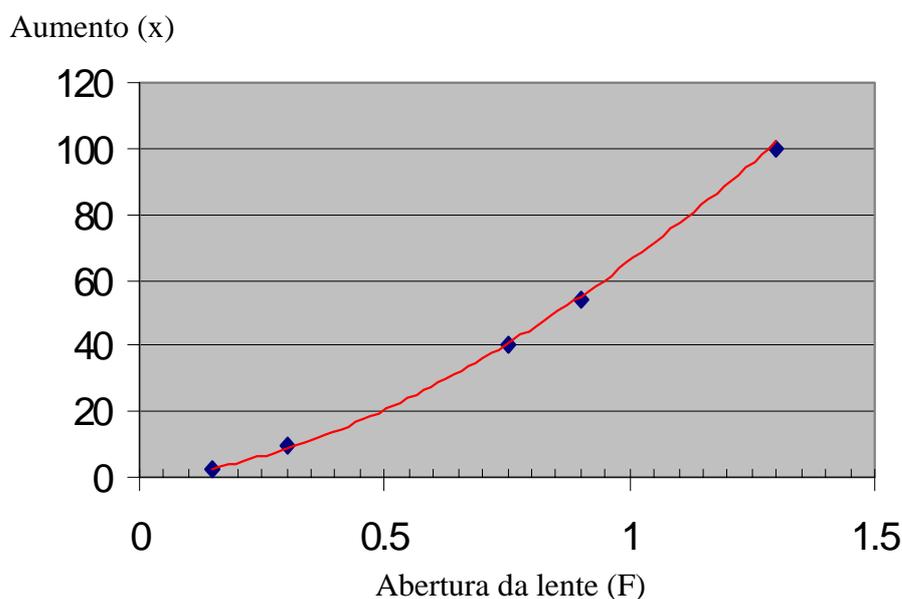


Figura AI.5 – Relação entre aumento e abertura de lentes

A função que relaciona as grandezas Aumento ( $x$ ) e Abertura da lente ( $F$ ) é dada pela eq.

AI.1:

$$\text{Aumento } (x) = -1,0512 F^3 + 44,519 F^2 + 21,093 F - 0,3416 \quad (\text{AI.1})$$

A fig. AI.6 mostra a imagem obtida da régua calibrada superposta à régua existente na ocular com a câmara WATEC 902H, com espaçador e lente ( $f=16\text{mm}$  e  $F=1.6$ ), com objetiva de 40x e ocular de 10x. A menor divisão da régua calibrada é de  $10\mu\text{m}$  na régua e  $10,0\text{mm}$  (26 pixels) na imagem correspondendo a um aumento total de 1000x com magnificação ( $M$ ) de 2,6 pixels/ $\mu\text{m}$ .

A fig. AI.7 mostra a imagem obtida da régua calibrada superposta à régua existente na ocular com a câmara WATEC 902H, com espaçador e lente ( $f=16\text{mm}$  e  $F=1.6$ ), com objetiva de 100x e ocular de 10x. A menor divisão é de  $10\mu\text{m}$  na régua e  $25,0\text{mm}$  (67 pixels) na imagem, correspondendo a um aumento total de 2500x com magnificação ( $M$ ) de 6,7 pixels/ $\mu\text{m}$ .

Para a câmara WATEC, pelas medidas executadas, calculou-se um aumento de 2,5x produzido pela lente da câmara ( $f=16\text{mm}$   $F=1.6$ ) em conjunto com o espaçador. Assim, de acordo com a fig. AI.5 e a tabela AI.1, o conjunto corresponde a uma lente de  $F \approx 0,11$ .

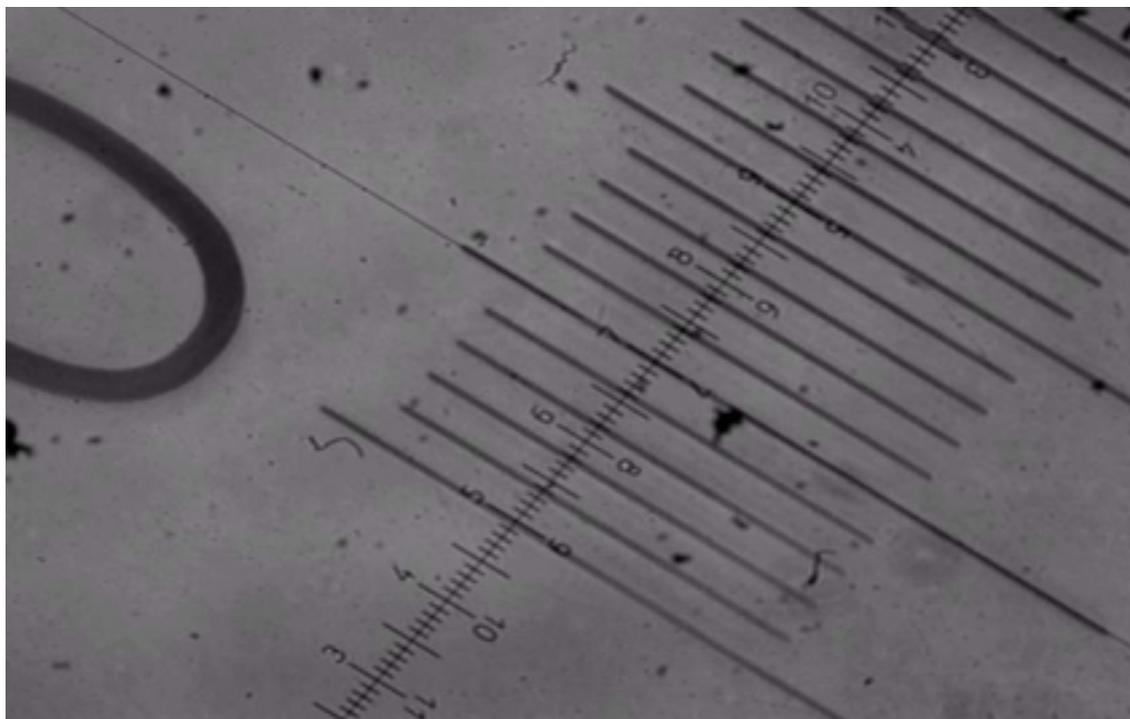


Figura AI.6- Imagem com câmara Watec 902H com objetiva 40x, ocular 10x, lente da câmara ( $f=16\text{mm}$   $F=1.6$ ) e espaçador da câmara.



Figura AI.7 - Imagem com câmara Watec 902H com objetiva 100x, ocular 10x, lente da câmara ( $f=16\text{mm}$   $F=1.6$ ) e espaçador da câmara.

## APÊNDICE II

### ANÁLISE DE INCERTEZAS DAS MEDIDAS

A todo sistema de medida deve estar associada uma análise de incerteza para qualificar os resultados obtidos.

Neste capítulo serão analisados os fatores responsáveis por incertezas nos valores das medidas dos componentes da velocidade das microalgas observadas em microscópio e das grandezas geométricas características das microalgas utilizadas no reconhecimento de padrões.

A seguir serão descritos cada um dos fatores que influenciam estas medidas originando incerteza nos valores obtidos. Posteriormente será quantificada a influência de cada um destes fatores com a finalidade de determinar um valor para a incerteza de cada medida [Almeida,1997].

#### 1. FONTES DE ERROS EXPERIMENTAIS

As fontes de erros são separadas em dois grupos, conforme dêem origem a erros sistemáticos ou aleatórios. Os erros sistemáticos são uma constante ou uma fração da própria medida, ou seja, os erros sistemáticos apresentam aproximadamente o mesmo valor para medidas repetidas. A ocorrência destes erros se deve à dificuldade de se determinar esta função ou constante. Os erros aleatórios são os erros não sistemáticos.

##### 1.1. FONTES DE ERROS SISTEMÁTICOS

A 1ª fonte de erro está na imagem quando projetada sobre o sensor devido à ótica. Consiste do ruído do fóton devido à natureza particulada da luz e ao processo estocástico de emissão da luz. Somente uma fração dos fótons é realmente detectada. Esta fração é chamada eficiência quântica. Para câmeras CCD esta eficiência varia entre 0,2 a 0,5 (Wilkinson, 1995).

##### 1.1.1. NÃO ORTOGONALIDADE ENTRE O EIXO DA OBJETIVA E O PLANO FOCADO

No microscópio, apenas uma fatia de espessura bastante reduzida do escoamento é focada. Deste modo, a região investigada do escoamento fica restrita a um plano. Quando se registra a imagem do escoamento espera-se estar registrando os componentes de deslocamentos de partículas paralelas ao plano de registro do CCD. A não ortogonalidade entre o plano do escoamento (lâmina do microscópio) e o eixo da objetiva da câmara de vídeo faz com que haja um ângulo não nulo entre as componentes dos deslocamentos das partículas e suas projeções

sobre a superfície sensível do sistema de registro da imagem (CCD). O mesmo ocorre com relação ao comprimento de referência no escoamento, utilizado para determinar o fator de escala. Esta, porém, não será, de modo geral, projetada sobre a superfície sensível do sistema de registro da imagem com o mesmo ângulo de projeção que os componentes dos diversos deslocamentos de partículas. Com isso a proporção dada pelo fator de escala entre os componentes do traço, em número de pixels, e os componentes do deslocamento real das partículas, em micrometros, conterà um erro.

### 1.1.2. DEFORMAÇÃO DA IMAGEM

Uma razão não constante ao longo da imagem entre os deslocamentos reais das partículas no escoamento e os deslocamentos na imagem pode ser devida a distorções produzidas na imagem devido ao efeito indesejado de refração da luz devido à mudança de meio (água-ar). De modo diferente da fonte de erro descrita na seção anterior, a razão entre um deslocamento no escoamento e o respectivo deslocamento na imagem não é função apenas da direção na qual os deslocamentos são medidos, mas também da posição absoluta das partículas. Para a correção destas distorções é necessário um mapeamento das mesmas ao longo da imagem a partir de diversos comprimentos de referência, localizados em posições diferentes.

### 1.1.3. COMPRIMENTO DE REFERÊNCIA NO ESCOAMENTO

O fator de escala, que relaciona as medidas em pixels na imagem digitalizada com as medidas efetivas no escoamento, é calculado pela razão entre um distância de referência conhecida no escoamento e o valor desta distância em pixels na imagem digitalizada. Um erro da medida da distância de referência repercute, portanto, nas medidas de velocidade, através do fator de escala.

## 1.2. FONTES DE ERROS ALEATÓRIOS

### 1.2.1. DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE POR EXTRAÇÃO DE MÉDIA

A velocidade medida não é a velocidade instantânea da partícula, mas sim, a velocidade média de um grupo de partículas, numa série de medidas em determinada região ao longo do intervalo de tempo  $\Delta t$ . Assim, para intervalos  $\Delta t$  muito grandes em relação ao inverso das maiores frequências do espectro do campo de velocidades, a velocidade medida poderá diferir significativamente da velocidade local no ponto ao qual é atribuída.

### 1.2.2. CONTRASTE DEFICIENTE DA IMAGEM

Deficiência no contraste global da imagem equivale a dificuldade na determinação do tom de cinza de corte da imagem para binarização. Com isso ocorre que pixels pertencentes ao

fundo podem vir a ser considerados pertencentes a alguma partícula, ou vice-versa, o que provoca um erro na determinação das coordenadas do centro da partícula, e na situação mais crítica, faz com que surjam partículas fictícias ou que partículas reais desapareçam.

O contraste deficiente na imagem pode ser consequência de:

- a) Baixo nível de exposição do CCD no caso de imagens de bactérias microscópicas obtidas em microscópio epifluorescente;
- b) Baixo número de tons de cinza do equipamento de digitalização da imagem.
- c) Erro na focalização quando é realizada a filmagem.

Há também deficiência de contraste localizada, entre uma partícula em particular e o fundo em seu redor. A consequência é a mesma, pixels do fundo sendo considerados pertencentes a alguma partícula ou vice versa, porém localizada. Isto pode ocorrer por deficiência local de iluminação, já que em geral a intensidade luminosa varia ao longo da área frontal e da fatia da amostra focada.

### 1.2.3. RESOLUÇÃO ESPACIAL DA IMAGEM

O pixel numa imagem digitalizada determina a sua resolução espacial. É impossível portanto fazer uma medida e garantir um erro na medida inferior a um pixel. A resolução espacial da imagem obtida numa câmara de vídeo CCD é função das dimensões do CCD e do número de pixels em cada direção do CCD.

De acordo com o manual do fabricante da câmara JVC TK 1180U, a câmara possui um CCD de  $\frac{1}{3}$ " correspondendo a 4,8mm x 3,6mm e 250000 pixels de tamanho efetivo. Assim, as dimensões do CCD são 510 pixels x 492 pixels efetivos, o que corresponde a uma resolução do CCD de 106 pixels/mm na direção horizontal e 136 pixels/mm na direção vertical. *O pixel não é quadrado.*

O limite de resolução  $d$  para observação das microalgas no microscópio ótico, segundo seu fabricante Zeiss (Möllring,1981) é dado pela eq.AII.1:

$$d = \frac{\lambda}{F_{obj} + F_{cond} + F_{espaçador}} \quad (\text{AII.1})$$

onde:

$d$ = limite de resolução do microscópio ótico

$\lambda$ = 550 nm (verde)

$F_{obj}$  = abertura da lente da objetiva = 0,75 (40x)

$F_{cond}$  = abertura da lente do condensador = 0,9

$F_{espaçador}$  = corresponde à abertura de uma lente acoplada à câmara de vídeo CCD = 0,9  
(54x) (ver fig. AI.5 e tabela A.1.1, Apêndice I)

Sendo, portanto:

$d = 0,215\mu\text{m}$  para amostras de microalgas observadas no estudo da velocimetria por acompanhamento de partículas.

Para amostras de microalgas observadas para extração de suas características, foi usada uma objetiva com  $F_{obj} = 1,3$  (100x), com proteção de óleo ( $n=1.515$ ) correspondendo a  $F_{obj-óleo} = 2.56$  (100x) portanto:

$d = 0,126\mu\text{m}$

Para bactérias fluorescentes observadas com filtro de barreira LP=520, conforme fig.2.5 seção 2.1, a emissão de fluorescência observada na câmara de vídeo CCD colocada sobre a ocular do microscópio tem um comprimento de onda  $\lambda$  acima de 520nm.

O limite de resolução  $d_{epi}$  para observação das bactérias fluorescentes no microscópio epifluorescente, é dado pela eq.AII.2:

$$d_{epi} = \frac{\lambda}{F_{obj} + F_{cond} + F_{lente+espaçador}} \quad (\text{AII.2})$$

onde:

$d_{epi}$  = limite de resolução do microscópio epifluorescente

$\lambda = 550$  nm (verde)

$F_{obj}$  = abertura da lente da objetiva, com proteção de óleo ( $n=1.515$ ) = 2.56 (100x)

$F_{cond}$  = abertura da lente do condensador = 0,9

$F_{lente+espaçador}$  = corresponde à abertura de uma lente acoplada à câmara de vídeo CCD = 0,11 (2,5x) (ver fig. AI.5 e tabela A.I.1, Apêndice I)

Logo:

$d_{epi} = 0,154\mu\text{m}$

#### 1.2.4. Intervalo de tempo

Há uma incerteza associada à medida do intervalo de tempo  $\Delta t$ , entre duas imagens sucessivas. Esta incerteza repercute na determinação dos componentes da velocidade feita através da razão entre os componentes do deslocamento das partículas e o intervalo de tempo  $\Delta t$ .

## 2. QUANTIFICAÇÃO DAS INCERTEZAS

A algumas das incertezas associadas às fontes de erro listadas anteriormente serão atribuídos valores (estas são as incertezas consideradas), enquanto que em relação as demais serão discutidas as condições em que podem ser desprezadas (são as incertezas não consideradas).

Ao final da seção serão determinadas as incertezas totais associadas a cada uma das medidas finais (componentes de velocidade e as coordenadas da posição de cada vetor velocidade) e às grandezas geométricas características das microalgas utilizadas no reconhecimento de padrões.

### 2.1. INCERTEZAS NÃO CONSIDERADAS

#### 2.1.1. INCERTEZA DEVIDO À NÃO ORTOGONALIDADE ENTRE O EIXO DA OBJETIVA E O PLANO ILUMINADO

Com a finalidade de minimizar o efeito de refração na mudança de meio (água-ar), devemos ter um ângulo nulo entre o CCD e o *plano focado*, conforme fig. AII.1. Este ângulo será denominado  $\alpha$ . Há porém uma incerteza associada a este ângulo que pode causar as conseqüências descritas no item 1.1.1. Determinando o erro máximo possível em função do ângulo  $\alpha$ , pode-se determinar um valor limite deste ângulo, para cada situação, que permita desprezar a incerteza associada.

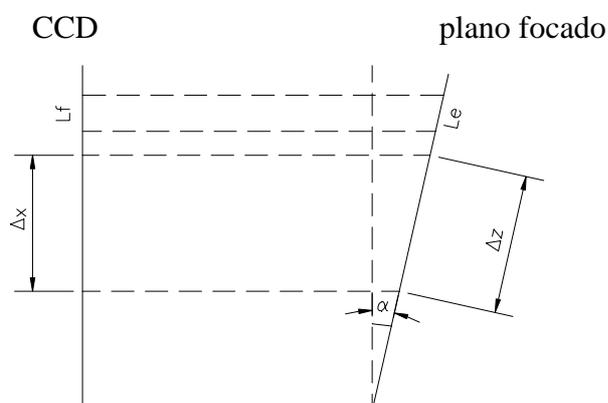


Figura AII.1 - Não ortogonalidade entre o eixo da objetiva e o plano focado.

Seja um deslocamento  $\Delta z$  que se deseja medir no escoamento e  $L_e$  o comprimento de referência. Sejam, ainda,  $\Delta x$  e  $L_f$  as distâncias correspondentes determinadas na imagem. Então a medida  $\Delta z$  do deslocamento será dada pela eq. AII.3:

$$\Delta z = F \cdot \Delta x = \frac{L_e}{L_f} \Delta x \quad (\text{AII.3})$$

onde  $F$  é o fator de escala que relaciona dimensões da imagem com dimensões no escoamento. Sendo  $\alpha$  o ângulo entre a superfície do CCD e os segmentos  $\Delta z$  e  $L_e$  no escoamento (os quais estão contidos no plano focado), teremos as eqs. AII.4 e AII.5:

$$\Delta x = M \Delta z \cdot \cos \alpha \quad (\text{AII.4})$$

$$L_f = M \cdot L_e \cdot \cos \alpha \quad (\text{AII.5})$$

onde  $M$  é a ampliação dada pela objetiva da câmara de vídeo.

Assim sendo, de acordo com a eq. AII.6:

$$\Delta z = \frac{L_e}{M \cdot L_e \cdot \cos \alpha} M \cdot \Delta z \cdot \cos \alpha \quad (\text{AII.6})$$

então esta incerteza não existe, pois a diferença no deslocamento é compensada pela diferença no comprimento de referência.

A incerteza só existirá se  $L_e$  e  $\Delta z$  não estiverem no mesmo plano, neste caso, haverá um ângulo  $\beta$ , não nulo, entre o deslocamento e o comprimento de referência.

A relação entre o valor verdadeiro do comprimento de referência ( $L_v$ ) e sua projeção no plano do deslocamento ( $L_p$ ), é expressa pela eq. AII.7:

$$L_p = L_v \cos (\beta) \quad (\text{AII.7})$$

Conseqüentemente, o erro  $E$  na medida obtida será dado pela eq. AII.8:

$$E = |L_v - L_p| = L_v (1 - \cos \beta) \quad (\text{AII.8})$$

O módulo do erro relativo máximo  $e_{máx}$  será, de acordo com a eq. AII.9:

$$e_{max} = 1 - \cos \beta \quad (\text{AII.9})$$

Para que o erro percentual máximo seja inferior a 1% é suficiente que  $\beta \leq 8,1^\circ$ , o que é facilmente obtido na montagem experimental. Vê-se assim que é razoável não considerar esta incerteza.

### 2.1.2. INCERTEZA DEVIDO À REFRAÇÃO

' Para medir esta incerteza, consideremos uma distância  $AB$ , perpendicular ao eixo  $Oz$  da objetiva da câmara de vídeo, sendo que o ponto  $A$  pertence a este eixo. Seja  $S$  uma superfície plana que corresponde à interface entre dois meios (1 e 2), com índices de refração  $n_1$  e  $n_2$ , e que é normal ao eixo  $Oz$ , conforme mostra a figura AII.2.

Um raio de luz que parte do ponto  $B$  e atinge a superfície do CCD, passando pela objetiva, sofre uma refração na superfície  $S$ . O raio refratado equivaleria, numa situação em não houvesse mudança de meio, a um raio partindo do ponto  $B'$ , também indicado na figura AII.2.

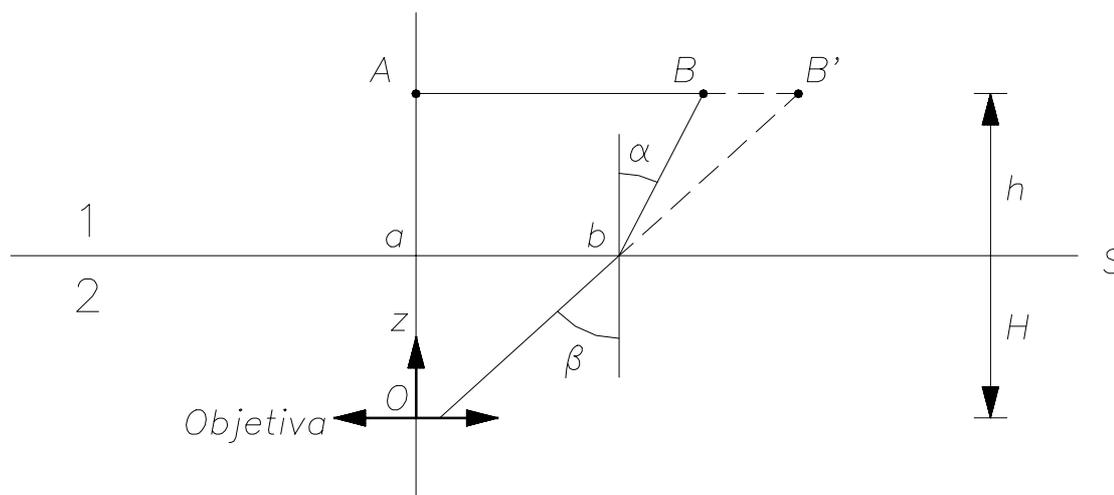


Figura AII.2 - Efeito da refração na medida de um segmento.

Na situação ilustrada,  $H$  é definido como a distância da objetiva à superfície  $S$  e  $h$  como a distância do segmento  $AB$  (ou  $AB'$ , ou  $BB'$ ) à mesma superfície  $S$ . O ponto  $a$  e o ponto  $b$  são as interseções com a superfície  $S$  do eixo  $Oz$  e de um raio proveniente de  $B$  que atinge a objetiva, respectivamente, enquanto  $\alpha$  é o ângulo entre o raio incidente  $Bb$  e a normal à superfície  $S$  e  $\beta$  é o ângulo entre o raio refratado  $B'b$  e a mesma normal.

Tem-se, de acordo com as eqs.AII.10 a AII.12 :

$$AB = ab + htg\alpha \quad (\text{AII.10})$$

$$AB' = ab + htg\beta \quad (\text{AII.11})$$

$$\therefore \frac{AB}{AB'} = \frac{ab + htg\alpha}{ab + htg\beta} \quad (\text{AII.12})$$

Nota-se que a relação entre os comprimentos  $AB$  real e  $AB'$  aparente não é constante.

Assim, a distorção decorrente do efeito de refração não será em geral proporcional para a distância  $L$  de referência e um deslocamento  $\Delta z$  qualquer, implicando em erro na medida do deslocamento  $\Delta z$ . Quando, porém,  $H+h \gg AB$ , tem-se  $\alpha \cong \beta \cong 0$ , e portanto  $\frac{AB}{AB'} \cong 1$ , ou seja,  $\frac{AB}{AB'}$  torna-se praticamente constante. Também se obtém este resultado quando  $h \ll ab$  e  $\text{tg}(\alpha)$ ,  $\text{tg}(\beta) \cong < 1$ .

No caso das imagens adquiridas em microscópio ocorre a condição  $h \ll ab$ .

Na formulação do modelo analisado foram usadas algumas hipóteses restritivas que são, entretanto, bastante gerais para a aplicação da técnica. Quanto à hipótese da superfície  $S$  ser plana, é perfeitamente viável, já que o fluido (água) e as partículas (microalgas) estão sobre uma lamínula de vidro de 3 mm de espessura e não há alturas diferentes de água porque o fluido não é viscoso e tende a se espalhar. Há que se considerar também que pode haver um terceiro meio entre os meios 1 e 2, o que equivaleria a uma placa de vidro sobre a amostra. Desde que esta parede seja fina em relação à distância  $h$  da objetiva ao segmento  $AB$ , ou que o índice de refração deste terceiro meio não seja muito diferente de  $n_1$  ou  $n_2$ , praticamente não haverá diferença em relação ao modelo que considera apenas os meios 1 e 2. Finalmente, quanto à hipótese de que  $A$  se situa sobre o eixo da lente, é fácil concluir que se fosse desejado determinar o efeito da refração na medida de um segmento  $BC$ , seria possível determinar  $BC$  por uma diferença  $|AC - AB|$  e  $B'C'$  por  $|AC' - AB'|$ .

### 2.1.3. INCERTEZA DEVIDO AO TAMANHO DA PARTÍCULA

Adrian, 1991, recomenda, para partículas de poliestireno em água, o diâmetro mínimo de 10  $\mu\text{m}$ , uma vez que para diâmetros menores é necessário aumentar muito a intensidade luminosa incidente a fim de obter-se uma boa imagem das partículas. Realmente, observando-se a fig. 6.56 seção 6.3.2, verifica-se a pouca nitidez de detalhes da microalga *Isochrysis galbana*, por seu tamanho muito inferior ao das outras espécies (3 $\mu\text{m}$ ).

#### 2.1.4. INCERTEZA DEVIDO À DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE POR EXTRAÇÃO DA MÉDIA

Esta incerteza pode ser significativamente reduzida limitando-se o intervalo de tempo  $\Delta t$ , entre duas imagens sucessivas. Sendo  $\omega_{\text{máx}}$  a maior frequência do espectro do campo de velocidades, pode-se desprezar a incerteza ora analisada se, conforme eq. AII.13:

$$\Delta t \leq \frac{1}{\omega_{\text{máx}}} \quad (\text{AII.13})$$

Devemos notar entretanto, que reduzindo  $\Delta t$ , também reduzimos o deslocamento das partículas, e em conseqüência, aumentamos a incerteza na medida do deslocamento.

Para as câmaras CCDs utilizadas,  $\Delta t = 0,033\text{s}$

Então:

$\omega_{\text{máx}} = 30\text{Hz}$  é o limite para flutuações de velocidade entre duas imagens.

## 2.2. INCERTEZAS CONSIDERADAS

### 2.2.1. INCERTEZA NA MEDIDA DO INTERVALO DE TEMPO

O intervalo de tempo  $\Delta t$  é o tempo que separa duas imagens sob análise no caso do processo de velocimetria por acompanhamento de partículas. Este intervalo de tempo está relacionado com a taxa de aquisição de quadros por segundo da câmara CCD utilizada. Para todos os resultados obtidos este intervalo foi de 30 quadros/s, o que equivale a um tempo de (1/30s).

Como exemplo de cálculo desta incerteza cita-se o trabalho de Van der Laan et al, 2001, que mediu a estabilidade da base de tempo da câmara CV-30 (JAI) tomada entre 22° C e 27° C durante 24 horas, no relógio mestre de 57,70426 MHz, com o freqüencímetro Topward Modelo 1220 de oito dígitos apresentando:

$$\sigma_{\Delta t} = \pm 1,4 \times 10^{-6}$$

Considerando que os vetores velocidade apresentam no máximo valores de 600 pixels/s correspondentes a 0,450 mm/s (cap 6 seção 6.4), a incerteza gerada pela base de tempo seria na ordem de  $0,63 \times 10^{-6}$  mm, portanto desprezível, com relação as outras incertezas quantizadas na ordem de 0,001144 mm a 0,003264 mm (ver seção 3.2 deste apêndice).

### 2.2.2. INCERTEZA NAS COORDENADAS ESPACIAIS

A menor incerteza de uma medida espacial é a resolução do sistema de medição. Deste modo, a incerteza mínima das coordenadas espaciais na imagem será de um pixel.

### 2.2.3. INCERTEZA NA MEDIDA DA DISTÂNCIA DE REFERÊNCIA

A incerteza na medida da distância de referência depende da resolução do instrumento utilizado para efetuar a medição. Foi utilizada uma régua acoplada à ocular do microscópio com resolução de  $L$  de  $10\mu\text{m}$  ( $0,010\text{mm}$ ) para efetuar a medição. A probabilidade que a leitura da distância de referência esteja entre 2 traços da régua separados por  $L$  é igual a 1. Pode-se assumir então que é igualmente provável a leitura estar dentro deste intervalo, sendo sua incerteza dada pela eq. AII.14, segundo BIPM, 1996:

$$\delta L = \frac{L}{2\sqrt{3}} \quad (\text{AII.14})$$

Logo, o valor da incerteza considerada é  $2,887\mu\text{m}$ .

### 2.2.4. INCERTEZA DEVIDO À QUANTIZAÇÃO DA IMAGEM

A principal origem desta incerteza está no fato de que a solução analítica dos escoamentos é expressa em números reais enquanto que as coordenadas espaciais na imagem são expressas em números inteiros. Como estamos interessados apenas no deslocamento das partículas, o intervalo de tempo e o fator de escala foram considerados unitários.

De acordo com a seção 6.4 e tabela 6.16, os deslocamentos das microalgas variam de 0 a  $\pm 600$  pixels/s. Então, a incerteza relativa devido à quantização da imagem será dada pela eq. AII.15:

$$\frac{\delta PI}{PI} = \sqrt{\left(\frac{\delta \Delta x}{\Delta x}\right)^2} \quad (\text{AII.15})$$

Para:

$$\delta \Delta x = 1 \text{ pixel}$$

$$\Delta x = 600 \text{ pixels ( maior deslocamento )}$$

$$\frac{\delta PI}{PI} \text{ min} = 0,0016$$

Para:

$$\delta\Delta x = 1 \text{ pixel}$$

$$\Delta x = 30 \text{ pixels ( menor deslocamento )}$$

$$\frac{\delta PI}{PI} \text{ max} = 0,033$$

### 3. INCERTEZA NAS MEDIDAS FINAIS PARA VELOCIMETRIA POR ACOMPANHAMENTO DE PARTÍCULAS

As medidas finais que desejamos obter são os componentes  $u$  e  $v$  da velocidade e as coordenadas  $x$  e  $y$  da posição do campo a qual esta velocidade é atribuída. As incertezas consideradas serão utilizadas para determinar as incertezas totais em cada medida empregando procedimento desenvolvido segundo BIPM, 1996, no qual a incerteza de uma variável  $F=f(x_1, x_2, \dots, x_n)$  é determinada pela eq. AII.16, quando as grandezas de entrada  $x_1, x_2, \dots, x_n$  não são correlacionadas:

$$\delta^2 F = \sum_{i=1}^n \left[ \frac{\partial F}{\partial x_i} \right]^2 \delta^2(x_i) \quad (\text{AII.16})$$

Da eq. AII.16 resulta a incerteza relativa da variável  $F$ , dada pela eq. AII.17:

$$\frac{\delta F}{F} = \sqrt{\left( \frac{\delta x_1}{x_1} \right)^2 + \left( \frac{\delta x_2}{x_2} \right)^2 + \dots + \left( \frac{\delta x_n}{x_n} \right)^2} \quad (\text{AII.17})$$

onde a incerteza de cada variável é obtida por uma avaliação do tipo A ou B.

A avaliação tipo A é o método de avaliação da incerteza pela análise estatística de uma série de observações.

A avaliação tipo B é o método de avaliação por outros meios, como:

uma suposta função densidade de probabilidade, baseada no grau de credibilidade que um evento vá ocorrer;

dados de medições prévias;

a experiência ou o conhecimento geral do comportamento e propriedades de materiais e instrumentos relevantes;

especificações do fabricante;

dados fornecidos em certificados de calibração e outros certificados;

incertezas relacionadas a dados de referência extraídos de manuais.

Quando as variáveis de entrada  $x_1, x_2, \dots, x_n$  são correlacionadas, a incerteza da variável  $F$ , segundo BIPM, 1996, é dada pela eq. AII.18:

$$\partial^2 F = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{\partial F}{\partial x_i} \right]^2 \delta^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{\partial F}{\partial x_i} \frac{\partial F}{\partial x_j} \delta(x_i) \delta(x_j) r(x_i, x_j) \quad (\text{AII.18})$$

Para o caso especial em que todas as estimativas de entrada são correlacionadas, com coeficientes de correlação  $r(x_i, x_j) = +1$ , a eq. AII.18 se reduz à eq. AII.19:

$$\delta^2 F = \left[ \sum_{i=1}^N \frac{\partial F}{\partial x_i} \delta(x_i) \right]^2 \quad (\text{AII.19})$$

### 3.1. INCERTEZA NO FATOR DE ESCALA

O fator de escala  $F$  é dado pelas eqs. AII.20:

$$F_x = \frac{L_x}{\Delta x} \quad F_y = \frac{L_y}{\Delta y} \quad (\text{AII.20})$$

onde:

$F_x$  = fator de escala na direção horizontal (mm/pixel)

$L_x$  = distância real horizontal conhecida entre dois pontos fixos do escoamento (mm)

$\Delta x$  = distância identificando  $L_x$  na imagem de amostra do escoamento (pixel)

Aplicando a equação AII.17 ao fator de escala dado pela equação AII.20, resultam as eqs.

AII.21:

$$\frac{\delta F_x}{F_x} = \sqrt{\left( \frac{\delta L_x}{L_x} \right)^2 + \left( \frac{\delta \Delta x}{\Delta x} \right)^2} \quad \frac{\delta F_y}{F_y} = \sqrt{\left( \frac{\delta L_y}{L_y} \right)^2 + \left( \frac{\delta \Delta y}{\Delta y} \right)^2} \quad (\text{AII.21})$$

Observa-se que quanto menor for o valor da distância de referência maior será a sua incerteza. De acordo com a fig.6.69, seção 6.4.1,  $15\mu\text{m}=20$  pixels na direção horizontal e 26 pixels na direção vertical, para objetiva de 10x.

Para a direção horizontal:

$$\delta L_x = \frac{5}{\sqrt{3}} \mu\text{m}$$

$$\delta \Delta x = 1 \text{ pixel},$$

$$L_x = 22,5 \mu\text{m}$$

$$\Delta x = 30 \text{ pixels (menor deslocamento)}$$

Resulta em uma incerteza para o fator de escala de:

$$\frac{\delta F_x}{F_x} \max = 0,1325 \text{ ou } 13,25\%$$

Sendo:

$$F_x = 0,00075 \text{ mm/pixel}, \text{ a incerteza absoluta é } \delta F_x \max = 0,000099 \text{ mm/pixel}$$

Para:

$$\delta L_x = \frac{5}{\sqrt{3}} \mu\text{m}$$

$$\delta \Delta x = 1 \text{ pixel},$$

$$L_x = 450 \mu\text{m}$$

$$\Delta x = 600 \text{ pixels (maior deslocamento)}$$

Resulta em uma incerteza para o fator de escala de:

$$\frac{\delta F_x}{F_x} \min = 0,0066 \text{ ou } 0,66\%$$

Sendo:

$$F_x = 0,00075 \text{ mm/pixel}, \text{ a incerteza absoluta é } \delta F_x \min = 0,000005 \text{ mm/pixel}$$

Para a direção vertical:

$$\delta L_y = \frac{5}{\sqrt{3}} \mu\text{m}$$

$$\delta \Delta y = 1 \text{ pixel},$$

$$L_y = 17,3 \mu\text{m}$$

$$\Delta y = 30 \text{ pixels (menor deslocamento)}$$

Resulta em uma incerteza para o fator de escala de:

$$\frac{\delta F_y}{F_y} \max = 0,1701 \text{ ou } 17,01\%$$

Sendo:

$$F_y = 0,00058 \text{ mm/pixel}, \text{ a incerteza absoluta é } \delta F_y \max = 0,000099 \text{ mm/pixel}$$

Para:

$$\delta L_y = \frac{5}{\sqrt{3}} \mu\text{m}$$

$$\delta \Delta y = 1 \text{ pixel},$$

$$L_y = 346 \mu\text{m}$$

$$\Delta y = 600 \text{ pixels (maior deslocamento)}$$

Resulta em uma incerteza para o fator de escala de:

$$\frac{\delta F_y}{F_y} \text{ min} = 0,0085 \text{ ou } 0,85\%$$

Sendo:

$$F_y = 0,00058 \text{ mm/pixel}, \text{ a incerteza absoluta é } \delta F_y \text{ min} = 0,000005 \text{ mm/pixel}$$

### 3.2. INCERTEZA NAS COORDENADAS ESPACIAIS

As coordenadas espaciais são determinadas pelas eqs. AII.22:

$$X_L = F_x \cdot x_p \qquad Y_L = F_y \cdot y_p \qquad (\text{AII.22})$$

onde o índice  $L$  se refere a coordenada em milímetros e o índice  $p$  a coordenada em pixels.

Aplicando a equação AII.17 para determinar a incerteza nas coordenadas espaciais nas direções  $x$  e  $y$  resultam as eqs. AII.23:

$$\frac{\delta X_L}{X_L} = \sqrt{\left(\frac{\delta F_x}{F_x}\right)^2 + \left(\frac{\delta x_p}{x_p}\right)^2} \qquad (\text{AII.23a})$$

$$\frac{\delta Y_L}{Y_L} = \sqrt{\left(\frac{\delta F_y}{F_y}\right)^2 + \left(\frac{\delta y_p}{y_p}\right)^2} \qquad (\text{AII.23b})$$

Para a direção  $x$ , de acordo com a seção 3.1:

$$F_x = 0,00075 \text{ mm/pixel}$$

$$\delta F_x \text{ max} = 0,000099 \text{ mm/pixel}$$

$$x_p = 10 \text{ pixels}$$

$$\delta x_p = 1 \text{ pixel}$$

Resulta uma incerteza para as coordenadas espaciais de:

$$\frac{\delta X_L}{X_L} \max = 0,1660 \text{ ou } 16,60\%$$

Sendo:

$$X_L = 0,0075\text{mm}, \text{ a incerteza absoluta máxima é } \delta X_L \min = 0,001245\text{mm}$$

No outro extremo da imagem:

$$F_x = 0,00075\text{mm} / \text{pixel}$$

$$\delta F_x \min = 0,000005\text{mm} / \text{pixel}$$

$$x_p = 640\text{pixels}$$

$$\delta x_p = 1\text{pixel}$$

Resulta uma incerteza para as coordenadas espaciais de:

$$\frac{\delta X_L}{X_L} \min = 0,0068 \text{ ou } 0,68 \%$$

Sendo:

$$X_L = 0,48\text{mm}, \text{ a incerteza absoluta é } \delta X_L \max = 0,003264\text{mm}$$

Para a direção y, de acordo com a seção 3.1:

$$F_y = 0,00058\text{mm} / \text{pixel}$$

$$\delta F_y \max = 0,000099\text{mm} / \text{pixel}$$

$$y_p = 10\text{pixels}$$

$$\delta y_p = 1\text{pixel}$$

Resulta uma incerteza para as coordenadas espaciais de:

$$\frac{\delta Y_L}{Y_L} \max = 0,1973 \text{ ou } 19,73\%$$

Sendo:

$$Y_L = 0,0058\text{mm}, \text{ a incerteza absoluta máxima é } \delta Y_L \min = 0,001144\text{mm}$$

No outro extremo da imagem:

$$F_y = 0,00058\text{mm} / \text{pixel}$$

$$\delta F_y \min = 0,000005\text{mm} / \text{pixel}$$

$$y_p = 480\text{pixels}$$

$$\delta y_p = 1\text{pixel}$$

Resulta uma incerteza para as coordenadas espaciais de:

$$\frac{\delta Y_L}{Y_L} \min = 0,0087 \text{ ou } 0,87 \%$$

Sendo:

$$Y_L = 0,2784\text{mm}, \text{ a incerteza absoluta é } \delta Y_L \max = 0,002422\text{mm}$$

Aumentando a resolução da imagem digitalizada a incerteza diminui, entretanto a resolução máxima está limitada a 106 pixels/mm que é a resolução do CCD da câmara de vídeo

na direção horizontal e 136 pixels/mm na direção vertical (seção 1.2.3). O aumento da resolução também aumenta o tempo de processamento da imagem.

### 3.3. INCERTEZA NAS COMPONENTES DA VELOCIDADE

As componentes da velocidade são determinados pelas eqs. AII.24:

$$u = F_x \cdot \frac{x_2 - x_1}{\Delta t} \quad (\text{AII.24a})$$

$$v = F_y \cdot \frac{y_2 - y_1}{\Delta t} \quad (\text{AII.24b})$$

#### 3.3.1 VARIÁVEIS DE ENTRADA NÃO CORRELACIONADAS

Aplicando a eq. AII.17, para determinar a incerteza para a velocidade nas direções  $x$  e  $y$ , e combinando com a incerteza devido à quantificação da imagem, resultam as eqs. AII.25:

$$\frac{\delta u}{u} = \sqrt{\left(\frac{\delta F_x}{F_x}\right)^2 + \left(\frac{\delta x_1}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\delta x_2}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\delta \Delta t}{\Delta t}\right)^2 + \left(\frac{\delta PI}{PI}\right)^2} \quad (\text{AII.25a})$$

$$\frac{\delta v}{v} = \sqrt{\left(\frac{\delta F_y}{F_y}\right)^2 + \left(\frac{\delta y_1}{\Delta y}\right)^2 + \left(\frac{\delta y_2}{\Delta y}\right)^2 + \left(\frac{\delta \Delta t}{\Delta t}\right)^2 + \left(\frac{\delta PI}{PI}\right)^2} \quad (\text{AII.25b})$$

Conforme seção 2.2.1, a incerteza na medida do intervalo de tempo  $\Delta t$  foi considerada desprezível..

Para:

$$F_x = 0,00075 \text{ mm / pixel}$$

$$\delta F_x \text{ min} = 0,000005 \text{ mm / pixel}$$

$$\Delta x = 600 \text{ pixels (maior deslocamento para } \Delta t = 1 \text{ s)}$$

$$\delta x_1 = \delta x_2 = 1 \text{ pixel}$$

$$\frac{\delta PI}{PI} \text{ min} = 0,0016$$

Resulta uma incerteza mínima para a componente  $u$  da velocidade de:

$$\frac{\delta u}{u} \text{ min} = 0,0072 \quad \text{ou } 0,72\%$$

Sendo:

$$u = 0,45 \text{ mm/s, a incerteza absoluta é } \delta u_{\text{min}} = 0,00324 \text{ mm/s}$$

Para a situação de maior incerteza:

$$F_x = 0,00075mm / pixel$$

$$\delta F_{\max} = 0,000099mm / pixel$$

$\Delta x = 30$  pixels (menor deslocamento)

$$\delta x_1 = \delta x_2 = 1 pixel$$

$$\frac{\delta PI}{PI}_{\max} = 0,033$$

Resulta uma incerteza máxima para componente  $u$  da velocidade de:

$$\frac{\delta u}{u}_{\max} = 0,1444 \text{ ou } 14,44\%$$

Sendo:

$$u = 0,0225 \text{ mm/s, a incerteza absoluta é } \delta u_{\max} = 0,003249mm / s$$

Para:

$$F_y = 0,00058mm / pixel$$

$$\delta F_{y \min} = 0,000005mm / pixel$$

$\Delta y = 600$  pixels (maior deslocamento para  $\Delta t=1s$ )

$$\delta y_1 = \delta y_2 = 1 pixel$$

$$\frac{\delta PI}{PI}_{\min} = 0,0016$$

resulta uma incerteza mínima para a componente  $v$  da velocidade de:

$$\frac{\delta v}{v}_{\min} = 0,009 \text{ ou } 0,9\%$$

Sendo:  $v = 0,348 \text{ mm/s, a incerteza absoluta é } \delta v_{\min} = 0,003132mm / s$

Para a situação de maior incerteza:

$$F_y = 0,00058mm / pixel$$

$$\delta F_{y \max} = 0,000099mm / pixel$$

$\Delta y = 30$  pixels (menor deslocamento)

$$\delta y_1 = \delta y_2 = 1 pixel$$

$$\frac{\delta PI}{PI}_{\max} = 0,033$$

Resulta uma incerteza máxima para componente  $v$  da velocidade de:

$$\frac{\delta v}{v}_{\max} = 0,1796 \text{ ou } 17,96 \%$$

Sendo:

$v = 0,0174 \text{ mm/s}$ , a incerteza absoluta é  $\delta v_{\max} = 0,003125 \text{ mm/s}$

Pelos resultados apresentados, pode-se observar que o fator preponderante no cálculo das incertezas é o fator de escala.

### 3.3.2 VARIÁVEIS DE ENTRADA CORRELACIONADAS

Aplicando-se a eq. AII.19, para as componentes da velocidade  $u$  e  $v$  (eq. AII.24) resulta a eq. AII.26:

$$\frac{\delta^2(u)}{u^2} = \left[ \frac{(\delta(x_2) - \delta(x_1))}{x_2 - x_1} - \frac{\delta(\Delta t)}{\Delta t} \right]^2 \quad (\text{AII.26a})$$

$$\frac{\delta^2(v)}{v^2} = \left[ \frac{(\delta(y_2) - \delta(y_1))}{y_2 - y_1} - \frac{\delta(\Delta t)}{\Delta t} \right]^2 \quad (\text{AII.26b})$$

onde:

$$\delta(x_2) - \delta(x_1) = 0$$

$$\delta(y_2) - \delta(y_1) = 0$$

$$\delta(\Delta t) = 0 \text{ de acordo com a seção 2.2.1.}$$

Logo:

$$\frac{\delta(u)}{u} = 0 \quad \text{e} \quad \frac{\delta(v)}{v} = 0$$

Comparando os resultados da aplicação das eqs. AII.25 e AII.26 conclui-se que

$$\frac{\delta(u)}{u} \max = 14,44\% \quad \text{e} \quad \frac{\delta(v)}{v} \max = 17,96\%$$

## 3.4. INCERTEZAS NAS MEDIDAS FINAIS DAS GRANDEZAS GEOMÉTRICAS CARACTERÍSTICAS DAS MICROALGAS E DAS BACTÉRIAS FLUORESCENTES

Para determinação das grandezas geométricas características das microalgas usadas no reconhecimento de padrões foram usadas no microscópio as objetivas de 10x e 40x. As imagens foram obtidas com a câmara JVC TK1180U, com espaçador. Para a determinação da área e perímetro das bactérias fluorescentes foi utilizada a câmara Watec com lente e espaçador. (Ver APÊNDICE I).

As 8 grandezas geométricas características das microalgas (área -A, perímetro-P, Xmax, Xmin, Elongação-E, Esfericidade-Esf, Diâmetro de Feret -DF e Compactação-C) foram definidas no capítulo 3, seção 3.2.

As avaliações de incerteza destas grandezas foram calculadas pelo método tipo A segundo BIPM, 1996. Estas incertezas são baseadas em métodos estatísticos, a partir de distribuição de valores em torno de uma média.

### 3.4.1. PROCEDIMENTOS DE CÁLCULOS

A incerteza da medição de uma grandeza  $x_i$  é calculada utilizando-se uma amostragem desta grandeza. A amostragem é composta de  $k$  elementos.

#### a- Cálculo da média aritmética da amostragem escolhida

A média aritmética, eq. AII.27, é considerada a melhor estimativa do valor da grandeza quando  $n$  observações independentes forem obtidas sob as mesmas condições.

$$\bar{x}_i = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_{i,k} \quad (\text{AII.27})$$

#### b- Cálculo do desvio padrão da amostragem

A variação entre o valor amostrado e o valor médio é caracterizada pela diferença dada pela eq. AII.28:

$$\Delta x = x_{i,k} - \bar{x}_i \quad (\text{AII.28})$$

Pode-se obter, para uma amostragem particular, as  $n$  variações, uma para cada amostra obtida. Esta diferença, certamente, terá valores positivos e negativos pois a média fica equidistante dos valores amostrados. A dispersão destes valores amostrados em relação à média é dada por outra média, a das variações. Para evitar-se, no entanto, que esta média deixe de levar em consideração todas as variações, pois umas sendo negativas vão reduzir o somatório total, eleva-se ao quadrado todas elas. O número de termos desta amostragem é tomado como  $n-1$  e definido como graus de liberdade. Esta média é denominada de *variância experimental*  $s^2(x_i)$  e será definida pela eq. AII.29:

$$(\Delta x_i)^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_{i,k} - \bar{x}_i)^2 = s^2(x_i) \quad (\text{AII.29})$$

A raiz quadrada desta variância é definida como *desvio padrão experimental*  $s(x_i)$ , dado pela eq. AII.30:

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (x_{i,k} - \bar{x}_i)^2} \quad (\text{AII.30})$$

c- Cálculo do desvio padrão da média aritmética

A melhor estimativa da variância experimental é dada pela *variância da média*, representada pela eq. AII.30 dividida por  $n$ .

O *desvio padrão da média*  $s(\bar{x}_i)$  é dado pela eq. AII.31:

$$s(\bar{x}_i) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} \quad (\text{AII.31})$$

d- Cálculo da incerteza padrão da componente  $x_i$

A incerteza padrão definida segundo BIPM, 1996, é dada pela eq. AII.32:

$$u(x_i) = s(\bar{x}_i) \quad (\text{AII.32})$$

### 3.4.2. PLANILHAS DE RESULTADOS DAS INCERTEZAS DAS GRANDEZAS GEOMÉTRICAS CARACTERÍSTICAS DAS MICROALGAS E DAS BACTÉRIAS FLUORESCENTES

As tabelas AII.1 a AII.8 apresentam as incertezas das variáveis características.

De acordo com o APÊNDICE I, as microalgas foram observadas no microscópio com uma objetiva de 10X com uma câmara de vídeo JVC TK1180U acoplada com espaçador que corresponde a um aumento de 54X. O fator de escala para o aumento total é de 1,3 pixels/ $\mu\text{m}$ . As bactérias foram observadas no microscópio epifluorescente com uma objetiva de 100X, ocular de 10X com uma câmara de vídeo Watec 902H acoplada com espaçador que corresponde a um aumento de 2,5X. O fator de escala para o aumento total é de 6,7 pixels/ $\mu\text{m}$ .

Tabela AII.1 Incerteza da grandeza *Área* (pixels<sup>2</sup>)

	Observação com aumento total de 540X $1\mu\text{m}^2 = 1,69 \text{ pixels}^2$					Observação com aumento total de 2500X $1\mu\text{m}^2 = 44,89 \text{ pixels}^2$
	<i>Amphidinium Operculatum</i> 122 amostras	<i>Fibrocapsa japonica</i> 36	<i>Tetraselmis chuii</i> 498	<i>Chaetoceros sp.</i> 19 amostras	<i>Isochrysis Galbana</i> 22 amostras	Bactérias fluorescentes 29 amostras
Média= $\bar{x}_i$	421,06	1058,86	260,27	57,36	67,47	213,17
Variância= $s^2(x_i)$	3922,12	70693,44	2358,51	641,32	534,53	55356,08
Desvio padrão= $s(x_i)$	62,63	265,88	48,56	25,32	23,12	235,28
Incerteza padrão = $u(x_i) = s(\bar{x}_i)$	5,67	44,31	2,18	5,81	4,93	43,69
Valor da Área (pixels <sup>2</sup> )	421,06 ±5,67	1058,86 ±44,31	260,27 ±2,18	57,36±5,81	67,47±4,93	213,17 ±43,69

Tabela AII.2 Incerteza da grandeza *Perímetro* (pixels)

	Observação com aumento total de 540X $1\mu\text{m} = 1,30 \text{ pixels}$					Observação com aumento total de 2500X $1\mu\text{m} =$
	<i>Amphidinium Operculatum</i> 122 amostras	<i>Fibrocapsa japonica</i> 36 amostras	<i>Tetraselmis chuii</i> 498 amostras	<i>Chaetoceros sp.</i> 19 amostras	<i>Isochrysis Galbana</i> 22 amostras	Bactérias fluorescentes 29 amostras
Média= $\bar{x}_i$	79,07	150,37	62,35	48,23	42,42	62,78
Variância= $s^2(x_i)$	60,60	1055,89	112,70	165,26	71,74	3136,13
Desvio padrão= $s(x_i)$	7,78	32,49	10,62	12,86	8,47	56,00
Incerteza padrão = $u(x_i) = s(\bar{x}_i)$	0,70	5,42	0,48	2,95	1,81	10,40
Valor do Perímetro (pixels)	79,07 ±0,70	150,37 ±5,42	62,35 ±0,48	48,23±2,95	42,42±1,81	62,78±10,40

Tabela AII.3 Incerteza da grandeza *Xmax* (pixels)

	Observação com aumento total de 540X 1µm = 1,30 pixels					Observação com aumento total de 2500X 1µm = 6,7 pixels
	<i>Amphidinium Operculatum</i> 122 amostras	<i>Fibrocapsa japonica</i> 36amostras	<i>Tetraselmis chuii</i> 498 amostras	<i>Chaetoceros sp.</i> 19 amostras	<i>Isocisis galbana</i> 22 amostras	Bactérias fluorescentes 29 amostras
Média= $\bar{x}_i$	27,07	47,10	20,81	12,21	11,04	21,03
Variância= $s^2(x_i)$	8,80	60,57	6,64	10,40	3,31	416,88
Desvio padrão= $s(x_i)$	2,97	7,78	2,58	3,23	1,82	20,41
Incerteza padrão= $u(x_i) = s(\bar{x}_i)$	0,27	1,30	0,12	0,74	0,39	3,80
Valor de Xmax (pixels)	27,07±0,27	47,10 ±1,30	20,81 ±0,12	12,21±0,74	11,04±0,39	21,03±3,80

Tabela AII.4 Incerteza da grandeza  $X_{min}$  (pixels)

	Observação com aumento total de 540X 1µm = 1,30 pixels					Observação com aumento total de 2500X 1µm = 6,7 pixels
	<i>Amphidinium Operculatum</i> 122 amostras	<i>Fibrocapsa japonica</i> 36amostras	<i>Tetraselmis chuii</i> 498amostras	<i>Chaetoceros sp.</i> 19 amostras	<i>Isochrysis Galbana</i> 22amostras	Bactérias Fluorescentes 29 amostras
Média= $\bar{x}_i$	19,79	28,64	15,03	6,77	8,37	9,88
Variância= $s^2(x_i)$	2,28	19,32	3,51	3,06	1,64	107,22
Desvio padrão= $s(x_i)$	1,51	4,40	1,87	1,75	1,28	10,35
Incerteza padrão= $u(x_i) = s(\bar{x}_i)$	0,14	0,73	0,08	0,40	0,27	1,92
Valor de Xmin (pixels)	19,79±0,14	28,64 ±0,73	15,03 ±0,08	6,77±0,40	8,37±0,27	9,88±1,92

Tabela AII.5 Incerteza da grandeza  $Elongação$

	Observação com aumento total de 540X					Observação com aumento total de 2500X
	<i>Amphidinium Operculatum</i> 122 amostras	<i>Fibrocapsa japonica</i> 36 amostras	<i>Tetraselmis chuii</i> 498 amostras	<i>Chaetoceros sp.</i> 19 amostras	<i>Isochrysis Galbana</i> 22 amostras	Bactérias Fluorescentes 29 amostras
Média= $\bar{x}_i$	1,372	1,669	1,394	1,751	1,323	3,210
Variância= $s^2(x_i)$	0,024	0,095	0,026	0,393	0,026	26,324
Desvio padrão= $s(x_i)$	0,154	0,308	0,161	0,627	0,162	5,131
Incerteza padrão= $u(x_i) = s(\bar{x}_i)$	0,014	0,051	0,007	0,123	0,034	0,953
Valor da Elongação	1,372 $\pm 0,014$	1,669 $\pm 0,051$	1,394 $\pm 0,007$	1,751 $\pm 0,123$	1,323 $\pm 0,034$	3,210 $\pm 0,953$

Tabela AII.6 Incerteza da grandeza *Esfericidade*

	Observação com aumento total de 540X					Observação com aumento total de 2500X
	<i>Amphidinium Operculatum</i> 122 amostras	<i>Fibrocapsa japonica</i> 36 amostras	<i>Tetraselmis chuii</i> 498 amostras	<i>Chaetoceros sp.</i> 19 amostras	<i>Isochrysis Galbana</i> 22 amostras	Bactérias Fluorescentes 29 amostras
Média= $\bar{x}_i$	0,849	0,616	0,860	0,367	0,463	0,723
Variância= $s^2(x_i)$	0,008	0,020	0,015	0,031	0,022	0,222
Desvio padrão= $s(x_i)$	0,087	0,143	0,123	0,177	0,147	0,471
Incerteza padrão= $u(x_i) = s(\bar{x}_i)$	0,008	0,024	0,005	0,035	0,031	0,087
Valor da Esfericidade	0,849 $\pm 0,008$	0,616 $\pm 0,024$	0,860 $\pm 0,005$	0,367 $\pm 0,035$	0,463 $\pm 0,031$	0,723 $\pm 0,087$

Tabela AII.7 Incerteza da grandeza *Diâmetro de Feret* (pixels)

	Observação com aumento total de 540X 1µm = 1,30 pixels					Observação com aumento total de
	<i>Amphidinium Operculatum</i> 122 amostras	<i>Fibrocapsa japonica</i> 36 amostras	<i>Tetraselmis chuii</i> 498 amostras	<i>Chaetoceros sp.</i> 19 amostras	<i>Isochrysis Galbana</i> 22 amostras	Bactérias fluorescentes 29 amostras
Média= $\bar{x}_i$	23,09	36,44	18,13	8,36	9,15	12,99
Variância= $s^2(x_i)$	3,01	20,93	2,81	3,38	2,34	106,20
Desvio padrão= $s(x_i)$	1,73	4,58	1,68	1,84	1,53	10,31
Incerteza padrão= $u(x_i) = s(\bar{x}_i)$	0,16	0,76	0,08	0,42	0,33	1,91
Valor do Diâmetro de Feret (pixels)	23,09±0,16	36,44±0,76	18,13±0,08	8,36±0,42	9,15±0,33	12,99±1,91

Tabela AII.8 Incerteza da grandeza *Compactação*

	Observação com aumento total de 540X					Observação com aumento total de
	<i>Amphidinium Operculatum</i> 122 amostras	<i>Fibrocapsa japonica</i> 36 amostras	<i>Tetraselmis chuii</i> 498 amostras	<i>Chaetoceros sp.</i> 19 amostras	<i>Isochrysis Galbana</i> 22 amostras	Bactérias Fluorescentes 29 amostras
Média= $\bar{x}_i$	0,857	0,780	0,874	0,739	0,829	0,78
Variância= $s^2(x_i)$	0,003	0,003	0,002	0,016	0,003	0,065
Desvio padrão= $s(x_i)$	0,050	0,056	0,049	0,126	0,051	0,254
Incerteza padrão = $u(x_i) = s(\bar{x}_i)$	0,005	0,009	0,002	0,025	0,011	0,047
Valor da Compactação	0,857±0,005	0,780±0,009	0,874±0,002	0,739±0,025	0,829±0,011	0,78±0,047