



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA



Análise de Técnicas para Contagem de Microalgas baseadas na Análise de Imagens

Autor: Diego Giordani

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Farenzena

Porto Alegre, janeiro de 2018

Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Lista de Símbolos	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Microalgas	3
2.1.1 Cultivo	4
2.1.1.1 Sistemas Abertos – Lagoas Raceway	4
2.1.1.2 Sistemas Fechados – Fotobiorreatores (FBR)	4
2.1.2 Aplicações	6
2.2 Controle e Otimização de Fotobiorreatores	7
2.3 Concentração de Biomassa – Contagem Celular	10
2.3.1 Densidade Óptica	10
2.3.2 Contagem Manual	10
2.3.3 Contagem Automática	11
2.3.4 Citometria de Fluxo	12
3 Materiais e Métodos	14
3.1 Imagens	14
3.2 Contagem Manual	16
3.3 Contagem Automática	16
3.3.1 Algoritmo 1 (A1)	16
3.3.2 Algoritmo 2 (A2)	17
3.3.3 Algoritmo 3 (A3)	18
3.3.4 Algoritmo 4 (A4)	18
3.4 Comparativo	19
4 Resultados e Discussão	20
4.1 Análise pelo Método de Contagem Manual	21
4.2 Análise Utilizando o Algoritmo 1	22
4.3 Análise Utilizando o Algoritmo 2	24
4.4 Análise Utilizando o Algoritmo 3	26
4.5 Análise Utilizando o Algoritmo 4	28
4.6 Comparativo entre as Técnicas	30
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	33
6 Referências	35

Agradecimentos

À minha mãe, por sempre estar ao meu lado, me ajudar, dar conselhos e, principalmente, por sempre dizer que, acima de tudo, eu devo buscar o que me faz feliz. Obrigado por sempre confiar em mim, me apoiar em Cerro Largo, em Porto Alegre, em Akron, em San Diego, me visitar em NY e depois me apoiar ainda mais em Porto Alegre de novo. Sei que sempre vou poder contar contigo.

À toda minha família, por simplesmente estar ali quando precisei.

Ao Professor Marcelo Farenzena, por me apresentar o mundo das microalgas e a gama de aplicações delas. Obrigado pela orientação e suporte na definição do tema deste trabalho. E também obrigado pelas boas conversas nas vezes que visitei sua sala.

A todos os professores que fizeram parte da minha carreira, por ensinarem tudo que sei, que me trouxe até aqui. Obrigado por compartilharem o conhecimento de vocês.

A todos outros professores que não fizeram parte da minha carreira, por acreditarem na educação e, exclusivamente aos da Universidade, por ajudarem a levar e manter a UFRGS no patamar que ela está.

À CAPES e ao Governo, por terem me dado a oportunidade de estudar fora do país durante um ano.

Ao povo brasileiro, por terem pago seus impostos que, apesar de tudo que vem acontecendo, foram capazes de sustentar minha formação em uma das melhores universidades do país.

Aos amigos, por estudarem juntos comigo, compartilharem conhecimentos, trocarem ideias e aspirações e, principalmente, pelos momentos de descontração.

Aos amigos desde pequeno, por sempre estarem prontos para um churrasco, mesmo em momentos difíceis, porque sim, isso ajuda muito a diminuir o estresse da faculdade e do trabalho. Obrigado pelos ótimos momentos comendo bolo de cenoura com cobertura de chocolate da Tia Irene.

Aos colegas da Ultragaz, por confiarem no meu trabalho e ajudarem no meu desenvolvimento.

À Bárbara, pelo incentivo e apoio, além de algumas jantas.

Resumo

O crescente interesse na utilização de microalgas em larga escala tem como principal empecilho o custo alto de tal tecnologia. A fim de melhorar a viabilidade econômica, o sistema de produção deve ser otimizado e, portanto, controlado. Para controlar, é necessário medir. Assim, buscam-se métodos de baixo custo para o monitoramento *online* dos cultivos, sendo a taxa de crescimento uma das principais variáveis monitoradas. Esta variável pode ser obtida a partir da concentração numérica de biomassa. No presente estudo, foram analisados quatro algoritmos para contagem automática de microalgas baseados na análise de imagens utilizando o software *Matlab*. Foram escolhidas quatro imagens para as análises, cada uma com diferentes resoluções, definições, luminosidades, densidades e variedades de microalgas. O Algoritmo 1 foi desenvolvido utilizando a técnica *bwboundaries*, o Algoritmo 2 a *imfindcircles*, e os Algoritmos 3 e 4 utilizaram as mesmas técnicas dos dois anteriores somadas a um pré-processamento das imagens para redução do ruído e melhora do contraste. Os resultados obtidos pelos algoritmos de contagem automática foram comparados com a técnica de contagem manual. A diferença média entre os resultados obtidos na contagem automática e na contagem manual foram de 26,8%, 1,2%, 8,9% e 8,4% para os Algoritmos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. O pior resultado foi do Algoritmo 1 devido à limitação da técnica utilizada quando há aglomeração de células, aos efeitos da borda da imagem, à baixa definição das imagens e ao baixo contraste. A aplicação de métodos de pré-processamento de imagem mostrou ser de grande valia quando o Algoritmo 3, que utilizou o mesmo método de contagem do Algoritmo 1, foi analisado. Os erros ainda aconteceram devido às mesmas fontes de erro do Algoritmo 1, porém foram reduzidos. O Algoritmo 2 apresentou o melhor resultado, à frente do Algoritmo 4, que utiliza o mesmo método e cujas imagens foram pré-processadas. Ao analisar as imagens após a contagem, notou-se que, na verdade, a melhor performance pertencia ao Algoritmo 4, pois as imagens processadas foram as mais condizentes com as imagens originais. No Algoritmo 2 houve erros causados pelos efeitos da aglomeração, da baixa definição das imagens e da luminosidade. No Algoritmo 4, esses efeitos foram reduzidos, exceto para uma das imagens, onde a baixa qualidade dos pixels gerou um erro grande, e isto acabou por aparentemente piorar o desempenho do algoritmo. Com a análise dos resultados numérico e visual, chegou-se à conclusão que o método *imfindcircles* é o melhor, ou seja, os Algoritmos 2 e 4 são os melhores, sendo que a escolha de um deles depende da imagem que está sendo analisada e das premissas necessárias ao método de análise. O pré-processamento das imagens é uma ferramenta importante que traz melhora nos resultados, porém seu uso deve ser restrito a imagens com boa qualidade. Sugere-se que novos testes sejam realizados utilizando mais imagens com diferentes concentrações de microalgas para que seja determinada a faixa de concentração para aplicação de cada algoritmo.

Palavras-chave: microalgas, contagem automática, citometria, Matlab, análise de imagens.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Vista plana de uma lagoa <i>raceway</i> com aeração de CO ₂ . Adaptado de BRENNAN; OWENDE (2010)	5
Figura 2.2: Fotobiorreator tubular com escoamento paralelo em tubos horizontais. Adaptado de CHISTI (2008)	5
Figura 2.3: Várias aplicações comerciais das microalgas. Adaptado de: SACASA CASTELLANOS (2013).....	6
Figura 2.4: Diagrama do sistema utilizado por BROWN et al. (1989) para contagem automática.....	11
Figura 2.5: Aplicações das análises por citometria de fluxo para processos biotecnológicos com microalgas. As caixas de tonalidade cinza referem-se a objetivos do uso da técnica. Adaptado de HYKA et al. (2013)	13
Figura 3.1: Diferença entre imagens com diferentes valores de dpi. Fonte: JORDÃO (2014)	14
Figura 3.2: Imagem microscópica (40x) de uma amostra normal de biomassa – Imagem 1. Fonte: MOORTHY; PREMALATHA; ARUMUGAM (2017)	14
Figura 3.3: Foto microscópica de <i>Isochrysis</i> sp – Imagem 2. Adaptado de HELM; BOURNE (2004).....	15
Figura 3.4: Imagem microscópica de <i>Nannochloropsis</i> , uma alga verde – Imagem 3. Adaptado de SUPPLY (2017).....	15
Figura 3.5: Foto microscópica obtida de um cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp – Imagem 4.	16
Figura 3.6: Ilustração do funcionamento do método de contagem manual aplicado a Im2.	17
Figura 4.1: Im1 após a conversão de RGB para imagem binária pelo método <i>im2bw</i>	20
Figura 4.2: Im2 após conversão de RGB para imagem em escala cinza pelo método <i>rgb2gray</i>	20
Figura 4.3: Identificação e contagem das microalgas em Im1 através da técnica de contagem manual.....	21
Figura 4.4: Identificação e contagem das microalgas em Im2 através da técnica de contagem manual.....	22
Figura 4.5: Identificação e contagem das microalgas em Im3 através da técnica de contagem manual.....	22
Figura 4.6: Processamento de Im1 utilizando A1.....	23
Figura 4.7: Processamento de Im2 utilizando A1.....	23
Figura 4.8: Processamento de Im3 utilizando A1.....	24
Figura 4.9: Processamento de Im4 utilizando A1.....	24
Figura 4.10: Processamento de Im1 utilizando A2.....	25
Figura 4.11: Processamento de Im2 utilizando A2.....	25
Figura 4.12: Processamento de Im3 utilizando A2.....	26
Figura 4.13: Processamento de Im4 utilizando A2.....	26

Figura 4.14: Processamento de Im1 utilizando A3.....	27
Figura 4.15: Processamento de Im2 utilizando A3.....	27
Figura 4.16: Processamento de Im3 utilizando A3.....	28
Figura 4.17: Processamento de Im4 utilizando A3.....	28
Figura 4.18: Processamento de Im1 utilizando A4.....	29
Figura 4.19: Processamento de Im2 utilizando A4.....	29
Figura 4.20: Processamento de Im3 utilizando A4.....	30
Figura 4.21: Processamento de Im4 utilizando A4.....	30

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Variáveis físico-químicas monitoradas e controladas por métodos <i>on-line</i> em cultivos de microalgas. Adaptado de HAVLIK et al. (2013)	8
Tabela 2.2: Métodos de monitoramento de variáveis biológicas em cultivos de microalgas com métodos <i>off-line</i> , <i>on-line</i> ou com potencial para utilização de métodos <i>on-line</i> . Adaptado de HAVLIK et al. (2013)	9
Tabela 3.1: Faixa de raio adequada para análise de cada imagem com os Algoritmos 2 e 4.	18
Tabela 3.2: Constantes utilizadas para realce no contraste de cada imagem em cada um dos domínios do RGB para os Algoritmos 3 e 4.	18
Tabela 4.1: Resultados obtidos com as técnicas desenvolvidas para contagem de microalgas e a diferença percentual ao comparar com a técnica de contagem manual. ..	21
Tabela 4.2: Diferença percentual média entre os algoritmos desenvolvidos e a contagem manual.....	31

Lista de Símbolos

A_λ – absorvância da amostra no comprimento de onda utilizado

λ – comprimento de onda

ϵ – coeficiente de extinção ou coeficiente de absorção celular da espécie em estudo

l – caminho ou distância percorrida pela radiação através da solução

c – concentração numérica de células da espécie em solução

N_m – número de microalgas obtido pela técnica de contagem manual

N_{aut} – número de microalgas obtido pela técnica de contagem automática

Lista de Abreviaturas e Siglas

FBR – fotobiorreator

ATP – adenosina trifosfato

TAG – triacilglicerol

IR – *infrared* ou infravermelho

UV – *ultraviolet* ou ultravioleta

CCD – *charge-coupled device* ou sensor de carga acoplada

NIR – *near-infrared spectroscopy*

MIR – *mid-infrared spectroscopy*

FTIR – *Fourier Transform infrared spectroscopy*

RGB – sistema de cores aditivas formado por *Red* (vermelho), *Green* (verde) e *Blue* (azul)

PC – *personal computer*

ASCII – *American Standard Code for Information Interchange*

Jpg – formato de imagens que é extensão do método de compressão de imagem criado pelo *Joint Photographics Experts Group*

Im1 – Imagem 1

Im2 – Imagem 2

Im3 – Imagem 3

Im4 – Imagem 4

A1 – Algoritmo 1

A2 – Algoritmo 2

A3 – Algoritmo 3

A4 – Algoritmo 4

1 Introdução

O cenário atual de preocupação com os impactos do efeito estufa tem como característica a busca por fontes de energia renováveis. O petróleo, principal combustível fóssil do mundo, tem como alternativa para sua substituição os biocombustíveis, que podem ser obtidos, por exemplo, a partir de produtos cultivados tradicionalmente – como cana-de-açúcar, soja e milho – ou pelo cultivo de microalgas, seres vivos capazes de produzir um óleo a partir do qual se produz o biodiesel. Além de produzir este óleo, as microalgas sequestram gás carbônico, que é necessário para seu crescimento. Vale ressaltar que a aplicação de microalgas vai além da produção de biodiesel, uma vez que a biomassa microalgal também é uma importante fonte de proteínas, carboidratos, pigmentos, entre outros compostos, o que faz dela um produto com aplicações desde a indústria de alimentação animal até a farmacêutica.

Além disso, as microalgas não competem com as culturas alimentares, como o milho ou o girassol, uma vez que na produção de biocombustível a partir do óleo de microalgas não se está produzindo nada que seja necessário a alimentação humana, e essa produção pode ser feita em qualquer tipo de terreno, inclusive em zonas áridas, onde não é possível cultivar alimentos. As microalgas também apresentam crescimento mais rápido que as culturas comuns de grãos; em um dia ou dia e meio é possível que a biomassa já esteja duplicada. Outras duas vantagens são: elas podem ser cultivadas em qualquer tipo de água (salgada, salobra, residual), não demandando água potável e ainda podendo participar de processos de tratamento de efluentes enquanto produzem o óleo; elas necessitam luz solar, gás carbônico e alguns nutrientes para serem cultivadas. (CHISTI, 2008)

Frente a essas vantagens, é crescente o número de pesquisas a fim de determinar as melhores estratégias para aumentar a produtividade de biomassa microalgal e seus componentes. Nesse contexto, tem-se o fotobiorreator como melhor sistema de cultivo em termos de produtividade por área. Entretanto, essa tecnologia é mais cara que os sistemas abertos. Além disso, o monitoramento dos cultivos é comumente empregado de forma *off-line*, o que diminui a eficácia do controle do processo devido ao elevado tempo das análises e às laboriosas técnicas utilizadas. Assim, têm-se buscado estratégias para redução do custo de cultivo nesse tipo de reator, trabalhando principalmente no desenvolvimento de sensores para monitoramento *on-line* dos cultivos, a fim de torná-lo viável para implementação em regimes contínuos. (BRENNAN; OWENDE, 2010; HAVLIK et al., 2013)

Entre as principais variáveis monitoradas durante o cultivo de microalgas está a taxa de crescimento, que pode ser obtida a partir da concentração de biomassa. Uma maneira de obter essa informação é pela contagem das células presentes no meio por uma dada unidade de volume, que resulta especificamente na concentração numérica de biomassa. A contagem manual, técnica muito laboriosa, é um dos métodos mais consolidados para tal finalidade. Dentro desse contexto, a contagem automática surgiu como uma alternativa que traz maior rapidez para essa análise, permitindo a aplicação de controle automático. Entretanto, os equipamentos são custosos e demandam mão de obra qualificada para sua operação. Assim, surge a necessidade do desenvolvimento de sensores de baixo custo para o monitoramento dos cultivos de microalgas. (SARRAFZADEH et al., 2015)

O presente estudo tem como objetivo geral testar diferentes algoritmos para contagem automática de microalgas por meio da análise de imagens. Os objetivos específicos são:

- Desenvolver um algoritmo que auxilie na execução da técnica de contagem manual das microalgas presentes nas imagens;
- Desenvolver quatro algoritmos utilizando diferentes métodos para contagem automática e aplicá-los em quatro diferentes imagens;
- Realizar a validação dos algoritmos desenvolvidos através da comparação de seus resultados com os resultados obtidos pela técnica de contagem manual;
- Determinar qual é a melhor técnica de contagem automática para as imagens utilizadas.

Este trabalho é composto por 5 capítulos, incluindo esta introdução. O Capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados neste estudo. Nela, serão revisados tópicos sobre microalgas (conceitos, métodos de cultivo e aplicações), técnicas utilizadas para controle fotobiorreatores, e técnicas para o monitoramento da taxa de crescimento pela concentração celular. No Capítulo 3 será descrita a metodologia e os materiais utilizados, além de como foram desenvolvidos os algoritmos. O Capítulo 4 será destinado à apresentação dos resultados e discussões a respeito dos mesmos. Por fim, o Capítulo 5 traz as conclusões chegadas ao final do estudo, bem como sugestões para trabalhos futuros.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Microalgas

Algas são consideradas uma das formas de vida mais antigas na terra. Elas são primitivas, isto é, não possuem raízes, caule e folhas, além de não possuir uma camada de células estéreis envolvendo as células reprodutivas. As algas são uma diversa coletânea de organismos contendo clorofila A como pigmento fotossintético primário. Estes organismos incluem muitas divisões do reino *Plantae*, como as algas marinhas, e algumas outras formas microscópicas uni e pluricelulares. Basicamente todas são plantas, exceto as cianobactérias e as diatomáceas. A estrutura das algas funciona prioritariamente para conversão de energia, sem nenhum desenvolvimento além das células, e esta simplicidade permite uma fácil adaptação às condições do meio-ambiente e uma prosperidade a longo prazo. (BRENNAN; OWENDE, 2010; METTING; PYNE, 1986)

A definição de microalga cobre todos microrganismos unicelulares e pluricelulares simples, incluindo microalgas procarióticas (cianobactérias ou *Chloroxybacteria*) e eucarióticas (alga verde ou *Chlorophyta*, alga vermelha ou *Rhodophyta*, e diatomácea ou *Bacillariophyta*). As células procarióticas não possuem organelas protegidas por membrana, e são mais relacionadas a bactérias do que a algas. Células eucarióticas, que são as mais comuns nas algas, possuem as organelas bem definidas responsáveis por controlar as funções da célula, permitindo que a mesma sobreviva e se reproduza. Os eucariontes são categorizados em uma variedade de classes definidas, principalmente, pela pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular básica. As principais classes são as já mencionadas algas verdes, algas vermelhas e diatomáceas. (BRENNAN; OWENDE, 2010)

A maioria das microalgas é unicelular, fotossintetizante e predominantemente aquática. Estas microalgas compõem o fitoplâncton aquático e marinho, ou seja, são responsáveis pela fotossíntese em ecossistemas aquáticos. Elas também habitam quase toda superfície terrestre, incluindo ambientes extremos, como os desertos. Estima-se que podem existir até vinte e seis mil diferentes espécies de microalgas no planeta, das quais poucas já foram identificadas para aplicações comerciais. (METTING; PYNE, 1986; MIRANDA et al., 2015)

As microalgas podem ser autótrofas ou heterótrofas. Algas autótrofas requerem apenas compostos inorgânicos (sais ou nutrientes), CO₂ e energia luminosa para crescimento. Algas heterótrofas requerem uma fonte externa de compostos orgânicos assim como nutrientes e fonte de energia. Estas não são fotossintetizantes. Também há algas com habilidades de realizar ambos processos, sendo chamadas de mixótrofas. As microalgas autótrofas, ou fotoautótrofas, atuam como produtores primários da cadeia alimentar aquática. Produtores primários são seres vivos que produzem seu próprio alimento através da fotossíntese, processo pelo qual a radiação solar e o CO₂ absorvido pelos cloroplastos são convertidos em adenosina trifosfato (ATP) e O₂. ATP é o composto responsável pela respiração da célula para produção de energia e consequente crescimento. (BRENNAN; OWENDE, 2010; DEBELIUS et al., 2009; METTING; PYNE, 1986)

O pigmento fotossintético principal é a clorofila A. Além deste, as microalgas também podem apresentar pigmentos como clorofila B, xantofila, luteína, prasinoxantina, e carotenoides alfa, beta e gama, que podem ser sintetizados e acumulados fora do cloroplasto sob condições limitadas de nitrogênio ou outro estresse celular. (MIRANDA et al., 2015)

As microalgas são conhecidas pela sua eficiência fotossintética, alta taxa de crescimento e proporcionalmente alto teor de lipídeos. Além do teor de lipídeos, o teor de proteínas e carboidratos também pode ser uma característica importante delas. (MIRANDA et al., 2015)

2.1.1 Cultivo

Para produção de biodiesel, o cultivo de microalgas é mais caro que o cultivo de uma planta tradicional, como milho e cana-de-açúcar. Porém, as microalgas crescem em meio aquoso e demandam menos água que uma planta terrestre. Além disso, as microalgas não causam impactos ambientais por uso da terra, pois o cultivo pode ser feito em território infértil e sem a necessidade de herbicidas e pesticidas, e também não necessitam água potável, pois podem ser cultivadas em águas salobra ou salgada. Outra vantagem do cultivo de microalgas é a versatilidade das propriedades bioquímicas da biomassa produzida, uma vez que, alterando-se as condições de cultivo, podem ser obtidos maiores ou menores teores de lipídeos, carboidratos, proteínas, etc. (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHISTI, 2008)

Em larga escala, as microalgas são usualmente cultivadas autotroficamente podendo ser em sistemas abertos (lagoas abertas), sistemas fechados (fotobiorreatores) ou híbridos (primeiro estágio em sistema fechado, segundo estágio em sistema aberto). Os processos fotoautotróficos em lagoas *raceway* (sistema aberto) e em fotobiorreatores (sistema fechado) são abordados nesta revisão, pois são os únicos métodos praticáveis em larga escala. (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHISTI, 2008; MIRANDA et al., 2015)

2.1.1.1 Sistemas Abertos – Lagoas Raceway

Uma lagoa *raceway* é um canal hídrico artificial em circuito fechado, sendo geralmente feita de concreto e possui de 0,2 a 0,5 m de profundidade. A luminosidade e a temperatura são naturais, e a fonte de gás carbônico é o ar local, podendo ser estimulada por meio de aeradores. Um rotor é responsável pela homogeneização e circulação. Este sistema é contínuo, onde a cultura (cepas de microalga e nutrientes) é alimentada em frente ao rotor e circula pelo sistema até o ponto onde se faz a colheita. A Figura 2.1 mostra um exemplo de representação de uma lagoa *raceway* com aeração de CO₂. (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHISTI, 2008)

Até recentemente, o cultivo de microalgas em sistema aberto era o único utilizado devido ao elevado custo dos biorreatores. Entretanto, devido ao processo em sistema aberto ser suscetível a contaminações e a ciclos diários (de luminosidade e temperatura), perder CO₂ para atmosfera (reduz eficiência), ter baixa produção de biomassa e ter o uso limitado a determinadas espécies de microalgas, o uso de fotobiorreatores pode se tornar vantajoso. (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHISTI, 2008; MIRANDA et al., 2015)

2.1.1.2 Sistemas Fechados – Fotobiorreatores (FBR)

A fim de permitir que uma única espécie de microalga seja cultivada por maiores períodos de tempo com menor risco de contaminação, utilizam-se FBRs. Este sistema apresenta custo mais elevado que os sistemas abertos, porém, além do já mencionado baixo risco de contaminação, os FBRs apresentam uma produtividade de biomassa maior e possibilidade para controle de processo mais rigoroso que o sistema aberto apresentado. Os FBRs são geralmente feitos de vidro ou material plástico translúcido e podem ter uma configuração tubular, de pratos planos ou de coluna. A Figura 2.2 apresenta o esquema de

um FBR tubular com tubos dispostos horizontalmente. (BRENNAN; OWENDE, 2010; PENIUK; SCHNURR; ALLEN, 2016)

Além disso, os FBRs podem trabalhar com diferentes métodos: batelada, contínuo, batelada alimentada e semicontínuo. O modo batelada é o mais usado, simples e flexível, porém é menos eficiente e apresenta qualidade inconsistente. Neste modo, o meio de cultura recebe apenas uma inoculação de microalgas, e então, após determinado tempo de cultivo, a densidade de células desejada é atingida. No processo contínuo, o meio de cultura é alimentado a vazão constante. O volume de reação também deve ser mantido constante e, para isto, a colheita é realizada continuamente. Assim, o sistema pode operar em regime estacionário por grandes intervalos de tempo. O processo contínuo é mais produtivo, gerando células de alta qualidade e podendo ser automatizado. Porém é muito complexo e custoso, sendo usado apenas em culturas com menores proporções. (MATSUDO; PAULO, 2006; NASCIMENTO; PICKERING, 2017)

No método batelada alimentada, alguns (ou todos) nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo, enquanto os produtos permanecem até o final do processo. O processo semicontínuo ocorre quando, ao término de um cultivo, utiliza-se parte do meio fermentado como inóculo do meio de cultivo da operação seguinte. Isso é repetido em uma sequência de operações, enquanto não houver queda na produtividade do processo. (MATSUDO; PAULO, 2006)

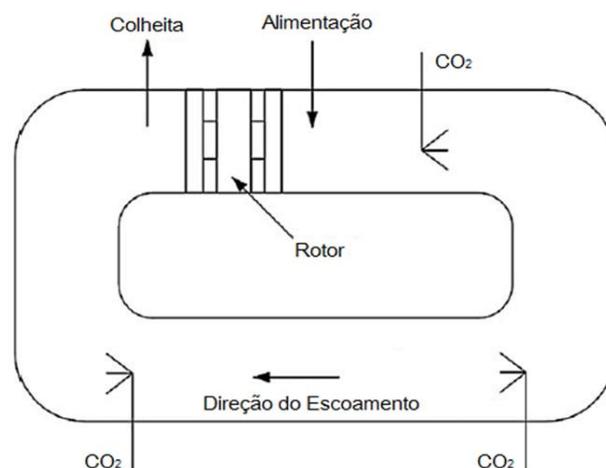


Figura 2.1: Vista plana de uma lagoa *raceway* com aeração de CO₂. Adaptado de BRENNAN; OWENDE (2010)

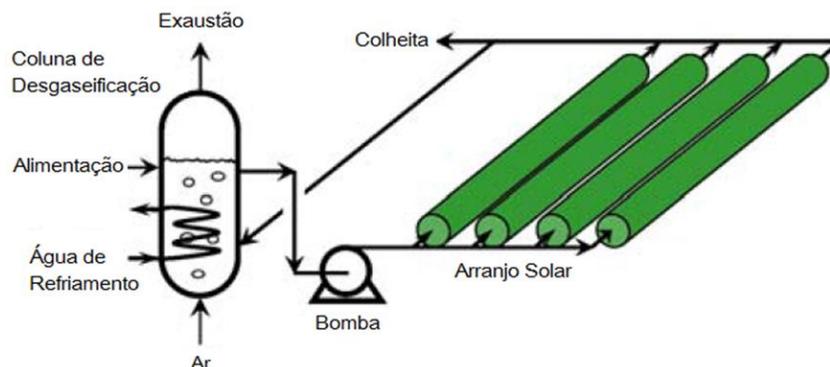


Figura 2.2: Fotobiorreator tubular com escoamento paralelo em tubos horizontais. Adaptado de CHISTI (2008)

2.1.2 Aplicações

As microalgas têm potencial para a produção de uma variedade de produtos, como pigmentos (clorofila, carotenoides, etc.), compostos bioativos (vários compostos antibacterianos, antifúngicos, etc.), proteínas, polissacarídeos (amido, alginatos, celulose, etc.), biopolíesteres e lipídeos (poli-insaturados, ácidos graxos e hidrocarbonetos). Esses produtos trazem uma gama de aplicações para as microalgas, como suplementação alimentar humana e nutrição animal, aquicultura, produtos farmacêuticos e cosméticos. A Figura 2.3 apresenta um esquema com as principais aplicações das microalgas. Além das aplicações observadas na Figura 2.3, as microalgas também podem ser utilizadas na biorremediação ou tratamento de efluentes. Através do processo de pirólise rápida, também é possível obter compostos químicos de valor agregado a partir das microalgas. (HYKA et al., 2013; SACASA CASTELLANOS, 2013; SANTOS, 2016)

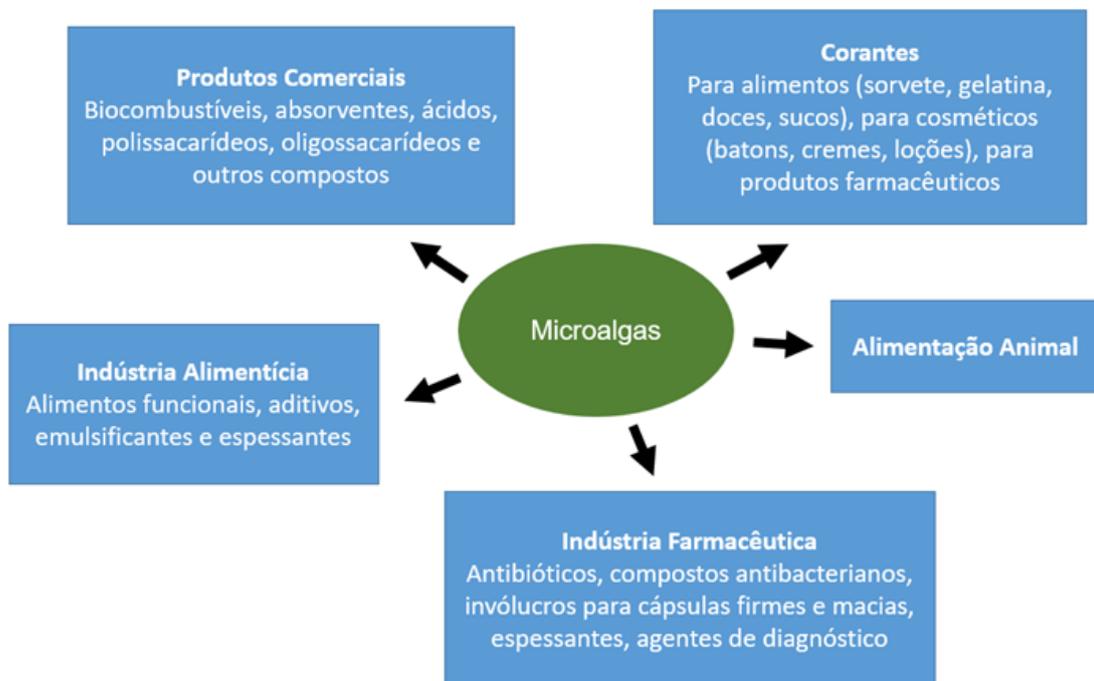


Figura 2.3: Várias aplicações comerciais das microalgas. Adaptado de: SACASA CASTELLANOS (2013)

Os pigmentos são aplicados na área alimentar, em cosméticos e na indústria farmacêutica. O principal deles é a clorofila, que é tratada, dando origem à clorofilina, importante corante para as indústrias alimentícia, têxtil e de papel. Os carboidratos produzidos pelas microalgas têm potencial aplicação terapêutica e nutricional, além de alguns deles serem utilizados como emulsificantes e estabilizantes em vários produtos alimentícios. Também com aplicação nutricional, principalmente para suplementação alimentar, têm-se as proteínas, ou melhor, os aminoácidos vindos da biomassa de microalga. (SANTOS, 2016)

Os ácidos graxos das microalgas podem ser comercializados para aplicações farmacêuticas e terapêuticas. Além disso, o elevado teor de lipídeos faz com que as microalgas sejam vistas como alternativa para produção de biodiesel. Após a retirada do óleo, a biomassa remanescente pode ser utilizada para produção de outros biocombustíveis, o bioetanol e o biogás. Os compostos bioativos presentes nas microalgas podem ser utilizados na produção de antibióticos, toxinas e vários outros farmacêuticos. (GONZALEZ et al., 2015; METTING; PYNE, 1986; SANTOS, 2016)

Tendo como foco a produção de biodiesel, as microalgas apresentam maior produtividade do que as culturas tradicionais; elas têm a capacidade de produzir entre 15-300 vezes mais óleo (principalmente o TAG) que as culturas de milho, cana-de-açúcar, soja, entre outros vegetais. O curto ciclo de processo é outro benefício das microalgas. Em uma cultura convencional de plantas, a colheita ocorre uma ou duas vezes por ano. Já na cultura das microalgas, a colheita ocorre entre 3-15 dias, dependendo da fonte de algas e do processo, o que permite colheitas múltiplas ou contínuas. (CAVALCANTI et al., 2014)

2.2 Controle e Otimização de Fotobiorreatores

Para estabelecer as microalgas como um sistema biotecnológico de produção único para obtenção de substâncias de alto valor, é necessário melhorar a produtividade e a reprodutibilidade dos processos de cultivo, além de se obter a melhor composição de biomassa. Assim, informações mais detalhadas sobre o metabolismo das microalgas no cultivo e nos processos de produção se fazem necessárias para que seja possível fazer o controle adequado sobre a cultura em crescimento no FBR, principalmente sobre a taxa de produtividade, para prevenir perdas econômicas. A luminosidade e a temperatura são os principais fatores que influenciam no crescimento das células fotoautotróficas. Além destes, a quantidade de nutrientes e o pH podem ser ajustados a fim de que se obtenha a maior produção de biomassa em menor tempo. Agitação e salinidade também são importantes na busca de maior produção de biomassa. (HYKA et al., 2013; MATSUDO; PAULO, 2006; MIRANDA et al., 2015; SANDNES et al., 2006)

Como exemplo, a luminosidade é essencial, pois é o substrato primário para a conversão de energia por fotossíntese. Entretanto, o excesso de luz pode reduzir o crescimento celular por fotoinibição ou promover a lise celular ao danificar polipeptídeos. Logo, a luminosidade deve ser controlada rigorosamente para que sempre esteja dentro de uma faixa onde se obtenha a melhor produtividade. O tempo para realização da colheita também é importante, uma vez que na colheita realizada de forma precipitada há baixa produtividade e na tardia, após um longo período de tempo, começa a haver escassez de nutrientes e consequente morte das células, o que também traz baixa produtividade. (MIRANDA et al., 2015)

O desenvolvimento de um sistema integrado de monitoramento dos parâmetros de crescimento é importante para a viabilidade comercial, fornecendo informações valiosas com as quais é possível otimizar o processo de produção e reduzir custos. Métodos de monitoramento de parâmetros de processo são caracterizados em *in-line*, *at-line*, *on-line* e *off-line*. No método *in-line*, o sensor entra em contato direto com o processo, enquanto no método *on-line* o líquido de processo é direcionado continuamente para um circuito fechado onde passa pelo sensor e então volta para o processo. O método *at-line* ocorre quando a amostra é removida do processo e analisada utilizando um equipamento fisicamente próximo ao processo. No método *off-line*, a amostra é removida do processo e então transportada até um local remoto para análise. (JUSTICE et al., 2011; SANDNES et al., 2006)

Monitoramento *on-line* traz benefícios para o cultivo de microalgas em larga escala visto que acarreta aumento na produtividade e homogeneidade celular. Esse monitoramento requer a utilização de sensores confiáveis. A maioria dos sensores utilizados atualmente funcionam apenas para escala de laboratório ou uso *off-line*. Idealmente, os dispositivos de medição dos cultivos de microalgas seriam *on-line*, rápidos, esterilizáveis, estáveis e seletivos, além de não necessitar calibração frequente. A Tabela

2.1 apresenta as principais variáveis físico-químicas de processo monitoradas e controladas pelo método *on-line* no cultivo de microalgas. A Tabela 2.2, por sua vez, traz os principais métodos de monitoramento das variáveis biológicas no cultivo de microalgas. (HAVLIK et al., 2013)

Tabela 2.1: Variáveis físico-químicas monitoradas e controladas por métodos *on-line* em cultivos de microalgas. Adaptado de HAVLIK et al. (2013)

Variável monitorada	Tipo de sensor	Range aceitável	Caso fora do range	Opções de controle
Densidade de fluxo de fótons (para uma única célula)	Sensor Quantum	10-250 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ (ótimo); 0-2000 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ (real)	Baixo: crescimento lento; Alto: fotoinibição	Design do FBR; Densidade da cultura; Agitação;
Temperatura	Elemento térmico (Pt-100)	15-35°C	Baixo: crescimento lento; Alto: morte das células	Banho de água; Trocador de calor; Sombreamento
pH	pHmetro com eletrodo de vidro; Sensor óptico – pH	7-10	Taxa de crescimento diminui	Injeção de CO_2
pO_2 (fase líquida)	Sensor óptico de O_2 (sensor Clark); Oxímetro; Sensor óptico - pH	<15-25 mg/L	Alto: taxa de crescimento diminui	Aeração
O_2 (fase gás)	Analizador paramagnético; Polarímetro	Depende do $\text{O}_2(\text{l})$ e da intensidade da agitação	Alto: taxa de crescimento diminui	-
pCO_2 (fase líquida)	Eletrodo de pCO_2 ; Analizador IR com medidor de fluxo	>0,1 kPa	Baixo: taxa de crescimento diminui	Injeção de CO_2
CO_2 (fase gás)	Analizador IR; Espectrômetro de massa	>0,15%	Baixo: taxa de crescimento diminui	Alimentação de CO_2
Nutrientes inorgânicos	Espectroscopia UV; Colorímetro; Eletrodos íon-seletivos (modificados)	Variável dependendo do nutriente	Baixo: limitação de crescimento; acúmulo de lipídeos ou de amido/glicose	Adição de nutrientes
Agitação	Nenhum	$\text{Re} < 6.000-10.000$	Baixo: limitação pelo CO_2 /inibição por O_2 ; Alto: danos mecânicos às células	Taxa de adição de gás; Intensidade da agitação

Tabela 2.2: Métodos de monitoramento de variáveis biológicas em cultivos de microalgas com métodos *off-line*, *on-line* ou com potencial para utilização de métodos *on-line*. Adaptado de HAVLIK et al. (2013)

Método de monitoramento	Variável monitorada (concentração)	Tipo de sensor	<i>Off-line</i> / <i>On-line</i>	Comentário
Densidade óptica, turbidez	Concentração mássica de células	Sensor de densidade óptica; Sensor de turbidez	<i>Off-line</i> e <i>On-line</i>	Escolha do comprimento de onda depende dos pigmentos
Colorimetria	Concentração mássica de células	Câmera CCD	<i>Off-line</i>	Necessita software para análise de dados
Microscopia <i>in situ</i>	Concentração numérica de células; Concentração mássica de células; Morfologia celular; População	Microscópio + CCD	<i>On-line</i>	Necessita software para análise de imagem
Espectro de absorvância	Pigmentos; Ácidos graxos	Espectrofotômetro	<i>Off-line</i>	Nível de ácidos graxos pode ser correlacionado à razão de pigmentos
Fluorimetria	Eficiência fotossintética; Rendimento quântico; Lipídeos; Pigmentos	Fluorômetro modulado por amplitude de pulso	<i>Off-line</i> e <i>On-line</i>	Identifica o estresse que leva ao início da produção de lipídeos
Radiação IR (NIR, MIR, FTIR)	Lipídeos; Proteínas; Teor de carboidratos	Sistema de fluxo de reflexão total atenuada; Sonda de fibra óptica	<i>Off-line</i> e <i>On-line</i>	Necessita software para análise de dados
Citometria de fluxo	Teor de lipídeos; Tamanho das células	Citômetro de fluxo	<i>Off-line</i> e <i>On-line</i>	Amostras precisam ser processadas para análise de lipídeos e amido/glicose

A concentração de biomassa é uma variável chave na construção de um sistema de monitoramento e controle do FBR, pois com ela é possível obter a taxa de crescimento do cultivo. Métodos convencionais para medir biomassa incluem peso seco da amostra, contagem direta por microscopia, espectrofotometria, concentração de proteínas, ou fluorescência. Alguns desses métodos são bastante laboriosos, uma vez que são *off-line* e baseados em amostragem e, de certa forma, relativamente custosos em termos de aquisição ou manutenção dos equipamentos. Algumas novas descobertas incluem um sensor foto-eletróquímico e a medida de O₂ gerado pelo cultivo. (BENAVIDES et al., 2015)

2.3 Concentração de Biomassa – Contagem Celular

Para estimar a taxa de crescimento, uma série de medições, em diferentes instantes, deve ser realizada para que seja possível calcular a taxa de mudança na concentração de biomassa. Considera-se ou estima-se a concentração da amostra utilizada para as medições igual à concentração no reator. Os métodos que serão abordados nessa revisão são utilizados para obtenção da concentração numérica de biomassa. (SACASA CASTELLANOS, 2013; SARRAFZADEH et al., 2015)

A concentração numérica é importante pois para dois cultivos com uma mesma concentração mássica de biomassa, pode haver uma quantidade de células diferente. Em outras palavras, há cultivos com células de maior tamanho e cultivos com células de menor tamanho. Logo, um cultivo com determinada concentração biomássica pode tanto ser composto de um pequeno número de células grandes quanto de um grande número de células pequenas. Na verdade, o que ocorre é uma distribuição de tamanhos das microalgas. Assim, o conhecimento do número de microalgas é um fator importante para o monitoramento do meio de cultivo no FBR. (PENIUK; SCHNURR; ALLEN, 2016)

2.3.1 Densidade Óptica

Para obtenção da concentração numérica de biomassa por densidade óptica, uma amostra do cultivo de microalgas é coletada, diluída ou não, e então levada ao espectrofotômetro. A absorvância obtida é convertida em concentração celular através de uma curva de calibração previamente construída utilizando a Lei de Beer-Lambert (Eq. 2.1):

$$A_{\lambda} = \epsilon l c \quad (2.1)$$

onde, A_{λ} é a absorvância da amostra no comprimento de onda utilizado (geralmente 750nm), ϵ é o coeficiente de extinção (em $\text{cm}^2/\text{célula}$), l é o caminho (em cm), e c a concentração de células (em células/mL). É importante ressaltar que o comprimento de onda utilizado pode variar dependendo da espécie de microalga analisada. (BETTIN, 2014)

Este método indireto de obtenção da concentração numérica de biomassa requer uma curva de calibração. Para construção dessa curva, os métodos *off-line* de gravimetria ou contagem celular por microscopia podem ser utilizados. (HAVLIK et al., 2013)

2.3.2 Contagem Manual

Para contagem manual das células, SARRAFZADEH et al. (2015) propuseram um método onde, utilizando uma pipeta automática, introduz-se 10 μL da suspensão de microalgas em um hemocitômetro Neubauer (Improved DHC-N01, C-Chip, NanoEnTek, Coréia do Sul). Este recipiente é então colocado no microscópio (Eclipse 80i, Nikon, Japão), através do qual as células são contadas utilizando lentes objetivas 20x. Para facilitar a contagem manual, o hemocitômetro é dividido em 100 quadrados de 0,1 μL cada. Apenas amostras sem células sobrepostas nos quadrados são contadas. As células são contadas nos quadrantes dos cantos do hemocitômetro. Cada quadrante possui quatro quadrados menores, ou seja, 0,4 μL . É calculada a média dos quadrantes e então se obtém o número de células por volume.

CAVALCANTI et al. (1999) realizaram um estudo comparando a técnica de contagem manual de microalgas com a técnica de contagem automática utilizando um algoritmo em C++. Para a técnica de contagem manual, os autores propuseram um método as fotos da amostra analisada eram tiradas, salvas computador e então um operador realizava a

contagem das células, marcando com o mouse a área contada, não havendo auxílio de algoritmo nesse processo.

2.3.3 Contagem Automática

O método de contagem automática utiliza o processamento de imagens digitais para contar as células e dimensioná-las (determinar a área de células). A similaridade com a contagem manual é uma vantagem particular, uma vez que esse método é considerado acurado por muitos pesquisadores e é vastamente empregado. A substituição da contagem manual pela automática traz um aumento na velocidade de contagem, redução nos erros, e aumento do número de amostras contadas por dia. (BROWN et al., 1989; JACKSON et al., 1984)

Para este método, SARRAFZADEH et al. (2015) utilizaram o contador automático de células Countess (CountessTM, ver. 2.03, Invitrogen, USA). O contador Countess analisa a imagem microscópica da câmara de contagem celular. Essa imagem é capturada na região central da câmara e o volume da região que é contada é igual a 0,4 μL , volume igual ao do quadrante contado no hemocítmetro. Entretanto, não é necessário adquirir um equipamento para realizar a contagem. BROWN et al. (1989) desenvolveram um sistema acoplado, basicamente, um microscópio, uma câmera e um computador, como ilustrado na Figura 2.4. A placa de interface PCVISION recebe as imagens diretamente da câmera, armazenando-as no PC, onde o software desenvolvido em linguagem C analisa as imagens, contando as células e determinando a área ocupada por células. É importante que se tenha a iluminação adequada no microscópio para garantir que se tenha uma boa discriminação das tonalidades das cores pelo computador.

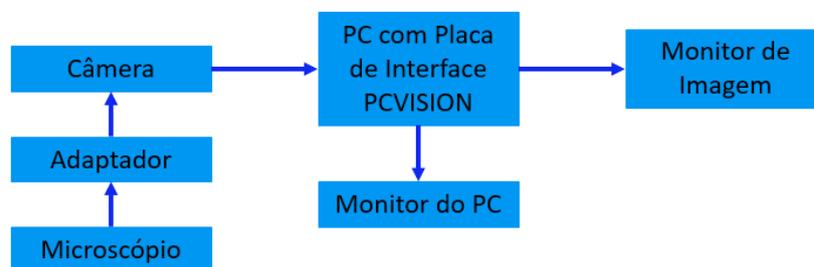


Figura 2.4: Diagrama do sistema utilizado por BROWN et al. (1989) para contagem automática.

Segundo HAVLIK et al. (2013), para fazer o monitoramento *on-line* utilizando esse método, é preciso instalar uma unidade de fluxo em circuito fechado que faz a coleta da amostra, coleta e analisa as imagens e envia a amostra de volta para o meio de cultivo. Além disso, os algoritmos de processamento devem ser ajustados para reconhecimento das células de microalgas, uma vez que cada tipo de célula requer algoritmos específicos.

Utilizando um sistema similar ao apresentado por BROWN et al. (1989), JACKSON et al. (1984) desenvolveram um software em código ASCII para contar as células e também estimar o volume de biomassa, e não apenas a área. ROJAS CAMACHO; FORERO; MENÉNDEZ (2017) utilizaram o software *Matlab* para desenvolver um algoritmo matemático que realiza a classificação do fitoplâncton através da análise de imagens.

O *Matlab* possui uma ferramenta chamada *Image Processing Toolbox*. Ela contém uma série de funções padrão para análise de imagens. Através desses comandos é possível encontrar formas, contar objetos, identificar cores e ainda medir as propriedades do

objeto. Assim, tem-se o software como grande aliado no desenvolvimento de um sensor para contagem automática de microalgas, uma vez que ele permite a construção de um algoritmo para identificação, contagem e medição do volume de células. (MATHWORKS, 2017a)

De acordo com MCANDREW (2004), os métodos de contagem que podem ser construídos no *Matlab* são influenciados pelas características da imagem. Assim, para que se tenha uma contagem mais assertiva, o autor sugere que, entre outras aferições, os ruídos sejam removidos e o contraste seja ajustado. Dependendo da conversão que a imagem sofre para que seja realizada a técnica de contagem, o ajuste de contraste requer diferentes constantes de aferição. Exemplificando, a imagem pode ser convertida de RGB para binária (preto e branco) ou para escala de cinza, e cada uma das conversões demanda um ajuste de contraste diferente.

2.3.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que mede a fluorescência das células. Por serem autofluorescentes, as microalgas são perfeitas para análise via citometria de fluxo. Apesar do alto custo e da necessidade de pessoal especializado para operar o equipamento, essa técnica tem como vantagem o fato de obter e gravar outros parâmetros para cada evento de partículas, permitindo, assim, a identificação de células de interesse separadas de outra matéria orgânica e classificar populações distintas de microalgas. Além da análise de meios de cultivo com população mista, a citometria de fluxo oferece alta confiança estatística, uma vez que é possível processar 12 a 30 amostras em uma hora, cada uma com mais de 10 mil células. (DASHKOVA et al., 2017; PENIUK; SCHNURR; ALLEN, 2016; SARRAFZADEH et al., 2015)

SARRAFZADEH et al. (2015) utilizaram o equipamento FACS Aria II fabricado pela Becton-Dickinson (CA, USA) para realizar a análise por citometria de fluxo. Este equipamento mede a fluorescência emitida pelas células e o espalhamento dos raios laser causado pela presença de microalgas para calcular o número de células. O comprimento de onda do laser utilizado foi de 488nm.

Combinado com a capacidade de separação de células e identificação dos diferentes grupos, o método é um instrumento crítico para estudos da ecologia aquática, como pode ser observado na Figura 2.5. Ele consegue, por exemplo, detectar grupos raros e muito pequenos de fitoplâncton, monitorar as dinâmicas sazonais das células, avaliar a viabilidade das células e suas características funcionais. A análise por citometria de fluxo pode ser ainda combinada com corantes fluorescentes para estudar alguma característica específica das células. Assim, é notável a grande vantagem que a citometria de fluxo traz: medir múltiplos parâmetros para cada célula em um modo de elevada taxa de transferência. Apesar da vantagem, os métodos convencionais que utilizam microscopia, como o método de contagem manual, ainda prevalecem devido ao custo. (DASHKOVA et al., 2017; HYKA et al., 2013)

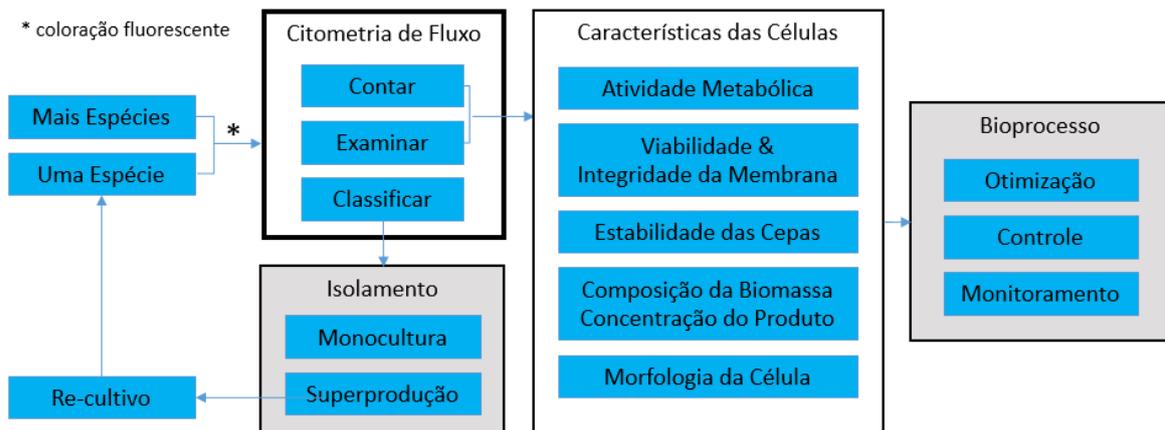


Figura 2.5: Aplicações das análises por citometria de fluxo para processos biotecnológicos com microalgas. As caixas de tonalidade cinza referem-se a objetivos do uso da técnica.
Adaptado de HYKA et al. (2013)

3 Materiais e Métodos

3.1 Imagens

Foram utilizadas quatro imagens diferentes como base para construção e análise dos algoritmos desenvolvidos, sendo três delas obtidas na internet. Essas imagens eram do mesmo formato (.jpg), mas apresentavam diferentes luminosidades, resoluções, definições, densidades e variedades de microalgas.

Para mensurar a definição das imagens, ou seja, a qualidade delas, foi utilizado o valor de dpi (*dots per inch*) como parâmetro. Para imagens do mesmo tamanho, um valor de dpi mais elevado implica em melhor qualidade. Assim, para este trabalho considerou-se como baixa definição valores menores que 100 dpi; média definição valores entre 100 e 300 dpi; e alta definição valores acima de 300 dpi. A Figura 3.1 exemplifica a diferença entre imagens com valores de dpi diferentes. Uma imagem de microalgas com maior dpi faz com que seja mais fácil a identificação das células e contagem das mesmas.



Figura 3.1: Diferença entre imagens com diferentes valores de dpi. Fonte: JORDÃO (2014)

A Imagem 1 (Im1) possui resolução de 198x198 pixels e definição de 96 dpi. Essa imagem, que pode ser observada na Figura 3.2, foi escolhida por apresentar baixa definição quando comparada às demais imagens e também possuir um menor número de microalgas. Além disso, essa imagem possui um caso de sobreposição entre duas microalgas.

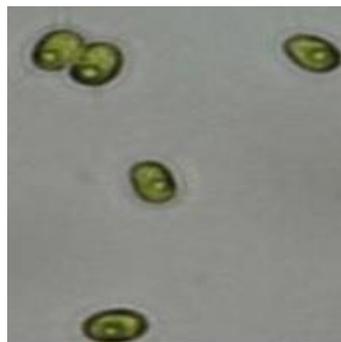


Figura 3.2: Imagem microscópica (40x) de uma amostra normal de biomassa – Imagem 1. Fonte: MOORTHY; PREMALATHA; ARUMUGAM (2017)

A Imagem 2 (Im2), mostrada na Figura 3.3, apresenta definição maior, 300 dpi. A resolução da imagem é 242x289. Essa imagem foi escolhida por apresentar definição alta, diferente do observado nas outras imagens, além de visivelmente ter um maior número de microalgas que Im1, não ter células sobrepostas e aparentar possuir uniformidade no formato e no tamanho das microalgas.

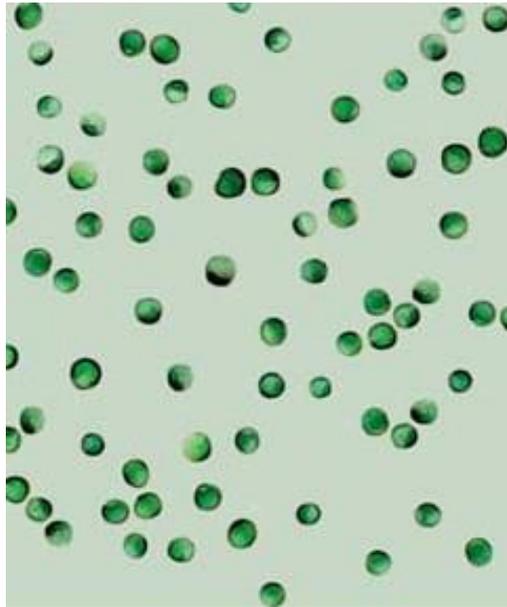


Figura 3.3: Foto microscópica de *Isochrysis sp.* – Imagem 2. Adaptado de HELM; BOURNE (2004)

A Imagem 3 (Im3), por sua vez, possui a definição baixa, 72 dpi. Sua resolução é 350x280. Essa imagem foi escolhida por possuir um grande aglomerado de células, o que permite a avaliação das técnicas frente a tal característica. A Figura 3.4 mostra a Im3.

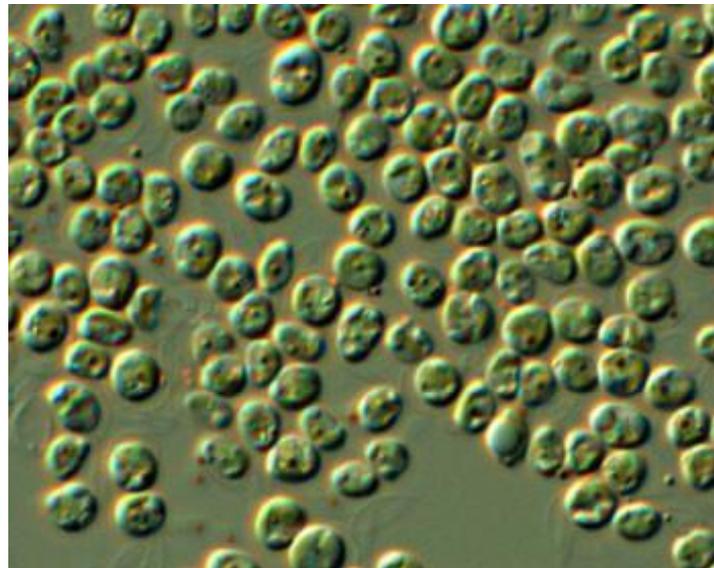


Figura 3.4: Imagem microscópica de *Nannochloropsis*, uma alga verde – Imagem 3. Adaptado de SUPPLY (2017)

Assim como Im1, a Imagem 4 (Im4) tem definição de 96 dpi e resolução de 438x251. Essa imagem é uma foto microscópica de uma solução oriunda do cultivo de *Scenedesmus sp.* A foto foi cedida pelo LACIP/DEQUI/UFRGS, laboratório responsável pela construção de um sistema de controle de baixo custo para um FBR, e esse sistema utilizaria o algoritmo desenvolvido neste trabalho para medição da concentração numérica de microalgas. Na Figura 3.5, pode-se observar a imagem. Ela foi considerada como a mais complexa, pois não apresenta formato definido das microalgas, apresenta sobreposição de células e ainda possui baixa definição.

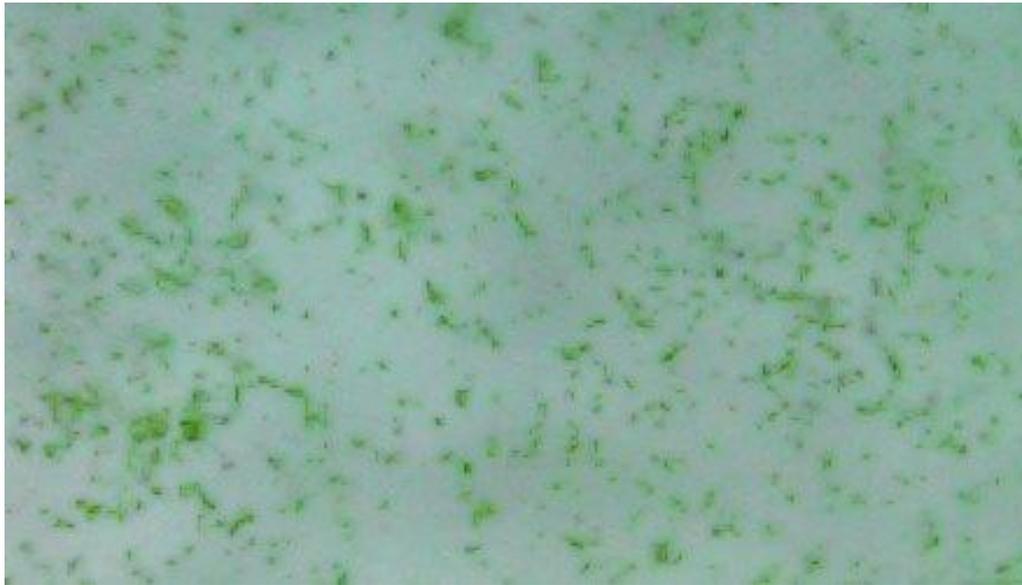


Figura 3.5: Foto microscópica obtida de um cultivo de *Scenedesmus sp* – Imagem 4.

3.2 Contagem Manual

Para auxiliar na contagem manual das microalgas, foi desenvolvido um algoritmo no software *Matlab*TM (MathWorks, MA, USA), versão R2015a. Os resultados obtidos por esta técnica serviram como base comparativa deste estudo, pois com eles foi possível avaliar a acurácia dos algoritmos desenvolvidos para contagem automática.

Ao executar o algoritmo, uma nova janela é aberta solicitando a seleção da imagem para contagem. Após abrir a imagem, a contagem pode ser feita simplesmente clicando-se nas microalgas. Cada clique corresponde a um número consecutivo, o qual é impresso no local do clique. Assim, a contagem manual fica facilitada. Na Figura 3.6 é possível observar como funciona o método de contagem manual amparado pelo algoritmo desenvolvido utilizando a *Im2*. As quatro linhas retas que se encontram (ilustrando uma mira) são utilizadas para auxiliar na correta seleção da microalga a ser contabilizada. Para as microalgas de formato circular na fronteira da imagem utilizou-se como critério que apenas as com visualmente mais de 50% da superfície dentro da imagem seriam contabilizadas, ou seja, o centroide do círculo deveria estar presente na imagem para a microalga ser contada.

3.3 Contagem Automática

No presente estudo, foram testados quatro algoritmos para contagem automática de microalgas no software *Matlab*TM (MathWorks, MA, USA), versão R2015a. Cada algoritmo foi construído, executado, analisado e teve seus parâmetros modificados por tentativa e erro visando o aumento de sua acurácia.

3.3.1 Algoritmo 1 (A1)

Para construção do primeiro algoritmo, escolheu-se a função *bwboundaries*, disponível na biblioteca do software utilizado. Essa função encontra todos os limites dos objetos contidos na imagem analisada. Como ela trabalha apenas com imagens binárias (preto e branco), foi necessário realizar a conversão das imagens RGB utilizadas para o formato requerido pelo método.

O comando *im2bw* foi utilizado para tal conversão. Para correta aplicação deste, um valor entre 0 e 1 deve ser indicado como parâmetro para o *thresholding*, que, segundo MCANDREW (2004), funciona como um filtro para imagem. Quando esse filtro é aplicado, pixels com luminosidade maior que o valor indicado se tornam brancos, enquanto os demais se tornam pretos, resultando assim em uma imagem binária. O comando *graythresh* pode ser utilizado em combinação com o *im2bw*, pois aquele determina qual é o melhor valor de *thresholding* para a conversão da imagem analisada.

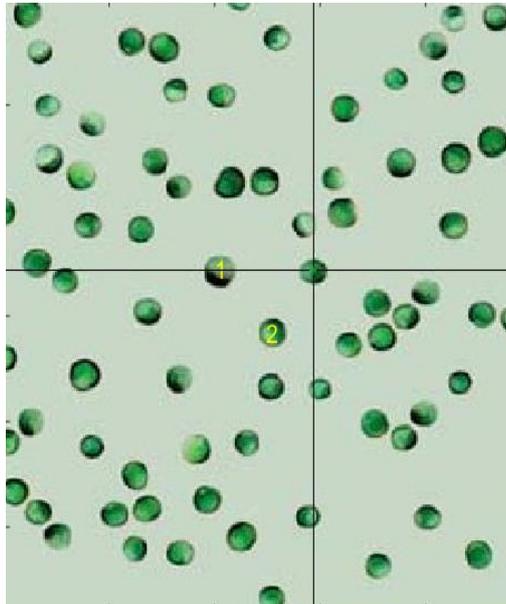


Figura 3.6: Ilustração do funcionamento do método de contagem manual aplicado a Im2.

Após a conversão, construiu-se um *loop* (comando *for*) para contagem de microalgas. A cada volta do *loop*, a função *bwboundaries* encontra uma fronteira de célula e a contabiliza. Quando a função não encontra mais células, o *loop* é terminado e a função retorna o número total de microalgas contadas na imagem.

3.3.2 Algoritmo 2 (A2)

Para construção do segundo algoritmo optou-se por utilizar uma técnica que não realiza uma conversão de imagem tão abrupta quanto a binária. Assim, escolheu-se a transformação de RGB para uma imagem em escala cinza por meio do comando *rgb2gray*, disponível na biblioteca do *Matlab*.

A partir dessa conversão, utilizou-se a função *imfindcircles* para encontrar os centroides dos objetos contidos na imagem, salvando automaticamente suas coordenadas em uma matriz. A função foi parametrizada pelo comando '*ObjectPolarity*', '*dark*'. Isto foi feito pois, visualmente, as microalgas presentes em cada imagem analisada eram mais escuras que o respectivo plano de fundo. Também foi necessário definir a sensibilidade e o método para encontrar os centroides. Por meio de testes, analisou-se visualmente o resultado de cada um e definiu-se que, para construção da função *imfindcircles*, seriam utilizados o método *twostage* e uma sensibilidade de 95%. O comando *viscircles* foi utilizado para circular os objetos encontrados. (MATHWORKS, 2017b)

Além disso, foi necessário fornecer uma faixa de valores de raio que seriam procurados pela função, ou seja, ao encontrar o centroide, o objeto (microalga) seria circularizado e contado caso seu tamanho estivesse dentro da faixa procurada. Para determinar qual a

faixa de raio para cada imagem, foi necessário testar a função até que o resultado visual fosse satisfatório, circulando corretamente o maior número de microalgas. A Tabela 3.1 mostra as faixas definidas como as mais adequadas para cada imagem analisada.

Tabela 3.1: Faixa de raio adequada para análise de cada imagem com os Algoritmos 2 e 4.

Imagem Analisada	Faixa de Raio
Im1	[10 25]
Im2	[3 10]
Im3	[10 13]
Im4	[1 5]

3.3.3 Algoritmo 3 (A3)

Para a construção do terceiro algoritmo, foram utilizadas as mesmas técnicas de A1. Entretanto, a imagem foi pré-processada; o comando *medfilt2* foi utilizado para reduzir os ruídos e o contraste (diferenças na intensidade de luminosidade) foi ajustado com diferentes constantes. Os domínios R, G e B foram tratados separadamente e, no caso do contraste, foram utilizados diferentes valores para as constantes, que podem ser observados na Tabela 3.2. Esses valores foram obtidos da mesma maneira que a faixa de raios: testes com diferentes valores e comparações visuais entre os *outputs* para cada valor. Após o processamento da imagem, a mesma foi convertida para binária e então teve suas microalgas contadas pela função *bwboundaries*. (MCANDREW, 2004)

Tabela 3.2: Constantes utilizadas para realce no contraste de cada imagem em cada um dos domínios do RGB para os Algoritmos 3 e 4.

Imagem Analisada	R	G	B
Im1	A3: 1,00	A3: 1,00	A3: 1,20
	A4: 1,00	A4: 1,00	A4: 1,00
Im2	A3: 1,50	A3: 0,98	A3: 1,10
	A4: 1,50	A4: 0,95	A4: 1,70
Im3	A3: 0,98	A3: 1,02	A3: 0,99
	A4: 0,85	A4: 1,12	A4: 0,83
Im4	A3: 1,10	A3: 0,99	A3: 0,99
	A4: 1,60	A4: 0,75	A4: 0,70

3.3.4 Algoritmo 4 (A4)

Assim como em A2, para construir A4 utilizou-se novamente a função *imfindcircles*, utilizando, para cada imagem, a faixa de raio adequada de acordo com a Tabela 3.1. Entretanto, desta vez realizou-se um pré-tratamento de imagem. A função utilizada nesse

tratamento foi a mesma utilizada para A3. Os parâmetros para realce do contraste podem ser observados na Tabela 3.2.

3.4 Comparativo

Para as Imagens 1, 2 e 3, foram comparados os resultados da contagem manual e da contagem utilizando cada um dos algoritmos desenvolvidos. As diferenças foram expressas em valores percentuais, de acordo com a Eq 3.1.

$$Diferença (\%) = \frac{N_{aut} - N_m}{N_m} \times 100\% \quad (3.1)$$

onde N_{aut} é o número de microalgas obtido por contagem automática e N_m é o número de microalgas obtido por contagem manual. Considerou-se bom o algoritmo que, para determinada imagem, apresentou diferença menor que 10%.

Para a Imagem 4, a contagem manual não foi realizada devido à dificuldade causada pela sobreposição de microalgas combinada à baixa resolução da imagem. Mesmo ao tentar segmentar a imagem, houve grande dificuldade para contagem manual e, ainda, os algoritmos para contagem automática não identificavam as microalgas nas imagens segmentadas. Entretanto, eles conseguiram fazer a contagem para a imagem inteira. Assim, as microalgas dessa imagem foram contadas apenas automaticamente e o resultado foi apresentado para cada algoritmo. Mesmo sabendo das dificuldades, essa imagem foi utilizada neste trabalho pois ela foi obtida por um microscópio digital de baixo custo recém adquirido pelo LACIP/DEQUI/UFRGS, e sua utilização tem como objetivo avaliar a possibilidade de utilização do mesmo em trabalhos futuros envolvendo contagem de microalgas.

4 Resultados e Discussão

A Figura 4.1 apresenta o resultado da aplicação do método de conversão *im2bw* utilizando o comando *graythresh* para determinar o melhor valor do parâmetro para o *thresholding* utilizando Im1 como demonstrativo. É possível perceber que as tonalidades de verde mais claras apresentam luminosidade semelhante à do plano de fundo da imagem, fazendo com que os dois se tornem brancos após a conversão. Assim, para o caso de Im1, as microalgas acabam por ficar com vazios internos. O mesmo efeito ocorre nas outras imagens.

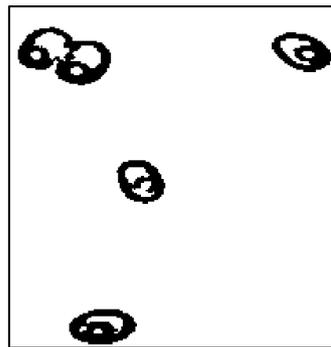


Figura 4.1: Im1 após a conversão de RGB para imagem binária pelo método *im2bw*.

Para o método *rgb2gray*, também demonstrando para a Im1, o resultado que se obtém na conversão pode ser observado na Figura 4.2. Esta imagem retrata o fator luminosidade novamente, onde fica ainda mais claro que a luminosidade interna da microalga é igual à do plano de fundo.

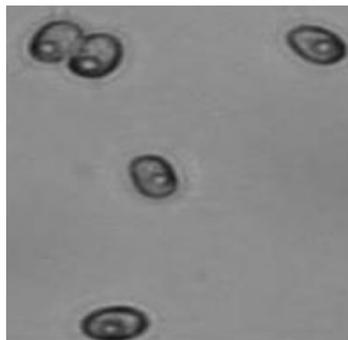


Figura 4.2: Im2 após conversão de RGB para imagem em escala cinza pelo método *rgb2gray*.

A Tabela 4.1 mostra todos os resultados obtidos para a contagem de microalgas e a diferença percentual do valor obtido para contagem automática em relação à contagem manual. Para a Imagem 1, o Algoritmo 2 foi o que obteve o melhor resultado, tendo seu número de microalgas igual ao número de microalgas encontrados por contagem manual. Para a Imagem 2, o número de microalgas obtido pelo Algoritmo 2 também foi o mais próximo ao resultado da contagem manual. Entretanto, A3 e A4 também apresentaram bons resultados para tal imagem. Analisando a Imagem 3, as análises utilizando A2 e A4 obtiveram o mesmo resultado percentual em módulo, onde A2 contou três algas a mais e

A4 três algas a menos do que a contagem manual. A análise de Im3 com A3 também apresentou um bom resultado.

Tabela 4.1: Resultados obtidos com as técnicas desenvolvidas para contagem de microalgas e a diferença percentual ao comparar com a técnica de contagem manual.

Imagem	Contagem Manual	A1	Dif. (%)	A2	Dif. (%)	A3	Dif. (%)	A4	Dif. (%)
Im1	5	4	-20,00%	5	0,00%	4	-20,00%	6	20,00%
Im2	71	79	11,27%	72	1,41%	69	-2,82%	73	2,82%
Im3	132	197	49,24%	135	2,27%	127	-3,79%	129	-2,27%
Im4	-	464	-	379	-	318	-	405	-

4.1 Análise pelo Método de Contagem Manual

Para a Imagem 4, quando tentou-se contar manualmente as microalgas, os números que apareciam a cada clique acabavam por encobrir várias microalgas. Além disso, a baixa definição da imagem aliada à presença de células muito pequenas, a sobreposição de células e a falta de formato definido das microalgas acabaram por inviabilizar a contagem manual. Nas Imagens 1, 2 e 3, houve maior facilidade de contagem devido às fronteiras das células serem de fácil observação visual, mesmo nos casos de definição baixa.

A contagem manual do número de microalgas nas imagens analisadas tem seu resultado apresentado na Tabela 4.1. Além disso, é possível observar as imagens e as células contadas nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5. Das três imagens analisadas, Im3 apresentou o maior número de microalgas, 132. Im2 apresentou 71 células, enquanto Im1 apresentou apenas 5.



Figura 4.3: Identificação e contagem das microalgas em Im1 através da técnica de contagem manual.

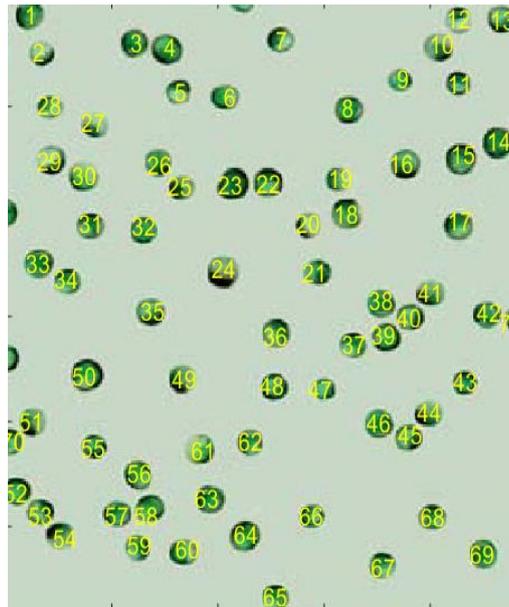


Figura 4.4: Identificação e contagem das microalgas em Im2 através da técnica de contagem manual.

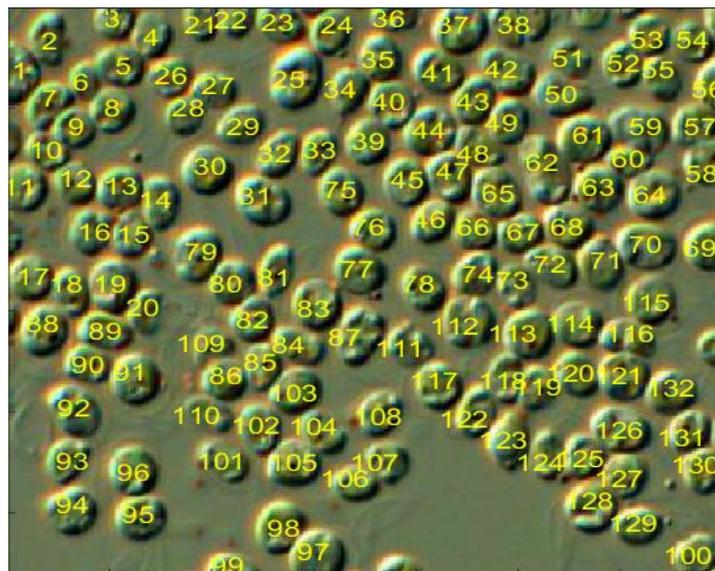


Figura 4.5: Identificação e contagem das microalgas em Im3 através da técnica de contagem manual.

4.2 Análise Utilizando o Algoritmo 1

As quatro imagens utilizadas nesse trabalho foram processadas utilizando o primeiro algoritmo. O algoritmo desenhou o contorno das células com cor verde e as bordas da imagem com cor vermelha. Na Figura 4.6 é possível observar as fronteiras encontradas pelo algoritmo em Im1. Como o método utilizado encontra as fronteiras dos objetos, a sobreposição de duas microalgas fez com que o método contabilizasse apenas uma. Assim, o algoritmo contou 4 microalgas, diferente do que foi observado na contagem manual (5), resultando em uma diferença de -20,00%.

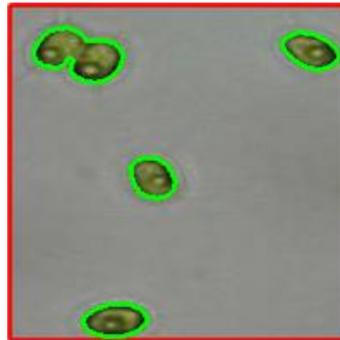


Figura 4.6: Processamento de Im1 utilizando A1.

Na Figura 4.7, tem-se o resultado da contagem automática para Im2. O algoritmo encontrou 79 microalgas na imagem, valor diferente do encontrado pela contagem manual (71). Essa diferença de 11,27% tem como principal causa o contraste da imagem. Algumas células apresentam uma coloração verde muito clara em algumas regiões de sua área superficial, o que faz com que essas regiões, assim como o plano de fundo da imagem, se tornem brancas quando a imagem é convertida em binária. Com isso, a fronteira correta da microalga não é encontrada e esta pode até ser contabilizada duas vezes, uma vez que a coloração verde clara pode estar dividindo a célula. Além disso, o algoritmo não contabiliza nenhuma microalga que esteja em contato direto com alguma das bordas da imagem.

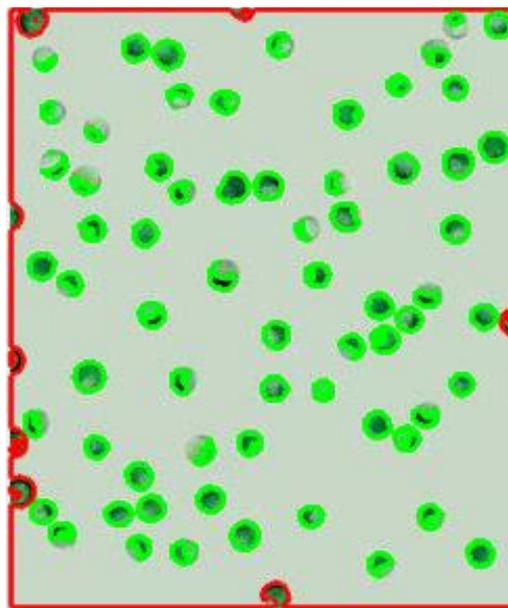


Figura 4.7: Processamento de Im2 utilizando A1.

Na Figura 4.8 foram encontradas 197 microalgas, novamente diferente do encontrado por contagem manual. Novamente a luminosidade da imagem causou essa diferença de 49,24% na análise de Im3, assim como foi em Im2. A pouca diferença entre as tonalidades das cores dentro das células e do plano de fundo fez com que muitas microalgas fossem contadas mais de uma vez. Além disso, essa imagem possuía várias microalgas em contato com as bordas da imagem, e estas não foram contabilizadas.

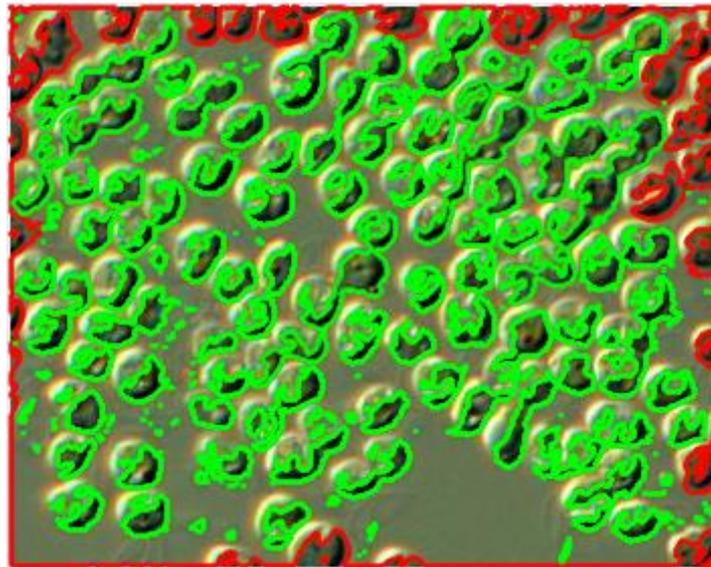


Figura 4.8: Processamento de Im3 utilizando A1.

Executando o algoritmo nos segmentos de Im4, não foram encontradas microalgas. Neste caso, a baixa definição da imagem aliada ao baixo contraste fez com que nenhuma fronteira de célula fosse encontrada. Assim, testou-se o algoritmo com a imagem inteira, e foram contadas 464 microalgas. O resultado final da imagem pode ser observado na Figura 4.9. É possível notar que muitas microalgas são englobadas como borda da imagem, prejudicando a contagem. Além disso, aglomerados de microalgas eram contados como uma microalga, e algumas microalgas eram contadas duas vezes por causa da luminosidade. Assim, o resultado obtido pelo Algoritmo 1 para a Im4 é duvidoso devido às várias fontes de erro.

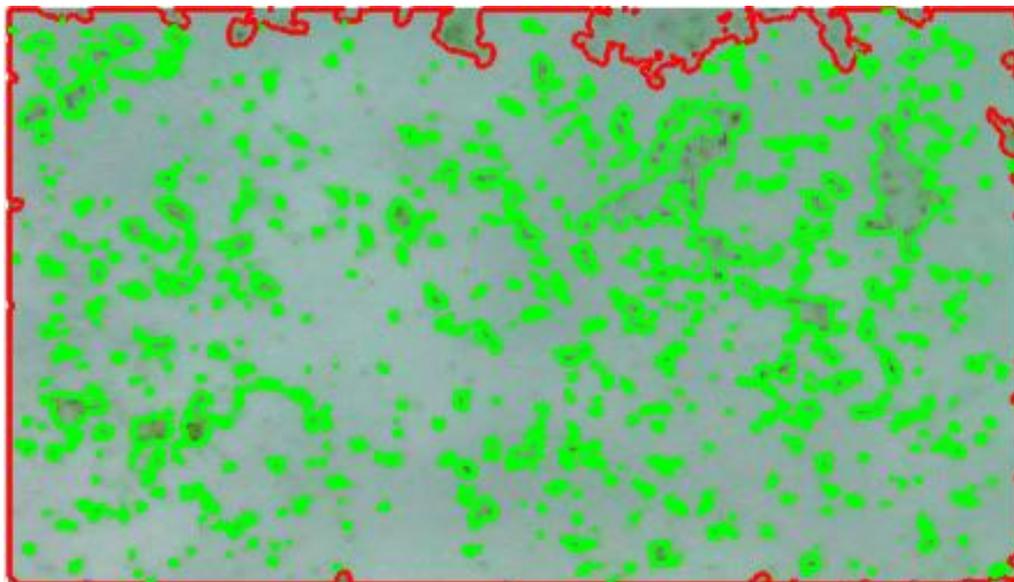


Figura 4.9: Processamento de Im4 utilizando A1.

4.3 Análise Utilizando o Algoritmo 2

Ao processar as imagens utilizando A2, o método utilizado circula em cor vermelha as microalgas localizadas. Para a Im1, foram encontrados 5 círculos. Os centroides dos círculos encontrados foram as microalgas e, assim, o algoritmo foi capaz de encontrar todas elas,

obtendo o mesmo resultado da contagem manual (5). As microalgas encontradas podem ser observadas na Figura 4.10.

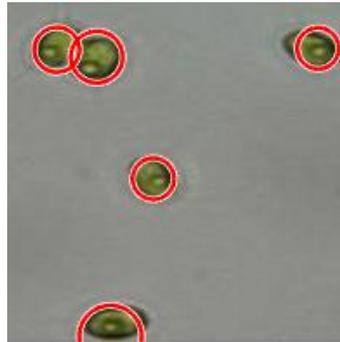


Figura 4.10: Processamento de Im1 utilizando A2.

Para a Im2 foram encontradas 72 microalgas, uma a mais do que foi encontrado pela contagem manual (71), resultando em uma diferença de 1,41%. Isto ocorreu porque uma das microalgas com menos de 50% da área superficial presente na imagem foi contada. Comparando as imagens resultantes da contagem manual e da contagem pelo A2 com a imagem original, observou-se que a microalga em questão aparenta estar dividida ao meio pela fronteira da imagem, ou seja, 50% dentro e 50% fora da imagem. Como A2 encontra os centroides, ele foi capaz de localizar e contar essa microalga. Pela contagem manual, essa microalga ficou a critério da interpretação de quem estava contando, e isso mostra que a contagem automática traz mais confiabilidade em casos como este.

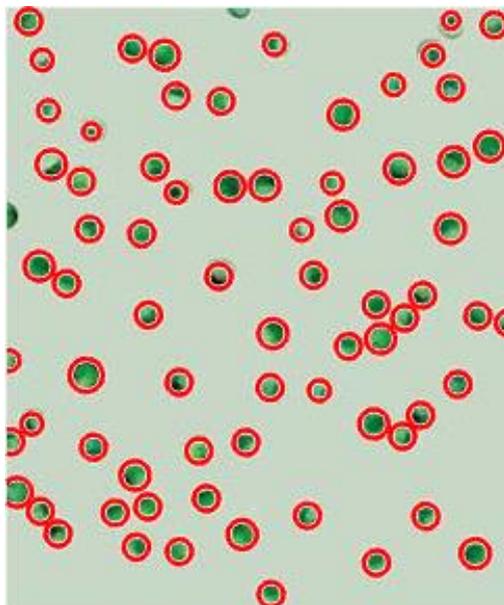


Figura 4.11: Processamento de Im2 utilizando A2.

Após processar a Im3, foram contadas 135 microalgas, mostradas na Figura 4.12, três a mais do número encontrado através da contagem manual (132), ou seja, uma diferença de 2,27%, o que mostra que o resultado foi satisfatório. Ao comparar as imagens resultantes de cada técnica, notou-se que, devido ao contraste da Im3 (imagem composta apenas por tons de verde escuro), algumas microalgas não foram localizadas. Isto levaria a um número menor de microalgas do que a contagem manual. Entretanto, devido ao grande aglomerado de células, o algoritmo encontrou círculos entre as microalgas, formados

quando algumas microalgas próximas estavam dispostas de maneira a deixar um espaço entre elas dentro da faixa de raios procurada pelo método.

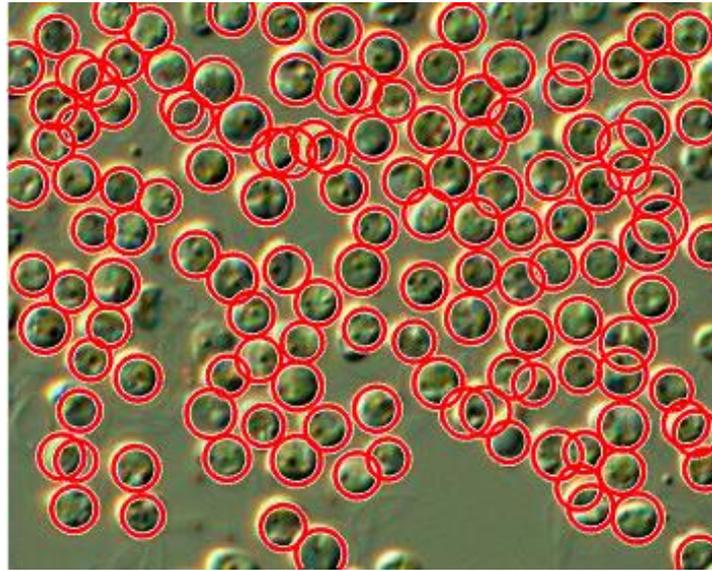


Figura 4.12: Processamento de Im3 utilizando A2.

Processando a Im4 com A2, tem-se como resultado a Figura 4.13. Foram contadas 379 microalgas. Como foi para A1, a baixa definição da imagem atrapalhou a utilização de A2, dificultando a localização das microalgas. Assim, em alguns pontos na figura é possível observar algumas microalgas não contabilizadas.

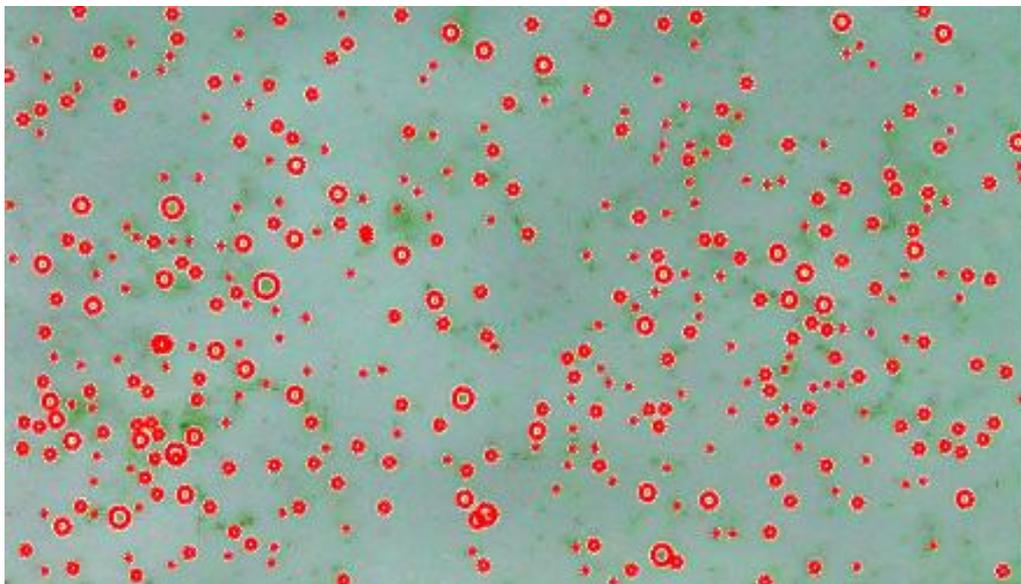


Figura 4.13: Processamento de Im4 utilizando A2.

4.4 Análise Utilizando o Algoritmo 3

A3 utiliza o mesmo método que A1, porém ele faz o pré-processamento da imagem. Assim, tem-se que as células encontradas foram contornadas em cor verde e as margens da imagem em cor vermelha. Utilizando A3 para processar a Im1, obteve-se o mesmo resultado que A1, 4 microalgas. Novamente o fato de que há duas microalgas sobrepostas trouxe à tona o erro inerente da técnica *bwboundaries*, contando apenas uma microalga.

Devido ao baixo número de microalgas, a redução do ruído não trouxe impacto na contagem. Na Figura 4.14, é possível observar o resultado do processamento da imagem.

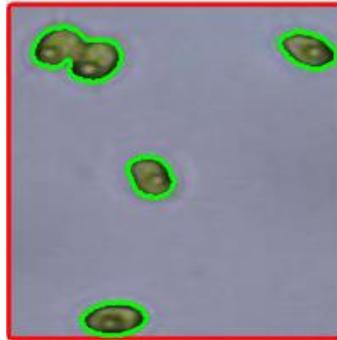


Figura 4.14: Processamento de Im1 utilizando A3.

Ao processar Im2, obteve-se a Figura 4.15. Nela, foram contadas 69 microalgas, duas a menos do que foi contado manualmente (71), ou seja, uma diferença de -2,82%, o que mostra que o resultado foi satisfatório. Como já foi mencionado, uma limitação do comando *bwboundaries* é a contagem de células que estão nas bordas da imagem. Analisando a imagem contada manualmente (Figura 4.4), foi observado que 5 microalgas de borda foram contabilizadas por ter mais de 50% da área contida na imagem. Logo, A3 deveria ter encontrado 66 microalgas, e não 69. Assim, foi possível concluir que, após o pré-processamento, ainda continuaram ocorrendo erros de dupla contagem de microalgas devido aos efeitos da luminosidade, porém em um volume bem menor que o ocorrido quando se utilizou A1.

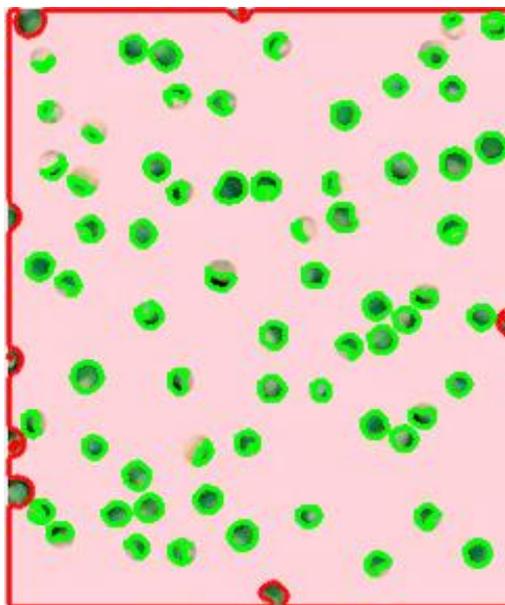


Figura 4.15: Processamento de Im2 utilizando A3.

Na Im3, foram contadas 127 microalgas, frente às 132 células contadas manualmente. Numericamente, o resultado aparenta estar próximo ao resultado da técnica padrão – diferença de -3,79% – podendo ser considerado satisfatório. Entretanto, ao observar o resultado na Figura 4.16, é possível observar que muitas microalgas não foram contadas devido ao efeito da borda, enquanto outras foram contadas mais de uma vez. Assim, mesmo após o pré-processamento da imagem, não foi possível realizar a contagem de maneira adequada da Im3 utilizando A3.

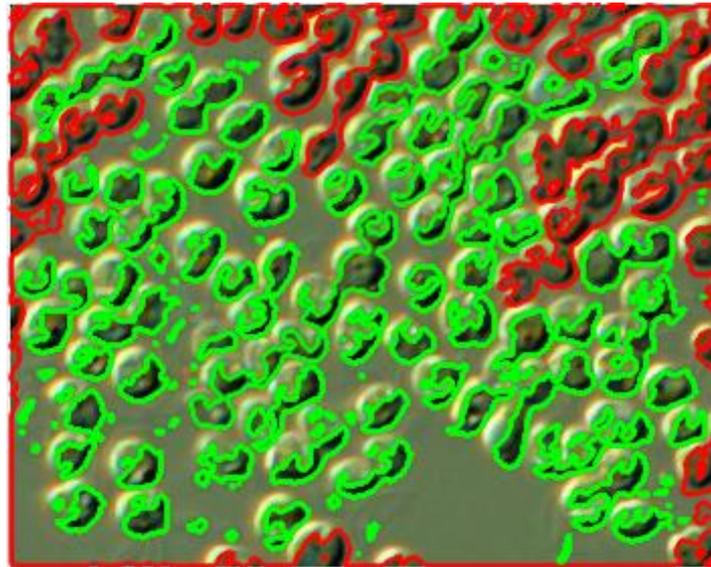


Figura 4.16: Processamento de Im3 utilizando A3.

Para Im4, a execução de A3 resultou na Figura 4.17. Foram contadas 318 microalgas com esta técnica. O efeito de borda pode ser claramente observado na figura, sendo responsável por deixar fora da contagem diversas microalgas. Mesmo com a remoção de ruídos e aferição do contraste, a baixa definição da imagem continuou prevalecendo e prejudicando a contagem por meio desse método.

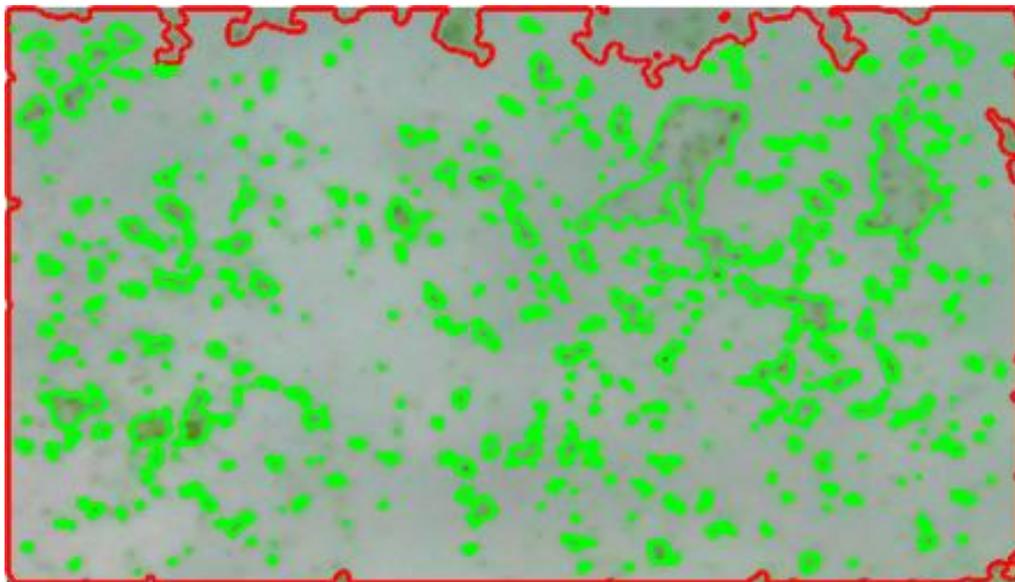


Figura 4.17: Processamento de Im4 utilizando A3.

4.5 Análise Utilizando o Algoritmo 4

O processamento de Im1 utilizando A4 resultou na Figura 4.18, onde foram contadas 6 microalgas, ou seja, 20% a mais que o resultado da contagem manual (5). Era esperado que o pré-processamento da imagem fosse trazer um resultado que se aproximasse do resultado da técnica padrão. Entretanto, a baixa qualidade dos pixels fez com que, ao aferir o contraste, um gradiente de cor se formasse em torno da microalga da parte mais inferior da imagem. Esse gradiente, cuja forma circular apresentou raio dentro da faixa procurada pelo código, foi contabilizado como uma microalga.

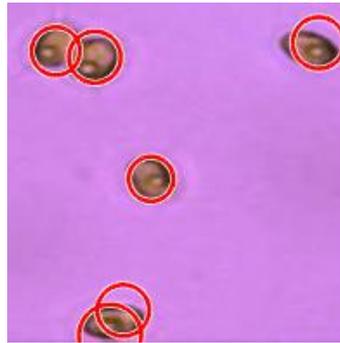


Figura 4.18: Processamento de Im1 utilizando A4.

Para Im2, foram contabilizadas 73 microalgas, diferente 2,82% do resultado da contagem manual (71), podendo-se considerar como um bom resultado. Observando a Figura 4.19, nota-se que apenas uma microalga da imagem não foi contabilizada. Essa microalga está localizada na parte superior de Im2 e possui menos de 50% de sua área contida na imagem. A4 contabilizou duas microalgas a mais do que a contagem manual, ambas aparentemente com menos de 50% de sua área contida na imagem. Uma delas havia sido contada também por A2, e sua causa, a interpretação de quem conta, já foi discutida. Para a outra, a causa dessa contagem pode ter sido o efeito do ajuste do contraste, capaz de gerar um gradiente de cor ao redor da célula, com raio dentro dos parâmetros e centro dentro da imagem, fazendo com que tal célula seja contabilizada, assim como ocorreu ao analisar a Im1.

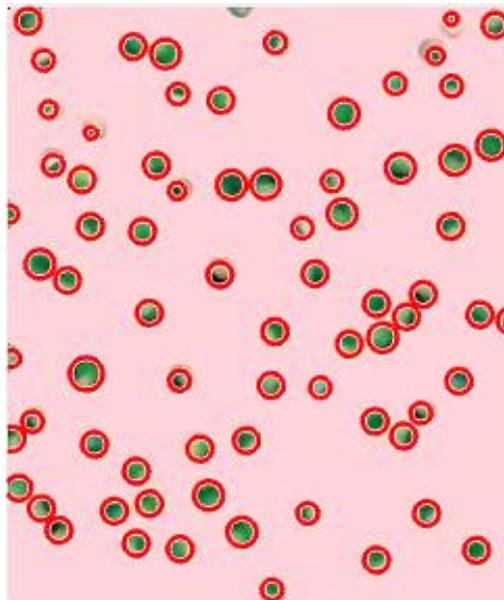


Figura 4.19: Processamento de Im2 utilizando A4.

Aplicando o algoritmo na Imagem 3, foi obtida a Figura 4.20 e foram contadas 129 microalgas. Assim, a diferença para o resultado da contagem manual (132) foi de -2,27%, ou seja, foi obtido um bom resultado. Apesar do ajuste no contraste, algumas microalgas ainda não foram encontradas pela técnica. Entretanto, esse ajuste também facilitou a percepção de microalgas pelo algoritmo: na análise com A2, houve uma contagem errônea de círculos formados pela disposição dos aglomerados de microalgas, que deixavam um espaço entre elas dentro da faixa de raios procurada pelo método; com A4, esse efeito ficou reduzido.

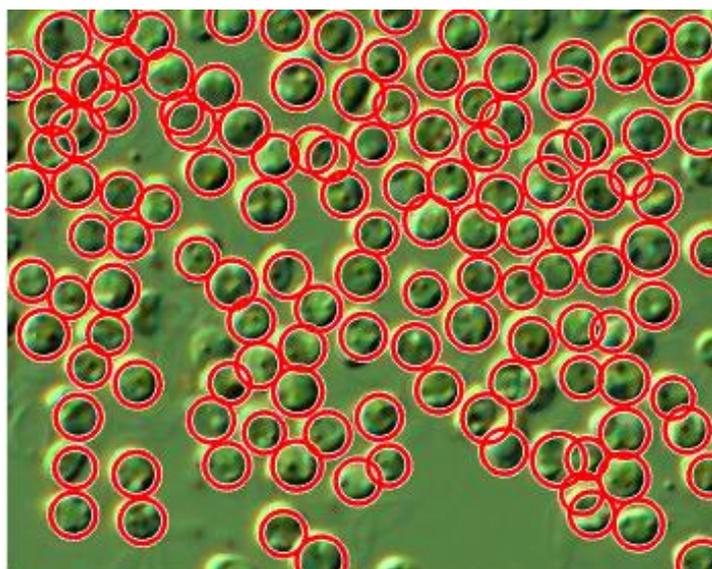


Figura 4.20: Processamento de Im3 utilizando A4.

Em Im4, foram contadas 405 microalgas. Dentro dos domínios do RGB, o contraste foi intensificado no vermelho (R), como pode ser observado na Figura 4.21, o que auxiliou na diferenciação das células, facilitando a contagem. Mesmo assim, a má qualidade da imagem continuou prejudicando a contagem, assim como o fez para todos os outros três algoritmos. Entretanto, visualmente esta técnica é a melhor tratando-se da Imagem 4. É possível perceber uma distribuição de círculos vermelhos mais condizente com a distribuição de microalgas da imagem original, sendo melhor que a observada com o processamento utilizando o Algoritmo 2. Além disso, não há o efeito da borda nem o efeito dos aglomerados, como nos Algoritmos 1 e 3.

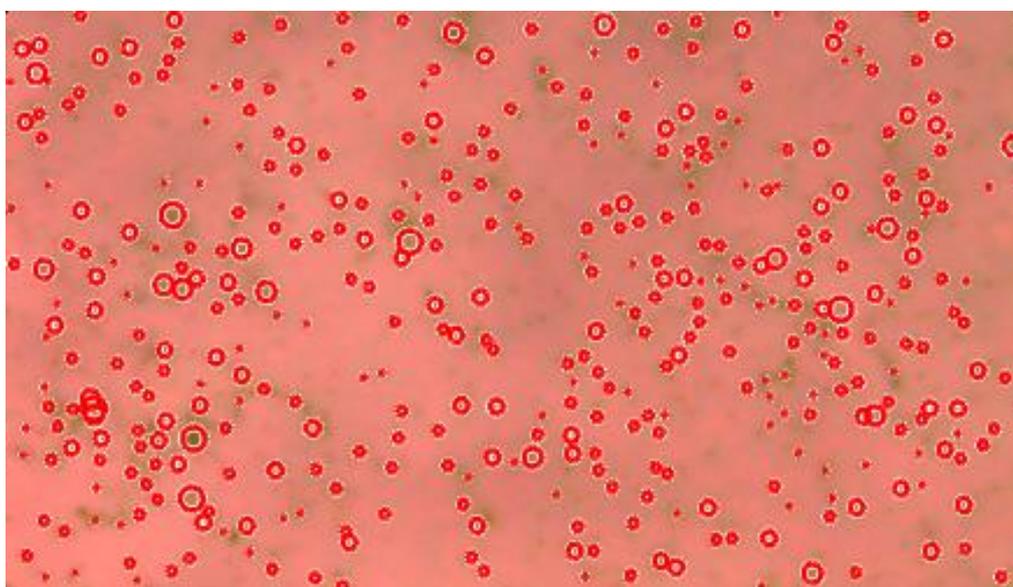


Figura 4.21: Processamento de Im4 utilizando A4.

4.6 Comparativo entre as Técnicas

A Tabela 4.2 mostra a média das diferenças percentuais obtidas ao comparar os algoritmos analisados com a contagem manual, utilizando as Imagens 1, 2 e 3. Com base nesses dados, é possível observar que o Algoritmo 2 foi o melhor frente às análises do

presente estudo. Entretanto, é importante ressaltar que, ao analisar um algoritmo de contagem automática para verificar sua aplicabilidade em um sistema, deve-se analisar, além do resultado numérico, a imagem resultante da contagem, pois esta é capaz de revelar alguns erros que passam despercebidos ao observar apenas o número final. Assim, tem-se que cada estilo de imagem demanda um algoritmo em particular sendo que, para a Imagem 4, foi escolhido o Algoritmo 4 como melhor, uma vez que este apresentou o resultado visual mais condizente com o observado na imagem original.

Tabela 4.2: Diferença percentual média entre os algoritmos desenvolvidos e a contagem manual.

Algoritmo	Diferença média (%)
A1	26,8%
A2	1,2%
A3	8,9%
A4	8,4%

LUCARINI; BIANCHI (2004) desenvolveram um algoritmo para contagem automática em linguagem C++ e compararam com a técnica de contagem manual, obtendo uma diferença média percentual de 17,6%, valor menor que o Algoritmo 1, porém maior que os Algoritmos 2, 3 e 4. As análises desses autores apresentaram erros que também foram observados no presente estudo: aumento da diferença percentual ao aumentar o agrupamento (aglomeração) das células; células com o centro muito claro, fazendo com que o sistema contasse duas ou mais células onde existia apenas uma; células sobre as linhas da borda; e baixa definição de algumas imagens.

CAVALCANTI et al. (1999), que também realizaram este comparativo, obtiveram boa correlação de resultados com os métodos manuais. A métrica do comparativo utilizada pelos autores foi percentual, onde se comparou o percentual de quadros com algas na contagem manual e o percentual de pixels com algas na contagem automática. Assim, eles obtiveram uma diferença média da ordem de 3,1. Ao transformar para a métrica do presente estudo, foi obtida uma diferença média de 16,3%. Novamente, apenas os Algoritmos 2, 3 e 4 apresentaram resultados melhores.

É possível perceber que, para os casos dos Algoritmos 1 e 3, o pré-processamento da imagem trouxe uma grande melhora no resultado da contagem automática. Ao comparar A2 e A4, tem-se A2 com o melhor resultado percentual. Entretanto, foi observado que para A4 foram obtidos melhores resultados nas Imagem 3 e 4; ocorreu erro na Imagem 1 devido à baixa definição da própria imagem; e na Imagem 2 o resultado foi mais condizente com a realidade, porém fora das premissas previamente definidas.

Por fim, é importante mencionar que, ao longo desse trabalho, foram desenvolvidos e testados algoritmos com técnicas além das apresentadas. Porém, devido à baixa qualidade da maioria das imagens, não foi possível analisá-las. Um exemplo de técnica testada foi o comando *edge* que, assim como o *bwboundaries*, encontra as fronteiras dos objetos nas

imagens. Entretanto, aquele método não necessita de conversão, isto é, ele trabalha com a imagem RGB. A baixa qualidade das imagens fez com que tal método não encontrasse objeto algum nelas. Além disso, também existe um método onde uma função correspondente à linha de fronteira das células é construída e, então, busca-se os objetos cujo formato condiz com a função. Novamente a baixa qualidade trouxe problemas para esta técnica, além de, para a Imagem 4, não existir um formato definido de microalgas para ser modelado e encontrado.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Neste estudo foram avaliados 4 algoritmos para contagem automática de microalgas em 4 diferentes imagens, sendo 3 buscadas de fontes alternativas e 1 obtida pelo microscópio que será utilizado para construção de um sistema de monitoramento de cultivo de microalgas. A contagem realizada por cada algoritmo em cada imagem foi comparada com o resultado da contagem manual. Após o comparativo, foi possível concluir que, para os Algoritmos 2, 3 e 4, as bases do sistema estão bem estabelecidas, apresentando bons resultados. Cada um deles tem maior eficiência e precisão em casos com microalgas separadas e melhor qualidade da imagem analisada. Além disso, o uso de técnicas para pré-processamento da imagem é importante para garantir bons resultados, porém é ideal que as imagens sejam de boa qualidade, uma vez que má qualidade pode causar erros durante o pré-processamento.

O algoritmo desenvolvido para contagem manual foi capaz de facilitar a aplicação dessa técnica, garantindo que nenhuma microalga fosse contada mais de uma única vez. Tendo como premissa que uma microalga seria contada manualmente se no mínimo 50% de seu volume estivesse presente dentro do quadro da imagem, ou seja, fosse possível visualizar seu centroide, foram contadas 5 microalgas na Imagem 1, 71 na Imagem 2, e 132 na Imagem 3. A contagem manual para a Imagem 4 se mostrou inviável devido à baixa qualidade da imagem, à dificuldade de identificação das fronteiras das microalgas por não haver um formato definido delas, e ao tamanho pequeno das células.

Para a contagem automática, os quatro algoritmos foram capazes de processar todas as imagens utilizadas. Comparando os resultados obtidos pela contagem automática com a contagem manual, para a Imagem 1, apenas o Algoritmo 2 foi capaz de encontrar o mesmo resultado (5) e, por isso, foi apontado como o melhor para este caso. Para os Algoritmos 1 e 3, houve a limitação inerente do método utilizado, que é a incapacidade de contar separadamente células aglomeradas. Para o Algoritmo 4, o pré-processamento da imagem acabou por prejudicar a contagem devido à criação de um gradiente de cor circular com raio dentro da faixa procurada pelo código, resultando na contagem errônea. Isto é um efeito comum quando se fazem mudanças de contraste em imagens de baixa qualidade.

Para a Imagem 2, A2 novamente obteve o melhor resultado, contando 72 microalgas, ou seja, 1,41% a mais que a contagem manual. A1 não obteve bom resultado devido aos efeitos da luminosidade da imagem. A3, que utiliza a mesma técnica de A1 mas realiza o pré-processamento da imagem, obteve um bom resultado. Comparando-se visualmente as imagens processadas por A3 e A4 (ambos utilizam métodos de pré-processamento de imagens), a primeira apresentou um resultado pior pois notou-se que algumas microalgas não haviam sido contabilizadas por estarem em contato com a margem, enquanto outras haviam sido contadas duas vezes. Para A4, a diferença de 2,82% para a contagem manual ocorreu porque o algoritmo deixou de contar apenas 1 microalga da imagem toda (incluindo as células que não atendiam à premissa da contagem manual), levando à conclusão de que, caso não houvesse premissa alguma, A4 teria sido o melhor algoritmo para contagem das microalgas em Imagem 2. Assim, tanto A2 quanto A4 estão aptos para contagem de microalgas nas condições estudadas para a Imagem 2, e, para escolha correta de qual utilizar, deve-se verificar primeiro as premissas do processo.

Na Imagem 3, A2 e A4 obtiveram os resultados mais próximos ao que foi contado manualmente, sendo a diferença do primeiro 2,27% e do segundo -2,27%. A2 contabilizou círculos formados pela aglomeração de microalgas, porém não contabilizou microalgas cuja luminosidade era muito similar ao plano de fundo da imagem (baixo contraste). A4, por sua vez, não contabilizou os círculos formados pelo efeito de aglomeração, porém houve o mesmo problema quanto ao contraste. O primeiro efeito positivo quando comparado com os demais códigos fizeram de A4 a melhor escolha para casos como o da Imagem 3. Devido ao grande aglomerado de células, A1 e A3 ficaram limitados pelo efeito de margem, não realizando a contagem de maneira adequada.

Com base no que foi analisado para as três primeiras imagens, definiu-se que, para a Imagem 4, o melhor algoritmo para contagem automática é o 4, que contou 405 microalgas. Ele foi escolhido porque, após o processamento da imagem, ele visualmente localizou as microalgas de forma mais condizente com a imagem original, sendo possível observar uma distribuição de círculos vermelhos melhor que a observada ao utilizar o Algoritmo 2, que não contabilizou várias microalgas, deixando muitos *gaps* na imagem. Além disso, o Algoritmo 4 não sofre os efeitos de borda e tem reduzidos os efeitos dos aglomerados, ao contrário do observado quando foram utilizados os Algoritmos 1 e 3.

Nas análises realizadas, observou-se que não era suficiente o resultado percentual do comparativo com a técnica padrão para tomar uma decisão a respeito de um algoritmo. Era essencial também conferir a imagem resultante da análise e comparar com a imagem original, para então poder apontar se o algoritmo estava condizente ou não.

Além disso, os resultados mostraram que não há um algoritmo único e universal para a contagem de microalgas. Cada um deve ser desenvolvido de acordo com o que se quer analisar e com a qualidade das imagens que se têm. Caso as microalgas não fossem circulares, A2 e A4 poderiam não ter a mesma performance que tiveram neste trabalho. Além disso, quando se tem imagens de baixa qualidade, utilizar algumas técnicas de pré-processamento pode não ser a melhor alternativa. Caso as imagens fossem de alta qualidade, acredita-se que os resultados obtidos teriam sido melhores. A busca por métodos de menor custo para o controle dos cultivos de microalgas trouxe como alternativa a utilização de um microscópio de preço baixo e, conseqüentemente, com baixa definição de imagem. Como este microscópio será utilizado em um trabalho futuro que utiliza os algoritmos desenvolvidos neste trabalho, foi necessário utilizar as imagens com baixa qualidade.

Assim, sugere-se para trabalhos futuros:

- Desenvolvimento de um sistema de automação para realizar as contagens periodicamente;
- Construção de mais algoritmos de baixo custo buscando a contagem automática em meios com diferentes microalgas;
- Análise da aplicabilidade dos algoritmos para diferentes faixas de concentração de microalgas e diferentes definições de imagem;
- Implementação do algoritmo com sistema de automação no desenvolvimento de um sistema de controle de baixo custo para fotobiorreatores.

6 Referências

BENAVIDES, M. et al. Design and test of a low-cost RGB sensor for online measurement of microalgae concentration within a photo-bioreactor. **Sensors (Switzerland)**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 4766–4780, 2015.

BETTIN, F. Treating urban wastewaters with microalgae : batch and continuous flow experiments and preliminary process design. [s. l.], 2014.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

BROWN, L. M. et al. Computer-based image analysis for the automated counting and morphological description of microalgae in culture. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 211–225, 1989.

CAVALCANTI, R. B. et al. UM MÉTODO PRÁTICO PARA ANÁLISES DE ALGAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA, BASEADO EM PROCESSAMENTO COMPUTADORIZADO DE IMAGENS. **20 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, [s. l.], v. V-011, p. 2169–2175, 1999.

CAVALCANTI, V. F. et al. CULTIVO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM FOTOBIOREATOR DE PLACAS PLANAS E PRODUÇÃO DE ÉSTERES POR TRANSESTERIFICAÇÃO in situ. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 244–254, 2014.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008.

DASHKOVA, V. et al. Imaging flow cytometry for phytoplankton analysis. **Methods**, [s. l.], v. 112, p. 188–200, 2017.

DEBELIUS, B. et al. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 1503–1513, 2009.

GONZALEZ, L. E. et al. Biodiesel Production Based in Microalgae: A Biorefinery Approach. **Natural Science**, [s. l.], v. 7, n. July, p. 358–369, 2015.

HAVLIK, I. et al. On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 406–414, 2013.

HELM, M. M.; BOURNE, N. Hatchery operation: culture of algae. **Food and Agriculture Organization of The United Nations**, Rome, 2004.

HYKA, P. et al. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 2–16, 2013.

JACKSON, G. S. et al. A computerized plankton counter. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 118, n. 2, p. 225–228, 1984.

JORDÃO, F. **Entenda quais são as diferenças entre o PPI e o DPI**. 2014.

JUSTICE, C. et al. Process control in cell culture technology using dielectric spectroscopy. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 391–401, 2011.

LUCARINI, A. C.; BIANCHI, R. A. C.; SILVA, L. A. UM SISTEMA PARA A CONTAGEM SEMI-AUTOMÁTICA. **Pesquisa e Tecnologia FEI**, [s. l.], p. 36–40, 2004.

MATHWORKS. **Image Segmentation and Analysis**. 2017a.

MATHWORKS. **MATLAB Library**. 2017b.

MATSUDO, M. C.; PAULO, S. Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio. **Usp**, [s. l.], p. 103, 2006.

MCANDREW, A. **An Introduction to Digital Image Processing with MATLAB**. [s.l.] : Victoria University of Technology, 2004.

METTING, B.; PYNE, J. W. Biologically active compounds from microalgae. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 386–394, 1986.

MIRANDA, C. T. et al. Microalgae Lipid and Biodiesel Production: A Brazilian Challenge. **American Journal of Plant Sciences**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 2522–2533, 2015.

MOORTHY, R. K.; PREMALATHA, M.; ARUMUGAM, M. Batch Sedimentation Studies for Freshwater Green Alga *Scenedesmus abundans* Using Combination of Flocculants. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 5, p. 37, 2017.

NASCIMENTO, D. D. Do; PICKERING, W. A. (EDS.). **Plant-Based Genetic Tools for Biofuels Production**. Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers, 2017.

PENIUK, G. T.; SCHNURR, P. J.; ALLEN, D. G. Identification and quantification of suspended algae and bacteria populations using flow cytometry: applications for algae biofuel and biochemical growth systems. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 95–104, 2016.

ROJAS CAMACHO, O.; FORERO, M.; MENÉNDEZ, J. A Tuning Method for Diatom Segmentation Techniques. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 762, 2017.

SACASA CASTELLANOS, C. Batch and Continuous Studies of *Chlorella vulgaris* in Photo-bioreactors. **The university of Western Ontario**, [s. l.], n. January, p. 80, 2013.

SANDNES, J. M. et al. Real-time monitoring and automatic density control of large-scale microalgal cultures using near infrared (NIR) optical density sensors. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 122, n. 2, p. 209–215, 2006.

SANTOS, B. **Estratégias para aumentar a produtividade de biomassa de microalgas com carbono orgânico**. 2016. Universidade Federal do Paraná, [s. l.], 2016.

SARRAFZADEH, M. H. et al. Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 216, p. 90–97, 2015.

SUPPLY, A. R. and. **Algae Culture Nannochloropsis**. 2017.