

ALESSANDRA COLOMBO SIMÕES GOMES

**Desenvolvimento e utilização de um novo sistema submersível de imageamento e visão computacional para o estudo da dinâmica de partículas e organismos planctônicos na Enseada do Flamengo, Ubatuba (SP)**

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Mendes Lopes

São Paulo  
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO

**Desenvolvimento e utilização de um novo sistema submersível de imageamento e visão computacional para o estudo da dinâmica de partículas e organismos planctônicos na Enseada do Flamengo, Ubatuba (SP)**

ALESSANDRA COLOMBO SIMÕES GOMES

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

**VERSÃO CORRIGIDA**

Julgada em \_\_ / \_\_ / \_\_

_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito
_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito
_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO

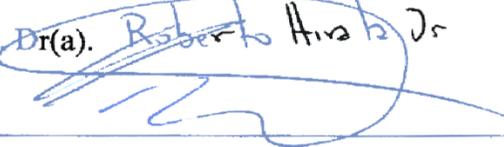
**Desenvolvimento e utilização de um novo sistema submersível de imageamento e visão computacional para o estudo da dinâmica de partículas e organismos planctônicos na Enseada do Flamengo, Ubatuba (SP)**

ALESSANDRA COLOMBO SIMÕES GOMES

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

**VERSÃO CORRIGIDA**

Julgada em 13/07/2018

		
Prof(a). Dr(a).	 Leuvenonin Fernandes	Aprovado
Prof(a). Dr(a).	 Roberto Azeiteiro Jr	Conceito Aprovado
Prof(a). Dr(a).	 Rubens C. L. Figueira	Conceito Aprovado

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Mendes Lopes pela proposta de um trabalho desafiador, que me proporcionou um grande aprendizado fazendo com que eu me aventurasse até mesmo pelo mundo da engenharia e da computação. Sou grata também por todo o seu apoio, por me ensinar a usar o Statistica, pela enorme paciência e principalmente por ter dividido comigo parte de todo o seu conhecimento.

Aos meus colegas do Laboratório de Sistemas Planctônicos, Rafa, Josi, Adrian, Yumi, Gelaysi, Damian, Cassia, Sil, Carol Leew e Lu muito obrigada por todo o apoio, incluindo o auxílio na manutenção do equipamento, pela companhia e carinho diários, pelas boas risadas, por me aguentarem até mesmo naqueles dias com um humor terrível, pelos cafezinhos e pelos cuscuzes. Sou grata à Maia por ter me ensinado tanto sobre ótica e eletrônica, me guiando no início do trabalho quando eu tinha certeza de que jamais aprenderia aquilo tudo e ao Bruno Ogata pelas palhaçadas infundáveis, pela elaboração do mapa do presente trabalho e por me lembrar sempre que ‘the zica never ends’. Eu não teria sobrevivido ao mestrado sem essa família.

Leandro Tielia de La Cruz muito, mas muito obrigada mesmo por TODA a ajuda. Obrigada por fazer os meus códigos em Matlab funcionarem, obrigada pelo auxílio com os testes da profundidade de campo, obrigada pela plotagem dos gráficos da série de dados ambientais, dos testes de tamanho e contraste e dos métodos de segmentação e pela elaboração das matrizes de confusão. Sou grata a você também pelo desenvolvimento, implementação e constante melhoria dos softwares LCR, LSDR, LPD e LLS. Por fim, agradeço principalmente por sua amizade, idéias, paciência, apoio e carinho. Você foi fundamental para a realização desse trabalho.

À nossa mãe Martinha por todo o amor, conselhos, histórias, preocupação, caronas, bolos deliciosamente incríveis e principalmente por nos salvar sempre que chegávamos desesperados com a corda no pescoço.

Cláudia Guimarães, Carolina Maciel e Yonara Garcia não tenho como expressar minha gratidão por tudo que fizeram por mim nessa etapa da jornada.

Claudinha minha psicóloga obrigada por me fazer chegar até aqui. Todo o seu imenso amor por mim (mesmo que você negue), suas palhaçadas, pentelhices, compreensão

e seus conselhos foram fundamentais que eu superasse cada um dos obstáculos impostos. Obrigada também por compartilhar o lindo do Dodô comigo tantas vezes.

Carolina Maciel sou eternamente grata por todo o carinho, pelas risadas mais deliciosas e verdadeiras que só você com as suas trapalhadas e idéias totalmente loucas e sem sentido conseguem despertar, por me ouvir com tanta atenção e paciência e pelos momentos leves e renovadores em sua companhia. Você me fez crescer não só como profissional, mas principalmente como pessoa. Admiro cada dia mais sua trajetória, perseverança, força, sabedoria, o jeito como você se preocupa e ama ao próximo e por sempre ter uma lição a acrescentar.

Yonara Garcia gostaria de dizer que o nosso casamento foi incrível. Te agradeço por me aguentar todos esses anos, por não ter me expulsado de casa com a Lilica mesmo com toda a minha bagunça, pelo seu afeto, apoio, conselhos, pela companhia no dia a dia do laboratório, nos jogos de frescoball fim da tarde, nas caminhadas noturnas a beira mar, nas faxinas e nas pedaladas. Obrigada pela alegria contagiante e por ser tão importante na minha vida, me fazendo saber que mesmo nos momentos mais difíceis posso contar com você.

Claudinha, Carol e Yo vocês três me proporcionaram os melhores momentos do meu mestrado, aqueles que vou levar para sempre nas histórias e nas memórias. As amizades assim é que dão sentido á nossa caminhada.

À Laís Escudeiro, Giovanna Figueiredo, Iole Orselli, Natália Ruiz, Juliana Gonçalves, Thiago Santos, Hanna Vale e Larissa Lamente, amigos eternos que mesmo longe estão sempre comigo.

Acima de tudo sou grata à minha família, especialmente aos meus pais Alexandre e Angélica, aos meus irmãos Junior e Felipe e às avós Dirce e Maria Lúcia pelo amor imensurável, por todos os valores, conselhos e ensinamentos, por serem meu porto seguro e minha motivação diária para seguir em frente. Obrigada por me darem a vida, por cuidarem de mim, por todo o apoio e compreensão. A vocês meu amor e gratidão eternos.

Aos meus anjinhos Bóris, Nite e Lilica pelo amor verdadeiro e pela amizade incondicional. Obrigada pela alegria contagiante, por estarem ao meu lado nos momentos de angústia e tristeza, por roncarem a tarde toda enquanto eu me descabelava tentando terminar essa dissertação e por compartilharem comigo o sentimento mais puro e sincero que só vocês sabem dar.

Gostaria por fim de agradecer a toda a equipe do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, em especial ao Edilson, Flávia e Sandrinha, pela energia maravilhosa e por sempre trazerem no rosto um sorriso cativante. Ao Júlio e ao Ricardo pelo auxílio com a parte eletrônica e empréstimo de materiais e às cozinheiras de Ubatuba, Dona Cida, Vânia e Bete por fazerem tudo com alegria e amor. Aos parceiros Lúcio Engler da empresa Scubatech, pela elaboração da estrutura mecânica do sistema, ao Nilson Frances Chetti da empresa Pulser, por toda a eletrônica do equipamento e ao Prof. Dr. Julio Cezar Adamowski por ter permitido a instalação do sistema em seu flutuante. A elaboração do presente trabalho não teria sido possível sem o financiamento do CNPq e da Petrobrás.

## **SUMÁRIO**

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. EQUIPAMENTO PARA IMAGEAMENTO IN SITU.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. CALIBRAÇÃO DO PONTO FOCAL, AUMENTO E PROFUNDIDADE DE CAMPO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3. CALIBRAÇÃO DOS SENSORES AMBIENTAIS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. SOFTWARES.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.1. AQUISIÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.2. EXTRAÇÃO DAS ROI's.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.3. CLASSIFICAÇÃO AUTOMÁTICA.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MÉTODOS UTILIZADOS NO FUNDEIO IN SITU.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. ÁREA DE ESTUDO.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. INSTRUMENTAÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3. DEFINIÇÃO DAS CONFIGURAÇÕES DOS SOFTWARES.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4. FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS.....</b>	<b>30</b>

<b>3.5. DADOS AMBIENTAIS.....</b>	<b>31</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. CONFIGURAÇÃO DOS SOFTWARES.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2. ESTUDO DE CASO – DINÂMICA DE PARTÍCULAS.....</b>	<b>53</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Exemplos de resultados obtidos com sistemas submersíveis para imageamento de partículas e organismos in situ. A- SIPPER; B- VPR; C- HAB Buoy; D- ISIIS; E- LOKI; F- UVP; G- ZOOVIS; H- IFCB; I- CPICS; J- SPC.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2: Sistemas submersíveis para imageamento de partículas e organismos in situ. A-SIPPER; B- VPR; C- HAB Buoy; D -ISIIS; E- LOKI; F- UVP; G- ZOOVIS; H- IFCB; I- CPICS; J- SPC.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 3: Exemplos de como o grupo taxonômico, a posição dos organismos e a associação entre eles podem afetar as características dos objetos, dificultando a classificação automática. A- Diatomácea em cadeia e célula sozinha; B- Larva de poliqueta vista frontal e lateral; C- Coscinodiscus com e sem Vorticella; D- Penilia em diferentes ângulos; E- Copépodo visualizado sob diferentes ângulos.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 4: Configuração do sistema ótico in-line para a técnica de sombreamento.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 5: Escalas usadas na validação do valor do aumento e definição do ponto focal.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 6: Disposição dos componentes óticos nos experimentos para posicionamento do ponto focal equidistante aos visores.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 7: Disposição dos componentes óticos do equipamento de imageamento com aumento de 0.814 X.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 8: Estrutura mecânica do equipamento de aquisição de imagens.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 9: Teste de estanqueidade da estrutura mecânica do equipamento de imageamento. ....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 10: Acima, representação do sistema eletrônico que controla o instrumento de filmagem e os sensores ambientais. Abaixo, foto do compartimento contendo os componentes eletrônicos.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 11: Teste final do sistema completo composto pela parte óptica, eletrônica e mecânica, realizado em laboratório, com duração de 35 horas.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 12: Escalas usadas na definição do ponto focal.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 13: Targets usados para demonstrar que objetos grandes são detectáveis ao longo de todo o caminho ótico do sistema. A e C- Imagens próximas ao visor do tubo</b>	

contendo a câmera. B e D-Imagem obtida com a escala encostada no visor do tubo contendo o LED.....	17
Figura 14: Escala de 75 $\mu\text{m}$ na primeira linha, de 100 $\mu\text{m}$ na segunda linha e de 250 $\mu\text{m}$ na terceira linha. As imagens A,D e G estão no limite da profundidade de campo próximo ao tubo da câmera, as imagens C, F e I estão no limite oposto do DOF e a B, E e H estão no ponto focal do Sistema.....	18
Figura 15: Calibração do sensor Cyclops-7 para obtenção da equação de correção da Clorofila.....	20
Figura 16: Diferentes concentrações de clorofila-a medidas em volts pelo sensor Cyclops-7 e em $\mu\text{g L}^{-1}$ por um fluorímetro. Os pontos azuis são a média de 5 valores e as barras representam o desvio padrão.....	21
Figura 17: Interface do software de aquisição de imagens LAPS Camera Recorder (LCR) .....	22
Figura 18: Interface gráfica do LAPS Plankton Detector (LPD), software para extração das Regiões de Interesse (ROI's) .....	23
Figura 19: Layout do software LAPS Learning Set (LLS), utilizado para segmentação das vinhetas e classificação automática dos organismos.....	24
Figura 20: Localização do ponto de fundeio do sistema de imageamento na Enseada do Flamengo no município de Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo.....	27
Figura 21: Equipamento de imagem com sensores acoplados, fixados em uma gaiola presa à plataforma flutuante. Ao fundo se vê o armário sobre o flutuante, onde foram instalados o computador e o controlador eletrônico do sistema, mostrados na Figura 22.....	28
Figura 22: Componentes eletrônicos e computador que controlam os sensores ambientais e o sistema de imageamento. A-Monitor de 11 polegadas; B – HD externo de 5TB; C- Computador NISE 3600E; D – Eletrônica composta por um Arduino, 4 relés e um regulador de tensão LM2596, responsáveis por ligar e desligar os sensores ambientais, o LED e a câmera.....	29
Figura 23: Resultados dos testes com o software LPD. Agrupamento de organismos por classe (focados e desfocados) para diferentes valores de contraste e tamanho.....	34

<b>Figura 24: Exemplo de organismos classificados manualmente como focados e desfocados.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 25: Resultado dos testes de tamanho e contraste utilizando o LPD, concentração de todas as partículas presentes nos 8 vídeos.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 26: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS à classe Appendicularia.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 27: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS à classe Ceratium.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 28: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação ao grupo Cnidaria.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 29: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS à classe Copepodo.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 30: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis do LLS à classe Diatomáceas.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 31: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS à classe Penilia.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 32: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS ao grupo Tontonia.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 33: Número total de partículas detectadas em cada método de segmentação disponível no LLS, baseado em um experimento de segmentação de um projeto reunindo 8 vídeos classificados manualmente.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 34: Medidas do eixo maior das partículas da classe Ceratium para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV - Mode Value; Ot - Otsu; Tr - Triangle e Wt - Watershed.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 35: Medidas do eixo maior das partículas da classe Cnidaria para para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr - Triangle e Wt - Watershed.....</b>	<b>46</b>

- Figura 36: Medidas do eixo maior das partículas da classe Nauplio e Copepoda para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.....47**
- Figura 37: Medidas do eixo maior das partículas da classe Coscinodiscus para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.....47**
- Figura 38: Medidas do eixo maior das partículas da classe Diatomácea Penada para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.....48**
- Figura 39: Medidas do eixo maior das partículas da classe Penilia para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.49**
- Figura 40: Medidas do eixo maior das partículas da classe Tontonia para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.....50**
- Figura 41: Medidas do eixo maior das partículas da classe Detrito para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.....50**
- Figura 42: Matriz resultante da validação cruzada da biblioteca selecionada para ser usada no estudo de caso com acurácia global de 86,8%.....53**

<b>Figura 43: Amostra de imagens obtidas pelo sistema de imageamento in situ.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 44: Exemplo de resultado fornecido pelo LPD. Imagem do frame original e das vinhetas extraídas a partir dele.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 45: Exemplo de como o Background remove ruídos estáticos no processo de extração de ROI's pelo LPD. As figuras superiores representam exemplos de frames originais e as inferiores seus respectivos backgrounds.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 46: Matriz de confusão comparando os resultados da classificação manual aos da automática, aplicada a um projeto contendo os oito vídeos utilizados nos testes do LPD e LLS.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 47: Série temporal de todos os dados, ambientais e de partículas, adquiridos ao longo do período de implementação do equipamento, entre 20 de fevereiro e 7 de maio. As áreas cinzas indicam os períodos no qual o instrumento foi levado para o laboratório para manutenção ou limpeza, as áreas em lilás demarcam possíveis correlações entre os parâmetros e as linhas vermelhas representam os dias nos quais o sistema foi limpo. .....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 48: Dados ambientais e de partículas, sem outliers, no período entre 5 de abril e 7 de maio, utilizados na análise estatística.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 49: Periodograma representando a frequência das densidades espectrais da abundância total de partículas e da abundância de partículas do range 1, evidenciando ciclos de horas a dias.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 50: Periodograma da abundância total de partículas dos ranges 2 e 3.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 51: Gráfico de frequências e densidade espectral dos dados de temperatura do ar e umidade.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 52: Gráfico de frequências da pressão atmosférica e velocidade do vento.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 53: Periodograma da radiação solar e nível do mar.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 54: Gráfico de frequências e densidade espectral da precipitação e temperatura da água.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 55: Periodograma representando as frequências e densidades espectrais da ficoeritrina e CDOM.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 56: Periodograma representando as frequências e densidades espectrais da salinidade de clorofila-a.....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1: Comparação das especificações de diferentes sistemas ópticos para imageamento in situ.....</b>	<b>5</b>
<b>Tabela 2: Distâncias dos componentes ópticos nos dois sistemas testados, um com lente de 60 mm de comprimento focal e outro com lentes de 100 mm, para os aumentos de 1, 0,75, 0,6 e 0,5 X.....</b>	<b>12</b>
<b>Tabela 3: Resultados da calibração da profundidade de campo do equipamento.....</b>	<b>18</b>
<b>Tabela 4: Especificações dos sensores ambientais Cyclops-7.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 5: Dados resultantes da calibração do sensor de clorofila. A tabela apresenta diferentes concentrações de clorofila-a medidas pelo sensor Cyclops-7, em Volts, e por um fluorímetro, em <math>\mu\text{g L}^{-1}</math>.....</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 6: Parâmetros de cada vinheta, extraídos pelo LLS.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 7: Classes dos modelos com 15, 12 e 9 categorias, aplicados no teste para definição da base de treinamento a ser usada no LLS.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 8: Valores da acurácia de cada modelo de biblioteca testado, obtidos por validação cruzada. As bordas pretas do quadrado demarcam os maiores valores entre bibliotecas com o mesmo número de classes. Os números com dois traços em volta são os maiores valores de acurácia quando comparando bibliotecas com o mesmo número de organismos em cada classe. O número em negrito se refere á maior acurácia dentre todas as opções estudadas.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 9: Representação das Densidades Espectrais distribuídas por Frequência em cada variável.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 10: Valores de coerência quadrada entre as variáveis com período mais significativo da ordem de 4 dias a uma semana (frequência de 0,004 a 0,007).....</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 11: Valores de coerência quadrada no range de frequência entre 0,027 e 0,031 para as variáveis com período significativo na ordem de 1 dia.....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	gua Costeira
AT	gua Tropical
ACAS	gua Central do Atlântico Sul
AUV	Autonomous Underwater Vehicle
CCD	Charge Coupled Device
CDOM	Matéria orgânica cromofórica dissolvida
CPICS	Continuous Particle Imaging and Classification System
DICANN	Dinoflagellate categorisation by artificial neural Network
DOF	Profundidade de campo
eHoloCam	Eletronic Holographic Camera
Fps	Frames por segundo
HAB Buoy	Harmful Algal Bloom Buoy
IFCB	Imaging FlowCytobot
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
ISIIS	In Situ Ichthyoplankton Imaging System
LAPS	Laboratório de Sistemas Planctônicos
LBP	Local Binary Patterns
LCR	Laps Camera Recorder
LED	Light Emitting Diode
LISST	Laser In situ Scattering and Transmissometry
LLS	Laps Learning Set
LOKI	Lightframe On-Sight Keyspecies Investigation
LOPC	Laser Optical Plankton Counter
LPD	Laps Plankton Detector
LSDR	Laps Serial Data Reader
MAPPER	Marine Aggregated Particle Profiling and Enumerating Rover
MVCO	Martha's Vineyard Coastal Observatory
OPC	Optical Plankton Counter
RF	Random Forest

ROI	Regiões de Interesse
ROV	Remotely Operated Vehicle
SIPI	Submersible Instrument for Plankton Imaging
SIPPER	Shadowed Image Particle Profiling and Evaluation Recorder
SPC	Scripps Plankton Camera System
SVM	Support Vector Machine
TOAST	Texas Observatory for Algal Succession Time-Series
UVP	Underwater Vision Profiler
VPR	Video Plankton Recorder
ZOOVIS	Zooplankton Visualization and Imaging System

## RESUMO

GOMES, A. C. S. **Desenvolvimento e utilização de um novo sistema submersível de imageamento e visão computacional para o estudo da dinâmica de partículas e organismos planctônicos na Enseada do Flamengo, Ubatuba (SP)**. 2018. 87f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho foi desenvolvida uma instrumentação óptica in-line para filmagem de partículas *in situ*, utilizando a técnica de sombreamento, acompanhada de softwares para processamento das imagens. As novas ferramentas foram implementadas e foi conduzido um estudo de caso para a avaliação da dinâmica de partículas e suas forçantes ambientais em uma região costeira de Ubatuba. O sistema com 4 sensores acoplados, adquiriu dados oceanográficos e de imagens a cada 40 minutos, no período entre 20 de fevereiro e 7 de junho de 2017. Dados meteorológicos adicionais foram obtidos para análises correlativas. Testes com os softwares de visão computacional estabeleceram o uso dos filtros de tamanho entre 500 e 16300 pixels e contraste maior que 50% para segmentação das Regiões de Interesse (ROIs). Os testes também indicaram a melhor performance do algoritmo de segmentação Mode Value e de uma base de treinamento composta por 9 classes com 300 organismos cada para a classificação automática. Devido à baixa acurácia obtida na etapa de classificação automática de imagens desconhecidas de organismos (27%), os objetos foram analisados nesse estudo como partículas, divididos de acordo com o tamanho de seu eixo maior em três ranges (<385  $\mu\text{m}$ ; 385-620  $\mu\text{m}$ ; >620 $\mu\text{m}$ ). A análise das partículas, por questões estatísticas, considerou o maior intervalo de amostragens contínuas da série, de 5 de abril a 7 de maio de 2017. Primeiramente a série de cada variável foi decomposta em componentes harmônicas, com base na análise de Fourier, visando detectar padrões recorrentes e, em seguida, as variáveis com picos de densidade espectral mais expressivos em frequências da ordem de uma semana e de um dia foram comparadas por meio da coerência quadrada. As partículas menores, do range 1, foram as que melhor representaram a abundância total e os maiores valores de coerência foram entre as variáveis com período característico de um dia. A instrumentação implementada e testada ao longo de cerca de 3 meses possibilitou a aquisição de imagens de qualidade e de resultados iniciais úteis para o aprimoramento do sistema, visando instalações futuras de longo prazo em ambientes costeiros. **Palavras chave: Sistemas óptico; Partículas; Plâncton; Classificação automática; Ubatuba.**

**ABSTRACT**

GOMES, A. C. S. **Development and implementation of a new submersible imaging system and computer vision tools for a study on particle and plankton dynamics in the Flamengo bay, Ubatuba (SP)**. 2018. 87f. Dissertation (Master) – Oceanographic Institute of University of São Paulo, São Paulo.

In this work, in-line optical instrumentation was developed for in situ particle filming, using the shadowgraphic technique, accompanied by image processing software. The new tools were implemented and a case study was carried out to evaluate the dynamics of particles and their environmental forcing in a coastal region of Ubatuba. The system, with 4 coupled environmental sensors, acquired oceanographic and image data every 40 minutes, between February 20 and June 7, 2017. Additional meteorological data were obtained for correlative analyzes. Tests with the implemented computer vision software have established the use of size filters between 500 and 16300 pixels and contrast level greater than 50% for the segmentation of Regions of Interest (ROIs). The test also indicated the best performance of the Mode Value segmentation algorithm and of a training set composed by 9 classes with 300 organisms each for automatic classification. Due to the low global accuracy obtained in the automatic classification stage of unknown images of organisms (27%), the objects were analyzed in this study as particle, divided according to the size of their major axis in three ranges ( $<385 \mu\text{m}$ ;  $385 - 620 \mu\text{m}$ ;  $>620\mu\text{m}$ ). Particle analysis, for statistical reasons, considered the largest continuous sampling range of the series, from April 5 to May 7, 2017. First, the series of each variables decomposed into harmonic components, based on Fourier analysis, aiming to detect recurrent patterns, and then the variables with more expressive spectral density peaks at frequencies of the order of one week and one day were compared by means of square coherence. The smaller particles of range 1 were the ones that best represented the total abundance, and the highest values of coherence were among the variables with characteristic period of one day. The instrumentation implemented and tested over about 3 months allowed the acquisition of high-quality images and the initial results were useful for improving the system, aiming at future long-term deployments in coastal environments. **Keywords: Optical System; Imaging; Plankton; Particles; Automatic Classification; Ubatuba.**

## 1. INTRODUÇÃO

O plâncton possui um papel central no funcionamento dos ecossistemas aquáticos, por uma série de razões. Seus componentes são o principal alimento para larvas de peixes e para certas espécies de peixes adultos (JACOBSEN, S. ET AL., 2018), impactando estoques pesqueiros, inclusive de importância comercial. Participam diretamente do ciclo de diversos elementos químicos em nível global, integrando o processo conhecido como bomba biológica, no qual o fitoplâncton intermedia o fluxo do carbono entre a atmosfera e os oceanos e o zooplâncton contribui tanto para a retenção quanto para o transporte dos elementos em direção às águas profundas. Além disto, o fitoplâncton inclui espécies tóxicas, que podem ter impacto sobre a pesca, a aquicultura e a saúde humana (BENFIELD, M. C. ET AL., 2007), entre outros fatores. O plâncton tem sido amplamente utilizado no diagnóstico e monitoramento ambiental, pois fornece informações sobre a saúde dos oceanos por meio de rápidas variações em sua ocorrência, abundância e tamanho, resultantes de alterações físicas e químicas na água (PICHERAL, M. ET AL., 2010).

A atividade metabólica do plâncton tem grande influência sobre a formação e a degradação da matéria orgânica e inorgânica particulada no ambiente aquático, tanto por meio da geração recorrente de novos indivíduos, que descartam diversos tipos de partículas como pelotas fecais, mudas e material mucoso contendo partículas aderidas, como a partir de sua morte, com a consequente produção de carcaças ou células em degradação. No ambiente oceânico, as partículas de origem biogênica são as principais contribuintes para a formação do reservatório total de matéria particulada, porém em ambientes costeiros rasos há uma importante influência do material de origem litogênica, associado aos fundos marinhos. Este material frequentemente é ressuspensionado em direção à coluna de água devido à ação dos ventos e correntes marinhas e se mistura às partículas biogênicas em suspensão e aos próprios organismos planctônicos, formando o chamado seston.

A composição e as características morfométricas do seston influenciam vários processos marinhos (OLSON, R. J.; SHALAPYONOK, A. AND SOSIK, H.M., 2003). Por exemplo, as partículas em suspensão alteram o percentual de penetração de luz na coluna de água, interferindo na distribuição dos organismos e, conseqüentemente, no consumo ou disponibilização de nutrientes inorgânicos e na produção de material particulado (PICHERAL, M. ET AL., 2010). Como consequência, a dinâmica do seston afeta o transporte

de carbono, nitrogênio e outros elementos para as camadas mais profundas, afetando os ciclos biogeoquímicos. Portanto, é importante entender a dinâmica do plâncton e das partículas em suspensão no ecossistema marinho, assim como das covariáveis ambientais que afetam sua distribuição (ASHJIAN, C. J. ET AL., 2001; SAMSON, S. ET AL., 2001 e SCHULZ, J. ET AL., 2010).

O estudo de organismos planctônicos e partículas nos oceanos se iniciou há mais de um século e desde então se baseia principalmente em métodos convencionais de amostragem, utilizando redes de arrasto, bombas de sucção e garrafas (SCHULZ, J. ET AL., 2010). Embora tenham ampliado o conhecimento para além das camadas superficiais, incluindo a amostragem estratificada, o uso de tais ferramentas, mesmo sendo aprimoradas, não permite a obtenção de dados em escalas espaciais e temporais refinadas, como necessário nesses tipos de estudo, uma vez que a dinâmica dos organismos planctônicos e a distribuição das partículas é complexa, com tais elementos ocorrendo em manchas nos oceanos e variando sua concentração desde poucos milímetros até dezenas de quilômetros e em diferentes escalas de tempo, de segundos a meses ou anos. Outro ponto é o fato de que a turbulência gerada pelos instrumentos tradicionais no momento da amostragem e a posterior fixação das amostras em formol ou álcool, que são os principais reagentes utilizados, podem deteriorar espécimes frágeis, como os pertencentes ao plâncton gelatinoso (MALKIEL, E. ET AL., 2006). A análise do material biológico após a coleta também pode ser considerada um complicador, por se tratar de uma tarefa intensa, a qual compreende subamostrar, contar, classificar e medir os organismos, requerendo um grande investimento de tempo de um especialista, elevando o custo do estudo e acarretando em um intervalo muito grande entre a coleta e a obtenção do resultado (BENFIELD, M. C. ET AL., 2007). Além disto, tem sido demonstrado que mesmo sob a responsabilidade de um especialista, os resultados obtidos podem estar sujeitos a erros derivados do observador (CULVERHOUSE, P.F. ET AL., 2003).

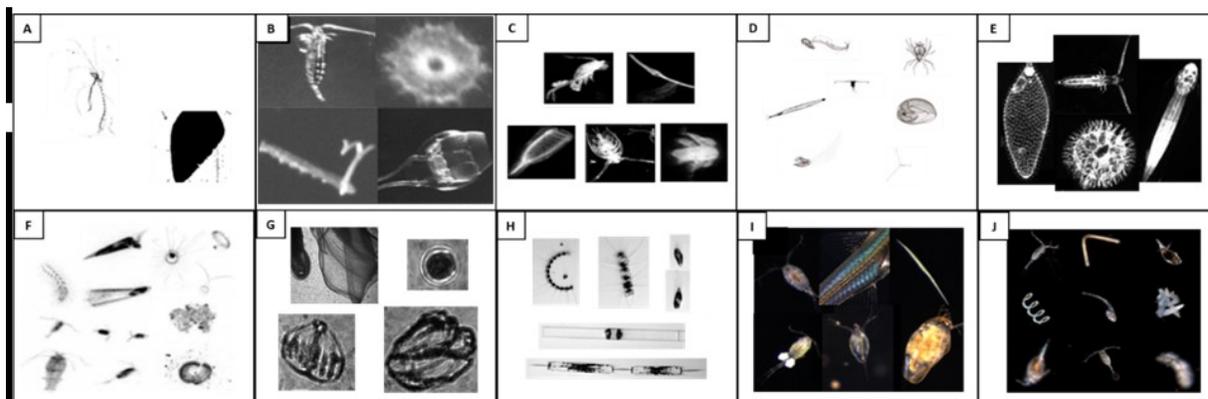
A busca da comunidade científica por transpor as limitações dos métodos tradicionais, aliada à disponibilidade de câmeras compactas e à modernização dos componentes eletrônicos, tem levado ao surgimento de uma nova era na oceanografia biológica, na qual passou-se a utilizar técnicas de captura de imagens e computação avançada para fazer registro das amostras tanto em laboratório, como ocorre em equipamentos

comerciais como a FlowCAM (SIERACKI, C. K; SIERACKI, M. E. AND YENTSCH, C. S., 1998) e o ZOOSCAN (GROSJEAN, P. ET AL., 2004), quanto *in situ*, reduzindo o tempo de obtenção dos resultados em comparação aos métodos tradicionais.

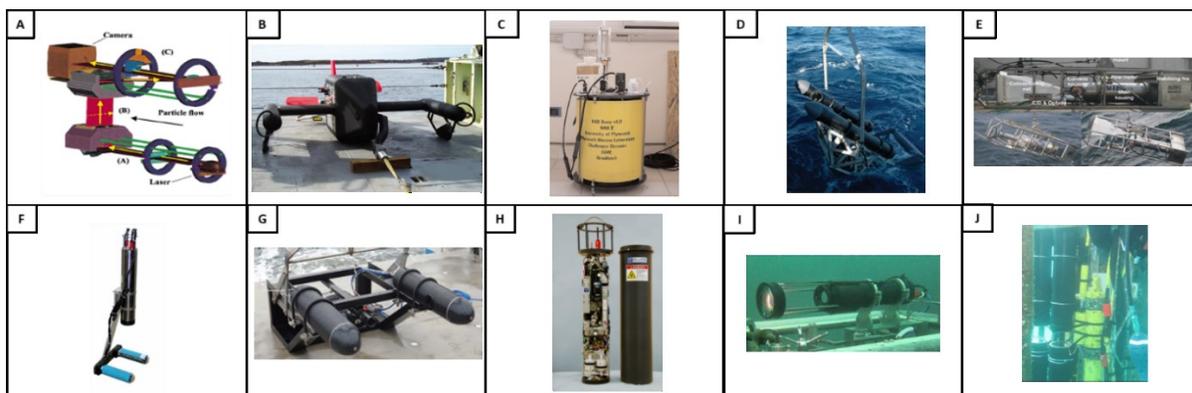
Um dos precursores dos sistemas de imageamento *in situ* para observação do plâncton nos oceanos foram ORTNER, P. B; HILL, L. C & EDGERTON, H. E., (1981) que criaram uma extensão da fotografia de silhueta inicialmente utilizada em laboratório. Em relação à observação de partículas e agregados *in situ* HONJO, ET AL. (1984) é apontado como um dos estudos pioneiros.

Atualmente existem duas linhas de sistemas de imageamento *in situ*, a primeira que quantifica e mede as partículas e organismos, permitindo distinguir partículas, agregados e, indiretamente, organismos, incluindo os seguintes instrumentos: Laser In situ Scattering and Transmissometry (LISST) (KARP-BOSS, L.; AZEVEDO, L. E BOSS, E., 2007) ; Marine Aggregated Particle Profiling and Enumerating Rover (MAPPER) (COSTELLO, D. K.; CARDER, K. L. AND STEWARD, R. G., 1991), Optical Plankton Counter (OPC) (HERMAN, A. W., 1992), e Laser Optical Plankton Counter (LOPC) (HERMAN, A.W.; BEANLANDS, B. AND PHILLIPS, F., 2004). O segundo grupo, além dos parâmetros mencionados, fornece também imagens em alta resolução (Figura 1), permitindo a classificação taxonômica mais detalhada, até nível específico em determinados casos. Se enquadram nessa categoria os seguintes equipamentos: Video Plankton Recorder (VPR) (DAVIS, C. S. ET AL., 1992) (DAVIS, C. S. ET AL., 2004), o primeiro instrumento a amostrar, contar e identificar automaticamente fito e zooplâncton *in situ*, obtendo dados de abundância e distribuição em tempo real (BENFIELD, M. C. ET AL., 2007); Harmful Algal Bloom Buoy (HAB Buoy) (CULVERHOUSE, P.F. ET AL., 2006); Shadowed Image Particle Profiling and Evaluation Recorder (SIPPER) (SAMSON, S. ET AL., 1999) (SAMSON, S. ET AL., 2001); Zooplankton Visualization and Imaging System (ZOOVIS) (SURYA, T. S., 2004) (BI, H. ET AL., 2012); Imaging FlowCytobot (IFCB) (OLSON, R. J. AND SOSIK, H. M., 2007); In Situ Ichthyoplankton Imaging System (ISIIS) (COWEN, R. K AND GUIGAND, C. M., 2008); Lightframe On-Sight Keyspecies Investigation (LOKI) (SCHULZ, J. ET AL., 2009) (SCHULZ, J. ET AL., 2010); Underwater Vision Profiler (UVP) (PICHERAL, M. ET AL., 2010); Continuous Particle Imaging and Classification System

(CPICS) (Coastal Ocean Vision Inc.) e Scripps Plankton Camera System (SPC) (ROBERTS, P. L. D. ET AL., 2014) (Figura 2).



**Figura 1: Exemplos de resultados obtidos com sistemas submersíveis para imageamento de partículas e organismos in situ. A- SIPPER; B- VPR; C- HAB Buoy; D- ISIIS; E- LOKI; F- UVP; G- ZOOVIS; H- IFCB; I- CPICS; J- SPC.**



**Figura 2: Sistemas submersíveis para imageamento de partículas e organismos in situ. A- SIPPER; B- VPR; C- HAB Buoy; D- ISIIS; E- LOKI; F- UVP; G- ZOOVIS; H-IFCB; I- CPICS; J- SPC.**

Uma abordagem alternativa para imageamento de plâncton e partículas *in situ* surgiu no fim da década de 1960 (KATZ, J. ET AL., 1999), com equipamentos que utilizam a holografia (OSTEN, W., 2018), uma técnica na qual as imagens são adquiridas sem lente focalizadora e posteriormente reconstruídas por técnicas computacionais avançadas. A holografia tem a vantagem de reduzir drasticamente a limitação da profundidade de campo<sup>1</sup>(DOF), presente nos demais sistemas de imageamento. No entanto, como a técnica depende de um feixe de luz coerente, há a necessidade de utilizar um feixe de laser colimado, um grande desafio tratando-se de estudos em um ambiente dinâmico como os oceanos

<sup>1</sup> Profundidade de Campo (DOF) é um intervalo de distâncias, nas proximidades do plano focal, dentro do qual os objetos imageados são considerados nítidos.

(SAMSON, S. ET AL., 2001). Um outro ponto relevante é a necessidade de uma etapa adicional de processamento computacional avançado, para a reconstrução dos hologramas. Alguns exemplos da aplicação de sistemas holográficos *in situ* são o trabalho de CARDER, K.L.; STEWARD, R.G. and BRETZER, P.R. (1982), de DUBELAAR, G.B.J. ET AL. (1999), as Holocameras de KATZ, J. ET AL. (1999) e MALKIEL, E. ET AL. (2006), a Eletronic Holographic Camera (eHoloCam) (SUN, H. ET AL., 2007) e o sistema LISST-HOLO (Sequoia Scientific Inc.). Uma revisão completa dos métodos de imageamento *in situ* é apresentada por WIEBE, P. H. AND BENFIELD, M. C. (2003) e por BENFIELD, M. C. ET AL. (2007).

A estrutura interna dos diversos equipamentos para imagens *in situ* consiste basicamente em uma fonte de luz, um conjunto de componentes ópticos e uma câmera, mas existe uma vasta gama de componentes passíveis de serem implementados (Tabela 1). A iluminação do instrumento pode ser feita por LED ou laser, de comprimentos de onda variados, o que interfere na atração ou não dos organismos e na aquisição de imagens mono ou policromáticas. Os componentes ópticos definem a qualidade da imagem, a magnificação dos objetos e a profundidade de campo do sistema. O tipo de câmera determina a área a ser imageada, a taxa de aquisição dos quadros e a resolução das imagens.

**Tabela 1: Comparação das especificações de diferentes sistemas ópticos para imageamento *in situ*.**

EQUIPAMENTO	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
UVP 5	Perfilagem	PICHERALL, M. ET AL., 2010
LOKI	Fundeado ou perfilagem	SCHULZ, J. ET AL., 2009
VPR	Fundeado ou perfilagem	DAVIS, C. S. ET AL., 2004
SIPPER	Perfilagem	SAMSON, S. ET AL., 2001
ISIIS	Perfilagem	COWEN, R. K and GUIGAND, C. M., 2008
ZOOVIS	Perfilagem	BI, ET. AL, 2012 and SURYA, 2004
SPC	Fundeado ou perfilagem	ROBERTS, P. L. D. ET AL., 2014
HAB Buoy	Fundeado com cabo	CULVERHOUSE, P.F. ET AL., 2006
CPICS	Fundeado com cabo ou perfilagem	Coastal Ocean Vision Inc.
IFCB	Fundeado	OLSON, R.J. and SOSIK H. M., 2007

EQUIPAMENTO	PROFUNDIDADE MÁXIMA (m)	ILUMINAÇÃO	CÂMERA	RESOLUÇÃO DA CÂMERA (Mp)	TAXA DE AQUISIÇÃO (FPS)	VOLUME IMAGEADO	AUTONOMIA	TAMANHO MÍNIMO E
						POR FRAME	DA BATERIA	MÁXIMO CAPAZ DE CAPTURAR
UVP 5	3000	LED vermelho (625 nm)	Sony XCI SX1	1,3	6	1.02 L	>840 minutos	100 µm - 2,66 mm
LOKI	500	LED	Prosilica GC1380	1,4	>15	-	-	<100 µm
VPR VII	1000	Luz xenon (>600 nm)	Pulnix 1040	1	60	Aprox. 7.2 ml (low magnification)	Cabeado	100 µm - 1 cm
SIPPER	500	Laser vermelho (635 nm)	EG&G LD2040 e LD2020	Line Scan	15000 lines e 7500	33 ml / hora (a 1m.s <sup>-1</sup> )	>180 minutos	200 µm - Alguns cm
ISIIS	-	LED azul (455 nm)	DALSA P2-22-02k40	Line Scan	-	-	78 minutos	Alguns mm - > 10 cm
ZOOVIS	250	LED vermelho (625nm)	Dalsa 1M28-SA	5	15	240 ml	-	>20 µm
SPC	-	LED branco	Sony ICX814	9	8 fps	0.2 ml	Cabeado	0.05 mm - 1mm
HAB Buoy	10	Luz próxima ao IR	-	-	-	0.1 ml /seg	Cabeado	20 µm - > 1mm
CPICS	10000	LED branco	-	6	> 10 fps	0,3 ml	Cabeado	-
IFCB	40 m	Laser (635 nm)	UniqVision UP-1800DS-CL	1.4	8 fps	0,0005 ml	> 2 months	10 - 150 µm

Inicialmente os equipamentos para imagens de partículas e plâncton *in situ* eram posicionados no final de redes de arrasto, como no trabalho de ORTNER, P. B; HILL, L. C AND EDGERTON, H. E. (1981) ou acopladas a armadilhas de sedimento (ASPER, 1987). Atualmente existem sistemas fixos em píeres e fundeios, cabeados ou não, ou utilizados para perfilagem, podendo ser cabeados ou autônomos, inclusive acoplados a AUVs e ROVs. Embora existam no momento poucos sistemas fixos, como o CPICS, SPC e o IFCB (HARRED, L. B. AND CAMPBELL, L., 2014), sendo que somente o último possui dados publicados e apenas para fitoplâncton, esse tipo de aplicação é a única que permite a aquisição de uma longa série de imagens em alta resolução temporal. Os sistemas para perfilagem permitem amostrar em alta resolução espaço-temporal, mas esbarram na limitação logística de executar longas séries temporais em campanhas oceanográficas. No caso dos sistemas autônomos acoplados a veículos movidos à propulsão, a aquisição de imagens por grandes distâncias ou longos intervalos de tempo é limitada pela disponibilidade de energia e de espaço para armazenamento dos dados.

Os sistemas de imageamento *in situ*, como mencionado anteriormente, apresentam inúmeras vantagens em relação aos métodos tradicionais, no entanto muitos desafios ainda se opõem face à ampla utilização dessa técnica. O tamanho do CCD ou CMOS das câmeras atualmente disponíveis, em conjunto com limitações relativas a resolução do sistema óptico, levam à obtenção de um volume imageado muito menor que o amostrado pelas redes (BENFIELD, M. C. ET AL., 2007), o que pode resultar na subamostragem dos organismos, especialmente de grupos raros (DAVIS, C. S. ET AL., 2004). Mesmo nos sistemas capazes de amostrar dezenas de litros por segundo (GUIDI, L. ET AL., 2008) o volume é uma ordem de grandeza menor quando comparado aos 750 L filtrados por segundo por uma rede com abertura de 1 m<sup>2</sup> (COWEN, R. K AND GUIGAND, C. M., 2008). A limitação do volume amostrado é intensificada pela pequena profundidade de campo de muitos sistemas de imagem, que implica em um elevado número de organismos desfocados, dificultando a classificação taxonômica. Outra possível fonte de erro é a atração dos organismos pela luz emitida pela instrumentação, o que pode prejudicar os estudos quantitativos (SAMSON, S. ET AL., 2001). Erros podem provir também de imagens repetidas de um mesmo organismo, um problema comum com câmeras de alta frequência. Além das limitações no momento da aquisição, múltiplos desafios também estão presentes nas etapas de transferência e

armazenamento do grande volume de dados obtidos e no posterior processamento das imagens, tendo esse último se mostrado o maior desafio da atualidade para o estudo de plâncton e partículas por imageamento *in situ* (CULVERHOUSE, 2006b).

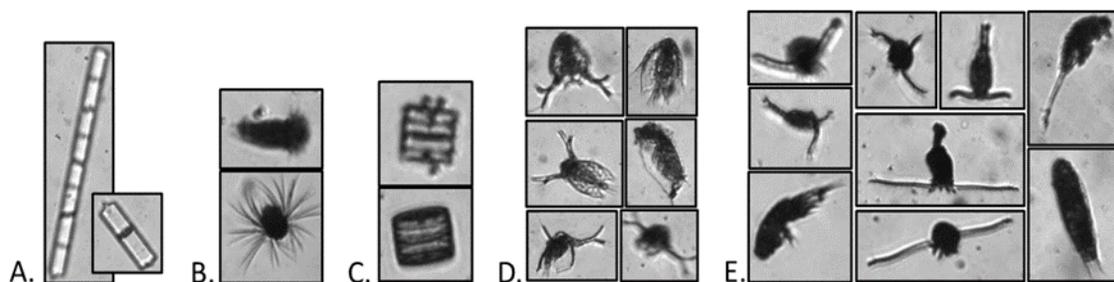
A criação e implementação de ferramentas computacionais para o reconhecimento e classificação automática de imagens surgiu na década de 1980 e atualmente é imperativa à vasta implementação dos sistemas submersíveis de imageamento do plâncton e partículas, devido ao enorme volume de dados gerados (SAMSON, S. ET AL., 2001), o que inviabiliza a análise manual.

A escassez de programas que fornecessem resultados de classificação automática de imagens de plâncton com alta acurácia, aliada à urgência em analisar os dados acumulados, motivou os grupos de desenvolvimento de instrumentos a investir em novas ferramentas de visão computacional. Os desenvolvedores do VPR criaram o Visual Plankton, escrito em Matlab (DAVIS, ET AL., 2005); o grupo do SIPPER criou uma ferramenta, utilizando o Support Vector Machine (SVM), que realiza a classificação de apenas uma classe de objetos (LUO, T. ET AL., 2005); o laboratório responsável pelo ZOOSCAN criou os softwares ZooProcess e Plankton Identifier para a classificação automática; o grupo do HAB Buoy fez o DICANN (Dinoflagellate categorisation by artificial neural Network ) (CULVERHOUSE, P.F., 2001) para classificar dinoflagelados; os desenvolvedores do IFCB usaram o software descrito por (SOSIK, H. M. AND OLSON, R. J., 2007) baseado em SVM para fitoplâncton; e os pesquisadores do UVP elaboraram o Ecotaxa (<http://ecotaxa.obs-vlfr.fr/>), que faz a classificação automática e permite a construção de um volumoso banco de dados. No entanto, essas ferramentas computacionais não são compatíveis com imagens provenientes de outros equipamentos ou, no mínimo, requerem pré-processamento, tornando sua aplicação limitada (CULVERHOUSE, P.F. ET AL., 2006).

A análise automática das imagens consiste basicamente em 3 etapas: i. detecção e extração das Regiões de Interesse (ROI's); ii. extração dos descritores; iii. classificação automática (BI, H. ET AL., 2015). Extrair as regiões de interesse consiste em executar uma varredura de um quadro de uma sequência de imagens, identificar regiões que diferem do fundo (background) e que, portanto, têm potencial de ser uma partícula ou organismo, recortá-las e salvá-las em disco, como vinhetas. Os descritores, obtidos a partir dos objetos contidos em cada vinheta, podem incluir características de textura ou parâmetros de forma,

como área, perímetro, eixo maior, eixo menor, entre outros (DAVIS, C. S. ET AL., 2004) (CULVERHOUSE, P.F. ET AL., 2006). A etapa da classificação automática utiliza ferramentas de visão computacional para, a partir dos parâmetros obtidos, identificar e classificar os objetos. Essa etapa requer uma biblioteca de treinamento, que consiste em um grande volume de objetos validados e classificados manualmente, que servirão como referência para o aprendizado de máquina (BENFIELD, M. C. ET AL., 2007).

Existem atualmente diversos algoritmos para a classificação automática, entre eles Support Vector Machine (SVM) (CORTES, C. AND VAPNIK, V., 1995), Random Forest (RF) (BREIMAN, L., 2001) e Deep Learning, sendo este último mais recente, baseado em inteligência artificial. A classificação automática de imagens por meio de inteligência artificial é desafiadora sob qualquer contexto, porém a enorme diversidade de formas e dimensões de organismos planctônicos e partículas imageadas no ambiente marinho torna esta tarefa ainda mais difícil. Outros complicadores são (i) a vasta gama de grupos taxonômicos planctônicos existentes, (ii) a orientação ou posição dos organismos no momento da captura da imagem, que podem gerar representações interpretadas como objetos distintos, (iii) a existência de associações entre os organismos e destes com outras partículas, que também modificam as características dos objetos (Figura 3) e (iv) a heterogeneidade do ambiente marinho, que inclui, entre outros aspectos, variações na abundância de partículas, turbulência e intensidade de luz (BENFIELD, M. C. ET AL., 2007).



**Figura 3: Exemplos de como o grupo taxonômico, a posição dos organismos e a associação entre eles podem afetar as características dos objetos, dificultando a classificação automática. A- Diatomácea em cadeia e célula sozinha; B- Larva de poliqueta vista frontal e lateral; C- Coscinodiscus com e sem Vorticella; D- Penilia em diferentes ângulos; E- Copépodo visualizado sob diferentes ângulos.**

O processamento computacional de imagens adquiridas *in situ* necessita uma volumosa base para treinamento inicial, montada por especialistas. No entanto, uma vez criada esta biblioteca, ela poderá ser usada em diversos projetos para a mesma bioregião,

permitindo a análise em tempo real de um volume massivo de dados, acelerando a obtenção dos resultados. Técnicas de transferência de aprendizado de máquina (transfer learning) estão em desenvolvimento (RODRIGUES, F. C. M. ET AL., 2018) para contornar a questão das especificidades geográficas ou aquelas derivadas da aquisição de imagens por sistemas ópticos diferentes.

Conforme visto, o uso do imageamento *in situ*, aliado a ferramentas computacionais, ainda envolve diversas dificuldades e limitações, mas está sendo aplicado amplamente e desponta como a tecnologia do futuro da oceanografia biológica para o estudo da dinâmica de partículas e organismos planctônicos.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo euleriano da dinâmica de partículas *in situ* e de sua correlação com forçantes oceanográficas, biológicas e meteorológica da região costeira da Enseada do Flamengo em Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo, a partir de medidas ambientais e da aquisição e processamento de imagens com uma nova tecnologia de filmagem e programas computacionais utilizando técnicas de aprendizado de máquina.

Os objetivos específicos incluíram:

- Desenvolver e implementar o sistema de imageamento *in situ*;
- Implementar as ferramentas computacionais e configurá-las;
- Determinar os parâmetros mais eficientes para a segmentação e classificação automática das imagens;
- Adquirir os dados em campo e analisar a série temporal;
- Extrair as regiões de Interesse (ROIs) de cada vinheta das imagens, segmentar os organismos e classificá-los automaticamente;
- Analisar as relações entre a ocorrência de partículas e os parâmetros ambientais.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. EQUIPAMENTO PARA IMAGEAMENTO *IN SITU***

Foi desenvolvido no âmbito deste trabalho um equipamento submersível para o estudo de plâncton e partículas no ambiente marinho. O instrumento é compacto, cabeado, leve (8 Kg) e pode ser utilizado fundeado ou fixado em píeres ou plataformas, até a profundidade máxima de 50 metros. Foi feita a opção pela implementação de um

equipamento, ao invés da aquisição de uma unidade comercialmente disponível, com a finalidade de adquirir o domínio da tecnologia.

O primeiro passo no projeto deste equipamento, batizado como Submersible Instrument for Plankton Imaging (SIPI), foi definir a técnica de imageamento a ser utilizada. A técnica de aquisição de imagens por sombreamento (shadowgraphic imaging) foi escolhida por sua simplicidade na montagem dos componentes ópticos e optomecânicos, e por gerar imagens de alta qualidade, permitindo a classificação taxonômica dos organismos e o reconhecimento das partículas, uma vez que gera um intenso gradiente de contraste de seus contornos em relação à imagem de fundo. Outro aspecto interessante desse método é sua profundidade de campo, que é maior do que em sistemas utilizando iluminação incidente. Além disso, a intensidade de luz requerida é menor do que em outras técnicas, pelo fato de o feixe ser direcionado diretamente para a câmera, reduzindo o espalhamento da luz, afora a vantagem de possibilitar a utilização de LEDs, facilitando o alinhamento do sistema e tornando-o menos oneroso (COWEN, R. K AND GUIGAND, C. M., 2008).

A configuração básica do sistema óptico para formar imagens sombreadas consiste em uma fonte de luz que direciona o feixe para uma lente colimadora, a qual torna o feixe paralelo; este então atravessa o volume imageado contendo os objetos de interesse e, na sequência, uma lente focalizadora capta o feixe e forma a imagem na câmera.

Foi utilizado um LED infravermelho (IR) ( $> 700$  nm) como fonte de luz, evitando que organismos fossem atraídos para o campo de visão do sistema, o que implicaria em resultados superestimados na abundância.

Os componentes mecânicos e ópticos do equipamento foram desenhados para uma configuração em linha direta (Figura 4), evitando a necessidade de espelhos e facilitando a manutenção do correto alinhamento do sistema.

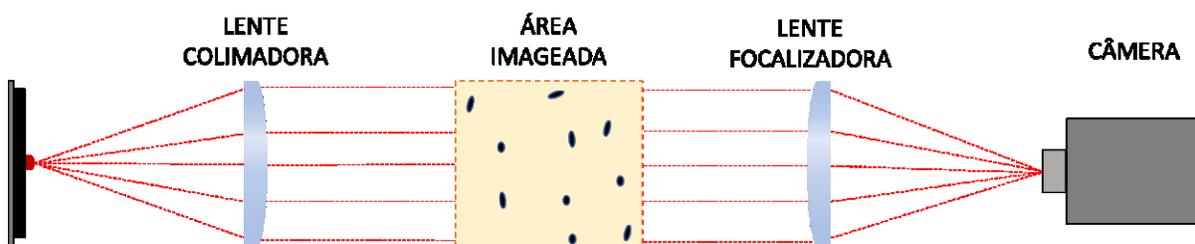


Figura 4: Configuração do sistema óptico in-line para a técnica de sombreamento.

Visando estudar objetos com o limite mínimo de tamanho da ordem do mesozooplankton (200  $\mu\text{m}$ ) foram realizados testes com diferentes configurações de sistemas ópticos para definição da magnificação do equipamento. Inicialmente o aumento foi definido utilizando uma câmera Prosilica GC2450, no entanto, problemas com repetição de frames no momento da aquisição fizeram com que os testes fossem refeitos, substituindo a Prosilica por uma Basler acA2040-25gm.

Em uma mesa óptica Newport ST Series Smart Table UT2, que isola qualquer interferência mecânica externa e garante o alinhamento dos componentes ópticos, foram montados dois sistemas com um LED infra-vermelho, duas lentes plano-convexas e a câmera Basler. As magnificações de 1, 0,75, 0,6 e 0,5 vezes foram testadas em ambos, sendo que em um deles foram usadas lentes de 60 mm de comprimento focal e, no outro sistema, lentes de 100 mm. O LED foi posicionado a uma distância equivalente ao comprimento focal da lente colimadora, enquanto as distâncias objeto-lente focalizadora ( $D_o$ ) e lente focalizadora-câmera ( $D_i$ ) foram definidas de acordo com o aumento do sistema e o comprimento focal da lente, segundo as Eq. (1) e Eq.(2) (HECHT, 2002), resultando nas distâncias apresentadas na Tabela 2.

$$D_o = f\left(1 - \frac{1}{A}\right) \quad \text{Eq. (1)}$$

$$D_i = f(-A + 1) \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde,

$D_i$ - distância entre a imagem e a lente focalizadora;

$D_o$ - distância entre o objeto e a lente focalizadora;

$f$ - distância focal da lente;

$A$  - aumento do sistema óptico;

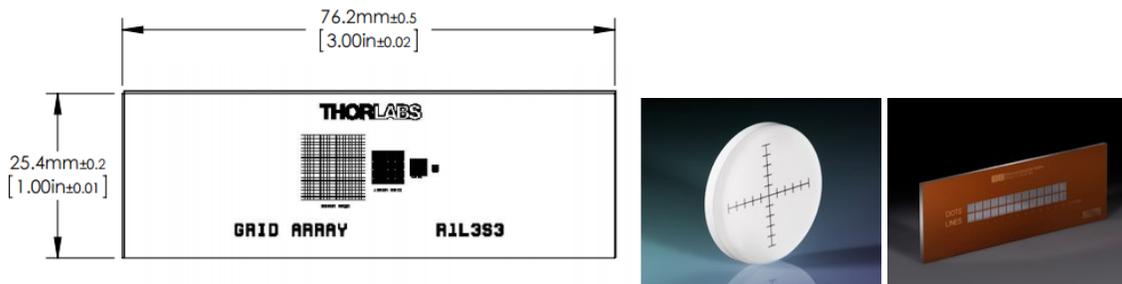
---

<sup>2</sup>Comprimento Focal da lente é a distância entre seu centro de curvatura e seu ponto focal.

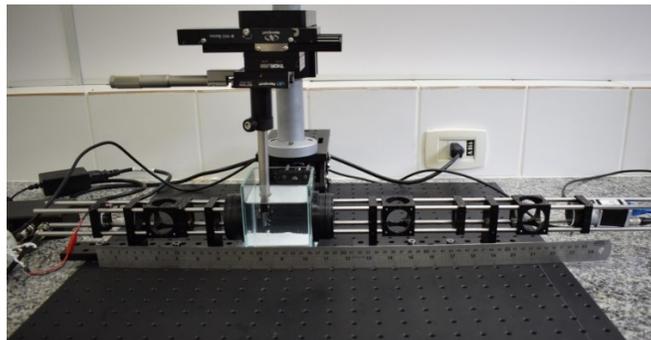
**Tabela 2: Distâncias dos componentes ópticos nos dois sistemas testados, um com lente de 60 mm de comprimento focal e outro com lentes de 100 mm, para os aumentos de 1, 0,75, 0,6 e 0,5 X.**

LENTE DE 60 mm					LENTE DE 100 mm				
Aumento	1X	0.75 X	0.6 X	0.5 X	Aumento	1X	0.75 X	0.6 X	0.5 X
$D_o$	12 cm	14 cm	16 cm	18 cm	$D_o$	20 cm	23.34 cm	26.67 cm	30 cm
$D_i$	12 cm	10.5 cm	9.6 cm	9 cm	$D_i$	20 cm	17.5 cm	16 cm	15 cm

Os componentes ópticos foram posicionados nas hastes suporte, nas referidas distâncias calculadas, adquirindo imagens de uma escala (Figura 5) inserida em um aquário com água do mar. As lentes, o LED e a câmera foram fixados, garantindo que o ponto focal em meio aquoso fosse equidistante aos visores (Figura 6) as imagens da escala foram usadas para o cálculo do aumento exato fornecido pelo equipamento submerso.



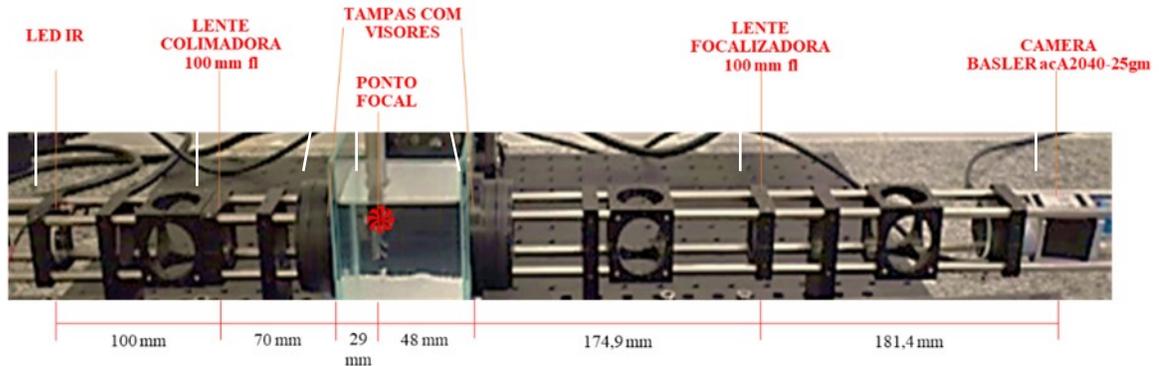
**Figura 5: Escalas usadas na validação do valor do aumento e definição do ponto focal.**



**Figura 6: Disposição dos componentes ópticos nos experimentos para posicionamento do ponto focal equidistante aos visores.**

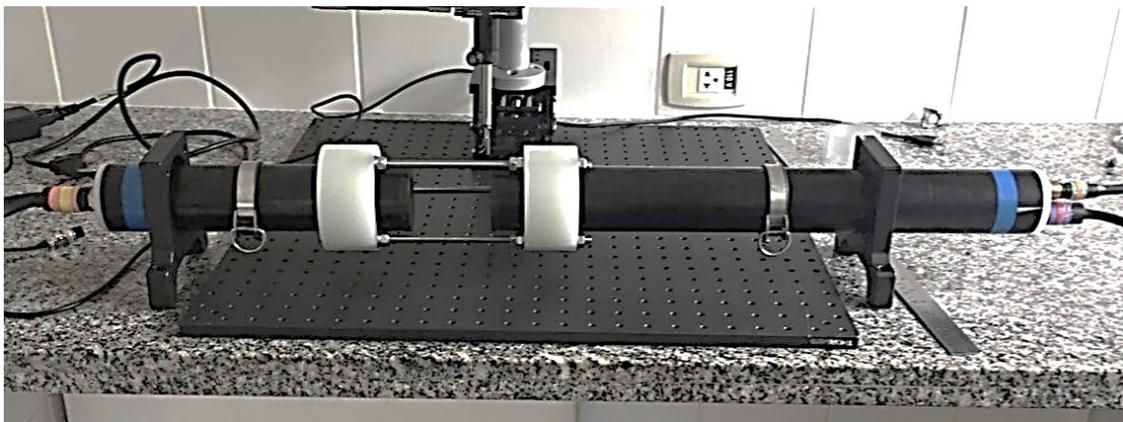
Finalizados os testes, foi definido que o sistema óptico seria composto por duas lentes plano-convexas de 25 mm de diâmetro da Qioptiq, série Linos e comprimento focal de 100 mm, um LED infravermelho e uma câmera Basler acA2040-25gm monocromática, 4MP, sensor de 2048 x 2048 px, pixel de 5,5 x 5,5  $\mu\text{m}$ , máximo de 25 fps, dispostos como mostrado na Figura 7. Tal configuração conferiu ao equipamento um aumento de 0,82 X, que foi estimado fotografando uma escala de tamanho conhecido em meio aquoso e comparando o

tamanho do pixel na imagem ( $6,76 \mu\text{m}$ ) ao pixel da câmera ( $5,5 \mu\text{m}$ ). O referido aumento fez com que a área capturada pelo pixel mudasse para  $6,76 \times 6,76 \mu\text{m}$ , portanto o sensor passou a imagear uma área de  $13,8 \times 13,8 \text{ mm}$ .



**Figura 7: Disposição dos componentes óticos do sistema de imageamento com aumento de 0.814 X.**

A estrutura mecânica do SIPI (Figura 8) é composta por dois tubos de alumínio ionizados, com 6,5 cm de diâmetro e 4 mm de espessura, duas tampas de policarbonato com visores de vidro de 5 mm de espessura, uma tampa de policarbonato com 2 conectores bulkhead macho, sendo um de 4 e outro de 8 vias, uma tampa de policarbonato com um conector fêmea e um macho de 4 vias e três hastes de alumínio rosqueáveis, permitindo ajustar o alinhamento entre os tubos.



**Figura 8: Estrutura mecânica do equipamento de aquisição de imagens.**

Uma avaliação da estanqueidade do sistema antecedeu sua implementação *in situ*, garantindo a preservação dos componentes óticos e eletrônicos. Neste teste os tubos foram preenchidos com material não resistente a água, fechados com as tampas próprias do sistema

e mantidos submersos em uma camada de água de 60 cm por 24 horas (Figura 9), por fim o conteúdo interno foi averiguado.



**Figura 9:** Teste de estanqueidade da estrutura mecânica do equipamento de imageamento.

A eletrônica do instrumento de imageamento é composta por um Arduino, dois relés e um regulador de tensão e permite o acoplamento de até duas sondas, além dos sensores de clorofila, ficoeritrina e matéria orgânica cromofórica dissolvida (CDOM) já instalados. O arduino é programado pelo usuário para realizar um ciclo em intervalos determinados, ativando e desativando os relés, que por sua vez ligam e desligam os sensores e o equipamento de imagem, fornecendo 12 volts para a câmera, 3,5 volts para o LED e 5 volts para cada sensor ambiental. O regulador de tensão LM2596 permite controlar a intensidade do LED (Figura 10). O equipamento de imageamento é ligado via cabo RJ45 a um computador contendo os programas LCR (LAPS Camera Recorder) e LSDR (LAPS Serial Data Reader) e via cabo Pp à eletrônica do sistema, que é conectada ao computador também via cabo RJ45.

Um último teste, realizado em laboratório, precedeu a implementação *in situ*, tendo o sistema completo sido configurado para adquirir imagens automaticamente por um período de 35 horas ininterruptas (Figura 11) a fim de verificar o correto funcionamento em conjunto da óptica, da eletrônica e da mecânica. O sucesso do teste indicou que o equipamento estava pronto para implementação no ambiente marinho.

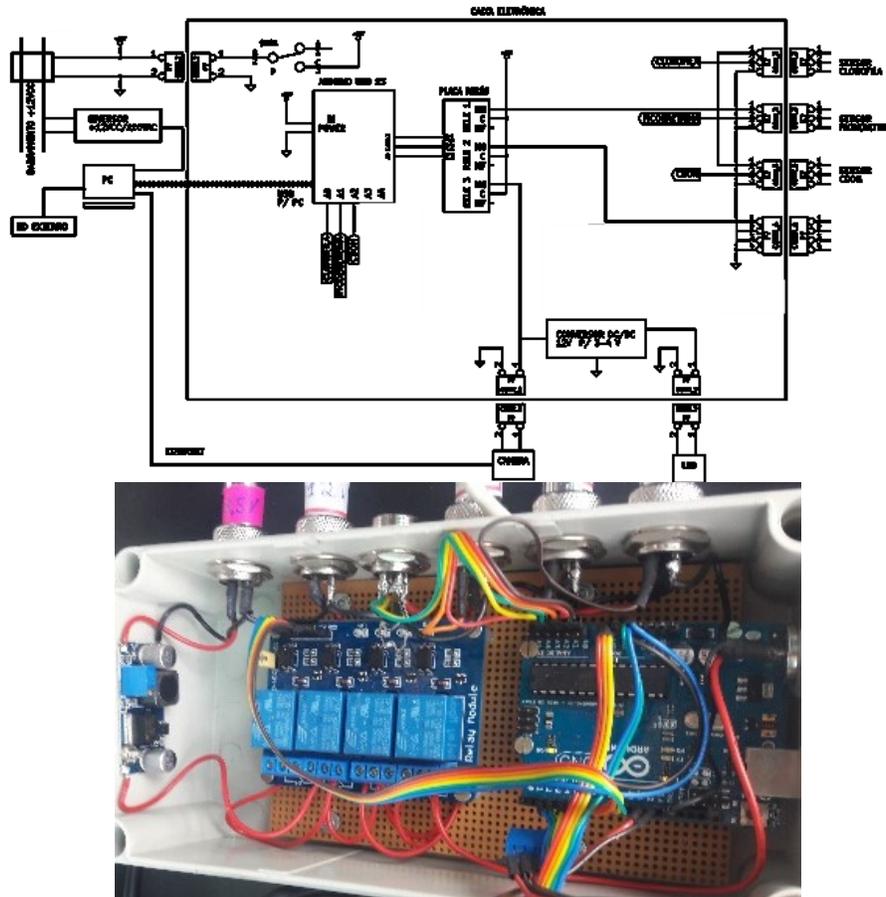


Figura 10: Acima, representação do sistema eletrônico que controla o instrumento de filmagem e os sensores ambientais. Abaixo, foto do compartimento contendo os componentes eletrônicos.

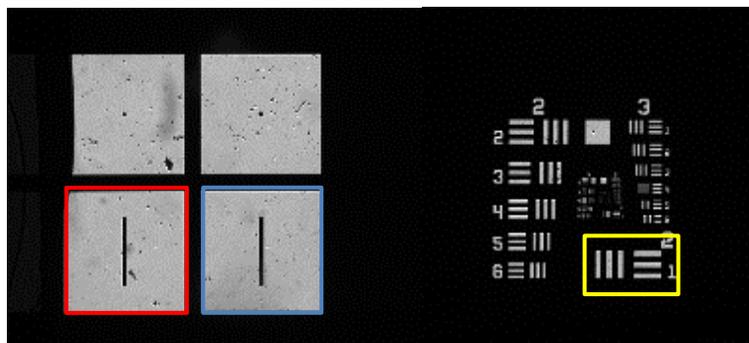


Figura 11: Teste final do sistema completo composto pela parte óptica, eletrônica e mecânica, realizado em laboratório, com duração de 35 horas.

## 2.2. CALIBRAÇÃO DO PONTO FOCAL, AUMENTO E PROFUNDIDADE DE CAMPO

O ponto focal é uma área no campo de visão do sistema, perpendicular ao CCD da câmera, na qual os objetos aparecem perfeitamente focados. Tal medida depende do aumento do sistema óptico, do comprimento focal das lentes e do meio no qual o imageamento está sendo realizado. Testes em laboratório demonstraram que a posição do ponto focal pode variar em até 1,5 cm dependendo se a imagem foi obtida no ar ou na água salgada.

A determinação do ponto focal foi realizada submergindo o equipamento em um tanque preenchido com água do mar, no qual duas escalas (Figura 12) a 58606 line dot e a R1DS1N negativo, foram fotografadas ao longo do caminho óptico em intervalos de 1 mm a partir do visor do tubo contendo a câmera. Foi utilizado o intervalo de distância de 1 mm porque as variações no foco em intervalos menores que esse foram insignificantes e tiveram valores próximos aos de ruídos causados pela presença de partículas na água. As imagens dos targets foram analisadas com auxílio do Matlab e aquelas cujo histograma apresentou maior número de pixels brancos foram consideradas no ponto focal, resultando em uma distância de 48 mm.



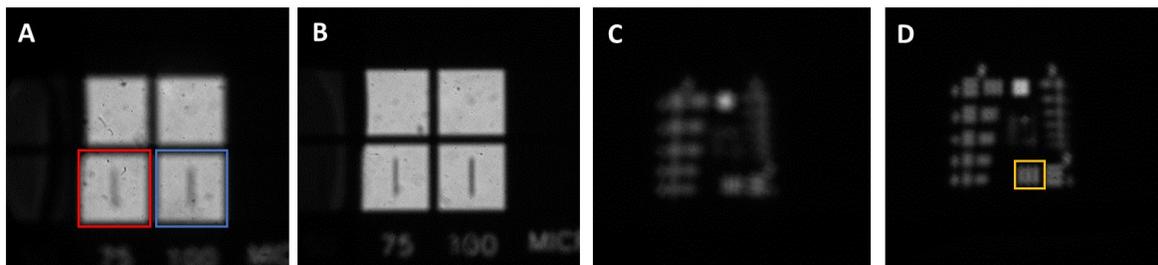
**Figura 12: Escalas usadas na definição do ponto focal.**

A profundidade de campo (DOF), como definida anteriormente, consiste em um intervalo ao redor do ponto focal no qual os objetos são considerados nítidos. A determinação da DOF é indispensável em sistemas de imagem, especialmente para estudo de abundância, pois define o valor imageado em cada frame e conseqüentemente interfere no valor da concentração de organismos por unidade de volume.

Embora o DOF seja influenciado pelo tamanho dos objetos, sendo menor para objetos pequenos, a proposta deste estudo foi definir uma profundidade de campo média para

todas as classes de tamanho, dado que em um mesmo frame estarão presentes partículas e organismos com dimensões variadas. Considerando que o limite mínimo de tamanho que o equipamento detecta é de 40  $\mu\text{m}$  para partículas em geral e 200  $\mu\text{m}$  para plâncton (valor maior devido à necessidade de identificação dos organismos), e que objetos maiores são detectáveis ao longo de todo o caminho óptico, como mostrado no exemplo com os targets na Figura 13 foram escolhidas para análise as linhas de 75 (Figura 12, quadrado vermelho) e 100  $\mu\text{m}$  da escala 58606 line dot (Figura 12, quadrado azul) e a linha de 250  $\mu\text{m}$  do grupo 2 elemento 1 do target R1DS1N negativo (Figura 12, quadrado amarelo), a partir das imagens obtidas no teste do Ponto Focal.

As vinhetas foram analisadas com o LAPS Plankton Detector (LPD), o software de segmentação do SIPI, e aquelas com contraste de 50% foram tomadas como os limites da profundidade de campo (Figura 14). Foi escolhido o valor de 50% pois testes com imagens de partículas e organismos demonstraram que esse valor exclui vinhetas demasiadamente desfocadas que seriam inviáveis para classificação (ver seção Resultados).



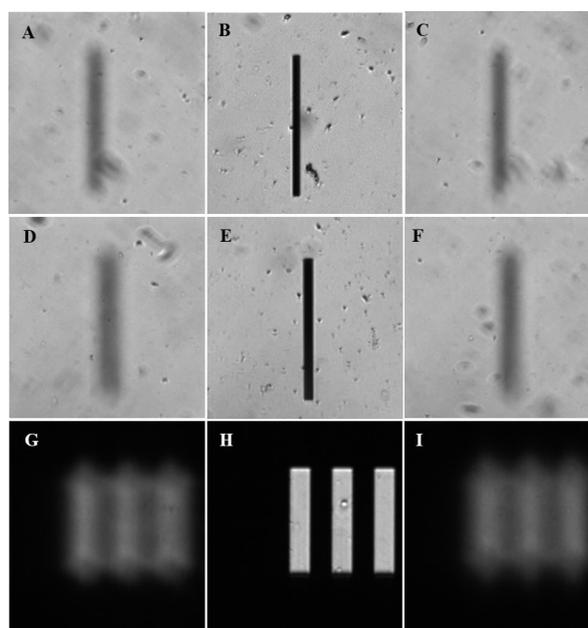
**Figura 13: Targets usados para demonstrar que objetos grandes são detectáveis ao longo de todo o caminho óptico do sistema. A e C- Imagens próximas ao visor do tubo contendo a câmera. B e D-Imagem obtida com a escala encostada no visor do tubo contendo o LED.**

As análises mostraram que usando a escala de 75  $\mu\text{m}$ , as imagens com contraste de 50% foram aquelas distando 30 e 66 mm do tubo da câmera, lembrando que o foco do sistema está a uma distância de 48 mm. As vinhetas da escala de 100  $\mu\text{m}$  que apresentaram contraste de 50% foram aquelas tiradas com as escalas a 25 e a 71 mm do tubo contendo a câmera. Por fim as imagens do target de 250  $\mu\text{m}$  a 20 e a 77 mm do tubo da câmera foram as que resultaram em 50% de contraste. As profundidades de campo e volume imageado por frame, dados pelas escalas de 75  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  e 250  $\mu\text{m}$  foram respectivamente 36 mm e 6,9 mL, 46 mm e 8,8 mL, 57 mm e 10,8 mL (Tabela 3).

**Tabela 3: Resultados da calibração da profundidade de campo do equipamento**

Escala	Distância entre o tubo do LED e o target (limite 1)	Distância entre o tubo da câmera e o target (limite 2)	DOF	Volume de um frame
75 $\mu\text{m}$	30 mm	66 mm	36 mm	6,9 mL
100 $\mu\text{m}$	25 mm	71 mm	46 mm	8,8 mL
250 $\mu\text{m}$	20 mm	77 mm	57 mm	10,8 mL

Considerando que as partículas menores são mais abundantes no ambiente marinho em relação às partículas grandes, sabendo que o limite mínimo de tamanho do objeto para ser detectado pelo sistema é de 40  $\mu\text{m}$  e para ser passível de classificação taxonômica é de 200  $\mu\text{m}$  e calculando a média entre os volumes obtidos no teste da profundidade de campo consideraremos que o volume imageado em cada frame é de 9 mL.



**Figura 14:** Escala de 75  $\mu\text{m}$  na primeira linha, de 100  $\mu\text{m}$  na segunda linha e de 250  $\mu\text{m}$  na terceira linha. As imagens A, D e G estão no limite da profundidade de campo próximo ao tubo da câmera, as imagens C, F e I estão no limite oposto do DOF e a B, E e H estão no ponto focal do Sistema.

### 2.3. CALIBRAÇÃO DOS SENSORES AMBIENTAIS

Conforme exposto anteriormente, foram acoplados ao SIPI três sensores Cyclops-7 da Turner Designs, para medição de clorofila, ficoeritrina e matéria orgânica cromofórica dissolvida (CDOM) (Tabela 4).

Os três sensores forneceram valores em Volts, os quais foram corrigidos para  $\mu\text{g.L}^{-1}$  no caso da clorofila e para ppb no caso dos outros dois parâmetros. A conversão dos dados de ficoeritrina e CDOM utilizaram respectivamente as Eq.3 e Eq.4, fornecidas pelo próprio fabricante (<http://www.turnerdesigns.com/products/submersible-fluorometer/cyclops-7f-submersible-fluorescence-and-turbidity-sensors>), enquanto a equação para correção da clorofila foi obtida por meio de calibração realizada neste trabalho.

**Tabela 4: Especificações dos sensores ambientais Cyclops-7.**

SENSORES	LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO	RANGE LINEAR
Clorofila	0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0-50 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Ficoeritrina	0,1 ppb	0-75 ppb
CDOM	0,1 ppb	0-150 ppb

\*Valores para o ganho de 10X

$$y = 358.528x, R^2 = 0.999 \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde,

Y – valor de CDOM em ppb;

X – valor medido em Volts;

$$y = 112.59x - 6.8111 \quad R^2=0.9888 \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde,

Y – valor de ficoeritrina em ppb;

X - valor medido em Volts;

No experimento para obtenção da equação de calibração da clorofila foi medido o teor desse pigmento em diferentes concentrações de uma cultura de *Tetrasselmis sp.* em meio Guillard f/2 (Figura 15) utilizando o sensor Cyclops-7 e foram retiradas amostras de 50 mL de cada concentração, as quais foram filtradas em filtro GF-F e congeladas para posterior análise com o fluorímetro Turner 10AU. Os valores em volts (Tabela 5) para cada concentração, que são resultantes da média de 5 medidas consecutivas com intervalo de 3 segundos entre elas, foram plotados em função dos resultados de clorofila-a fornecidos pelo fluorímetro (Figura 16), obtendo-se a seguinte equação de conversão para  $\mu\text{g.L}^{-1}$ :

$$y=10,075x+0,968 \quad \text{Eq. (5)}$$

Onde,

x- valor medido em Volts;

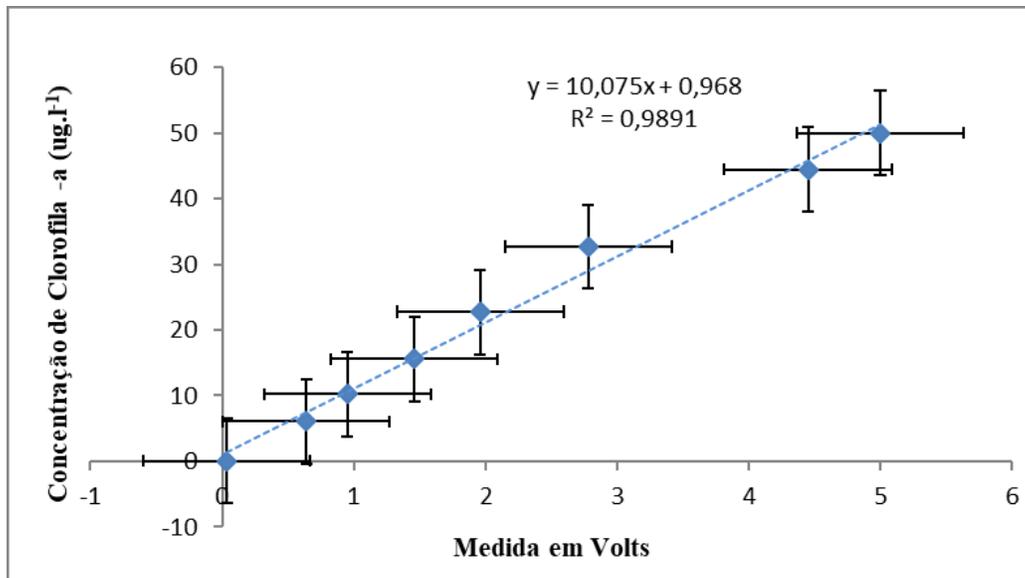
y - valor da concentração de clorofila-a ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ );



Figura 15: Calibração do sensor Cyclops-7 para obtenção da equação de correção da Clorofila.

Tabela 5: Dados resultantes da calibração do sensor de clorofila. A tabela apresenta diferentes concentrações de clorofila-a medidas pelo sensor Cyclops-7, em Volts, e por um fluorímetro, em  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Amostra	Valor medido em Volts	Concentração de Cl-a medida no fluorímetro ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
A0	4,45	44,4
A1	2,78	32,688
A2	1,96	22,752
A3	1,46	15,552
A4	0,95	10,224
A5	0,640	6,096
Branco	0,036	0,0835



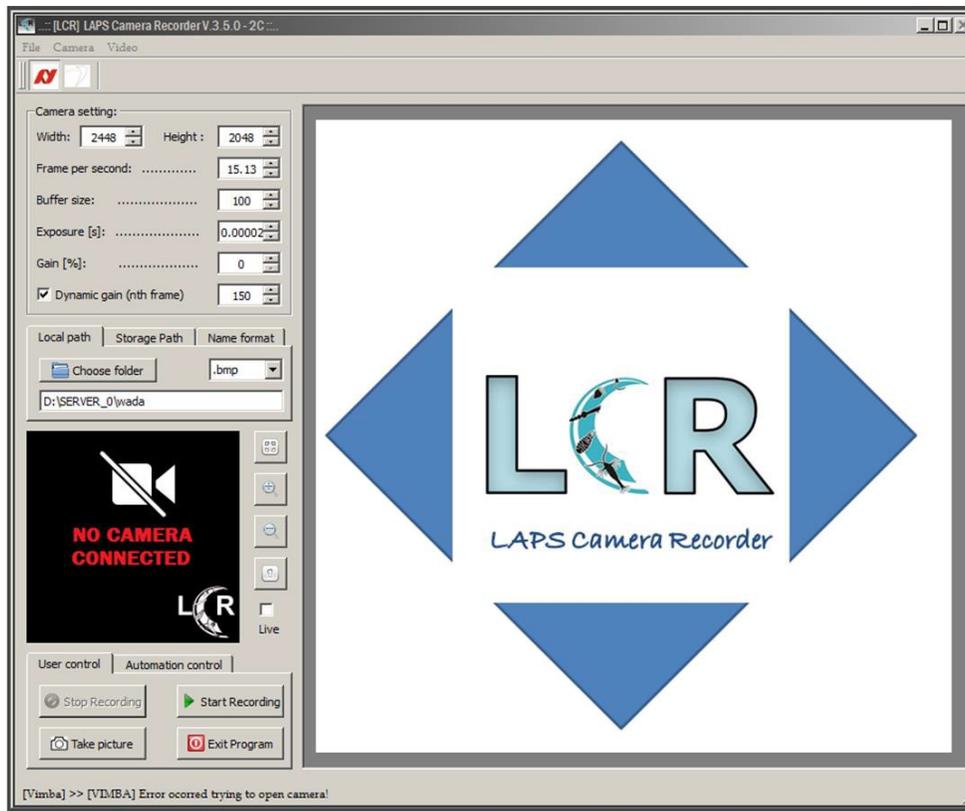
**Figura 16:** Diferentes concentrações de clorofila-a medidas em volts pelo sensor Cyclops-7 e em  $\mu\text{g L}^{-1}$  por um fluorímetro. Os pontos azuis são a média de 5 valores e as barras representam o desvio padrão.

## 2.4. SOFTWARES

Os programas são o elo entre os dados fornecidos por equipamentos de imagem *in situ* e os resultados ambientais. Como mencionando anteriormente, o processo de usar imagens para extrair informações sobre partículas e organismos consiste basicamente nas seguintes etapas: i. aquisição; ii. extração das ROIs; iii. classificação automática. Após a aquisição de imagens, é necessário extrair informações sobre as partículas e organismos de interesse e, em seguida, utilizar estas informações para realizar a etapa de classificação automática. Para este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sistemas Planctônicos da Universidade de São Paulo um conjunto de programas computacionais, em linguagem C++, descritos brevemente a seguir.

### 2.4.1 AQUISIÇÃO

A etapa de aquisição é coordenada por dois programas, o LAPS Camera Recorder (LCR) (Figura 17) que regula a captura das imagens e o LAPS Serial Data Reader (LSDR) que controla o acionamento de todo o sistema.



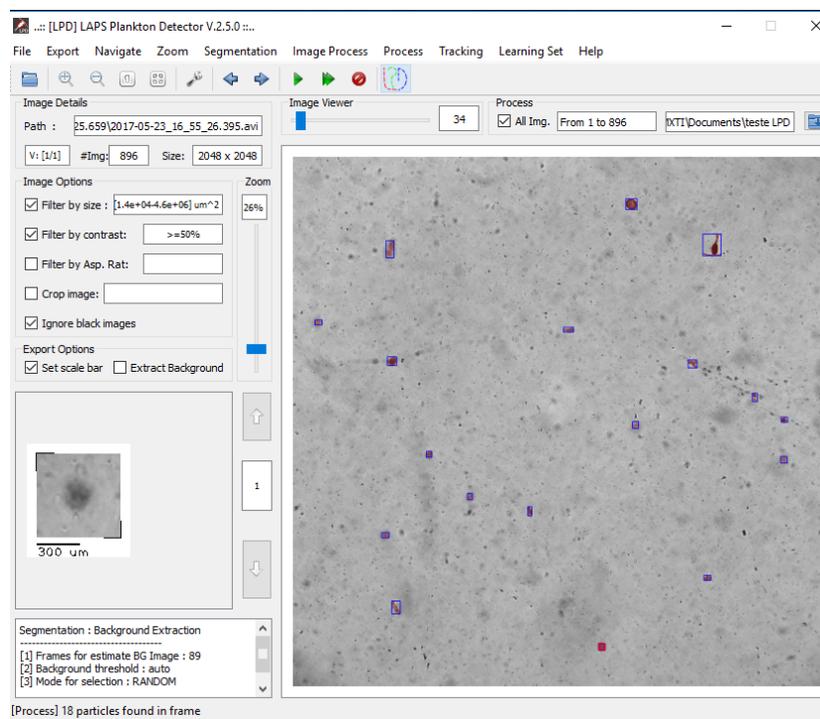
**Figura 17: Interface do software de aquisição de imagens LAPS Camera Recorder (LCR).**

O LCR funciona com as câmeras Basler e Prosilica e permite ao usuário definir o tamanho do CCD, o valor do ganho ou ganho automático, o tempo de exposição, a taxa de aquisição das imagens (fps), as pastas onde serão salvos os arquivos e se os frames serão salvos como imagens (bmp, jpg ou png) ou em formato de vídeo (.avi), que é mais compacto. A aquisição das imagens pode ser realizada em modo manual, com o usuário iniciando e pausando a gravação, ou automática, sendo controlada pelo LSDR. O LCR ainda fornece um arquivo texto a cada conjunto de dados, informando a data e hora na qual a câmera foi ligada e desligada, qual ganho foi utilizado ao longo da aquisição e quantos frames foram salvos ao fim da amostragem. Os arquivos são nomeados com o formato `2017-02-20\_16\_24\_04.126`, contendo o ano-mês-dia\_hora\_minuto\_segundo de aquisição dos dados.

O LSDR liga e desliga o LCR, ativa e desativa o Arduino, fornece ininterruptamente o status de funcionamento do equipamento, salva amostras de imagens e os dados dos sensores em uma pasta do Dropbox, para o usuário acessar os dados de qualquer local do planeta via internet, e padroniza os nomes para o mesmo formato do LCR, permitindo a posterior correlação dos parâmetros ambientais com as imagens.

## 2.4.2. EXTRAÇÃO DAS ROI's

A etapa de segmentação é realizada pelo LAPS Plankton Detector (LPD) (Figura 18) e consiste em carregar um ou vários arquivos, no formato de vídeo (avi) ou de imagens (png, jpg ou bmp), binarizar os frames e recortar de cada um deles as áreas com pontos pretos, que são candidatos a partículas. Além disso, o LPD disponibiliza ao usuário a opção de inserir escala nas vinhetas e de filtrar os objetos por tamanho e contraste, sendo que na determinação do tamanho podem ser usados os seguintes algoritmos de segmentação: “*Dynamic threshold*” (OTSU, N., 1979), “*Watershed*” (VINCENT, L. AND SOILLE, P., 1991) ou “*Background Extraction*” (JACQUES, J.C.S.; JUNG, C.R. AND MUSSE, S.R., 2006).

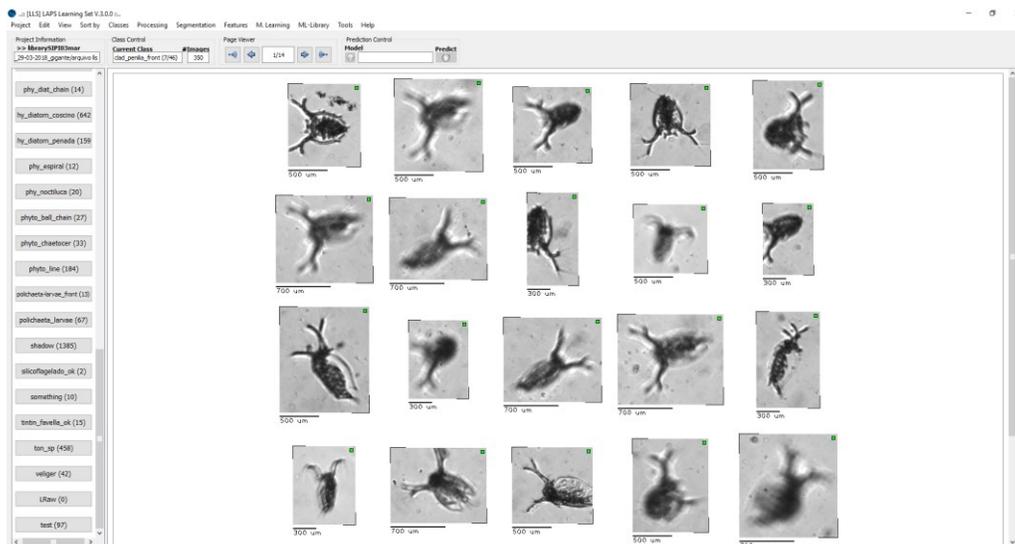


**Figura 18: Interface gráfica do LAPS Plankton Detector (LPD), software para extração das Regiões de Interesse (ROI's).**

As ROI's extraídas são enviadas para uma pasta determinada pelo usuário e salvas no formato `LpdSeg\_VID-2017-02-22\_00\_11\_11.010` utilizando o nome do arquivo original, fornecido pelo LCR, como referência, enquanto cada vinheta dentro dela recebe o nome com o formato `frame\_2274\_2017-02-22\_00\_49\_19.468\_529\_469`, informando o número do frame no qual a imagem estava inserida (frame\_2274), a data e hora de coleta e a posição X e Y do ROI no frame (529\_469). O software ainda fornece um arquivo de texto contendo o número de partículas encontradas em cada frame.

### 2.4.3 CLASSIFICAÇÃO AUTOMÁTICA

O LAPS Learning Set (LLS) (Figura 19) permite ao usuário criar projetos, importando os arquivos fornecidos pelo LPD e montar training sets ou ainda fazer a classificação automática utilizando tais training sets. O programa recebe o arquivo com as vinhetas, extrai os parâmetros de textura e/ou de forma, sendo que para esse último utiliza o método de segmentação selecionado pelo usuário e salva tais medidas em uma planilha. Essa planilha será usada no processo de classificação automática.



**Figura 19: Layout do software LAPS Learning Set (LLS), utilizado para segmentação das vinhetas e classificação automática dos organismos.**

A versão atual do LLS trabalha com 43 parâmetros, apresentados na Tabela 6. Para obter as medidas de textura pode-se escolher entre os métodos de Local Binary Patterns (LBP) (OJALA, T.; PIETIKAINEN, M. AND MAENPAA, T., 2000) ou Haralick (HARALICK, R. M.; SHANMUGAM, K. AND DINSTEN, I., 1973), enquanto que para os parâmetros de forma estão disponíveis os seguintes algoritmos de segmentação: Otsu (OTSU, N., 1979), Triangle Method (ZACK, G.W.; ROGERS, W.E. & LATT, S.S., 1977), abordagem LBP, que é um método baseado no LBP, Watershed (VINCENT, L. AND SOILLE, P., 1991), Background Extraction (JACQUES, J.C.S.; JUNG, C.R. AND MUSSE, S.R., 2006) e o Mode Value, que é um algoritmo desenvolvido pelo Laboratório de Sistemas Plancônicos da Universidade de São Paulo adaptado do Triangle Method.

O LLS ainda apresenta ferramentas adicionais possibilitando unir dois ou mais projetos, transferir imagens de um projeto para outro, excluir vinhetas e realizar validação cruzada das bibliotecas.

**Tabela 6: Parâmetros de cada vinheta, extraídos pelo LLS.  
Adaptado de MEDEIROS, M.G.**

<b>Geométrico</b>			
Area_pixel	Área do objeto em pixels		
AreaNoHole_Area_pixel	Área do objeto em pixels com exclusão dos buracos		
Solidity	Área do menor plígono que envolve o objeto (convex hull)		
Perimeter_pixel	Perímetro do objeto em pixels (tamanho do contorno externo em pixels)		
ConvexPerimeter_pixel	Perímetro (em pixels) do convex hull que envolve o objeto		
Convexity	Relação entre o 'ConvexPerimeter' e o e o perímetro do objeto - Resulta em valores de 0 a 1		
Max_ConvexityDef	Relação entre o diâmetro e o comprimento do objeto		
Circularity	Valor 1 é um círculo perfeito, valores próximos a 0 indicam um polígono alongado		
HeywoodCircularity	Relação do perímetro do objeto dividido pelo perímetro de uma circunferência de mesma área		
Waddel_Circularity	Diâmetro de um círculo com mesma área do objeto		
Rectangularity	Relação entre a área do objeto e a área do menor retângulo que dentro dele se encaixa		
Eccentricity	Relação que caracteriza		
Elongation	Relação entre o eixo maior e o menor do objeto		
MinorDimInside	Menor diâmetro contido no objeto		
Minor Feret	Eixo menor do objeto		
Major Feret	Eixo maior do objeto		
HoleAreaRatio	Relação entre a área do objeto e a área dos buracos		
MinEnclosingCircleArea_pixel	Área do círculo mínimo que envolve o objeto		
EllipsisArea_pixel	Área da elipse mínima que envolve o objeto		
RelatDist2BoundingBox	Distância Euclidiana entre os centróides do objeto e do bounding box (quadrado mínimo que envolve o objeto)		
RelatDist2ConvexHullCtr	Distância Euclidiana entre os centróides do objeto e do convex hull (polígono que envolve o objeto)		
RelatDist2Ellipse	Distância Euclidiana entre os centróides do objeto e da elipse que envolve o objeto		
RelatDist2EnclCircle	Distância Euclidiana entre os centróides do objeto e do círculo que envolve o objeto		
<b>Intensidade</b>			
MeanIntsty_Full	Média da intensidade de cinza do objeto todo		
StdDevIntsty_Full	Desvio padrão da intensidade de cinza do objeto todo		
MeanIntsty_noHole	Média da intensidade de cinza do objeto com exclusão dos buracos (contornos azuis nas imagens)		
StdDevIntsty_noHole	Desvio padrão da intensidade de cinza do objeto com exclusão dos buracos		
Median	Valor mediano da intensidade de cinza do objeto		
Contrast_edge	Mede a relação entre a diferença de intensidade máxima de pixels da borda com a diferença máxima de intensidade no ROI		
<b>Forma do histograma</b>			
Entropy	Grau de aleatoriedade das intensidades de uma imagem.		
Skewness	Medida de assimetria da distribuição de intensidades de uma imagem.		
Kurtosis	Medida de alongamento da distribuição de intensidades relativo a uma distribuição normal.		
<b>Descritores de textura de Haralick</b>			
Entropy	$= \sum_{i,j=1}^L -\bar{T}(i,j) \times \log(\bar{T}(i,j) + 1)$	Cluster_shade	$= \sum_{i,j=1}^L (\bar{T}(i,j) \times (i + j - \mu_x - \mu_y)^3)$
Energy	$= \sum_{i,j=1}^L \bar{T}(i,j)^2$	Correlation	$= \sum_i \sum_j p_d(i,j) \frac{(i - \mu_x)(j - \mu_y)}{\sigma_x \sigma_y}$
Homogeneity	$= \frac{\sum_{i,j=1}^L \bar{T}(i,j)}{1 +  i - j }$	MaximumProbability	$= \max(\bar{T}(i,j)), 0 \leq (i,j) < L$
Contrast	$= \sum_i \sum_j (i - j)^2 p_d(i,j)$	Dissimilarity	$= \sum_{i,j=1}^L (\bar{T}(i,j) \times  i - j )$
Cluster_tendency	$= \sum_{i,j} \{i + j - \mu_x - \mu_y\}^4 * P(i,j)$	AutoCorrelation	$= \frac{\sum_{i,j=1}^L (\bar{T}(i,j) \times (j - \mu_x)(i - \mu_y))}{\sigma_x - \sigma_y}$

### 3. MÉTODOS UTILIZADOS NO FUNDEIO *IN SITU*

O SIPI foi implementado em um ponto fixo, adquirindo dados de fevereiro a junho de 2017, os quais posteriormente foram tratados com os softwares LPD e LLS visando entender a dinâmica de partículas em uma região costeira de uma enseada no litoral norte do estado de São Paulo e sua correlação com as forçantes ambientais.

#### 3.1. ÁREA DE ESTUDO

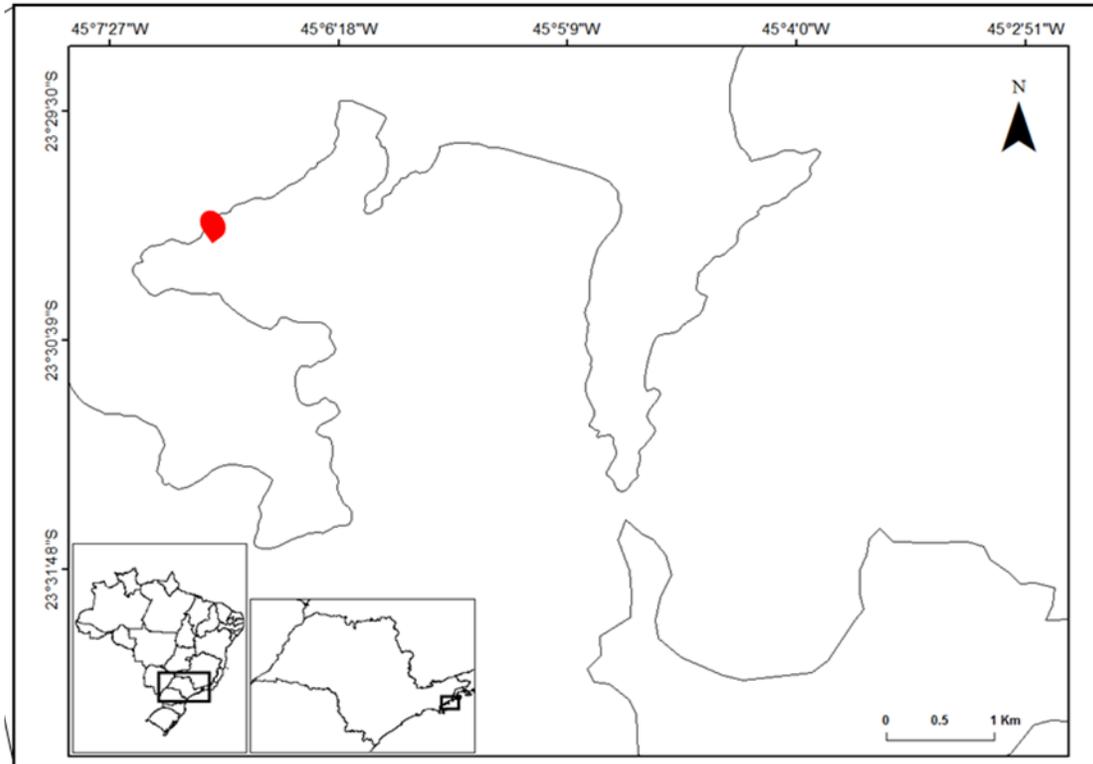
O equipamento de filmagem com sensores foi instalado a 1,5m de profundidade em uma plataforma flutuante posicionada na latitude de 23°30'01''S e longitude 45°07'04''W, na isóbata de 4 metros, próximo à base de pesquisa “Clarimundo de Jesus” do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO/USP), na enseada do Flamengo, Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo.

A enseada do Flamengo possui abertura para sul, é protegida das águas de sudeste pela Ilha Anchieta, tem predomínio do sistema de maré semi-diurna, valores de velocidade da corrente inferiores a 10 cm s<sup>-1</sup> no inverno e menores que 15 cm s<sup>-1</sup> no verão (MAHIQUES, M. M., 1992) e forte influência dos ventos nas áreas próximas ao continente (CASTRO-FILHO, B. M. ET AL., 2015).

Segundo MAGLIOCCA, A. e KUTNER, A. S. (1965) a corrente de água vinda de sul entra na Enseada pelo lado ocidental, margeia a costa e bifurca-se, indo parte para a porção oriental e parte para o Saco da Ribeira, localizado no fundo da enseada. O conjunto de parâmetros atuantes na região provoca uma grande variabilidade nos tamanhos dos sedimentos, variando entre silte muito fino até areia fina e com predomínio de deposição de argila no Saco da Ribeira (MAHIQUES, M. M., 1992).

A plataforma interna da região de Ubatuba é dominada nas camadas superficiais pela Água Costeira (AC), com salinidade inferior a 34 e temperatura acima de 25°C e nas camadas subsuperficiais pela Água Central do Atlântico Sul (ACAS), com temperatura menor que 18°C e salinidade entre 34,5 e 36, 8. Esporadicamente, principalmente durante o verão, há a ocorrência da Água Tropical (AT) misturada à AC, sendo que a AT apresenta valores de salinidade acima de 36 e temperaturas maiores que 22 graus (CASTRO-FILHO, B. M.; MIRANDA, L.B. AND MIYAO S. Y., 1987). Durante a primavera e verão, devido ao predomínio de ventos de leste e nordeste associados ao transporte de Ekman, é comum a

Água Costeira se afastar da costa, resultando na intrusão da ACAS, que pode ser registrada em profundidades de até 20 metros. Esse processo introduz nutrientes nas camadas superficiais, elevando a produção planctônica (BRANDINI, F. P. ET AL., 2014).



**Figura 20: Localização do ponto de fundeio do sistema de imageamento na Enseada do Flamengo no município de Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo.**

### 3.2. INSTRUMENTAÇÃO

O SIPI, os três sensores ambientais Cyclops-7 da Turner e um sensor autônomo de condutividade e temperatura da série INFINITY-CTW ACTW-USB da JFE Advantech Co. foram inseridos em uma unidade de suporte confeccionada em alumínio e esta foi fixada à plataforma flutuante com correntes galvanizadas (Figura 21).



**Figura 21: Equipamento de imagem com sensores acoplados, fixados em uma gaiola presa à plataforma flutuante. Ao fundo se vê o armário sobre o flutuante, onde foram instalados o computador e o controlador eletrônico do sistema, mostrados na Figura 22.**

Todo o sistema foi ligado a um computador NISE 3600E, Intel Core i5, ethernet 100/1000, com 4 entradas USB 3.0, 2 entradas USB 2.0, 5 RS232 e uma RS232/422/485, sistema Windows 7 com 8 GB memória RAM e os dados foram salvos em HDs externos, facilitando seu transporte para laboratório (Figura 22). O sistema computacional foi ajustado para religar em caso de falta de energia e iniciar automaticamente os programas com as últimas configurações utilizadas. Além disso, como o computador foi conectado à Internet, utilizando o sinal de WiFi do laboratório da base, amostras dos dados foram enviadas para o Dropbox a cada três ciclos de coleta, permitindo ao usuário acompanhar a qualidade dos dados e o correto funcionamento do sistema à distância. A energia do equipamento foi fornecida por cabos subterrâneos ligados ao laboratório em terra.



**Figura 22: Componentes eletrônicos e computador que controlam os sensores ambientais e o sistema de imageamento. A-Monitor de 11 polegadas; B – HD externo de 5TB; C- Computador NISE 3600E; D – Eletrônica composta por um Arduino, 4 relés e um regulador de tensão LM2596, responsáveis por ligar e desligar os sensores ambientais, o LED e a câmera.**

### 3.3. DEFINIÇÃO DAS CONFIGURAÇÕES DOS SOFTWARES

As configurações de uso do LPD e do LLS foram definidas por meio de experimentos, visando analisar o maior número de objetos de interesse, buscando excluir partículas muito desfocadas, tentando definir o método de segmentação mais preciso e consequentemente otimizar os resultados da classificação automática.

Oito vídeos, sendo um do final de fevereiro, cinco do mês de março e dois de Abril, um do início e outro do fim do mês, foram processados no LPD, com filtro de tamanho entre 300 e 999999 pixels, sem filtro de contraste e utilizando o algoritmo de segmentação de Background Extraction, pois é o único capaz de remover os ruídos estáticos causados por partículas aderidas aos visores. A partir das ROI's obtidas foram criados manualmente 8 projetos no LLS utilizando parâmetros de forma e de textura, pois segundo OGATA, B. (2016) a combinação entre eles otimiza o resultado da classificação automática. Este procedimento resultou em um total de 281.904 vinhetas divididas em 10 grupos, classificados em focados e desfocados, resultando em 20 classes. Na sequência, com o auxílio do Matlab, as partículas foram plotadas em função do contraste e range de tamanho, fornecendo quais intervalos de valores englobam a grande maioria dos objetos, tanto por grupos quanto em sua totalidade, permitindo definir os filtros a serem usados no LPD.

A definição do método de segmentação a ser usado no processo de classificação automática pelo LLS se baseou na análise qualitativa das imagens segmentadas pelos

diferentes algoritmos disponíveis e em resultados quantitativos de dois estudos, um que estimou o número total de objetos e a quantidade deles em cada grupo, quando aplicado cada um dos algoritmos, e outro que avaliou a razão entre a área do ROI e a área segmentada e a média e o desvio padrão da área, do eixo menor e do eixo maior de cada classe para os diferentes métodos de segmentação.

Uma outra etapa fundamental para o sucesso da classificação automática é a criação de um training set capaz de fornecer resultados com alto nível de precisão, o que depende da variedade dos objetos, do balanço no número de classes e do número de imagens em cada categoria. Foram montadas 12 configurações distintas de uma biblioteca alternando o número de classes entre 15, 12 e 9 e o número de vinhetas em cada uma delas entre 400, 300, 200 e 100. Na sequência foi obtida para cada modelo uma matriz resultante da validação cruzada, permitindo analisar o número de falsos positivos (classificados incorretamente), de verdadeiros positivos (classificados corretamente) e a acurácia. A biblioteca que apresentou maior valor de acurácia foi selecionada para ser utilizada na classificação automática dos objetos do estudo de caso.

Os resultados dos experimentos mencionados acima serão apresentados a seguir na seção de Resultados.

### **3.4. FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS**

O LCR foi configurado para trabalhar com a câmera Basler, ganho automático, evitando assim que as imagens ficassem muito claras ou muito escuras e com exposição de 15  $\mu$ s. Na definição da taxa de aquisição optou-se pelo menor valor que não deixasse de capturar partículas, definindo-se 15 frames por segundo (fps), adquiridos de maneira automática. Os frames foram salvos em formato de vídeos, a uma frequência de 11 fps, dado que o formato '.avi' é mais compacto do que imagens em bmp ou jpeg.

O LSDR foi programado para fazer um ciclo a cada 40 minutos, que consistiu em adquirir imagens por um minuto e em seguida fazer 3 medidas com cada sensor de clorofila, ficoeritrina e CDOM, com intervalo de 10 segundo entre cada medida consecutiva.

As configurações de filtro de tamanho e contraste do LPD foram estabelecidas segundo os resultados dos experimentos com partículas (seção 3.3), que serão apresentados na seção de Resultados.

Na etapa de segmentação pelo LLS se optou pelo uso do algoritmo Mode Value, que forneceu o melhor resultado para partículas em geral. Os parâmetros de forma e textura também foram utilizados, pois contribuem para elevar o nível de acerto da classificação automática, como mencionado anteriormente. A classificação automática das imagens obtidas no estudo de caso, apresentado na seção de Resultados, foi realizada utilizando uma biblioteca composta por 2700 vinhetas divididas em 9 classes, sendo elas: Appendicularia, Ceratium, Cnidaria, Copepodo, Detrito, Diatomácea, Filamentos, Larva de Poliqueta e Penilia. O método de aprendizado de máquina foi o Random Forest, cuja eficiência já foi comprovada pelos trabalhos de JACOBSEN, S. ET AL. (2018) e GORSKY, G. ET AL. (2010), entre outros. As imagens processadas no LPD e no LLS forneceram a abundância total das partículas e a abundância por range de tamanho.

### **3.5. DADOS AMBIENTAIS**

Dados de imagens, clorofila, ficoeritrina e CDOM foram adquiridos em ciclos de 1 minuto de filmagem, 3 medidas dos parâmetros ambientais de 10 em 10 segundos e 40 minutos de intervalo, além disso 5 valores de temperatura e 5 de salinidade foram medidos na frequência de 1Hz, também a cada 40 minutos.

Dados meteorológicos de temperatura do ar, umidade relativa, pressão atmosférica, velocidade do vento e radiação solar foram adquiridos na estação meteorológica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo em intervalos de 15 minutos e medidas do nível do mar de 3 em 3 minutos foram fornecidas pelo marégrafo dessa mesma instituição, ambos posicionados na Base Clarimundo de Jesus em Ubatuba, a uma distância de aproximadamente 350 metros do ponto de fundeio. Os parâmetros ambientais incluíram também valores de precipitação a cada uma hora, provenientes da estação automática do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizada em Paraty.

Na análise visual dos dados da série temporal completa foram plotados os valores brutos de cada parâmetro para cada horário de coleta. Nas análises estatísticas, para as variáveis com apenas um valor por amostra, foi calculada a média e o desvio padrão entre as três amostras anteriores e três posteriores e os valores fora do intervalo dos desvios padrão foram interpolados. No caso das variáveis com mais de uma medida por amostra os outliers, definidos como o ponto mais distante da mediana entre os valores de um mesmo horário de aquisição, foram excluídos e a nova mediana foi utilizada.

O período amostrado foi do final de fevereiro ao início de junho de 2017, incluindo a transição entre o fim do verão e o início do outono. No entanto, por se tratar de um período experimental, o equipamento foi retirado para manutenção nos dias 1 a 4 de março, 21 a 28 de Março e 2 a 5 de Abril. Para fins estatísticos será analisado o maior intervalo sem interrupção de dados, sendo entre 5 de abril e 7 de Maio de 2017. Além disso, devido a limitações no processo de classificação automática, que serão detalhadas mais a frente, os objetos foram analisados como partículas e divididos em três ranges de tamanho de acordo com a dimensão de seu eixo maior. O espectro de tamanho 1 incluiu objetos com área menor que 3302 pixels, equivalente a 385  $\mu\text{m}$  de lado considerando a partícula quadrada, o range 2 inclui objetos entre 3302 e 8563 pixels e a classe de tamanho 3 com área maior que 8563 pixels ou 620  $\mu\text{m}$  de lado.

As séries temporais de cada uma das variáveis, compostas por 1186 medidas, tiveram seus sinais decompostos em funções sinusoidais básicas com base na análise de Fourier realizada com o auxílio do software Statistica, buscando detectar padrões recorrentes dos fenômenos. As frequências menores que 0,004, referentes a períodos maiores que 7 dias, não foram analisadas devido à extensão relativamente curta da série total. Ou seja, foi assumido que períodos superiores a  $\frac{1}{4}$  da série não seriam resolvidos adequadamente pela análise e por isso foram desconsiderados. Os aspectos formais dessa análise estão especificados em BLOOMFIELD (1976) e JENKINS & WATTS (1968).

O comprimento de onda em uma função senoidal ou cossenoidal é tipicamente expressa em termos do número de ciclos por unidade de tempo (frequência) e o período dessas funções é definido como sendo o intervalo de tempo requerido para que ocorra um ciclo completo, dado isso período (T) e frequência ( $\nu$ ) se relacionam por  $T = 1/\nu$ .

No presente trabalho a frequência foi computada em termos de ciclos por observação, pois cada observação representa uma unidade de tempo (40 minutos). A variância foi expressa em densidade espectral estimada a partir da suavização do periodograma, resultante da aplicação de *Hamming window* (BLACKMAN, R.B. & TUKEY, J.W., 1958). Na abordagem *Hamming window*, os pesos para a média móvel ponderada dos valores do periodograma são calculados para cada frequência segundo as equações 7 e 8.

$$W_j = 0,54 + 0,46 * \cos\left(\frac{\pi*j}{p}\right) \quad (j=0 \text{ a } p) \quad \text{Eq.(7)}$$

$$W_{-j} = W_j \quad (j \neq 0) \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde,

$$p = \frac{(m-1)}{2};$$

m – comprimento da série;

W<sub>j</sub> – peso da variável j;

Os resultados da análise básica de Fourier indicaram as variáveis cujas frequências mais representativas tinham valores próximos. Esses parâmetros foram divididos em grupos de frequências e o espectro cruzado entre eles foi obtido. As frequências com baixa densidade espectral foram excluídas da análise de coerência quadrada porque valores muito baixos podem resultar em alta coerência entre si mesmo, não existindo um padrão cíclico, podendo levar a interpretações errôneas.

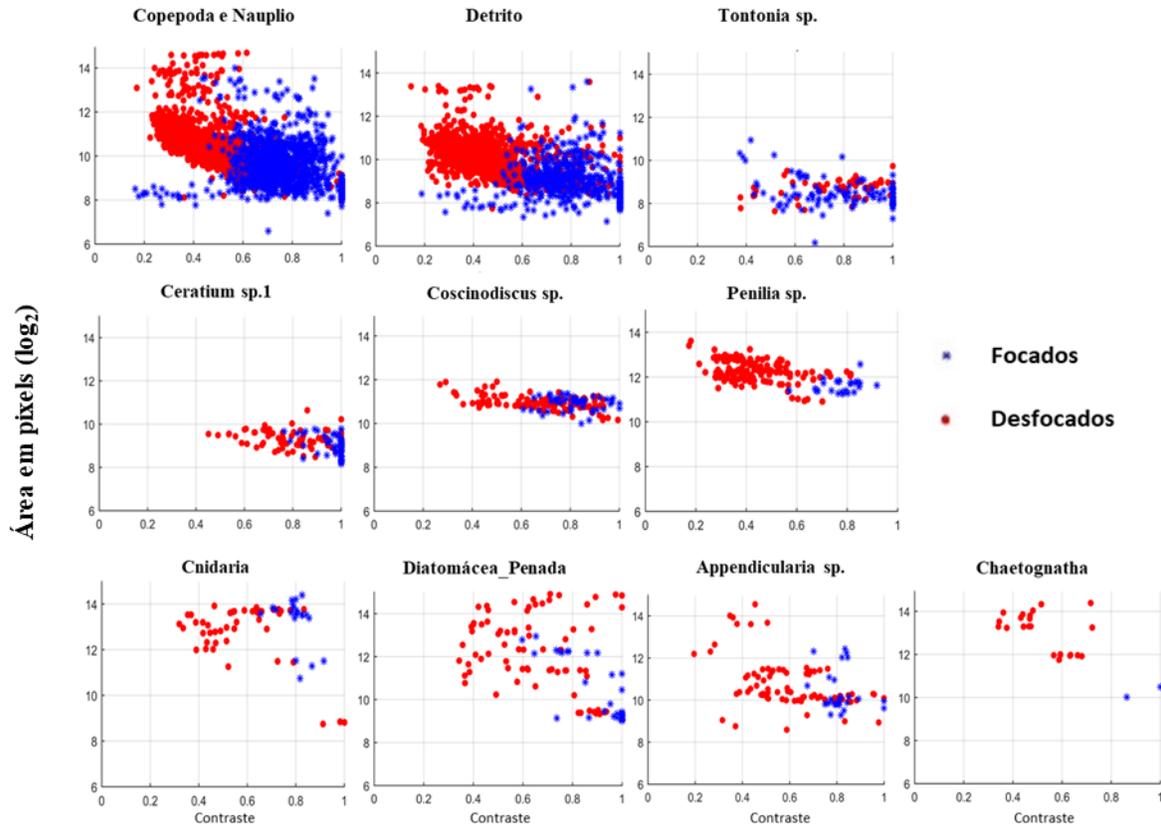
A análise dos espectros cruzados é uma modalidade bivariada da análise de Fourier que busca identificar a correlação entre os componentes cíclicos de duas series temporais. Uma descrição mais detalhada do processo matemático pode ser encontrada em LOPES, R.M. (1997).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CONFIGURAÇÃO DOS SOFTWARES

Os testes com o software LPD permitiram definir os filtros de contraste e tamanho mais adequados ao processo de extração de ROIs utilizando o Background Extraction. O referido método de segmentação foi escolhido por extrair o ruído estático dos frames pois, por se tratar de um sistema fixo, detritos e organismos frequentemente se acoplam aos visores, o que poderia incorrer em erros na estimativa de abundância de partículas.

Os resultados dos experimentos, apresentados na Figura 23, mostraram que o tamanho dos organismos das classes Copepodo\_Nauplio e Detritos variou entre 256 e 16384 pixels ( $\log_2^8$  e  $\log_2^{14}$ ), no entanto, os focados predominaram entre 128 e 4096 pixels. O contraste desse conjunto de partículas ficou entre 20 e 100%, com os focados concentrados a partir de 50%. Os menores organismos apresentaram mínimos de contraste até próximo de 10%.



**Figura 23: Resultados dos testes com o software LPD. Agrupamento de organismos por classe (focados e desfocados) para diferentes valores de contraste e tamanho.**

As classes *Ceratium*, *Coscinodiscus* e *Penilia*, tanto focados quanto desfocados, tiveram áreas variando, respectivamente, entre 256 e 1024  $\mu\text{m}^2$ , 1024 e 4096  $\mu\text{m}^2$  e 2048 e 8190  $\mu\text{m}^2$ . Os objetos desfocados apareceram a partir de aproximadamente 20% de contraste enquanto os focados do grupo *Ceratium* tiveram contraste mínimo de 70%, os da categoria *Coscinodiscus* 60% e de *Penilia* 55%. Organismos classificados manualmente como desfocados apareceram misturados aos focados, pois a categorização manual considerou apenas objetos exatamente no foco, além de se tratar de uma técnica subjetiva e os valores de contraste extraídos pelo software são quantitativos e, portanto, não necessariamente as duas abordagens coincidem. A Figura 24 apresenta exemplos de objetos das duas categorias, indicando semelhanças e diferenças entre partículas alocadas em grupos distintos.

As vinhetas do grupo *Cnidaria*, *Diatomácea\_Penada*, *Appendicularia* e *Chaetognatha* resultaram em valores de contraste de 30 até 100% com os focados presentes a partir de 60% e tamanhos no intervalo entre 256 e 32768 pixels. No entanto, ficou evidente que parte dos itens desfocados aparece misturada aos focados (Figura 23). Isso pode ter

ocorrido pela subjetividade da classificação manual, como mencionado anteriormente, devido à variação morfológica dos organismos, tanto em função da espécie quanto por sua posição, ou ainda pelo fato de se tratar de espécimes com certa transparência, o que dificulta ao método de segmentação contornar o objeto por completo, segmentando apenas parte do mesmo. No caso de Apendiculárias fora de foco, por exemplo, é comum que apenas o tronco seja reconhecido, o que resulta em um contraste mais alto do que se todo o organismo tivesse sido segmentado. Essa mesma limitação esteve presente na classe *Tontonia* (um gênero de ciliado, comum na área de estudo), que apresentou um padrão diferente dos demais grupos estudados, com focados e desfocados distribuídos indistintamente no gradiente de contraste e tamanho, demonstrando que não é possível usar essas métricas para distinção desse grupo. Pode-se apenas afirmar que os intervalos entre 128 e 1024 pixels e contraste maior que 30% englobam praticamente todos os objetos dessa categoria.

O conjunto de padrões de todas as classes (Figura 25) permitiu inferir que a grande maioria dos objetos está concentrada entre os valores de 30 e 100% de contraste, com máximo entre 40 e 70%. No entanto, a análise por classes indicou que os organismos focados aparecem a partir de 50% de contraste, valor então escolhido como o filtro padrão a ser usado no LPD. Em relação ao tamanho, foi observada a maior concentração de partículas dentro do intervalo entre 256 e 16300 pixels, equivalente a  $11492 \mu\text{m}^2$  e  $731707 \mu\text{m}^2$ .

Analisando os resultados dos experimentos com softwares com o intuito de excluir objetos muito desfocados, impossíveis de serem classificados e enfatizar os organismos do mesozoplâncton, definiu-se que no LPD seria usado filtro de tamanho entre 500 e 16300 pixels quadrados, referentes a objetos com área dentro do intervalo entre 22849 e 731707  $\mu\text{m}^2$  (para pixel com dimensão de  $6,76 \times 6,76 \mu\text{m}$ ) o que equivaleria a um quadrado com lado entre 152 a 856  $\mu\text{m}$ . O limite mínimo foi escolhido sendo um pouco inferior ao do mesozoplâncton para evitar que o LPD excluísse espécimes com baixa razão de aspecto (alongados), porém incluídos nessa categoria devido ao seu comprimento total. O filtro de contraste de 50% foi escolhido por ser o maior valor que exclui poucas partículas de interesse.

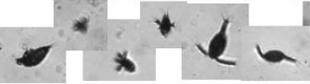
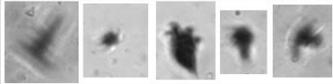
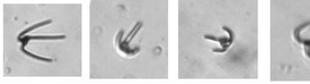
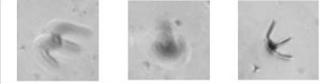
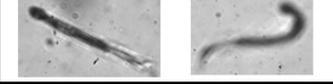
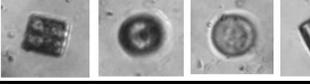
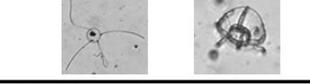
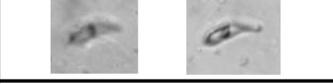
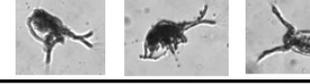
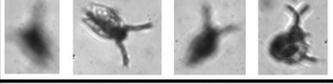
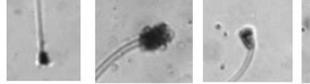
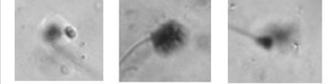
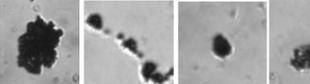
GRUPO	FOCADO	DESFOCADO
Copepodo e Nauplio		
Ceratium sp. 1		
Appendicularia		
Chaetognatha		
Coscinodiscus		
Cnidaria		
Diatomácea Penada		
Penilia		
Tontonia		
Detrito		

Figura 24: Exemplo de organismos classificados manualmente como focados e desfocados.

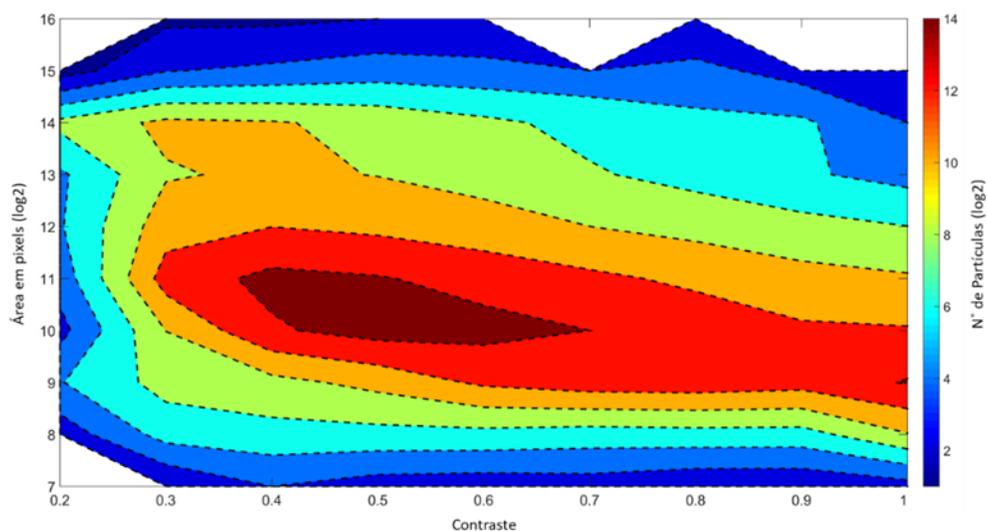


Figura 25: Resultado dos testes de tamanho e contraste utilizando o LPD, concentração de todas as partículas presentes nos 8 vídeos.

As análises qualitativas usaram o LLS e as partículas que possuíam contraste maior que 50% e tamanho entre 500 e 16300 pixels de área, pertencentes aos 8 vídeos do teste anterior, para definição do melhor algoritmo de segmentação. Os resultados, que são apresentados nas figuras a seguir, mostraram que o método Triangle é extremamente sensível, sendo capaz de detectar partes gelatinosas que nenhum outro consegue, no entanto, ele segmenta também diversos componentes não relevantes, como manchas e ruídos estáticos, incorrendo em erro nos valores dos parâmetros de forma e textura. Por este motivo, o método não foi o mais adequado para nenhuma das classes avaliadas.

## APPENDICULARIA

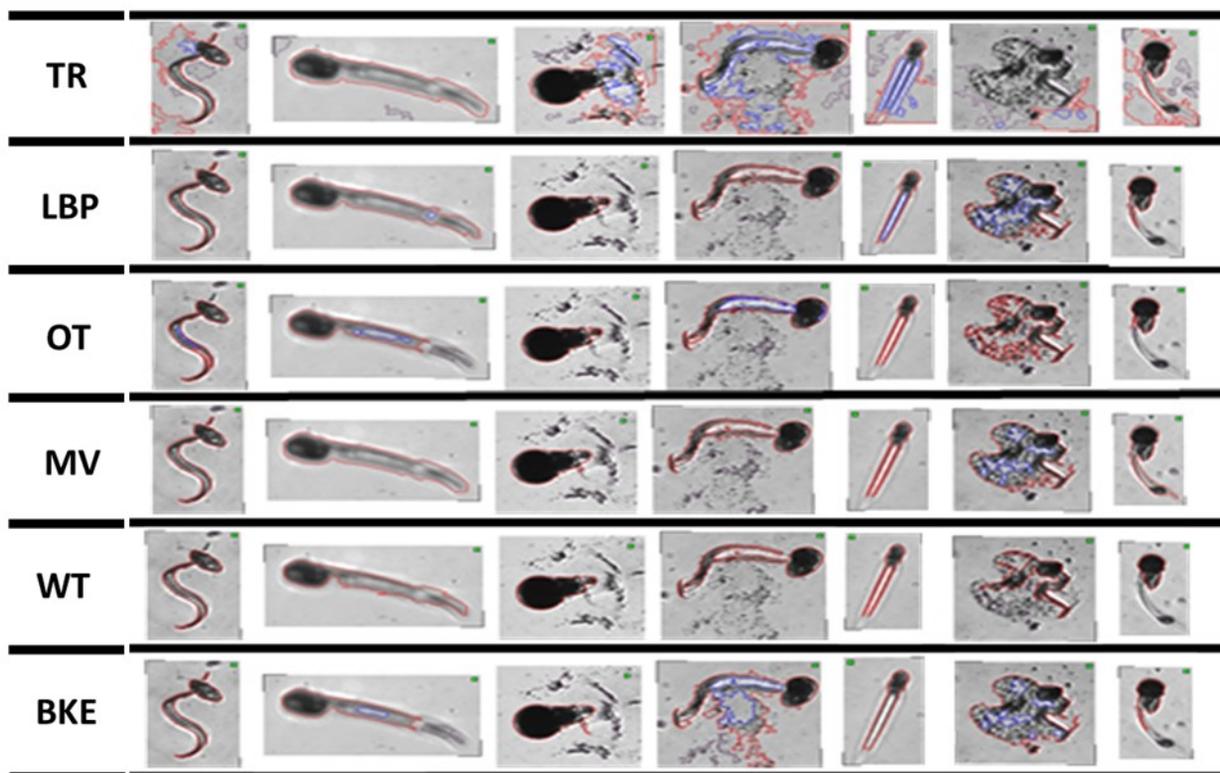


Figura 26: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS à classe Appendicularia.

A aplicação dos diferentes algoritmos aos objetos do grupo Appendicularia (Figura 26) demonstrou que LBP, OTSU, Mode\_Value, Watershed e Background Extraction funcionaram satisfatoriamente e de maneira similar para todas as imagens exemplificadas, exceto a última, na qual apenas o Mode Value foi capaz de segmentar o tronco e a cauda. Os métodos LBP, Mode Value e Background Extraction se destacaram por terem sido os únicos a segmentar corretamente a `casa` na penúltima imagem, embora o método de Background

Extraction tenha detectado outros elementos na terceira imagem. Diante destes resultados, o método Mode Value foi considerado o mais eficiente para esta classe de organismos.

Na segmentação do grupo Ceratium (Figura 27) todos os algoritmos, exceto Triangle, forneceram excelentes resultados, embora na terceira imagem a análise com Otsu não tenha contornado o objeto todo e com o LBP uma mancha tenha sido considerada. Apesar da boa performance das técnicas, o Mode Value ainda foi o que se mostrou mais adequado à classe Ceratium. Resultado semelhante foi observado para o grupo Cnidaria (Figura 28), no qual o Triangle se destacou por detectar tentáculos na segunda e na sexta imagens, estruturas que os demais métodos não foram capazes de delinear, porém sempre também selecionando ruídos que não pertenciam ao contorno do organismo em questão. Na sexta imagem Watershed, LBP e Mode Value delinearum um tentáculo não selecionado pelos demais algoritmos, enquanto que na sétima imagem apenas Background Extraction e Mode Value segmentaram a maioria dos tentáculos.

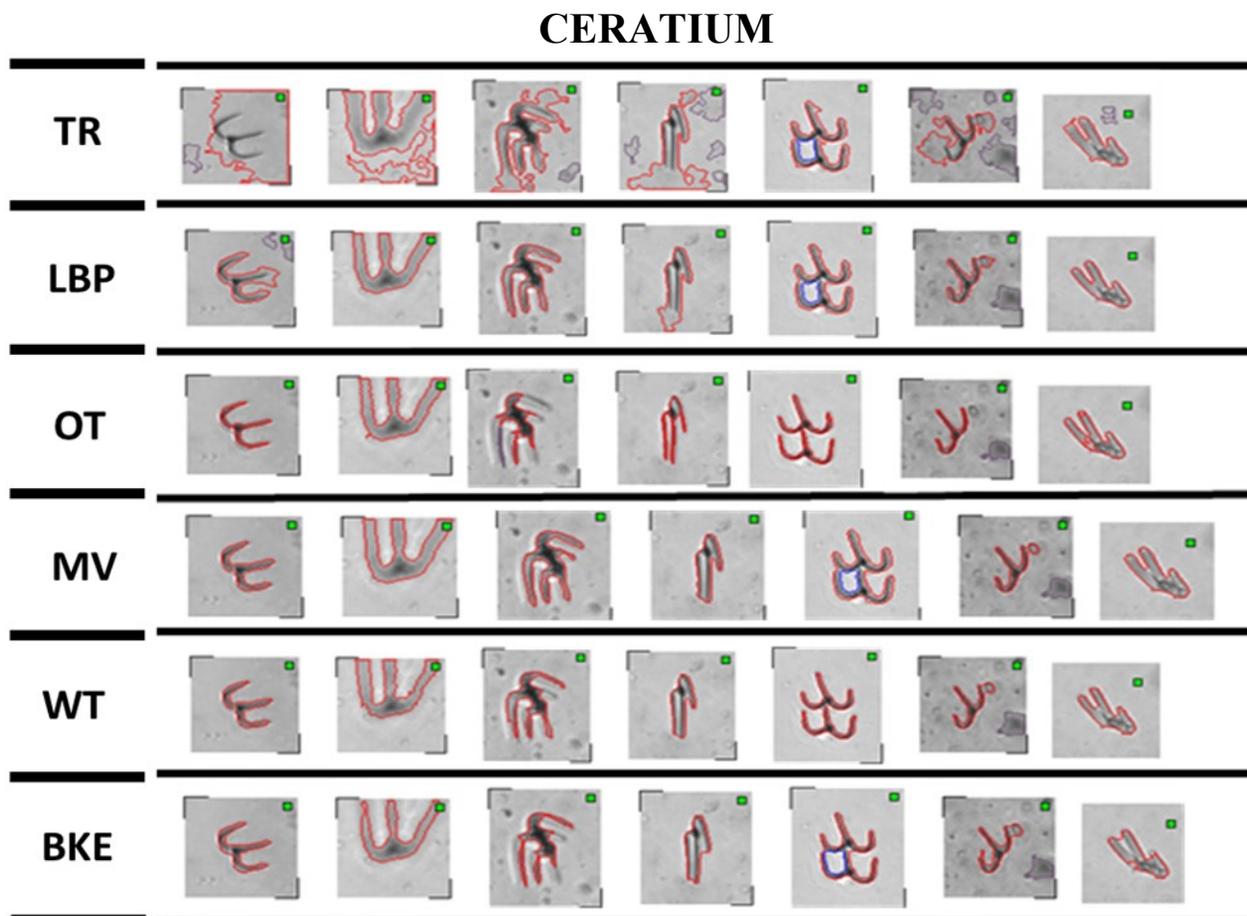


Figura 27: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS à classe Ceratium.

Os resultados da segmentação da classe Copepodo (Figura 29) evidenciaram que na primeira imagem apenas o Triangle detectou os detalhes das antênulas, porém com o mesmo erro mencionado anteriormente, enquanto que o Mode Value foi o único capaz de selecionar as antênulas desfocadas na quarta vinheta, sendo novamente o método mais adequado. Nas demais imagens as performances dos algoritmos foram satisfatórias e similares entre si.

## CNIDARIA

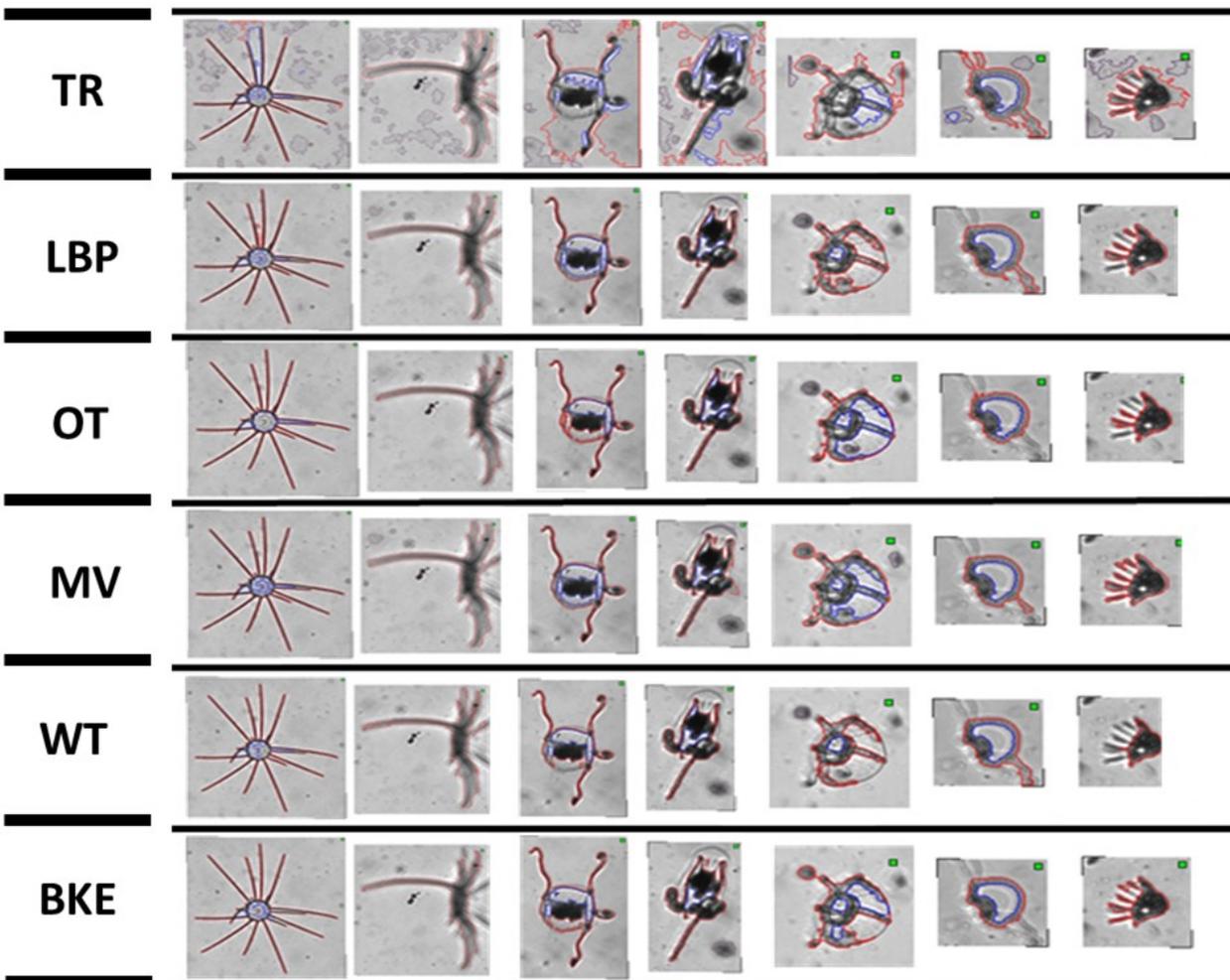
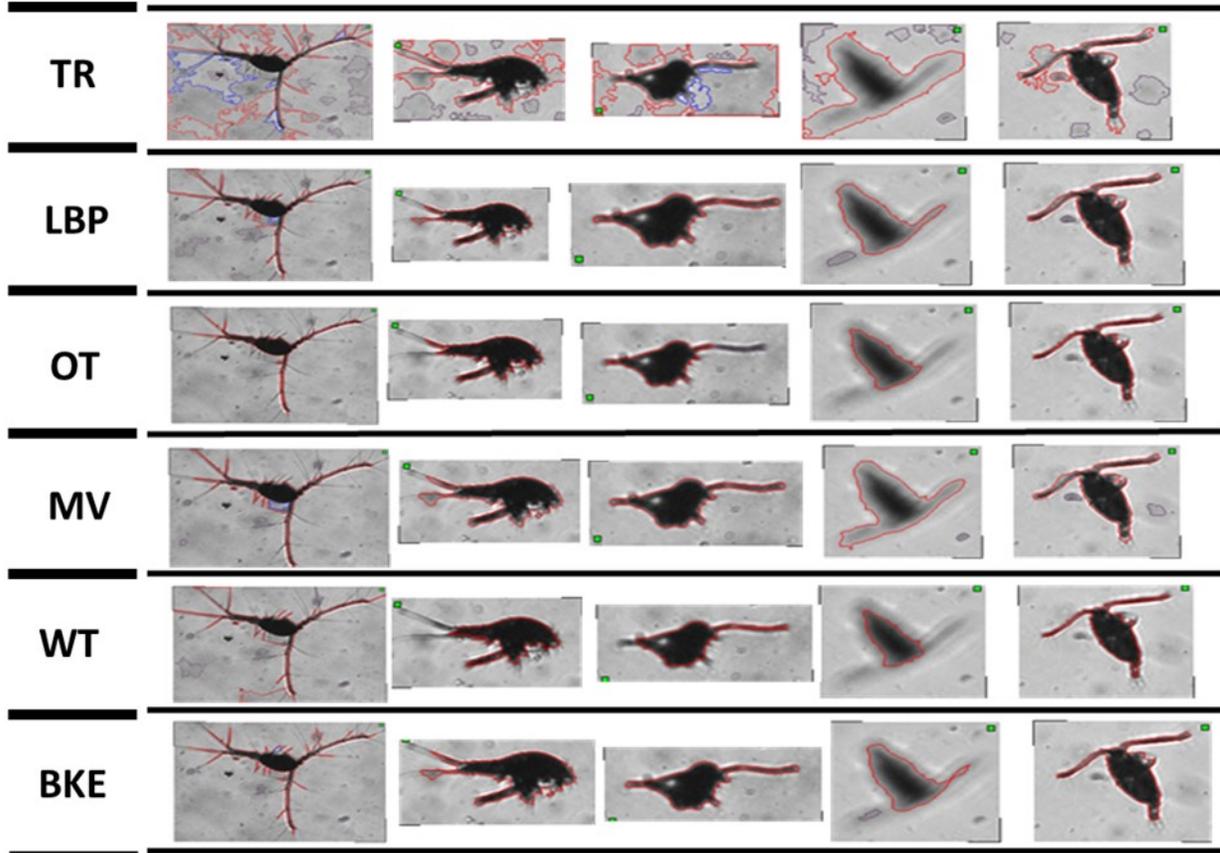


Figura 28: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação ao grupo Cnidaria.

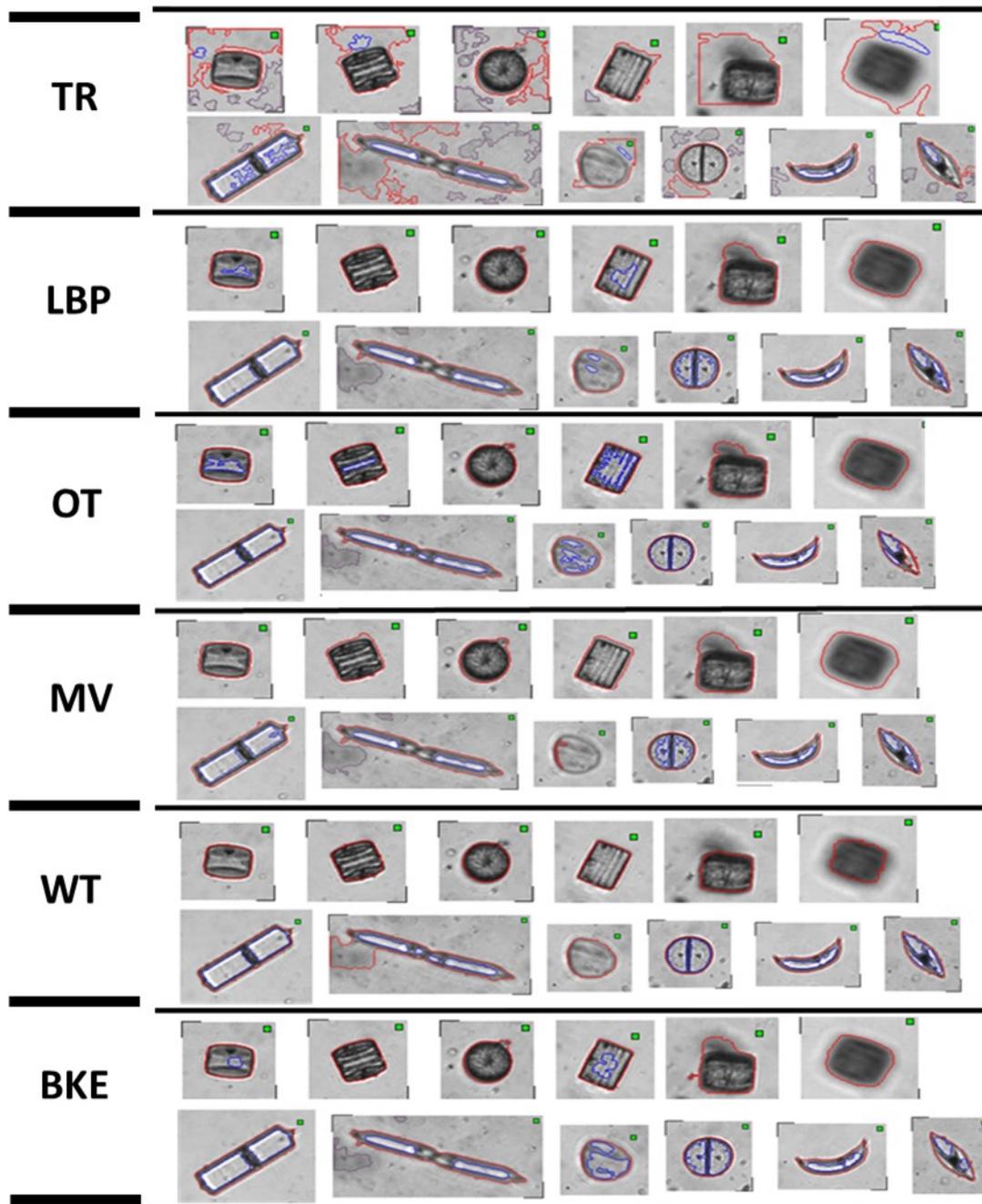
## COPEPODO



**Figura 29: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS à classe Copepodo.**

O algoritmo Watershed foi o mais adequado para as *Coscinodiscus* sp. do grupo Diatomaceas (Figura 30), tendo sido o único que detectou corretamente apenas o organismo na quinta imagem, sem influência de ruídos. Apesar disso, os demais métodos, exceto Triangle, forneceram bons resultados para as outras vinhetas. Em relação às diatomáceas penadas (Figura 30) na segunda imagem Watershed segmentou uma mancha junto com o organismo, isso porque ele considera o ponto mais escuro da imagem e a partir dele detecta a área ao redor com intensidade semelhante; já os demais métodos funcionaram corretamente para esse caso. Mode value não foi capaz de selecionar o organismo da terceira imagem e Otsu não contornou corretamente a partícula da última foto. Background Extraction e a abordagem LBP segmentaram corretamente todas as imagens, sugerindo que são as técnicas mais adequadas para segmentar diatomáceas penadas.

## DIATOMÁCEA



**Figura 30: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis do LLS à classe Diatomáceas.**

No caso de Penilia (Figura 31) na segunda imagem apenas o Mode Value contornou corretamente o organismo, selecionando inclusive a porção transparente deste. O método Triangle foi capaz de detectar esta mesma área da imagem, mas a presença de ruídos incorreu em resultados errôneos. A quinta vinheta foi segmentada corretamente pelos métodos Mode

Value e Background Extraction e na última vinheta o Mode Value foi o que apresentou melhor resultado, embora não tenha circundado a porção transparente do objeto. Nenhum dos algoritmos segmentou perfeitamente todas as partículas, mas o Mode Value foi considerado o mais adequado para a presente classe.

## PENILIA

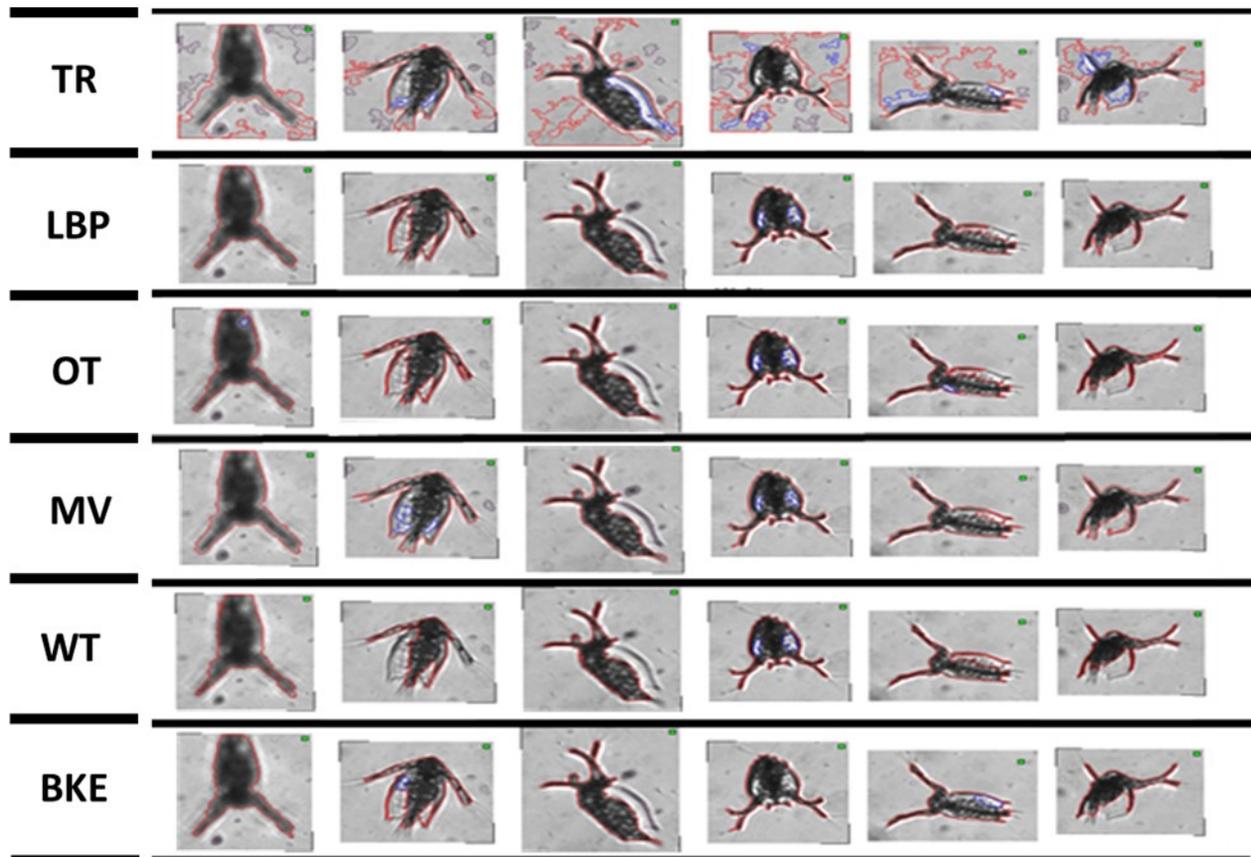
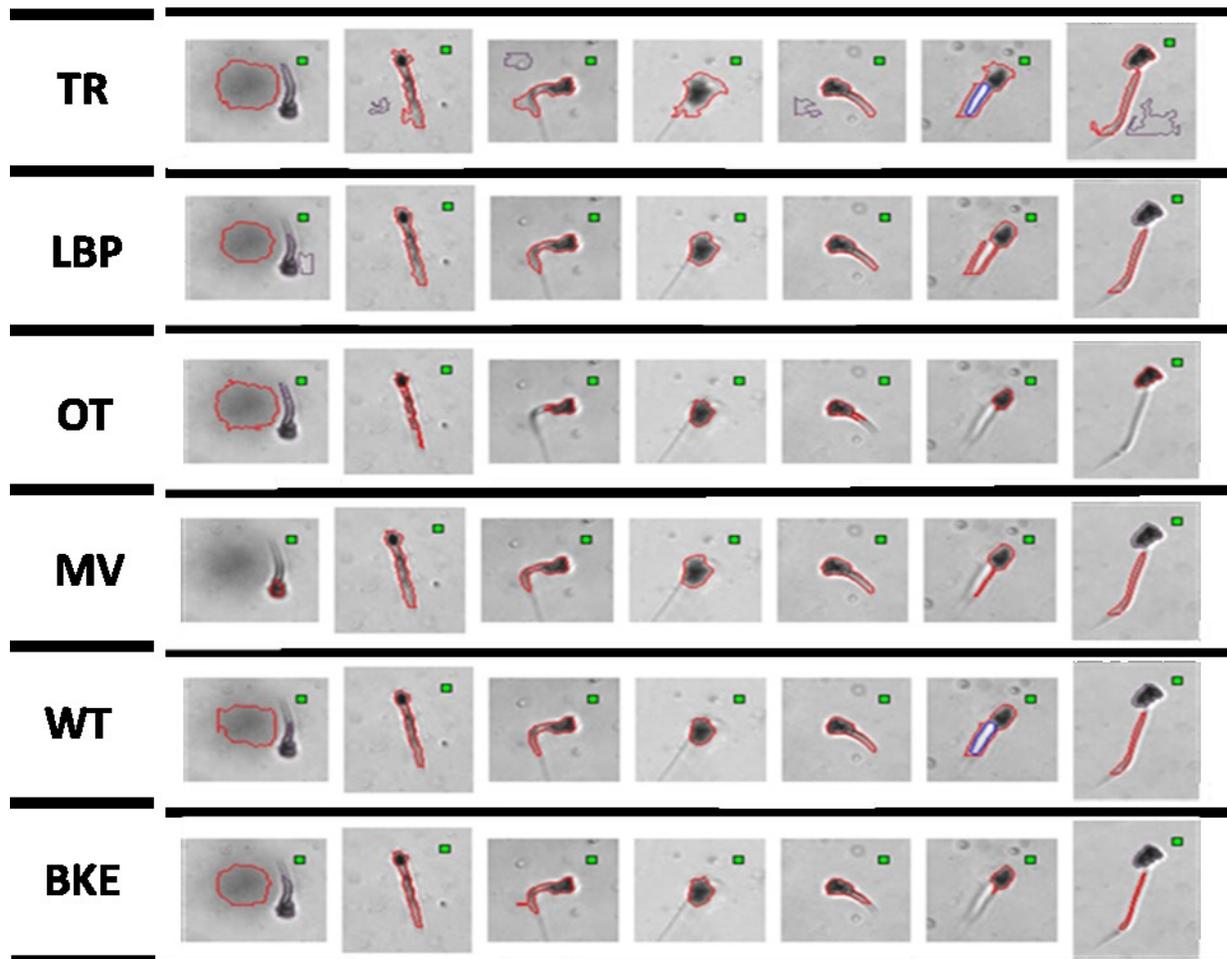


Figura 31: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS à classe Penilia.

Identificar corretamente o grupo *Tontonia* é um grande desafio por se tratar de organismos com uma coroa ciliar de alta intensidade e uma cauda extremamente fina, quase transparente. Na primeira vinheta da figura 32 todos os métodos segmentaram a mancha ao invés do organismo, exceto o Mode Value, mas este contornou apenas a coroa ciliar. O algoritmo Otsu da terceira até a sétima imagem não foi capaz de selecionar a cauda dos organismos (um apêndice contrátil observado neste gênero), apenas a estrutura da coroa. Background Extraction, Mode Value, Watershed e LBP na terceira imagem conseguiram identificar parte da cauda e a coroa, e os três últimos algoritmos obtiveram sucesso

processando a quinta vinheta. Na sexta e sétima imagens apenas Triangle e Watershed segmentaram perfeitamente o organismo, mas esse último não teve boa performance para a primeira imagem. Tendo em vista os resultados do teste, Mode Value parece ter sido o método com melhor capacidade de segmentação deste grupo.

## TONTONIA



**Figura 32: Resultado da aplicação dos métodos de segmentação disponíveis no LLS ao grupo Tontonia.**

O experimento qualitativo aplicando seis algoritmos de segmentação a sete diferentes classes de organismos sugeriu que Mode Value foi o algoritmo mais adequado para Copepoda, Appendicularia, Ceratium, Cnidaria, Penilia e Tontonia, o método de Watershed forneceu os melhores resultados para Coscinodiscus, e LBP e Background Extraction indicaram serem os mais apropriados para detectar as diatomáceas penadas. Considerando que o software LLS permite ao usuário selecionar apenas um método de

segmentação para o conjunto de amostras (projetos) a ser analisado, definiu-se que no estudo de caso apresentado a seguir seria usado Mode Value, por ter respondido melhor a um maior número de classes.

A definição do método de segmentação ainda foi complementada por resultados quantitativos sobre o número total de partículas segmentadas e a média e desvio padrão do eixo maior dos objetos para cada método, aplicado a 9 diferentes classes. A Figura 33 mostra que os 6 algoritmos conseguiram segmentar praticamente o mesmo número de organismos em todas as classes, a única diferença significativa foi a menor quantidade de detritos desfocados detectados pelo Mode Value, em torno de 850 objetos, enquanto os demais algoritmos detectaram mais de 1200 vinhetas. Este resultado fortalece a idéia de que o Mode Value é a técnica mais adequada, uma vez que detritos desfocados incorrem em erros nas medidas de forma, portanto é desejável que sejam excluídos nos estudos morfométricos ou estudos de abundância por intervalo de tamanho.

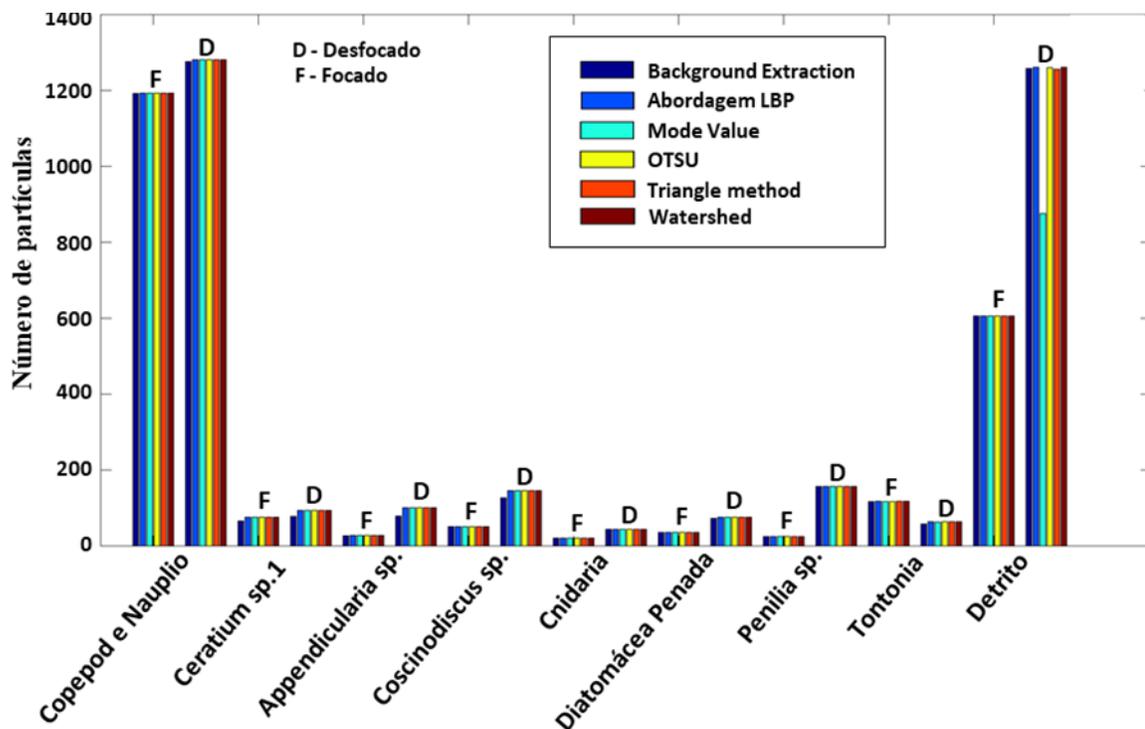
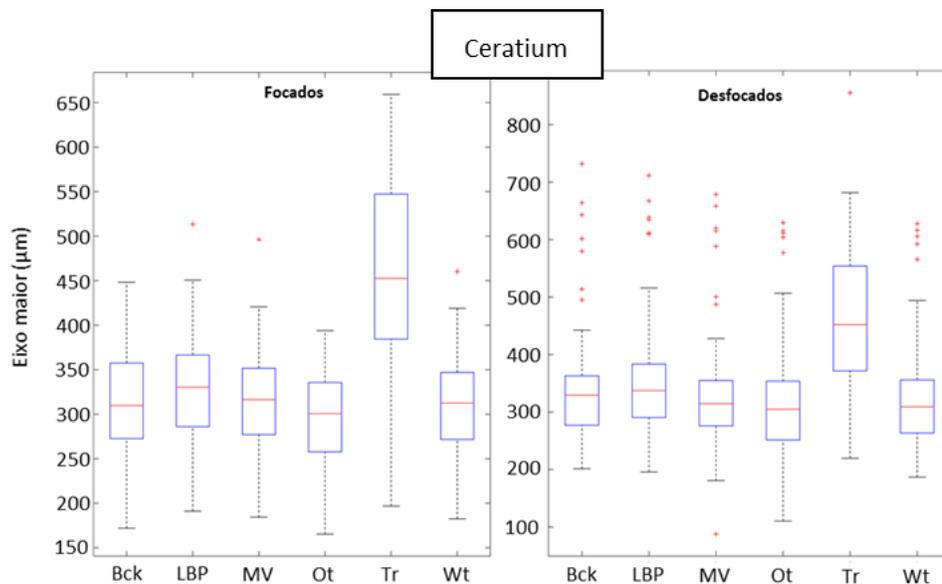
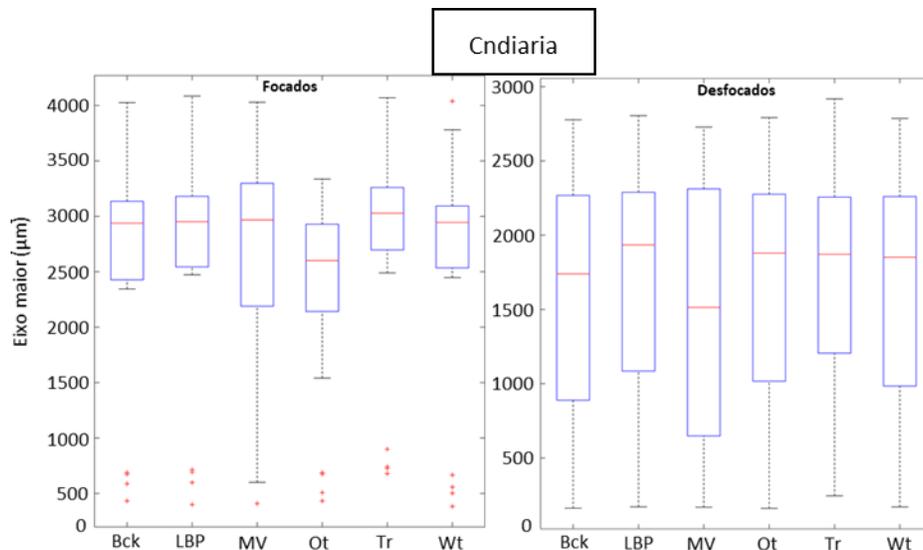


Figura 33: Número total de partículas detectadas em cada método de segmentação disponível no LLS, baseado em um experimento de segmentação de um projeto reunindo 8 vídeos classificados manualmente.

A comparação entre as medidas do eixo maior dos organismos desconsiderou a classe Appendicularia, devido ao baixo número de organismos presentes. As figuras a seguir representam a mediana (linha vermelha), o desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul) da medida do eixo maior das partículas para cada classe de partículas e para cada método de segmentação, sendo Background Extraction, abordagem LBP, Mode Value, Otsu, Triangle e Watershed. Os resultados da classe Ceratium (Figura 34) mostram que Triangle foi o único diferente dos demais porque, como mencionado na análise qualitativa, ele segmenta ruídos junto com os organismos. A mediana do método LBP foi superior às outras, possivelmente por detectar manchas e os valores de Otsu foram abaixo da média pois trata-se de um método que não detecta muitos detalhes no processo de segmentação. Estes padrões também ocorreram no estudo qualitativo.



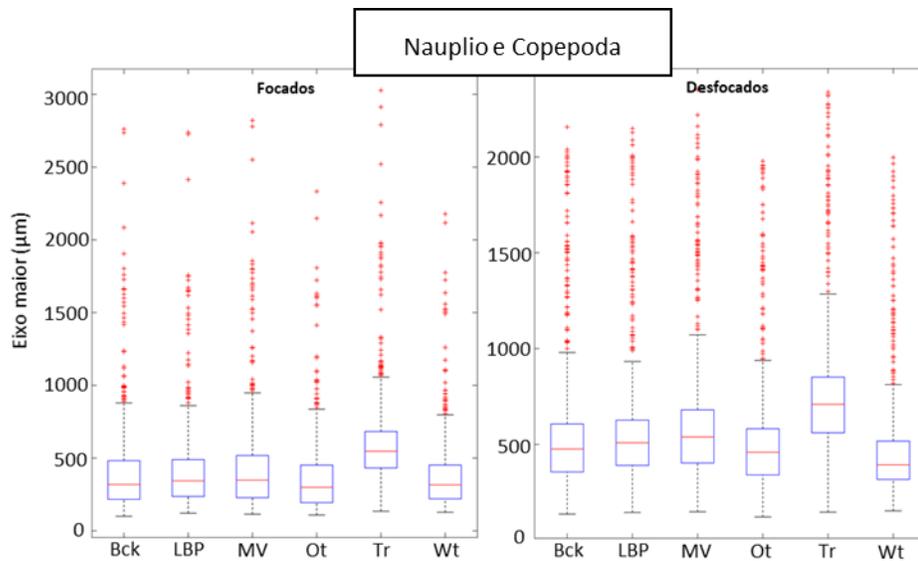
**Figura 34: Medidas do eixo maior das partículas da classe Ceratium para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV - Mode Value; Ot - Otsu; Tr - Triangle e Wt - Watershed.**



**Figura 35: Medidas do eixo maior das partículas da classe Cnidaria para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot – Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.**

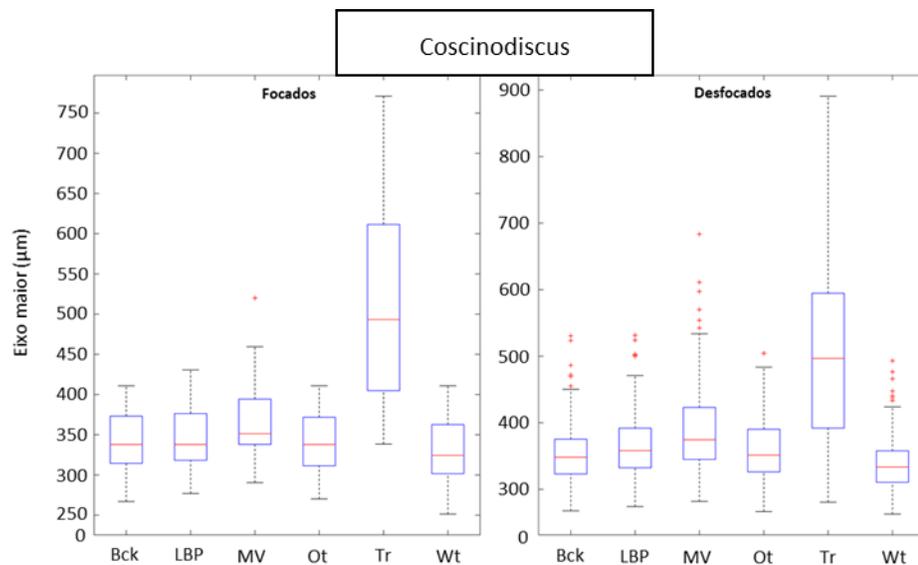
O grupo Cnidaria (Figura 35) revelou valores menores de tamanho para o método de Otsu na categoria focados, possivelmente por delinear menos detalhes, além de uma variação maior no algoritmo Mode Value, pois foi o único capaz de segmentar os organismos por completo. Em relação às partículas desfocadas, a performance das seis técnicas foi semelhante, possivelmente por se tratarem de vinhetas com contorno pouco definido. Nenhuma das técnicas apresentou diferenças das demais quando considerados os valores da mediana e os limites do desvio padrão.

A Figura 36 representa a classe Nauplio e Copepodo, para a qual todos os algoritmos funcionaram de maneira similar. Otsu e Watershed geraram medianas menores que as demais, pois não capturam detalhes como antênulas, como mostra a terceira imagem do teste qualitativo (Figura 29). Em contrapartida, as dimensões do algoritmo Mode value ficaram levemente acima das outras quatro técnicas, pois segmenta o organismo por completo.



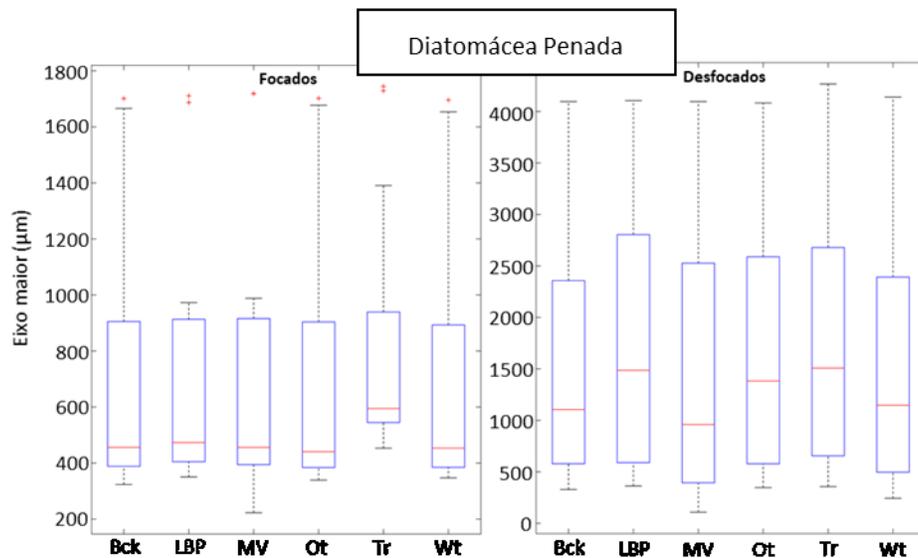
**Figura 36: Medidas do eixo maior das partículas da classe Nauplio e Copepoda para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot – Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.**

No grupo Coscinodiscus (Figura 37), todas as segmentações foram semelhantes, exceto por Triangle, inclusive para as partículas desfocadas, pois a forma desses organismos varia pouco, mesmo fora de foco. O algoritmo Watershed gerou as menores medianas. Conforme visto no teste qualitativo, este algoritmo não segmentou o ruído presente na vinheta e excluiu áreas de baixo contraste, como as bordas dos objetos desfocados.



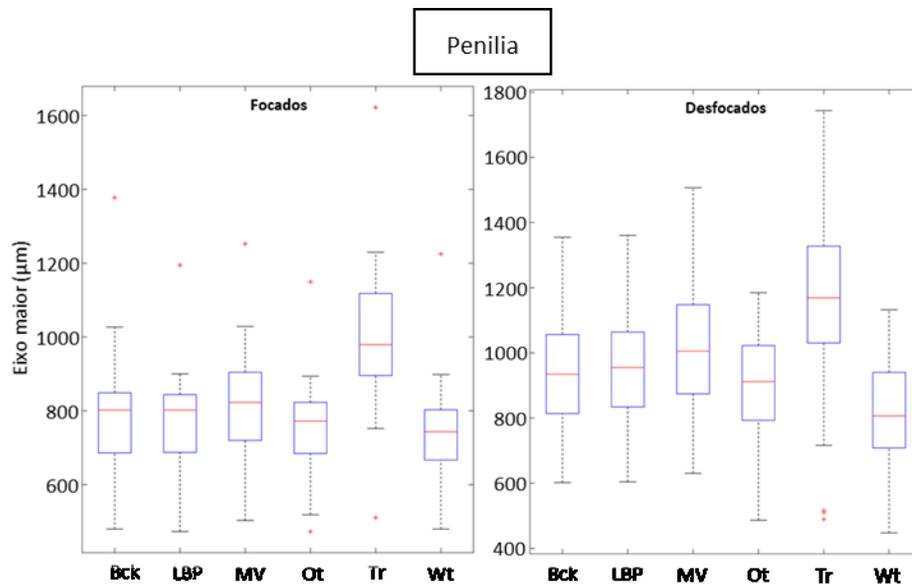
**Figura 37: Medidas do eixo maior das partículas da classe Coscinodiscus para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot – Otsu; Tr-Triangle e Wt – Watershed.**

Os seis métodos de segmentação forneceram resultados próximos na classe Diatomácea Penada (Figura 38) tanto focados como para desfocados. Para essa segunda categoria a variação foi muito maior, dado que ruídos provenientes do objeto desfocado incorrem em erros nas medidas de tamanho, principalmente por serem objetos com um certo grau de transparência.



**Figura 38: Medidas do eixo maior das partículas da classe Diatomácea Penada para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.**

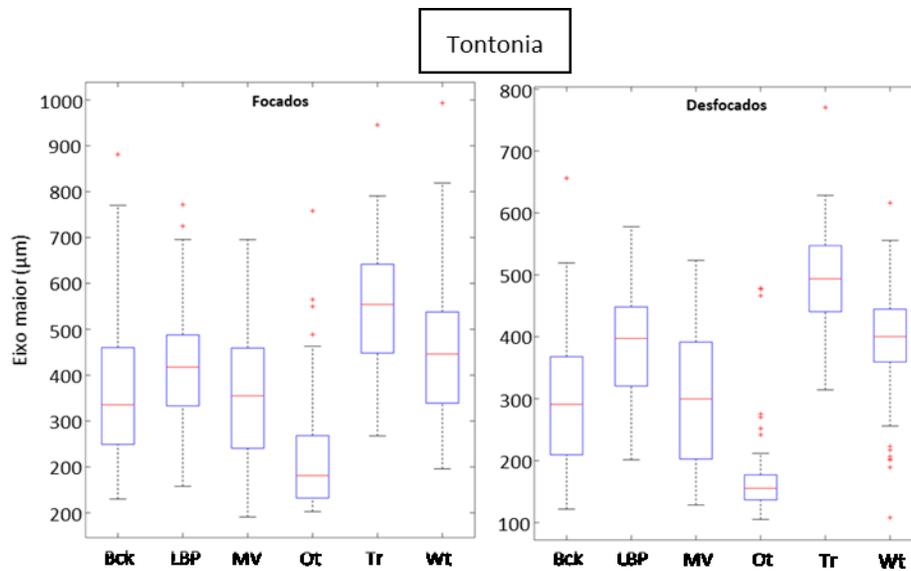
As medidas da classe Penilia (Figura 39) possibilitaram inferir que as medianas geradas por Mode Value e Triangle foram maiores porque são capazes de detectar detalhes transparentes, mas lembrando que o segundo método inclui muitos ruídos como resultados. Com exceção do método Triangle, todos os outros foram semelhantes, com os valores das medianas dentro do intervalo desvio padrão, tanto para focados como para desfocados.



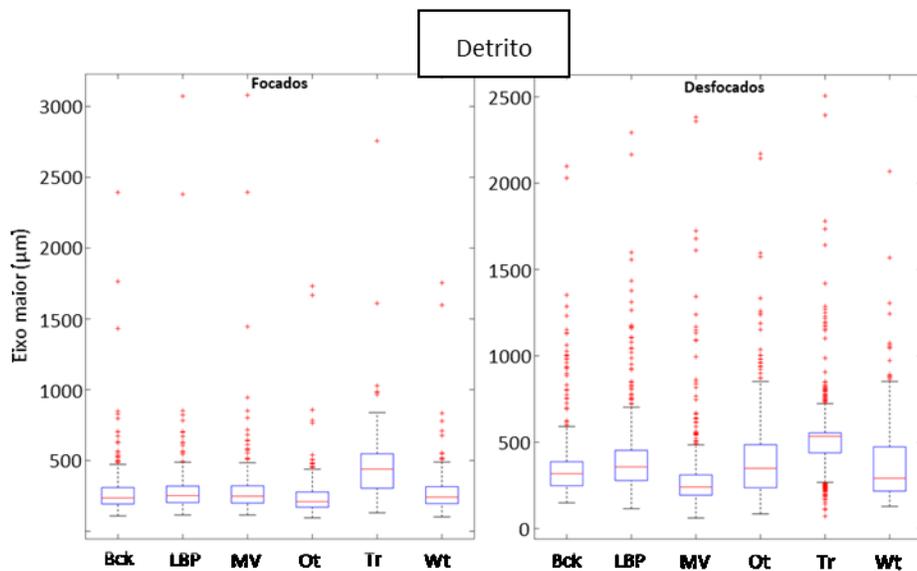
**Figura 39: Medidas do eixo maior das partículas da classe Penilia para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.**

Os dados da categoria Tontonia (Figura 40) tiveram as maiores variações entre os métodos, possivelmente devido à dificuldade em segmentar a cauda desses organismos, como indicado no estudo qualitativo. O método de Otsu resultou na menor mediana, pois nem sempre segmentou o organismo por inteiro, oposto aos métodos Triangle, Watershed e LBP, que foram mais adequados por resultarem nas maiores medianas.

Os métodos de segmentação aplicados aos Detritos (Figura 41), com exceção do Triangle, não tiveram diferenças significativas, com valores da mediana próximas entre si, principalmente na categoria dos objetos focados. As variações presentes nos detritos desfocados resultam da sensibilidade de cada método para detectar ruídos, como manchas, ou de sua limitação para distinguir entre o objeto e o fundo (background).



**Figura 40:** Medidas do eixo maior das partículas da classe Tontonia para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.



**Figura 41:** Medidas do eixo maior das partículas da classe Detrito para cada algoritmo de segmentação. Mediana (linha vermelha), desvio padrão (linhas pontilhadas em cinza) e a área contendo 50% dos valores (área em azul). Bck - Background Extraction; LBP - abordagem LBP; MV -Mode Value; Ot - Otsu; Tr-Triangle e Wt - Watershed.

O teste quantitativo com os diferentes métodos de segmentação sugeriu que, com exceção do método Triangle, todos os demais não geraram diferenças relevantes nas métricas de forma estudadas, quando aplicados aos grupos Ceratium, Cnidaria, Nauplio e Copepoda, Coscinodiscus, Diatomácea Penada, Penilia e Detrito. Apenas na classe Tontonia foi observada uma elevada discrepância entre Otsu, Triangle e Watershed. Em relação ao

número total de objetos segmentados houve divergência apenas para o algoritmo Mode Value, no caso de Detritos desfocados. Os resultados desse teste deram suporte aos resultados da análise qualitativa. O fato de Mode Value ter excluído mais detritos desfocados do que as demais técnicas corroborou para defini-la como a estratégia mais adequada para a segmentação das partículas adquiridas no presente estudo.

O último teste com o LLS foi realizado para definir a melhor configuração da biblioteca. Foram construídas bases de treinamento com 15, 12 e 9 classes (Tabela 7), testadas com 400, 300, 200 e 100 organismos por categoria. O resultado da acurácia da validação cruzada de cada um dos testes é apresentado na Tabela 8.

**Tabela 7: Classes dos modelos com 15, 12 e 9 categorias, aplicados no teste para definição da base de treinamento a ser usada no LLS.**

Modelo com 15 Classes	Modelo com 12 Classes	Modelo com 9 Classes
Appendicularia	Appendicularia	Appendicularia
Bastão	Bolhas	Ceratium sp.
Bolhas	Ceratium sp.	Cnidaria
Ceratium sp.	Cnidaria	Copepodo
Cnidaria	Copepodo	Detrito
Copepodo	Detrito	Diatomáceas
Coscinodiscus	Diatomáceas	Filamentos
Detrito	Filamentos	Larva_Poliqueta
Diatomáceas	Larva_Poliqueta	Penilia
Filamentos	Nauplio	
Larva_Poliqueta	Penilia	
Manchas	Tontonia	
Nauplio		
Penilia		
Tontonia		

A biblioteca com 15 classes alcançou o maior valor de acurácia entre os três modelos nos testes com 100, 200 e 400 organismos por categoria, correspondendo a 83,6, 86,5 e 86,8%, respectivamente. Quando analisadas as bibliotecas com 300 organismos por classe, a melhor performance foi com 9 grupos, com classificação correta de 86,8% do total dos

objetos. Fazendo uma comparação entre os métodos com mesmo número de grupos, fica evidente que, para 15 categorias, a maior acurácia foi obtida para a configuração de 400 objetos por grupo. Nos casos com 9 e 12 categorias o melhor resultado foi alcançado para classes com 300 organismos. A biblioteca escolhida para ser aplicada na classificação automática do estudo de caso teve acurácia de 86,8%, o maior valor entre as 12 opções estudadas, e foi composta por 9 classes com 300 organismos em cada uma.

**Tabela 8: Valores da acurácia de cada modelo de biblioteca testado, obtidos por validação cruzada. As bordas pretas do quadrado demarcam os maiores valores entre bibliotecas com o mesmo número de classes. Os números com dois traços em volta são os maiores valores de acurácia quando comparando bibliotecas com o mesmo número de organismos em cada classe. O número em negrito se refere a maior acurácia dentre todas as opções estudadas.**

Número de Classes	Número de Organismos por Classe	Acurácia (%)
15	400	-86,81-
15	300	85,11
15	200	-86,48-
15	100	-83,63-
12	400	85,25
12	300	86,48
12	200	84,45
12	100	82,08
9	400	86,09
9	300	<b>-86,82-</b>
9	200	85,17
9	100	81,49

A validação cruzada baseada em Random Forest com maior acurácia (86,8%) extraiu 43 parâmetros de forma e textura, tendo classificado corretamente 2344 imagens de um total de 2700. A matriz de confusão resultante (Figura 42) mostra a relação entre as classes validadas (A0 a I0) e os objetos classificados na validação cruzada (a0 a i0), evidenciando que a maior taxa de acerto foi nas classes Ceratium, Diatomáceas e Filamentos, enquanto que a principal fonte de erros foi o grupo detritos, com o menor índice de acerto de todo o teste (62%). Tais partículas foram confundidas principalmente com Copepodos (16%) e Appendicularias (11%).

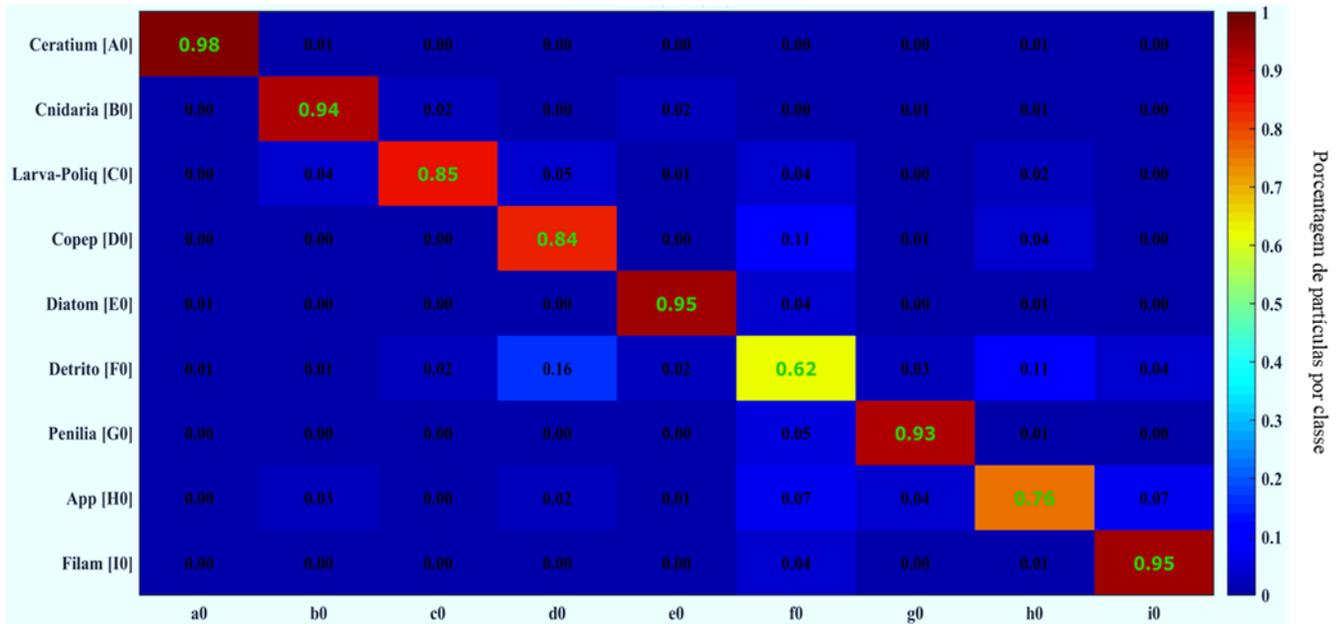


Figura 42: Matriz resultante da validação cruzada da biblioteca selecionada para ser usada no estudo de caso com acurácia global de 86,8%.

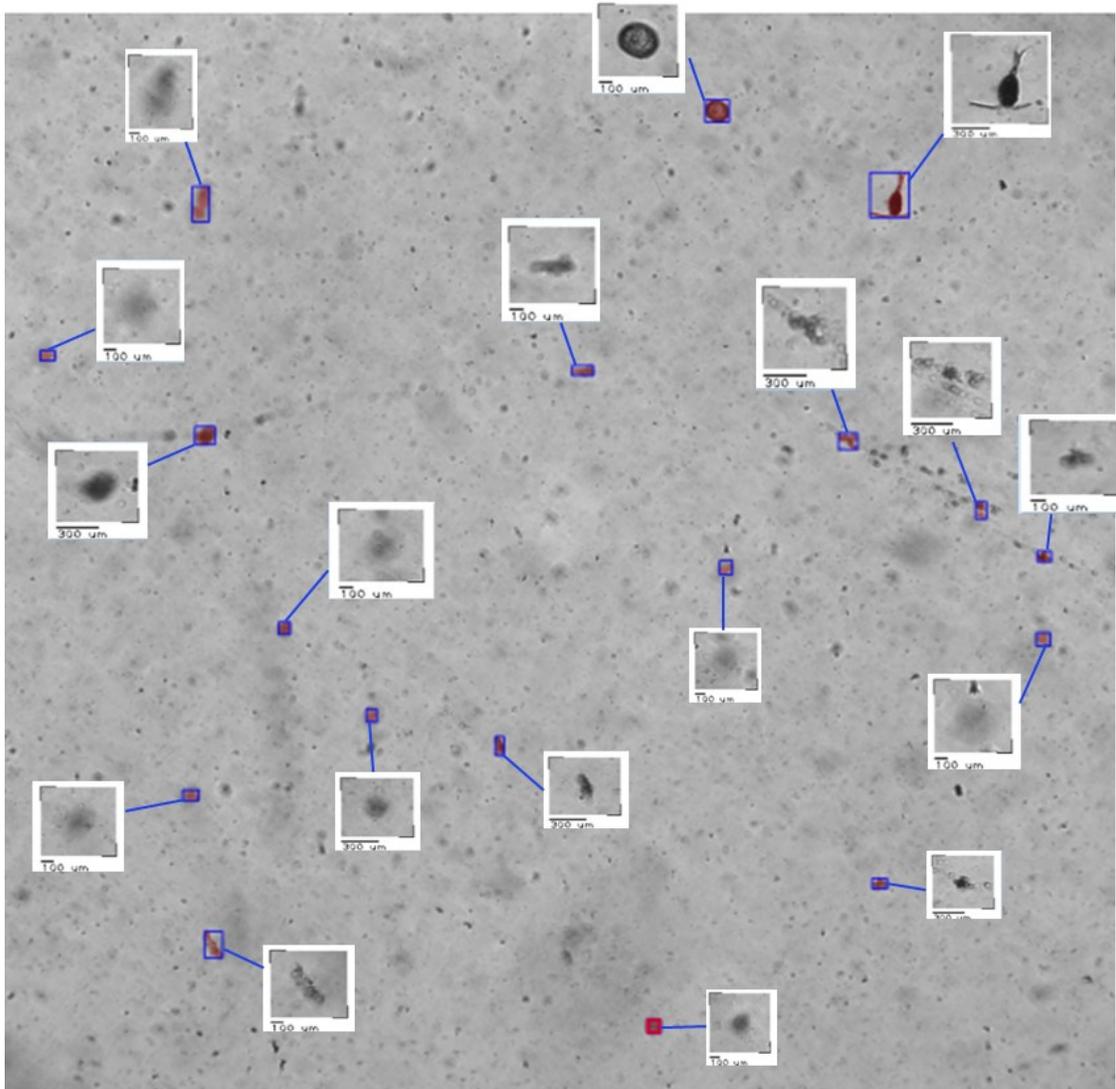
## 4.2. ESTUDO DE CASO – DINÂMICA DE PARTÍCULAS

O equipamento de imageamento acionado pelos programas LCR e LSDR funcionou satisfatoriamente, adquirindo imagens de qualidade (Figura 43) sem sofrer influência da iluminação externa, na frequência correta configurada pelo operador e salvando os dados no formato desejado.



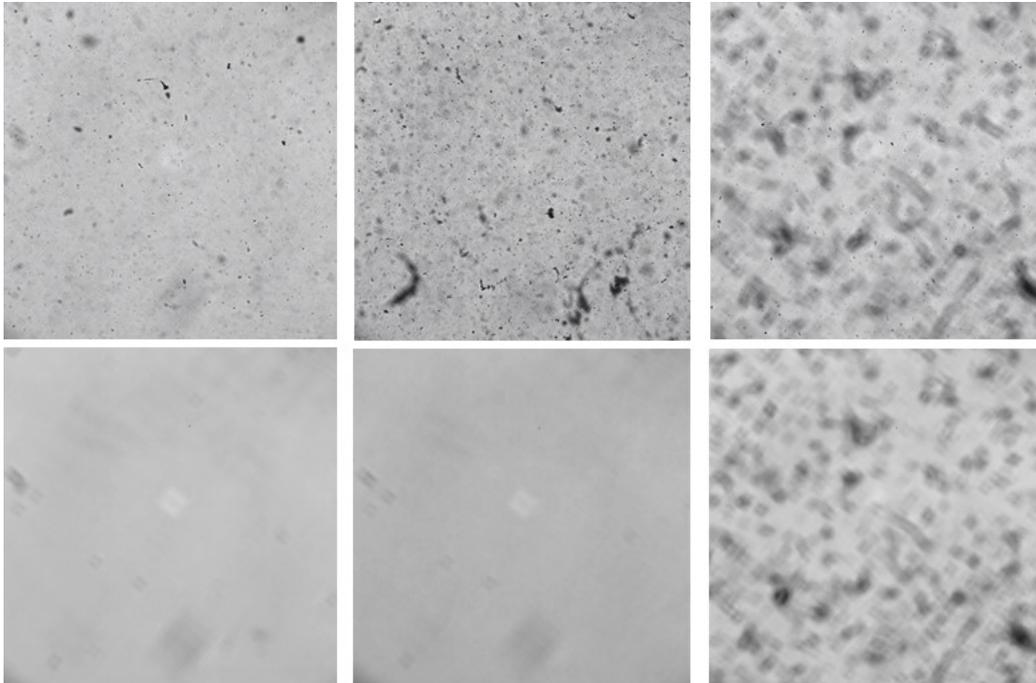
Figura 43: Amostra de imagens obtidas pelo sistema de imageamento in situ.

O LPD também apresentou boa performance usando os filtros de tamanho e contraste definidos. Foram extraídas todas as regiões de interesse de cada frame (Figura 44), excluindo as partículas muito pequenas e reduzindo em torno de 80% o número de manchas segmentadas.



**Figura 44: Exemplo de resultado fornecido pelo LPD. Imagem do frame original e das vinhetas extraídas a partir dele.**

O método de Background Extraction foi escolhido no LPD por ser capaz de remover ruídos estáticos das imagens. A Figura 45 mostra que a função foi executada com êxito. As imagens do lado esquerdo indicam que na ausência de ruído estático o fundo ficou claro e sem partículas. O exemplo do meio mostra que mesmo com alta concentração de objetos se os visores estiverem limpos esses objetos não são considerados como parte do fundo e resultam em vinhetas segmentadas. A figura da direita representa um exemplo de quadro com alta presença de ruído estático e seu respectivo fundo, mostrando que a grande maioria dos ruídos estáticos foi removida do processo de segmentação.



**Figura 45: Exemplo de como o Background remove ruídos estáticos no processo de extração de ROI's pelo LPD. As figuras superiores representam exemplos de frames originais e as inferiores seus respectivos backgrounds.**

Todas as ferramentas do LLS funcionaram satisfatoriamente, permitindo ao usuário criar um novo projeto, alocar as vinhetas em pastas, montar a base de treinamento, obter a validação cruzada e realizar a classificação automática.

A biblioteca composta por 9 classes com 300 organismos em cada uma, apontada pelo teste dos softwares como a mais acurada, foi aplicada a um projeto contendo os 8 vídeos utilizados nos testes do LPD e LLS e o resultado da classificação automática foi comparado ao da validação manual (Figura 46). A matriz de confusão a seguir mostra a porcentagem de organismos classificados em cada categoria, sendo que a diagonal representa os objetos classificados corretamente. Os nomes grifados indicam os grupos que fazem parte da base de treinamento enquanto os nomes não grifados se referem às classes pertencentes ao projeto que não estavam incluídas na biblioteca.

Analisando a matriz de confusão nota-se que os grupos com maiores índices de acerto foram Copepoda e Diatomácea, com 74% dos organismos tendo sido classificados corretamente, seguidos por Ceratium com 78%, Detrito 79%, Cnidária 82%, Penilia 84% e o grupo com maior precisão foi das Appendicularias, com 97%. Em contrapartida as categorias com maiores índices de erro foram Copepoda desfocados, Náuplio, Náuplio desfocado e

Véliger, dos quais respectivamente 51%, 89%, 80% e 88% dos objetos foram alocados na categoria Detrito. Os organismos do grupo Tontonia desfocado também tiveram uma alta porcentagem de organismos classificados erroneamente, com 35% identificados como detrito e 38% como Appendicularia. Em relação à Tontonia, 41% delas foram classificadas como Appendicularia e 35% como filamento. O grupo Larva\_Poliqueta teve 97% de seus indivíduos classificados como Copepoda, enquanto que 78% dos Chaetognata desfocado e 100% dos focalizados foram categorizados como Filamento. Houve casos em que a classificação diferiu da validação manual, mas houve casos de organismos das classes desfocadas serem classificados como focalizados em suas respectivas categorias. Isso ocorreu em 71% das diatomáceas, 80% de Appendicularias, 69% de Ceratium e 58% do grupo Cnidaria, o que contabilizou no cálculo da acurácia como erro, mas se tratam de classificações corretas. A acurácia global da classificação automática foi de 27%, porém é preciso ponderar que a biblioteca não possuía exemplares de alguns grupos encontrados no projeto classificado. Se computássemos os desfocados que foram categorizados corretamente a acurácia aumentaria para 47% e no caso de o projeto conter apenas as mesmas classes da biblioteca a acurácia atingiria 75%.

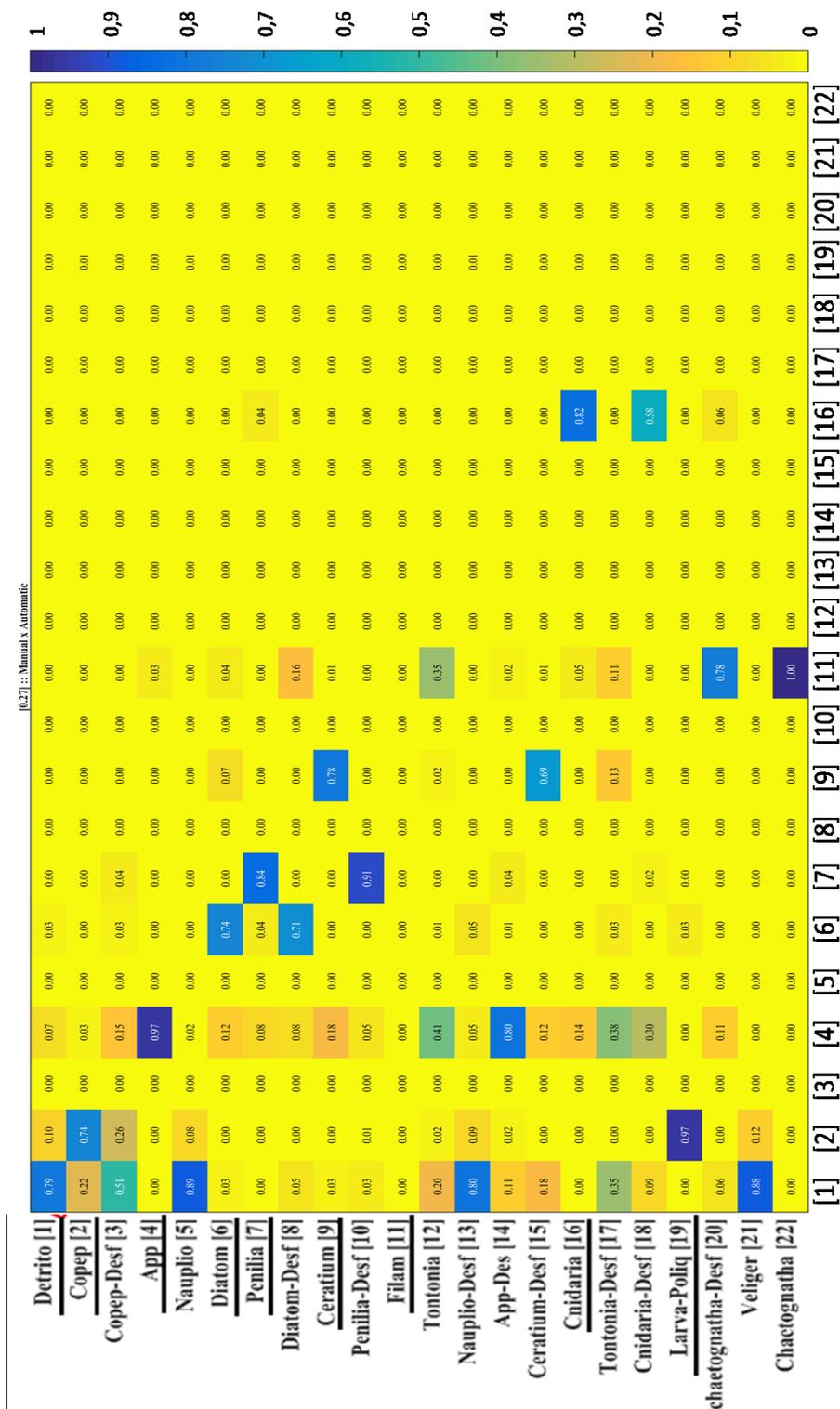


Figura 46: Matriz de confusão comparando os resultados da classificação manual aos da automática, aplicada a um projeto contendo os oito vídeos utilizados nos testes do LPD e LLS.

Considerando o erro proveniente da acurácia da classificação automática e sua propagação na extrapolação da abundância obtida em um mililitro para milhares de metros cúbicos, o valor de 27% resultante da classificação automática do presente teste indica que esse método ainda necessita ser melhorado antes de sua aplicação a uma quantidade massiva de dados. Diante desse cenário, decidiu-se por considerar todos os objetos como sendo partículas e estudá-los em três diferentes ranges de tamanho ( $<385 \mu\text{m}$ ;  $385\text{-}620 \mu\text{m}$ ;  $>620\mu\text{m}$ ), correlacionando-os aos parâmetros ambientais.

A Figura 47 apresenta todos os dados, ambientais e de partículas, obtidas no presente estudo de caso, no período compreendido entre 20 de fevereiro e 7 de Maio de 2017. Nota-se em cinza os períodos de manutenção do equipamento em laboratório, sendo que no início de março e de abril tal manutenção consistiu na retirada da bioincrustação e em março foi necessária a troca dos sensores ambientais devido a infiltração nas emendas dos fios.

A calibração dos novos sensores foi verificada utilizando um padrão sólido da Turner, o qual demonstrou que as medidas estavam de acordo com os valores dos sensores substituídos. As áreas em lilás indicam possíveis correlações entre o número total de partículas e os dados ambientais e as linhas vermelhas representam os dias nos quais o instrumento foi limpo durante os intervalos entre as filmagens.

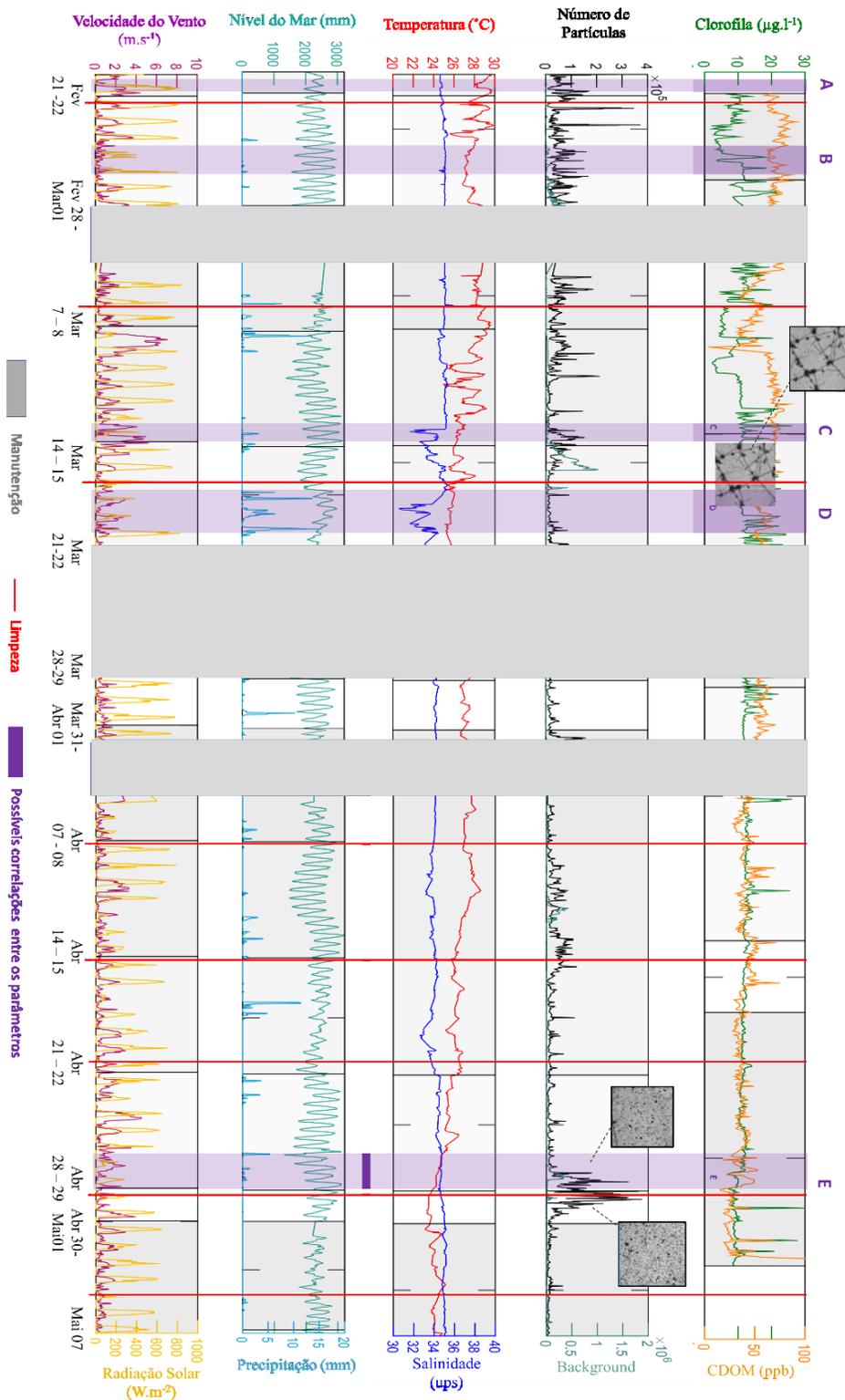
A região A mostra um aumento na concentração de partículas, assim como da temperatura e da velocidade do vento. Em B nota-se valores médios na abundância das partículas associado à redução da temperatura, da radiação solar e da velocidade do vento e grande amplitude de variação do nível do mar.

A faixa C aponta para aumento do nível médio do mar, velocidade do vento moderada e chuva, associados a uma brusca redução da salinidade e elevação da abundância de partículas. Nesse período houve também uma intensa elevação do teor de clorofila, atingindo valores máximos do sensor, e CDOM. No entanto, as imagens mostraram que o sistema estava com alto nível de incrustação, superestimando os resultados.

Em D o valor de concentração de partículas não mudou, mas o nível do mar estava acima da média e ocorreu aumento da clorofila e do CDOM associados à redução da salinidade e intensa precipitação. Neste período, possivelmente a chuva contribuiu para o aporte de material em suspensão. A área E apresentou um leve aumento de CDOM, baixa radiação solar, pouco vento, nível médio do mar elevado e grande amplitude de variação,

baixa na temperatura e uma alta concentração de partículas, possivelmente associada à entrada de uma massa de água vinda de área mais ao largo da Enseada do Flamengo.

Analisando todo o intervalo de amostragem, nota-se que os valores de CDOM tenderam a aumentar no meio da série, sendo menor no início e no final desta. A concentração de clorofila, apesar de flutuações pontuais, de maneira geral apresentou valores próximo ao longo de toda a amostragem. O número de partículas oscilou mais até a primeira metade da série; na segunda metade houve um aumento brusco dos valores no fim do mês de abril. O parâmetro background representa a quantidade de ruídos estáticos presentes em cada imagem extraída dos vídeos obtidos, seu valor elevado significa a presença de muito material aderido aos visores, o que pode influenciar nas medidas dos sensores. Tal fenômeno foi observado apenas no meio de março, durante o qual inclusive os valores de clorofila foram muito elevados. A temperatura variou entre 23 e 29 °C, com uma tendência de redução ao longo da série, o que era esperado por se tratar de uma amostragem entre o final do verão e meados do outono. A salinidade ficou próxima a 35, com três reduções significativas até 31, associados à alta precipitação. A frequência do nível do mar evidenciou os ciclos da maré semi-diurna, com sinais de sizígia e quadratura nas variações das amplitudes e indícios da influência do vento, precipitação e entrada de frentes frias nos valores máximos do nível do mar. A série de dados da velocidade do vento mostrou uma tendência a elevação dos valores durante o dia e redução no período noturno.



**Figura 47:** Série temporal de todos os dados, ambientais e de partículas, adquiridos ao longo do período de implementação do equipamento, entre 20 de fevereiro e 7 de maio. As áreas cinzas indicam os períodos no qual o instrumento foi levado para o laboratório para manutenção ou limpeza, as áreas em lilás demarcam possíveis correlações entre os parâmetros e as linhas vermelhas representam os dias nos quais o sistema foi limpo.

Os dados de abundância dos três ranges de tamanho de partículas e de suas forçantes ambientais, correspondentes ao período entre 5 de abril e 7 de maio de 2017 (Figura 48) foram tratadas para retirada dos outliers e em seguida utilizada na análise estatística. A série de 33 dias é composta pelas medidas de Clorofila-a, CDOM, abundância total de partículas por Litro e abundância em cada um dos três ranges de tamanho, Temperatura da água e do ar, Salinidade, Precipitação, Nível do Mar, Velocidade do Vento, Radiação Solar e Pressão atmosférica. Nota-se ao longo da série que, como esperado, as partículas menores foram mais abundantes que as do range 2, que superaram em quantidade os maiores agregados, pertencentes ao range 3. A partir da análise visual dos gráficos nota-se possíveis correlações entre a intensificação do vento, redução da salinidade, aumento da abundância de partículas e da Clorofila no dia 10 de abril. No dia 18 a ocorrência de alta precipitação esteve associada à elevação do número de partículas e no dia 24 a alta abundância, principalmente de partículas do range 3 acompanhou a acentuação da velocidade do vento. O fenômeno observado nos dias 28 e 29, indicado na área E da Figura 47 aponta para uma intensa elevação na pressão atmosférica acompanhada de alta concentração de nuvens, como demonstrado no gráfico da radiação solar, redução da temperatura da água e ocorrência das maiores concentrações de partícula ao longo da série. A combinação desses fatores levanta fortes indícios da entrada de uma frente fria.

Os periodogramas da série temporal de 5 de abril a 7 de maio de 2017 mostraram que a abundância total de partículas e abundância de partículas do range 1 (Figura 49) tiveram frequências de aproximadamente 0,05, 0,03 e 0,0045, sendo que apenas a menor frequência teve uma densidade espectral elevada. Tais valores correspondem a períodos de 13 horas, 22 horas e 6,2 dias, uma vez que o período é  $1/f$  e cada ciclo (1 unidade de período) corresponde a 40 minutos. A frequência de 0,0045 também foi a mais destacada nos padrões das partículas dos ranges 2 e 3 (Figura 50) e da temperatura da água (Figura 54), sendo que um pequeno aumento da densidade espectral foi notado para ambos os ranges na frequência de 0,04 (16,7 horas), para R3 em 0,052 (12,8 horas) e para temperatura da água em 0,025 (26,7 horas).

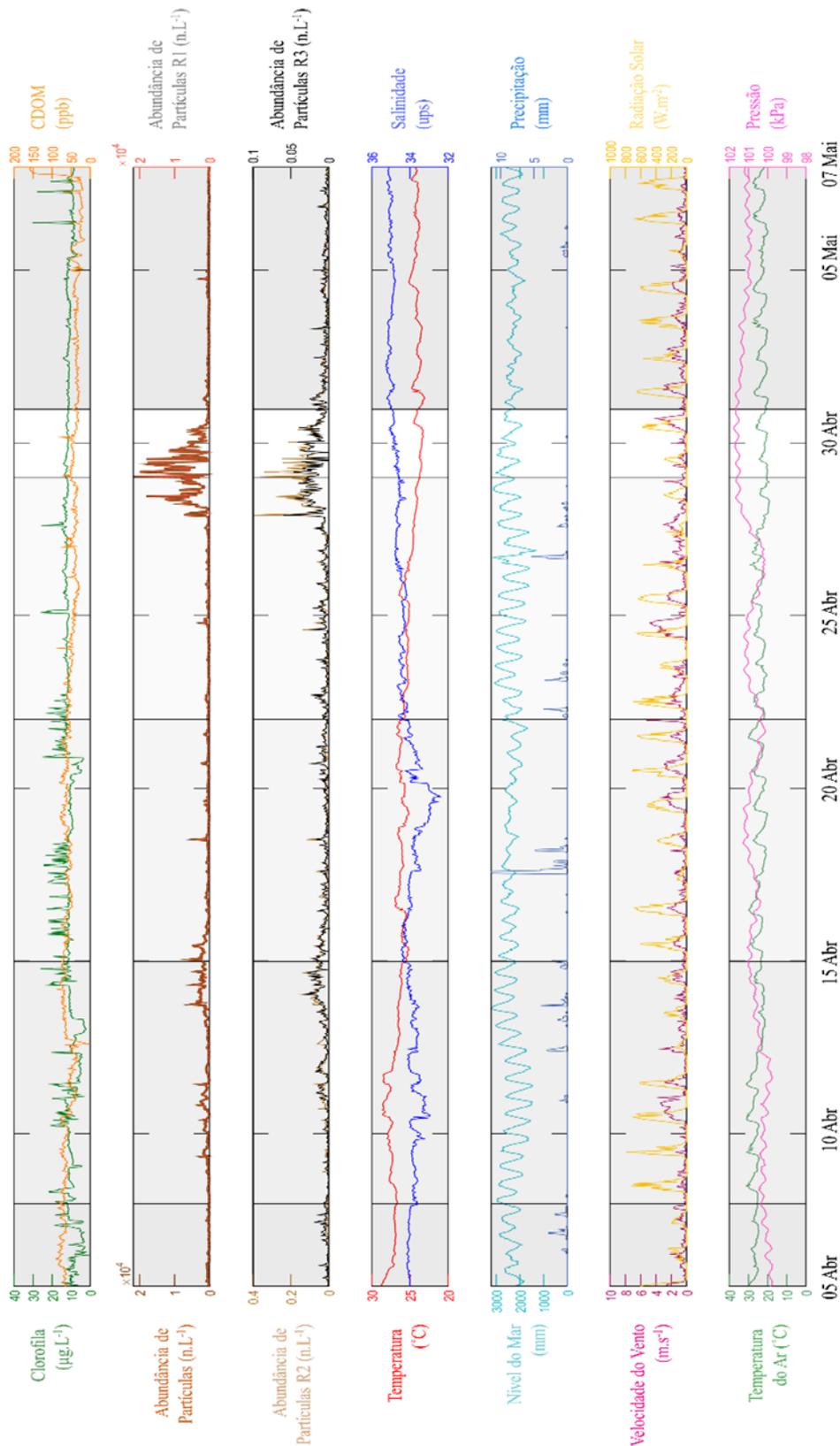
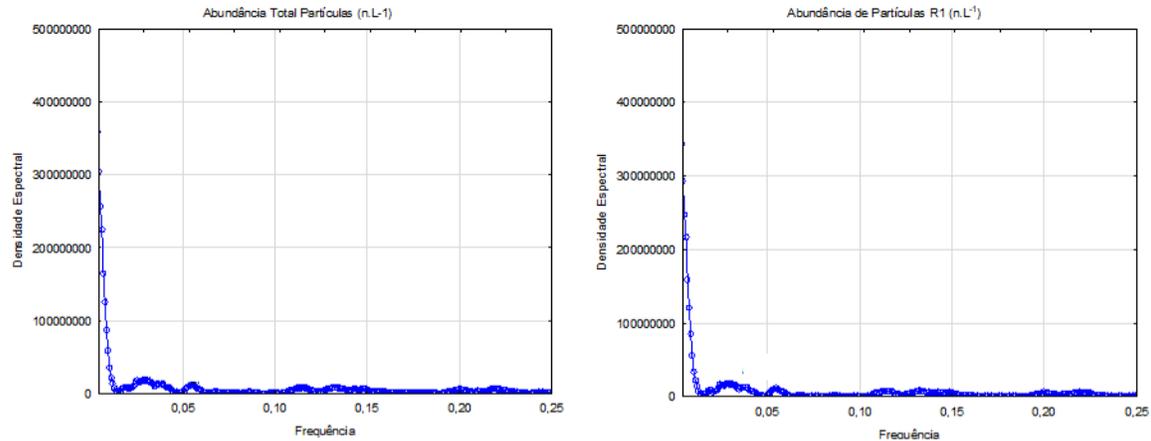


Figura 48: Dados ambientais e de partículas, sem outliers, no período entre 5 de abril e 7 de maio, utilizados na análise estatística.

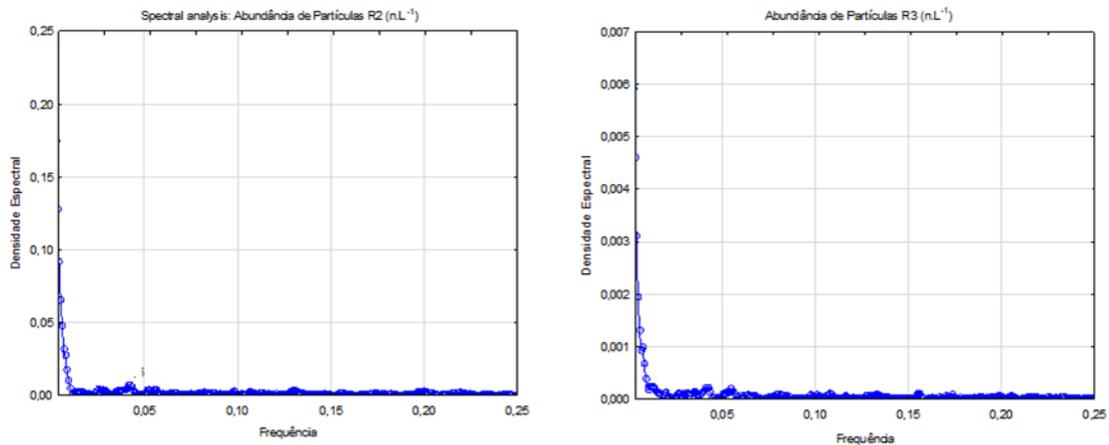
A frequência máxima dos dados de temperatura do ar (Figura 51) umidade (Figura 51), radiação solar (Figura 53) e velocidade do vento (Figura 52) foi 0,027, sendo também observada a temperatura nas frequências de 0,054 e 0,005 (13,3 horas) com densidades espectrais pequenas e médias respectivamente. O periodograma de umidade do ar mostrou 4 picos nas frequências de 0,006 (4,6 dias), 0,008, 0,019 e 0,054 (12,3 horas), enquanto o de velocidade de vento ocorreu também nas frequências de 0,006, 0,011, 0,016, 0,033, 0,037 (18 horas) e 0,054, porém com densidade espectral bastante reduzida. A radiação solar, além de ocorrer na faixa de 0,027, teve densidade espectral elevada na frequência de 0,054.

O maior pico do periodograma da pressão atmosférica (Figura 52) ocorreu na frequência de 0,005 e um pequeno sinal apareceu para 0,055. O nível do mar (Figura 53) resultou em alta densidade espectral na frequência de 0,054, média em 0,005 e pequena em 0,025. No periodograma da precipitação (Figura 54) ocorreram mais de 30 diferentes frequências com valores mais elevados, variando entre as frequências de 0,004 a 0,25 (2,7 horas), no entanto as mais expressivas foram em 0,0059, 0,038, 0,092 e 0,12 (5,5 horas). O periodograma da temperatura da água (Figura 54) indica que a variação dessa forçante está associada a uma frequência de 0,004, com um pico secundário em 0,03 (22,2 horas).

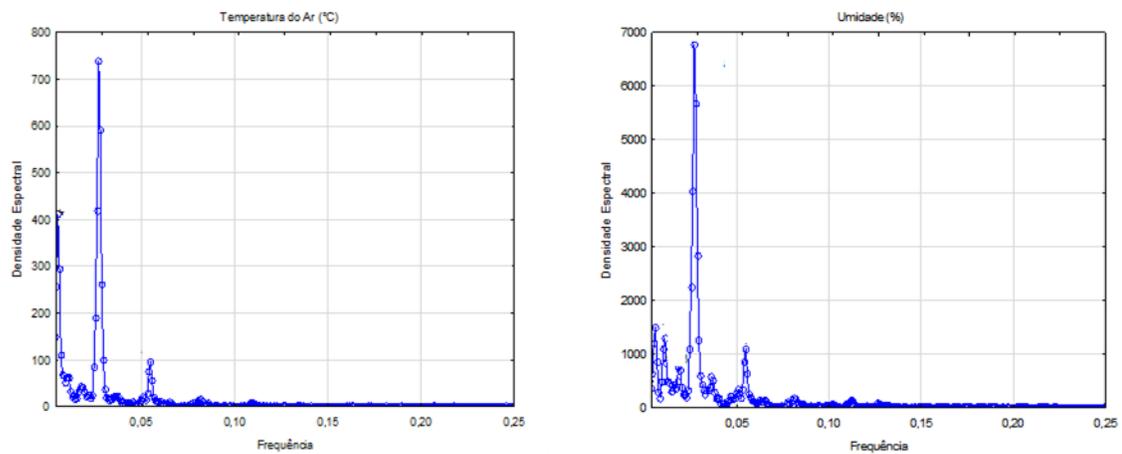
A série temporal de ficoeritrina resultou em três frequências, a mais elevada foi a de 0,0067, seguida por 0,024 e 0,057. A variação temporal de CDOM (Figura 55) resultou em frequências mais elevadas nas faixas de 0,006, 0,02, 0,03 e 0,05, embora aproximadamente 10 picos tenham sido registrados. O periodograma da salinidade apontou maior relevância das densidades espectrais para as frequências 0,0042 e 0,0093, enquanto que para o caso da clorofila-a, para a qual apareceram em torno de 23 picos de densidade, as frequências mais importantes foram 0,0042, 0,0084, 0,01, 0,02 e 0,13.



**Figura 49:** Periodograma representando a frequência das densidades espectrais da abundância total de partículas e da abundância de partículas do range 1, evidenciando ciclos de horas a dias.



**Figura 50:** Periodograma da abundância total de partículas dos ranges 2 e 3.



**Figura 51:** Gráfico de frequências e densidade espectral dos dados de temperatura do ar e umidade.

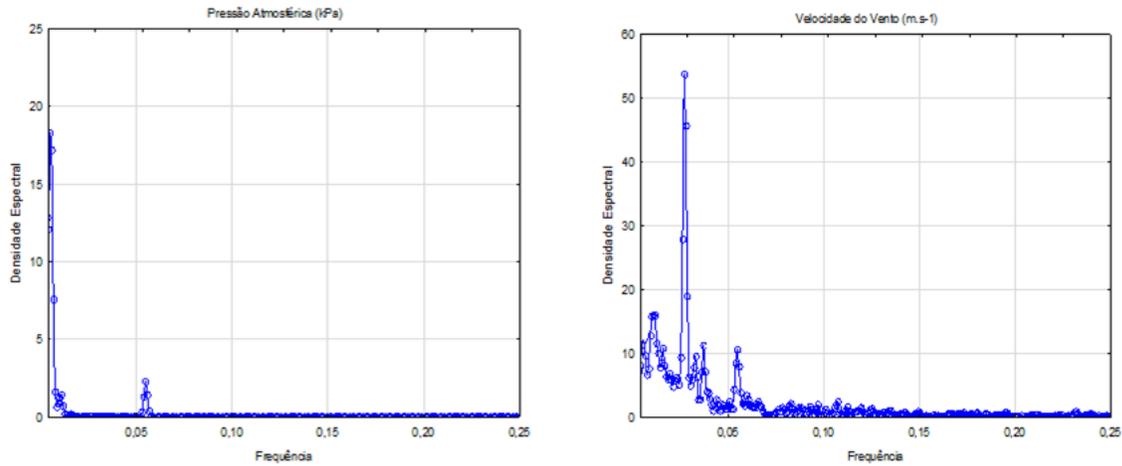


Figura 52: Gráfico de frequências da pressão atmosférica e velocidade do vento.

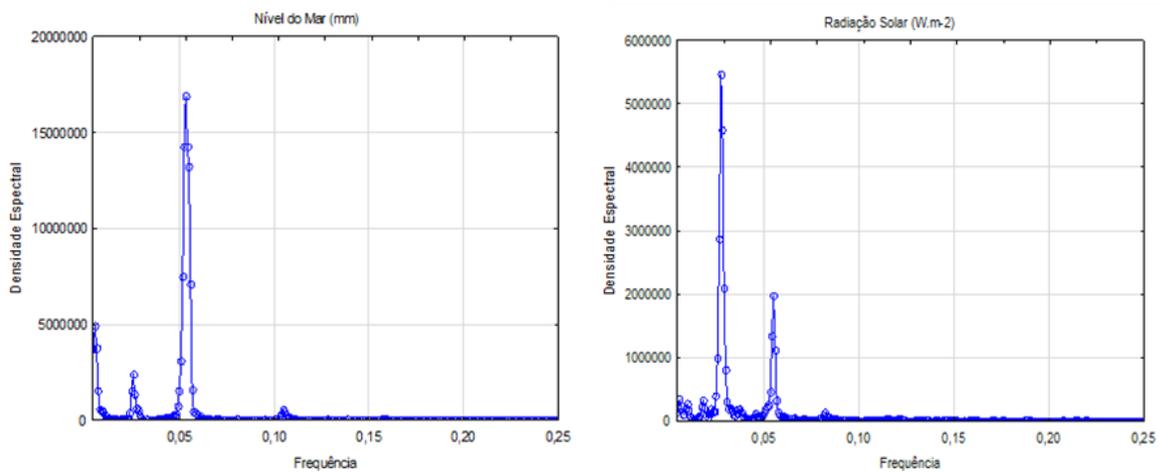


Figura 53: Periodograma da radiação solar e nível do mar.

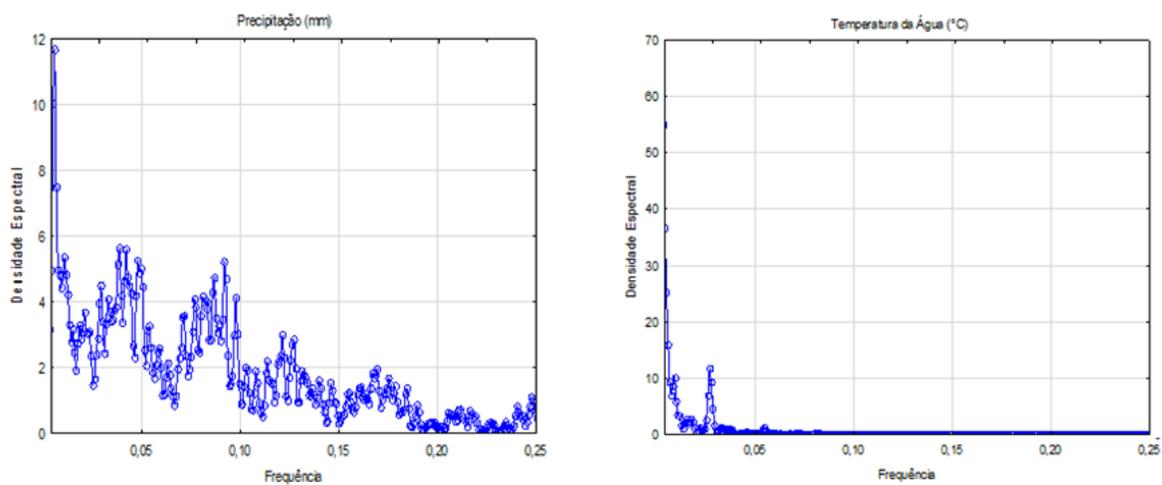
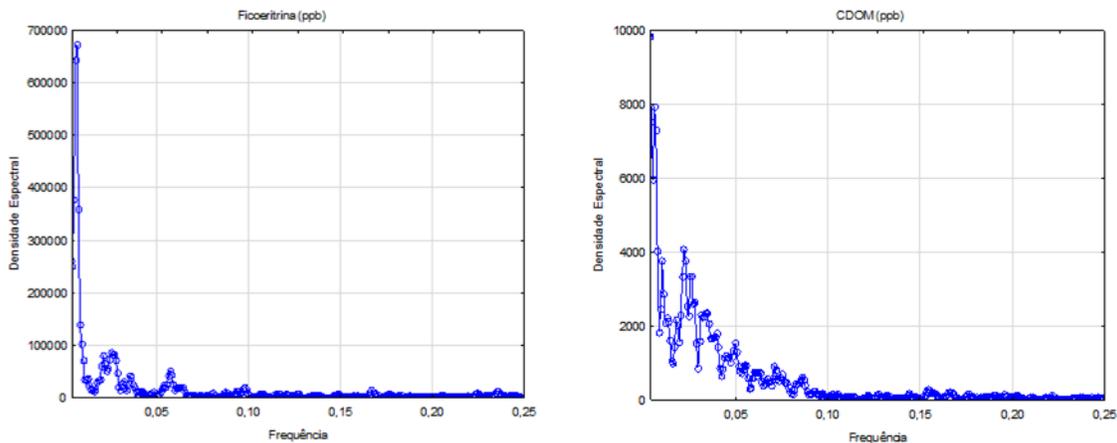
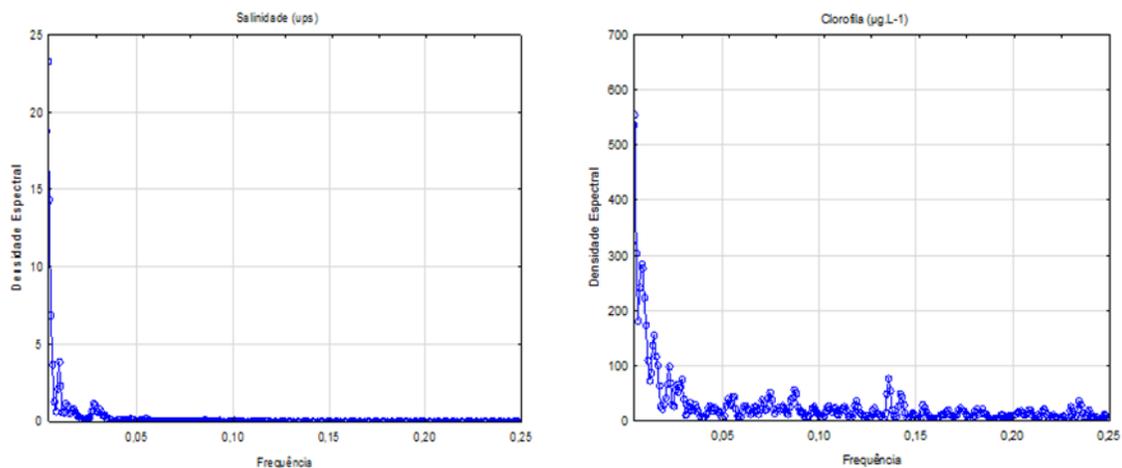


Figura 54: Gráfico de frequências e densidade espectral da precipitação e temperatura da água.



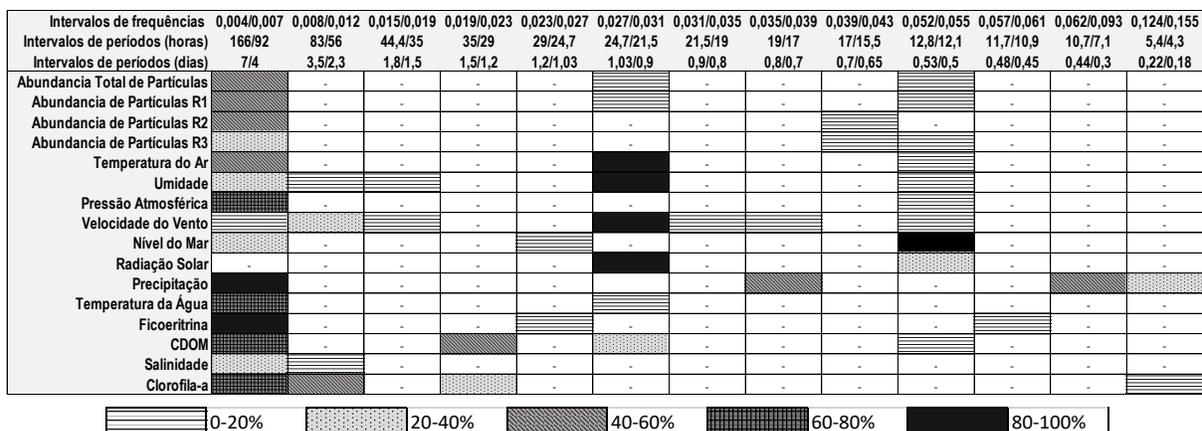
**Figura 55: Periodograma representando as frequências e densidades espectrais da ficoeritrina e CDOM.**



**Figura 56: Periodograma representando as frequências e densidades espectrais da salinidade de clorofila-a.**

Os dados das frequências com densidades espectrais mais elevadas foram convertidos em intervalos de horas e dias e resumidos na Tabela 9. Esta tabela mostra, em termos percentuais, para quais frequências e períodos a densidade espectral foi maior, no intervalo de frequências  $> 0,004$  (7 dias).

Nota-se que para a temperatura do ar, Umidade, Velocidade do Vento e Radiação Solar o principal período de variação é diário, enquanto para a abundância de partículas total, partículas do range 1 e 2, Temperatura do ar, para pressão atmosférica, Precipitação, Temperatura da água, Ficoeritrina, CDOM e Clorofila-a o sinal mais significativo foi da ordem de 4 dias a uma semana. O período de 12 horas foi o mais representativo apenas para o nível do mar e as frequências das partículas do range 3 e da Salinidade não apresentaram densidade espectral maior que 40% para nenhum dos períodos analisados.



**Tabela 9: Representação, em termos percentuais, da distribuição das Densidades Espectrais em intervalos de frequência para cada variável.**

Os resultados da análise bivariada, que complementaram a análise básica de Fourier, são mostrados nas tabelas 10 e 11. A primeira representa a coerência quadrada entre as variáveis com período predominante da ordem de quatro dias a uma semana, enquanto a segunda tabela expressa os valores de coerência entre as variáveis com período da magnitude de um dia.

Na comparação entre os espectros com período de 4 dias a uma semana a variável que resultou na maior coerência quadrada com as partículas dos ranges 1 e 2 foi a temperatura do ar, com valor de 0,6. Valores maiores que 0,7 foram encontrados também para a precipitação quando comparada à temperatura do ar e à pressão atmosférica e na correlação entre os espectros da temperatura da água e do ar e temperatura da água e pressão. A coerência quadrada entre CDOM e ficoeritrina, clorofila-a e precipitação e Clorofila e CDOM variaram entre o mínimo de 0,727 e o valor máximo de 0,812. Os maiores valores de coerência foram entre as partículas R1 e R2 e entre a pressão atmosférica e a temperatura do ar.

	Partículas R1	Partículas R2	Temp. Ar	Pressão	Precipitação	Temp. da Água	Ficoeritrina	CDOM	Clorofila-a
Partículas R1		0,967	0,406	0,547	0,280	0,113	0,482	0,446	0,157
Partículas R2	0,967		0,605	0,560	0,271	0,403	0,416	0,404	0,336
Temp. Ar	0,406	0,605		0,854	0,780	0,824	0,178	0,388	0,279
Pressão	0,547	0,560	0,854		0,809	0,791	0,120	0,411	0,08
Precipitação	0,280	0,271	0,780	0,809		0,602	0,101	0,541	0,727
Temp. da Água	0,113	0,403	0,824	0,791	0,602		0,337	0,665	0,538
Ficoeritrina	0,482	0,416	0,178	0,120	0,101	0,337		0,812	0,237
CDOM	0,446	0,404	0,388	0,411	0,541	0,665	0,812		0,772
Clorofila-a	0,157	0,336	0,279	0,08	0,727	0,538	0,237	0,772	

**Tabela 10: Valores de coerência quadrada entre as variáveis com período mais significante da ordem de 4 dias a uma semana (frequência de 0,004 a 0,007).**

	Temp. Ar	Umidade	Vel. Vento	Rad. Solar
Temp. Ar		0,994	0,963	0,992
Umidade	0,994		0,956	0,988
Vel. Vento	0,963	0,956		0,967
Rad. Solar	0,992	0,988	0,967	

**Tabela 11: Valores de coerência quadrada no range de frequência entre 0,027 e 0,031 para as variáveis com período significativo na ordem de 1 dia.**

A Tabela 11 indica forte coerência entre todas as variáveis com espectros com período principal da ordem de um dia pois todos os valores de coerência quadrada ficaram acima de 0,95, sendo que o maior valor ocorreu na correlação entre a temperatura do ar e a umidade.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo envolveu o desenvolvimento de uma instrumentação fixa para a captura de imagens de plâncton e partículas em suspensão no ambiente marinho, seguido de ensaios preliminares para sua aplicação no monitoramento temporal de médio e longo prazo, em alta frequência de amostragem. Existem poucos registros de séries de plâncton e partículas em outros ambientes costeiros do mundo com resolução temporal similar.

Os únicos artigos científicos publicados até o momento neste contexto foram baseados no Imaging FlowCytobot (IFCB), um instrumento avançado de imageamento na faixa de tamanho do fitoplâncton e microzooplâncton, que tem gerado dados de longo prazo em dois observatórios costeiros: Martha's Vineyard Coastal Observatory (MVCO) e Texas Observatory for Algal Succession Time-Series (TOAST). Neste último, a Universidade do Texas vem obtendo há quase uma década uma série temporal consistente (HARRED, L. B. AND CAMPBELL, L., 2014).

Outros instrumentos de captura de imagens de plâncton e partículas têm sido implementados na América do Norte e utilizados para o monitoramento temporal, incluindo o Scripps Plankton Camera (SPC). O SPC está fundeado desde 2014 no píer do Scripps Institution of Oceanography coletando dados diários de fito- e zooplâncton (WIEBE, ET AL., 2017), mas ainda não existem publicações específicas derivadas deste instrumento. Um cenário semelhante ocorre em relação ao terceiro e último equipamento fixo para imageamento do plâncton desenvolvido até o momento, o Continuous Particle Imaging and Classification System (CPICS), que está fundeado na ilha de Izu-Oshima, Japão (FREITAS,

2018). Vê-se, portanto, que se trata de um tema na fronteira do desenvolvimento tecnológico na área da oceanografia biológica.

Do ponto de vista do hardware, o SIPI foi baseado parcialmente em materiais importados, mas todo o processo de montagem e integração dos componentes eletrônicos, mecânicos, optomecânicos e ópticos foi executado localmente no decorrer do projeto. O desenvolvimento do sistema de imageamento *in situ* utilizou menos recursos do que seria necessário para a aquisição de um equipamento comercial similar e contribuiu para iniciar um processo de redução da dependência tecnológica de fabricantes sediados em outros países. Este é um aspecto importante não apenas devido aos custos alfandegários envolvidos para a compra e a manutenção de equipamentos importados, como também como uma forma de conquistar autonomia para configurar a instrumentação de acordo com as necessidades de cada projeto científico, algo que dificilmente se obtém com um equipamento comercial. Além disso, o desenvolvimento e implementação locais reduzem os riscos inerentes à descontinuidade da fabricação e manutenção por parte de empresas estrangeiras, como ocorreu recentemente com o LOPC (Lopes, comunicação pessoal).

A aplicabilidade dos sistemas para imageamento de partículas e organismos *in situ* vem sendo avaliada por diversos estudos, comparando-os aos métodos tradicionais de coleta por redes de plâncton e análise por microscopia em laboratório. De uma maneira geral, os resultados destes exercícios de intercalibração têm sugerido que os sistemas de imageamento são mais eficazes para amostrar espécimes frágeis ou gelatinosos, como medusas, sifonóforos, appendiculárias e protistas como radiolários coloniais e acantários, porém com a desvantagem de um menor volume amostrado em comparação com as redes (ASHJIAN, C. J. ET AL., 2001).

Uma das primeiras séries de publicações a tratar desta questão analisou o VPR e amostras coletadas com uma rede MOCNESS, sugerindo que o método tradicional subamostrou os grupos mencionados acima, enquanto as imagens não detectaram quantitativamente as espécies mais raras. Porém, mesmo com estas disparidades, ambos os métodos geraram resultados semelhantes (BENFIELD, M. C. ET AL. , 1996) (DENNETT, M. R. ET AL., 2002). Medidas obtidas com o SIPPER foram comparadas às adquiridos com o OPC e redes, indicando que o OPC amostrou metade das partículas detectadas pelo SIPPER, as redes coletaram metade da biomassa de mesozoplâncton do SIPPER, perdendo

os espécimes mais frágeis e subamostrando apendiculárias, salpas e doliolidos, enquanto que copépodes foram subestimados pelo SIPPER (REMPSEN, A.; HOPKINS, T.L. E SAMSON, S., 2004). Um exercício de intercalibração do LOPC com o ZooScan sugeriu que estes equipamentos geram resultados complementares, que coincidem em uma certa faixa do espectro de tamanho dos organismos, enquanto que nos extremos inferior e superior do espectro um instrumento é mais eficiente que outro (SCHULTES, S. & LOPES, R.M., 2009).

O consenso gradativamente estabelecido entre os pesquisadores é de que não existe um método que possa ser designado como “padrão ouro” para a quantificação da abundância do plâncton e de partículas em suspensão no oceano, pois cada técnica tem suas vantagens e desvantagens. No caso da classificação dos organismos, a identificação manual é tida como o ponto de partida da montagem das bases de treinamento para os algoritmos de aprendizado de máquina, embora seja amplamente reconhecido que os especialistas também cometem erros (CULVERHOUSE, P.F. ET AL., 2003). Pelas razões mencionadas, optou-se neste trabalho por não executar ensaios de intercalibração entre amostras coletadas com redes de plâncton e as imagens obtidas com o SIPI. No entanto, foi necessário realizar testes para determinar as técnicas mais eficientes para a segmentação das partículas e para a montagem da base de treinamento. Os experimentos para definição do método de segmentação mostraram resultados melhores no delineamento do contorno dos organismos no caso do algoritmo Mode Value. HIRATA, N.S.T.; FERNANDEZ, M.A. E LOPES, R.M., (2016) compararam os métodos Otsu, Dynamic Threshold e Watershed, sendo que o primeiro apresentou o melhor resultado, mas o presente estudo mostrou que a técnica Mode Value foi superior. A segmentação pelo método Triangle mostrou potencial para imagens binárias, uma vez que é capaz de identificar baixas intensidades, mas no presente caso incorreu em erros por influência do fundo das imagens, que não foi extraído nas vinhetas segmentadas.

A maior acurácia no experimento com as bibliotecas foi obtida com o arranjo composto por 9 classes com 300 organismos em cada uma, fornecendo uma acurácia de 86,8% na validação cruzada. Especialistas sugerem que usando textura, forma e outros parâmetros, com a técnica Support Vector Machine, uma biblioteca com 10 a 20 classes poderia chegar a 70-80% de acurácia (BENFIELD, M. C. ET AL., 2007). Utilizando entre 7 e 10 categorias, a acurácia estimada em amostras obtidas com o VPR variou entre 60-90% (DAVIS, ET AL., 2005), dependendo do conjunto de táxons: para 7 táxons foi entre 60-70%

e para apenas 2 táxons chegou a 79-82% de acurácia. GISLASON, A.; LOGEMANN, K. e MARTEINSDOTTIR, G. (2016) usaram bibliotecas com 6 grupos e alcançaram acurácia entre 76-80%. Portanto, a biblioteca aqui validada, com 9 classes, superou a média de sua categoria quando comparada a outros estudos.

Quanto ao número de objetos em cada classe da base de treinamento, nossos resultados foram similares aos reportados pelo estudo de GORSKY, G. ET AL. (2010), no qual os autores demonstraram, utilizando 8 classes, que a acurácia aumenta até 200 a 300 organismos por categoria e que acima disso o aumento do número de objetos por grupo não aprimora o resultado da validação cruzada. JACOBSEN, S. ET AL. (2018) trabalharam com imagens do ZooScan, utilizando bibliotecas com 18 e 11 classes. Estes autores obtiveram acurácia maior que 90% utilizando o algoritmo Random Forest na validação cruzada, mas na classificação automática de 22 amostras ambientais com essa mesma base de treinamento a acurácia foi incomparavelmente menor, tendo como referência os resultados da validação manual. As observações destes autores foram compatíveis com o resultado do presente trabalho, no qual a acurácia da classificação automática foi de 27% para amostras “desconhecidas”, não relacionadas à validação cruzada. As dificuldades da classificação automática de organismos planctônicos imageados *in situ* é tamanha que uma parte considerável dos estudos baseados em equipamentos comercialmente disponíveis, como o UVP, se dedica a analisar todas as imagens como partículas, assim como feito no presente trabalho. No caso do UVP, os dados de partículas têm servido para avaliar o transporte passivo de material particulado desde a zona eufótica em direção ao oceano profundo, como em GUIDI, L. ET AL. (2008), que quantificaram a neve marinha utilizando armadilhas de sedimento e o UVP, demonstrando a viabilidade dessa nova tecnologia nas estimativas de fluxo vertical.

Em nossos resultados, é preciso considerar que organismos presentes nas imagens *in situ* não faziam parte da base de treinamento, contribuindo em grande parte para a baixa acurácia global observada. Não foram feitos rearranjos na biblioteca para adequá-la às amostras do ambiente, porque a abordagem era estudar um caso mais próximo ao real, no qual frequentemente novos táxons passam a ocorrer e não compõem a base de treinamento original. As maiores fontes de erro da biblioteca foram organismos confundidos com detritos, o que não é inesperado, principalmente em estudos em áreas rasas, com uma alta

concentração de partículas e agregados. Objetos das classes Tontonia e Chaetognatha foram alocados nas categorias filamento, provavelmente devido à forma semelhante dos organismos com estas partículas, dependendo do contraste e da posição. A classificação de larvas de poliquetas como copépodes ocorreu porque o primeiro grupo continha apenas 29 itens, entre eles dois espécimes que apareceram repetidamente e que, por estarem no ângulo lateral, eram semelhantes aos copépodes. O desbalanço no número de organismos utilizados na composição da base de treinamento é outro fator a ser considerado e é de fato um problema recorrente em vários estudos sobre a classificação automática do plâncton (LEE,H.; PARK,M. & KIM, J., 2016)

A definição de um padrão de biblioteca que forneça acurácia próxima a 100% ainda permanece um desafio para os pesquisadores, em nível mundial. Tal resultado depende de muitas variáveis, como o número de classes, a quantidade de organismos em cada categoria e a composição dessas classes, em referência a quais táxons serão incluídos na biblioteca, se os organismos vistos de diferentes ângulos serão alocados juntos ou separados e para qual categoria serão designados os organismos existentes *in situ* mas que não fazem parte da base de treinamento. Os estudos existentes a respeito dessa temática utilizam imagens muito diferentes entre si e abordam a questão da quantidade de categorias na biblioteca e o número de objetos em cada grupo, mas não existem estudos avaliando qualitativamente as alternativas para a montagem de uma base de treinamento, além de algumas informações apresentadas por (GORSKY, G. ET AL., 2010). Além disso, a qualidade das imagens geradas pelos diferentes instrumentos tem, provavelmente, uma grande influência na qualidade da classificação automática, uma questão também ainda praticamente inexplorada na literatura.

As medidas ambientais obtidas com os sensores eletrônicos fundeados e sincronizados com o sistema de aquisição de imagens tiveram ampla variação ao longo do período de observações entre final de fevereiro e início de junho de 2017.

A temperatura, que flutuou entre 23 e 29 °C, e a salinidade, aproximadamente na faixa de 31 a 35, estiveram próximas aos valores obtidos por GAETA ET AL (1999), MANTELATTO, F. L. M. & FRANSOZO, A. (1999), ALVES, B. G. R. ET AL. (2014) e outros autores que estudaram a plataforma interna e enseadas da região de Ubatuba.

Os valores máximos de clorofila obtidos no presente estudo foram cerca de uma ordem de grandeza superiores aos reportados por MIYASHITA, L.K; GAETA, S.G E LOPES, R.M (2011), entre outros. Alguns fatores devem ser considerados na avaliação destes resultados. Em primeiro lugar, os dados comparativos de clorofila disponíveis em outros estudos foram derivados de áreas da plataforma interna mais profundas ( $> 30$  m), em mar aberto, com condições ambientais diferentes das encontradas no ponto de coleta do presente estudo, que era bastante raso ( $\sim 3$  m), sujeito a maiores interações com o fundo, incluindo a ressuspensão de sedimentos. Além disso, este é o primeiro estudo na região de Ubatuba utilizando sensores eletrônicos *in situ*, que são capazes de detectar por fluorescência a presença de agregados e mesmo partículas menores com alta concentração de clorofila. Coletas pontuais seguidas de análise por extração de pigmentos são incapazes de detectar variações de pequena escala (DURHAM, W.M. & STOCKER, R., 2012) como as observadas no presente trabalho. Finalmente, uma limitação dos dados aqui apresentados se refere a outros fatores ambientais que interferem nas medidas de clorofila por fluorimetria *in situ*, incluindo superestimativa pela presença de altas concentrações de CDOM, subestimativas quando há alta irradiância solar devido ao efeito de “quenching” não fotoquímico, e interferências da temperatura (BELLINI, C. B., 2016).

Em relação aos dados meteorológicos, a velocidade máxima do vento, de  $7 \text{ m s}^{-1}$ , foi levemente inferior ao valor máximo encontrado por GAETA, S. A. ET AL. (1999), em amostragens durante o verão. A radiação solar máxima observada nesse mesmo estudo foi de  $400 \text{ W m}^{-2}$  no ano de 1999, valores próximos aos registrados por BELLINI (2016) no verão-outono de 2014-2015. Porém, em 2017, obtivemos valores de até  $800 \text{ W m}^{-2}$ , sugerindo que a variabilidade em escalas multianuais deve ter forte influência sobre a dinâmica de fatores meteorológicos que afetam o plâncton e a distribuição de partículas em suspensão, o que demandaria a manutenção de uma série temporal longa para ser avaliada. Os altos valores de densidade espectral na frequência diária para temperatura do ar, umidade, velocidade do vento e radiação solar eram esperadas, considerando a duração do período de luz na latitude do ponto fixo e o fato de a direção do vento variar seu sentido terra-mar durante os períodos diurno e noturno. A alta coerência quadrada entre estes parâmetros sugere de fato o efeito preponderante da radiação solar na frequência diária, que faz variar a temperatura do ar e acarreta a mudança na direção do vento, trazendo uma massa mais úmida e densa do oceano

para o continente durante o período mais quente do dia e do continente para o oceano a noite, acompanhada de mudanças correspondentes na temperatura da água.

Os ciclos de 12 ou 13 horas do nível do mar possivelmente estão relacionados à maré semi-diurna característica da região de estudo (CASTRO-FILHO, B. M.; MIRANDA, L.B. AND MIYAO S. Y., 1987), no entanto, para garantir a veracidade da afirmação seria necessário filtrar os dados da variação do nível do mar para decompor o sinal proveniente apenas da maré das demais intervenções. Os ventos e a entrada de frentes frias também interferem no nível do mar, com a chamada maré meteorológica, porém o sinal diário que estaria relacionado ao vento foi menos intenso e para que os sinais devidos à entrada de frentes fossem detectados claramente a série de dados deveria ser mais longa dos que os 33 dias aqui considerados. A frequência de variação da salinidade não foi semelhante a nenhuma outra variável, nem mesmo ao nível do mar ou à pluviosidade. BATISTA & HARARI (2017) observaram que as enseadas da região de Ubatuba, incluindo a Enseada do Flamengo, têm baixa taxa de renovação de suas águas, limitando a circulação marinha. Este fator pode ter contribuído para a baixa variabilidade da salinidade verificada no presente estudo. No trabalho de (TANIGUCHI, M; STIEGLITZ, T. E ISHITOBI, T., 2008), para a mesma região, foi registrado que na maré alta ocorre maior intrusão de água subterrânea, reduzindo a salinidade, processo que também pode ter tido influência em nossas observações.

Os períodos de 4 dias a uma semana que corresponderam a altas densidades espectrais para os dados de temperatura do ar, pressão atmosférica, precipitação, temperatura da água, ficoeritrina, CDOM e clorofila-a podem estar associadas à entrada de frentes frias ou outras forçantes ainda não identificadas com base nos resultados disponíveis. Por se tratar de um intervalo de transição do verão para o outono, uma tendência sazonal tampouco pode ser descartada, mas novamente seria necessária uma série temporal mais longa para isolar essa influência. As altas coerências quadradas entre precipitação e temperatura do ar, precipitação e pressão, temperatura da água e do ar, temperatura da água e pressão mostraram a influência dos fatores meteorológicos sobre o ambiente costeiro raso amostrado, via alterações na temperatura da água.

Os máximos de densidade espectral em frequências coincidentes para CDOM e ficoeritrina e CDOM e clorofila-a podem estar associadas à influência do CDOM nas medidas fluorimétricas, como mencionado anteriormente, mas outros fatores não podem ser

descartados. Por exemplo, uma maior ocorrência de microalgas e cianobactérias em um dado momento poderia elevar o sinal da clorofila-a e ocasionar uma maior concentração de CDOM por meio da liberação de exudatos, mas esta hipótese só poderia ser avaliada por meio da análise detalhada da composição e densidade do fitoplâncton, acompanhada de experimentos de laboratório. É também importante ressaltar que CDOM não é necessariamente um bom indicador da concentração da matéria orgânica dissolvida total (incluindo o carbono orgânico dissolvido) no ambiente marinho (HARVEY, E. T.; KRATZER, S. & ANDERSSON, A., 2015). A relação entre os períodos de ocorrência da clorofila-a e da precipitação pode ser devido ao maior aporte de nutrientes dissolvidos de origem continental.

Embora no estágio atual da implementação do sistema óptico não tenha sido possível viabilizar a classificação automática dos organismos planctônicos *in situ*, devido às limitações discutidas anteriormente, os dados sobre concentração e tamanho das partículas em suspensão foram disponibilizados e indicaram uma intensa dinâmica temporal. As partículas do range 1, menores que 385  $\mu\text{m}$ , foram as mais abundantes, correspondendo a 90% ou mais da concentração total. A frequência do grupo R3 (>620  $\mu\text{m}$ ) não teve correlação com nenhuma variável ambiental, enquanto as classes R1 e R2 ocorreram na frequência de 6,17 dias com alta coerência quadrada entre si e com a temperatura do ar e a pressão atmosférica. Além disso, houve uma intensa elevação na concentração de partículas resultante de mudanças meteorológicas por volta de 28 de maio de 2017, evidenciada pela redução na temperatura do ar e da água, baixa intensidade de radiação solar e elevação brusca da pressão atmosférica (Figura 48). Por se tratar de um único evento de tal magnitude ao longo de 33 dias, não foi possível avaliá-lo sob o ponto de vista da análise de série temporal. De todo modo, os resultados sobre a variação temporal sugeriram que o sinal de frequência semanal foi o mais determinante para a dinâmica das partículas em suspensão, mas que eventos meteorológicos podem introduzir uma alta complexidade temporal ao sistema.

Em nosso conhecimento, não existem estudos baseados em sistemas de captura de imagens por sombreamento voltados para o monitoramento da concentração de partículas em suspensão em áreas costeiras rasas. Apenas o sistema LISST-HOLO (GRAHAM, G.W. ET AL., 2012) tem tido essa capacidade, porém utilizando a técnica de holografia digital. Os estudos da dinâmica de partículas na região de Ubatuba incluem apenas trabalhos primariamente voltados para o plâncton, como de SCHULTES, S. & LOPES, R.M. (2009) e

MARCOLIN, ET AL. (2015), que foram desenvolvidos em regiões mais distantes da costa, portanto sujeitos a condições ambientais bastante distintas das encontradas no ponto de fundeio do SIPI.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os equipamentos de imagem têm demonstrado potencial para uma vasta gama de aplicações, incluindo estudos de distribuição de partículas e plâncton, composição da comunidade planctônica, fluxo de massa e nutrientes associado à dinâmica de partículas e cálculo de taxa de remineralização na coluna de água. São ainda poucos os grupos que atuam no desenvolvimento deste tipo de instrumentação e não há muito contato entre eles, o que acarreta no dispêndio de muita energia para solucionar um mesmo problema (BENFIELD, M. C. ET AL., 2007). A criação de um padrão global de imagens associado a um software universal com um volumoso banco de dados encurtaria a busca por uma técnica de análise rápida e com acurácia superior a de um especialista, derrubando a última barreira ao estabelecimento de equipamentos de imageamento *in situ* e inteligência artificial, como a nova ferramenta da oceanografia biológica do século XXI.

O Submersible Instrument for Plankton Imaging (SIPI) se mostrou viável à aplicação fundeada por um longo período, apresentando a vantagem de não ter limitação de energia ou memória e permitir o acoplamento de vários sensores ambientais. A técnica de imagens sombreadas favoreceu a segmentação de organismos transparentes mais ainda não garantiu 100% de acerto, portanto ajustes de contraste se mostraram úteis às próximas versões do equipamento. O volume imageado de 9 ml é uma ordem de grandeza maior do que o do SPC 2 e do CPICS, e é semelhante ao volume do VPR, no entanto é significativamente menor do que os volumes obtidos pelo UVP 4, SIPPER e ZOOVIS. Atualmente o equipamento já pode ser utilizado para uma vasta gama de observações, incluindo estudos quantitativos e qualitativos de partículas e organismos de um grande range de tamanho, estudos de comportamento *in situ*, monitoramento Euleriano de espécies invasoras ou tóxicas, entre outros.

Alguns pontos a serem melhorados em versões futuras incluem aumentar o volume imageado, estender a profundidade de campo, torna-lo autônomo em relação a alimentação de energia e armazenamento de dados e instalar um sistema automático de limpeza dos

visores e sensores. Outros aspectos que podem ser alterados buscando a melhoria do sistema são uma maior robustez das estruturas elétrica e mecânica, permitindo aplicação em lugares remotos, o processamento das imagens em tempo real reduzindo o espaço de armazenamento necessários e, quando a aplicação exigir, o uso de luz branca e câmera policromática, introduzindo o parâmetro cor como mais uma ferramenta para a classificação automática. É importante ressaltar que para sistemas fixados essa alteração requer um método inovador que impeça a atração dos organismos pela fonte luminosa. Apesar das limitações, a primeira versão do SIPI, aqui reportada, foi desenvolvida em menos de dois anos, enquanto que os projetos de desenvolvimento do SPC, UVP, SIPPER, entre outros, têm história muito mais longa.

As ferramentas computacionais aplicadas no presente estudo também apresentaram grande potencial. O cálculo de contraste pode ser aprimorado no LPD para excluir 100% dos objetos desfocados e no caso do LLS pode ser alterado visando reduzir a influência do tamanho dos organismos e de bordas muito claras ao redor destes no valor final desse parâmetro. A aplicação de apenas um método de segmentação no LLS é outro ponto que poderia ser alterado para a aplicação simultânea de mais de um método ou aplicação do método mais apropriado a cada classe. Mas para isso seria necessário criar uma ferramenta de pré-classificação dos organismos. Quanto ao aprendizado de máquina, está em implementação atualmente no LAPS, em substituição ao Random Forest, novos métodos de Deep Learning, os quais têm demonstrado excelentes resultados para classificação automática de organismos. Os esforços na área de visão computacional aplicada à identificação automática do plâncton estão convergindo para a utilização destas técnicas (ELLEN, J.; LI, H. E OHMAN, M. D., 2015) (ORENSTEIN, E. C. E BEIJBOM, O. , 2017), aliadas à ferramentas de Transfer Learning (LEE, H.; PARK, M. & KIM, J., 2016; RODRIGUES, F. C. M. ET AL., 2018) e o gradativo abandono de algoritmos baseados em extração de características de imagens, como é o caso do SVM e Random Forest.

No presente estudo foram adquiridos dados de partículas em altíssima resolução temporal. Há de se considerar que muitos fatores influenciam na distribuição de partículas e que eles variam em intensidade e ocorrência de um local para outro, além de atuarem integrados, o que torna difícil correlacionar toda uma dinâmica complexa a apenas um parâmetro. Outro ponto relevante é que a aquisição dos dados foi realizada em um ambiente

extremamente raso, com uma dinâmica ainda mais variável e com grande interferência antrópica e continental, o que tornou o processamento das imagens e a correlação das variáveis ainda mais complexo.

A aquisição de uma série mais longa associada à classificação taxonômica das partículas poderia clarificar melhor a ocorrência e variação das partículas, incluindo padrões sazonais e uma maior abundância de eventos de entrada de frente fria, e estabelecer sua correlação com as variáveis ambientais.

As próximas versões do equipamento de imageamento incluirão a detecção de ROIs em tempo real, minimizando o problema de armazenamento e transferência de uma quantidade massiva de dados. Outra ferramenta que será incluída no LPD é a de exclusão de organismos que aparecem repetidas vezes devido à alta velocidade de aquisição da câmera. Futuros teste com training sets em continuidade ao presente trabalho incluirão uma maior gama de bibliotecas com diferentes números de classes, uma maior quantidade de organismos em cada grupo e testes com categorias mais detalhadas, separando organismos do mesmo táxon observados em diferentes ângulos e posições, como retraídos ou esticados, com antênulas abertas ou fechadas, entre outros. Estas bibliotecas serão posteriormente utilizadas em conjunto com as ferramentas do Deep Learning.

## REFERÊNCIAS<sup>3</sup>

ALVES, B. G. R. ET AL. Benthic community structure and organic matter variation in response to oceanographic events on the Brazilian SE inner shelf. *Cont. Shelf Res.*, v. 85, p. 106-116, 2014.

ASHJIAN, C. J. ET AL. Distribution of plankton, particles, and hydrographic features across Georges Bank described using the Video Plankton Recorder. *Deep-Sea Res.*, v. 48, p. 245-282, 2001.

ASPER, V. L. Measuring the flux and sinking speed of marine snow aggregates. *Deep-Sea Res.*, Great Britain, v. 34, n. 1, p. 1-17, 1987.

BATISTA, S.S. & HARARI, J. Modelagem da dispersão de coliformes termotolerantes e enterococos em duas enseadas na região costeira de Ubatuba (SP). *Eng. Sanit. Ambient.*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, Mar/Abr 2017.

BELLINI, C. B. Variabilidade de alta frequência temporal de clorofila-a e sua relação com o campo de ventos e marés no canal de São Sebastião/SP. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, p. 1-114, 2016.

BENFIELD, M. C. ET AL. Video plankton recorder estimates copepod, pteropod and larvacean distributions from a stratified region of Georges Bank with comparative measurements from a MOCNESS sampler. *Deep-Sea Res. II*, v. 43, n. 7-8, p. 1925-1945, 1996.

BENFIELD, M. C. ET AL. RAPID Research on Automated Plankton Identification. *Oceanography*, Rockville, v. 20(2), p. 172-187, Jun. 2007.

BI, H. ET AL. Deployment of an imaging system to investigate fine-scale spatial distribution of early life stages of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in Chesapeake Bay. *J. Plankton Res.*, v. 0, n. 0, p. 1-11, Dec. 2012.

---

<sup>3</sup>De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

BI, H. ET AL. A Semi-Automated Image Analysis Procedure for In Situ Plankton Imaging System. Plos One, v. 10, n. 5, p. 1-17, May 2015.

BLACKMAN, R.B. & TUKEY, J.W. The measurement of power spectra from the point of view of communications engineering - Part I, v. 37, n. 1, p. 185-282, Jan. 1958.

BLOOMFIELD, P. Fourier analysis of time series: an introduction. John Wiley, New York, p. 1-258, 1976.

BRANDINI, F. P. ET AL. Deep chlorophyll maximum and plankton community response to oceanic bottom intrusions on the continental shelf in the South Brazilian Bight. Cont. Shelf. Res, v. 89, p. 61-75, 2014.

BREIMAN, L.. Random Forests. Mach Learn, v. 45, p. 5-32, 2001.

CARDER, K.L.; STEWARD, R.G. AND BRETZER, P.R. In-situ holographic measurements of the sizes and settling rates of oceanic particulate. J. Geophys. Res, v. 87, p. 5681-5685, 1982.

CASTRO-FILHO, B. M. ET AL. Correntes e Massas de Água na Plataforma Continental. In: S.A, P. -P. B. Meteorologia e Oceanografia. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 1, 2015. Cap. 5, p. 191-254.

CASTRO-FILHO, B. M.; MIRANDA, L.B. AND MIYAO S. Y. Condições hidrográficas na plataforma continental ao largo de Ubatuba: variações sazonais e em média escala. Bol. do Inst. Oceanogr., São Paulo, v. 35, n. 2, p. 135-151, 1987.

CORTES, C. AND VAPNIK, V. Support-vector networks. Mach Learn, v. 20, n. 3, p. 273-297, Sep 1995.

COSTELLO, D. K.; CARDER, K. L. AND STEWARD, R. G. Development of the marine-aggregated-particle profiling and enumerating rover. Proc. SPIE, Underwater Imaging, Photography and Visibility, San Diego, v. 1537, Dec. 1991.

COWEN, R. K AND GUIGAND, C. M. In situ ichthyoplankton imaging system (ISIIS): system design and preliminary results. Limnol. Oceanogr-Meth., v. 6, p. 126-132, 2008.

CULVERHOUSE, P. F. E. A. Automatic image analysis of plankton: Future perspectives. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 312, p. 297-309, 2006b.

CULVERHOUSE, P.F. DiCANN: a machine vision solution to biological specimen categorisation. *Proceedings of EurOcean 2000, Hamburg, DE*, p. 239-241, 29 August-2 September 2001.

CULVERHOUSE, P.F. ET AL. Do experts make a mistake? A comparison of human and machine identification of dinoflagellates. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, v. 247, p. 17-25, Feb. 2003.

CULVERHOUSE, P.F. ET AL. HAB Buoy: a new instrument for in situ monitoring and early warning of harmful algal bloom events. *Afr. J. Mar. Sci., South Africa*, p. 245-250, 2006.

DAVIS, C. S. ET AL. The Video Plankton Recorder (VPR): Design and initial results. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., Stuttgart*, v. 36, p. 67-81, Jul. 1992.

DAVIS, C. S. ET AL. Real-time observation of taxa-specific plankton distributions: an optical sampling method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 284, p. 77-96, Dec. 2004.

DAVIS, ET AL. A three-axis fast-tow digital Video Plankton Recorder for rapid surveys of plankton taxa and hydrography. *Limnol. Oceanogr.*, v. 3, p. 59-74, 2005.

DENNETT, M. R. ET AL. Video plankton recorder reveals high abundances of colonial Radiolarian in surface waters of the central North Pacific. *J. Plankton Res.*, v. 24, n. 8, p. 797-805, 2002.

DUBELAAR, G.B.J. ET AL. Design and First Results of CytoBuoy: A Wireless Flow Cytometer for In Situ Analysis of Marine and Fresh Waters. *Cytometry*, v. 37, p. 247-254, 1999.

DURHAM, W.M. & STOCKER, R. Thin Phytoplankton Layers: Characteristics, Mechanisms, and Consequences. *Annual Review of Marine Science*, v. 4, p. 177-207, 2012.

ELLEN, J.; LI, H. E OHMAN, M. D. Quantifying California Current Plankton Samples with Efficient Machine Learning Techniques. In. *Oceans'15 MTS/IEEE, Washington, DC, USA*, 19-22 Oct. 2015.

FREITAS, G.R. Plankton diversity and community structure based on a cabled observatory data. Master`s thesis presented to graduate scholl of Marine Science and Technology o Tokio University, Tokio, p. 1-34, Mar. 2018.

GAETA, S. A. ET AL. Environmental forcing on phytoplankton biomass and primary productivity of the coastal ecosystem in Ubatuba region, southern Brazil. *Rev. bras. oceanogr.*, v. 46, n. 1, p. 11-27, 1999.

GISLASON, A.; LOGEMANN, K. AND MARTEINSDOTTIR, G. The cross-shore distribution of plankton and particles southwest of Iceland observed with a Video Plankton Recorder. *Cont Shelf Res*, v. 123, p. 50-60, 2016.

GORSKY, G. ET AL. Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system. *J. Plankton Res*, v. 32, n. 3, p. 285-303, 2010.

GRAHAM, G.W. ET AL. Interpreting LISST-100X measurements of particles with complex shape using digital in-line holography. *J. Geophys. Res.*, v. 117, p. 1-20, Mai. 2012.

GROSJEAN, P. ET AL. Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples using the ZOOSCAN digital imaging system. *ICES J. Mar. Sci.*, v. 61, n. 4, p. 518-525, May 2004.

GUIDI, L. ET AL. Relationship between particle size distribution and flux in the mesopelagic zone. *Deep-Sea Res.*, v. 55, p. 1364-1374, 2008.

HARALICK, R. M.; SHANMUGAM, K. AND DINSTEIN, I. Textural Features for Image Classification. *IEEE Syst. Man Cyb.*, v. 3, n. 6, p. 610-621, 1973.

HARRED, L. B. AND CAMPBELL, L. Predicting harmful algal blooms: a case study with *Dinophysis ovun* in the Gulf of Mexico. *J. Plankton Res.*, v. 36, n. 6, p. 1434-1445, Jul. 2014.

HARVEY, E. T.; KRATZER, S. & ANDERSSON, A. Relationships between colored dissolved organic matter and dissolved organic carbon in different coastal gradients of the Baltic Sea. *Ambio*, v. 44, n. 3, p. 392-401, Jun. 2015.

HECHT, E. Optics. 4. ed. San Francisco: Addison Wesley, v. 1, 2002.

HERMAN, A. W. Design and calibration of a new optical plankton counter capable of sizing small zooplankton. Deep-Sea Res., Great Britain, v. 39, n. 3/4, p. 395-415, 1992.

HERMAN, A.W.; BEANLANDS, B. AND PHILLIPS, F. The next generation of Optical Plankton Counter: the Laser-OPC. J. Plankton Res., v. 26, n. 10, p. 1135-1145, Sep. 2004.

HIRATA, N.S.T.; FERNANDEZ, M.A. E LOPES, R.M. Plankton image classification based on multiple segmentations. In: 2nd Workshop on Computer Vision for Analysis of Underwater Imagery, Cancun, 2016.

HONJO, S. ET AL. Direct optical assessment of large amorphous aggregates (marine snow) in the deep ocean. Deep\_Sea Res, Great Britain, v. 31(1), p. 67-76, 1984.

JACOBSEN, S. ET AL. Temporal and spatial variability of zooplankton on the Faroe shelf in spring 1997-2016. J Marine Syst, Tórshavn, v. 177, p. 28-38, 2018.

JACQUES, J.C.S.; JUNG, C.R. AND MUSSE, S.R. A background subtraction model adapted to illumination changes. Proceedings-International Conference on Image Processing, ICIP, p. 1817-1820, 2006.

JENKINS, G.M. & WATTS, D.G. Spectral analysis and its applications, Holdem Day, San Francisco, p. 1-525, 1968.

KARP-BOSS, L.; AZEVEDO, L. E BOSS, E. LISST-100 measurements of phytoplankton size distribution: evaluation of the effects of cell shape. Limnol. Oceanogr..Methods, v. 5, p. 396-406, 2007.

KATZ, J. ET AL. Submersible holocamera for detection of particle characteristics and motions in the ocean. Deep-Sea Res. I, v. 46, p. 1455-1481, 1999.

LEE, H.; PARK, M. & KIM, J. Plankton classification on imbalanced large scale database via convolutional neural networks with transfer learning. In: Image Processing (ICIP), Phoenix, AZ, USA, 25 - 28 Set. 2016.

LOPES, R.M. Distribuição espacial, variação temporal e atividade alimentar do zooplâncton no complexo estuarino Paranaguá. Tese de Doutorado apresentada ao curso de pós graduação em ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, v. 1, p. 1-140, 1997.

LUO, T. ET AL. Active Learning to Recognize Multiple Types of Plankton. *J. Mach. Learn. Res.*, v. 6, p. 589-613, 2005.

MAGLIOCCA, A. AND KUTNER, A. S. Sedimentos de fundo da enseada do Flamengo, Ubatuba, SP. *Contribuições Avulsas do Instituto Oceanográfico, São Paulo*, v. 198, p. 1-15, 1965.

MAHIQUES, M. M. Variações temporais na sedimentação hoocênica dos embaiamentos da região de Ubatuba (SP). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo (Tese de Doutorado), p. 352p, 1992.

MALKIEL, E. ET AL. On the spatial distribution and nearest neighbor distance between particles in the water column determined from in situ holographic measurements. *J. Plankton Res*, v. 28, n. 2, p. 149-17, 2006.

MANTELATTO, F.L.M. & FRANSOZO, A. Characterization of the physical and chemical parameters of Ubatuba Bay, Northern Coast of São Paulo state, Brazil. *Rev. Bras. Biol.*, São Carlos, v. 59, n. 1, 1999.

MARCOLIN, C.R.; GAETA, S. & LOPES, R.M. Seasonal and interannual variability of zooplankton vertical distribution and biomass size spectra off Ubatuba, Brazil. *J. Plankton Res.*, v. 37, n. 4, p. 808-819, Jul. 2015.

MEDEIROS, M. G. Desenvolvimento de uma instrumentação de captura de imagens in situ para estudo da distribuição vertical do plâncton. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 88p, 2017.

MIYASHITA, L.K, GAETA, S. A E LOPES, R.M. Life cycle and reproductive traits of marine podonids (Cladocera, Onychopoda) in a coastal subtropical area. *J Plankton Res*, v. 33, n. 5, p. 779-792, 2011.

OGATA, B. Assessment of a new software for semi-automatic analysis of digital images of zooplankton. TCC (Bacharelado - Universidade Estadual Paulista), São Vicente, p. 14, 2016.

OJALA, T.; PIETIKAINEN, M. AND MAENPAA, T. Gray scale and Rotation Invariant Texture Classification with Local Binary Patterns. In: *Computer Vision-ECCV 2000.*, Berlin, Heidelberg, v. 1842, 2000.

OLSON, R. J. AND SOSIK, H. M. A submersible imaging-in-flow instrument to analyze nano- and microplankton: Imaging FlowCytobot. *Limnol. Oceanogr-Meth*, v. 5, n. 1, p. 195-203, 2007.

OLSON, R. J.; SHALAPYONOK, A. AND SOSIK, H.M. An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanoplankton: FlowCytobot. *Deep-Sea Res. I*, v. 50, p. 301-315, 2003.

ORENSTEIN, E. C. E BEIJBOM, O. Transfer Learning and Deep Feature Extraction for Planktonic Image Data Sets. In. *IEEE Winter Conference on Application of Computer Vision*, Santa Rosa, California, 24-31 Mar. 2017.

ORTNER, P. B; HILL, L. C AND EDGERTON, H. E. In-situ silhouette photography of Gulf Stream zooplankton. *Deep-Sea Res, Great Britain*, v. 28A(12), p. 1569 - 1576, 1981.

OSTEN, W. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, v. 4, 2018. 139-150 p.

OTSU, N. A threshold selection method from graylevel histograms. *IEEE T. Syst. Man Cyb.*, v. 9, n. 1, p. 62-66, 1979.

PICHERAL, M. ET AL. The Underwater Vision Profiler 5: An advanced instrument for high spatial resolution studies of particle size spectra and zooplankton. *Limnol Oceanogr Methods*, v. 8(9), p. 462-473, Sep. 2010.

REMSEN, A.; HOPKINS, T.L. E SAMSON, S. What you see is not what you catch: a comparison of concurrently collected net, Optical Plankton Counter, and Shadowed Image Particle Profiling Evaluation Recorder data from the northeast Gulf of Mexico. *Deep Sea Res. I*, v. 51, p. 129-151, 2004.

ROBERTS, P. L. D. ET AL., 2014. Pier Recognition: An in-situ Plankton Web Camera (Scripps Plankton Camera). In: *Ocean Optics XXII. 2014, Portland. Anais Eletrônico*. Disponível em: [http://spc.ucsd.edu/wp-content/uploads/2015/03/Roberts\\_Mac.pdf](http://spc.ucsd.edu/wp-content/uploads/2015/03/Roberts_Mac.pdf). Acesso em: 19 mar. 2018.

RODRIGUES, F. C. M. ET AL. Evaluation of Transfer Learning Scenarios in Plankton Image Classification. In *Proceedings of the 13th International Joint Conference on Computer Vision, Imaging and Computer Graphics Theory and Applications (VISIGRAPP 2018)*, v. 5, p. 359-366, 2018.

SAMSON, S. ET AL. Design and initial results of high-resolution shadowed image particle profiling and evaluation recorder. In *Proc. Oceans '99 MTS/IEEE, Seattle*, v. 1, p. 58-63, 1999.

SAMSON, S. ET AL. A System for High\_Resolution Zooplankton Imaging. *IEEE J Oceanic Eng*, v. 26(4), p. 671 - 676, Oct. 2001.

SCHULTES, S. & LOPES, R.M. Laser Optical Plankton Counter and Zooscan intercomparison in tropical and subtropical marine ecosystems. *Limnol. Oceanogr.: Methods*, v. 7, p. 771-784, 2009.

SCHULZ, J. ET AL. Lightframe On-sight Key species Investigation (LOKI) - The art of imaging tiny plankton species on-the-fly. *IEEE Oceans'09: Balancing technology with future needs*, Bremen, 11-14 May 2009.

- SCHULZ, J. ET AL. Imaging of plankton specimens with the lightframe on-sight keystone species investigation (LOKI) system. *J. Eur. Opt. Soc-RAPID*, v. 5, n. 100175, p. 1990-2573, Apr. 2010.
- SIERACKI, C. K; SIERACKI, M. E. AND YENTSCH, C. S. An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 168, p. 285-296, Jul. 1998.
- SOSIK, H. M. AND OLSON, R. J. Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnol. Oceanogr-Meth*, v. 5, p. 204-216, 2007.
- SUN, H. ET AL. In situ Underwater Electronic Holographic Camera for Studies of Plankton. *IEEE J. Oceanic Eng.*, v. 32, n. 2, p. 373-382, Apr. 2007.
- SURYA, T. S. Zooplankton visualization system: design and real-time lossless image compression. *LSU Dissertação de mestrado, Louisiana*, p. 6-8, 2004.
- TANIGUCHI, M; STIEGLITZ, T. E ISHITOBI, T. Temporal variability of water quality submarine groundwater discharge in Ubatuba, Brazil. *Estuar. Coast. Shelf. S.*, v. 76, p. 484-492, 2008.
- VINCENT, L. AND SOILLE, P. Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE T Pattern Anal.*, v. 6, p. 583-598, 1991.
- WIEBE, P. H. AND BENFIELD, M. C. From the Hensen net toward four-dimensional biological oceanography. *Prog. Oceanogr.*, v. 56, p. 7-136, 2003.
- WIEBE, P. ET AL. *Marine Plankton: A Practical Guide to Ecology, Methodology, and Taxonomy*. Oxford. v. 1. 2 ed. p. 110-114. 2017
- ZACK, G.W.; ROGERS, W.E. & LATT, S.S. Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 25, n. 7, p. 741-753, 1977.