

**ESTUDO DE TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO
DE IMAGENS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE
CINÉTICA EM SÊMEN DE *OVIS ARIES***

ANTÔNIO ELIZEU DA ROCHA NETO

2007

ANTÔNIO ELIZEU DA ROCHA NETO

**ESTUDO DE TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO DE
IMAGENS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE
CINÉTICA EM SÊMEN DE *OVIS ARIES***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-graduação
“Stricto Sensu” em Máquinas e Automação Agrícola, para
obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Rocha Neto, Antônio Elizeu da.

Estudo de técnicas de processamento de imagens para análise da atividade cinética em sêmen de *Ovis aries* / Antônio Elizeu da Rocha Neto. -- Lavras : UFLA, 2007.

66p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Roberto Alves Braga Júnior.

Bibliografia.

1. Análise de imagens. 2. Sêmen – Atividade cinética. 3. Reprodução animal.
4. Ruminantes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 621.367

ANTÔNIO ELIZEU DA ROCHA NETO

**ESTUDO DE TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO DE
IMAGENS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE
CINÉTICA EM SÊMEN DE OVIS ARIES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-graduação
“Stricto Sensu” em Máquinas e Automação Agrícola, para
obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 04 de Setembro de 2007.

Dr. Hector Jorge Rabal
Dr. André Vital Saúde
Dr. João Bosco Barreto Filho
Dr. Giovanni Francisco Rabelo

CIOP Argentina
UFLA
UFLA
UFLA

Dr.. Roberto Alves Braga Júnior
UFLA
(Orientador)

Lavras
Minas Gerais – BRASIL

DEDICATÓRIA

Dedico a minha esposa Poliana

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, que me deu a vida e o qual em todos os momentos confiei firme e decididamente. Assim como também me dotou de uma mente e inteligência que me incitam na busca do Saber e da Verdade.

Ao meu pai, em memórias, e minha mãe por ter me tornado o homem que sou e nunca permitir desistir dos meus sonhos.

Aos meus irmãos e irmãs que têm uma parcela nesta conquista.

Aos tios, tias, primos, primas e avó por acreditarem que eu seria capaz.

Ao Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior que com sua amizade e sabedoria, realmente, foi um exemplo de docente, pois soube orientar, compreender minhas limitações, nunca me deixando desanimar com os obstáculos e sempre me estimulando a continuar.

Ao Dr. Hector Jorge Rabal pelo acolhimento na Argentina, pela orientação e pela condução e direcionamento dos trabalhos em sua área.

Aos Drs Marcelo Ricardo Trivi e Ricardo Arizaga, os quais me acolheram na Argentina e abriram as portas do CIOp e auxiliaram em meu trabalho.

Aos meus amigos de república Wagner(peixe) e Rafael(bomba) que com o tempo se tornaram irmãos e conselheiros.

Ao CNPq pelo auxílio recebido desde o início desta dissertação, sem o qual, teria sido realizado com maior sacrifício.

Ao Prof Dr. João Bosco Barreto Filho, pela orientação e pela interpretação das análises.

Aos amigos Marcell e Daniel pela ajuda, apoio e paciência em minha falta de tempo.

Ao grupo Casa da Vaca, pelo incentivo desde o início de minha pesquisa.

À Cleide Miriam pela ajuda na elaboração de textos.

A minha companheira, amiga e amada esposa, Poliana, a qual sempre serei grato pela compreensão e paciência infinita em todos os momentos nos quais precisei me ausentar. Dedico este trabalho especialmente a você, pois sempre confiou em mim.

Minha gratidão sincera a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, colaboraram na realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Fonte Incoerente-----	3
FIGURA 2 Aumento da Coerência de uma Fonte Incoerente -----	4
FIGURA 3 Esquema do Scattering -----	5
FIGURA 4 Padrão de speckle formado por iluminação laser de HeNe em um vidro-----	6
FIGURA 5 THSP e a Matriz de Co-ocorrência de um Material com Alto Nível de Atividade-----	7
FIGURA 6 Vizinhanças 4 e 8 de um Pixel -----	10
FIGURA 7 Etapas do Processamento de Imagens-----	11
FIGURA 8 Diferentes threshold (a) Original (b) 0 a 120 (c) 120 a 255-----	13
FIGURA 9 Vortex de Asa-----	17
FIGURA 10 Coluna Central e STS Formado pela Composição da Coluna -----	21
FIGURA 11 Filtro Gaussiano e Montagem do STS a partir da Coluna Central. -----	22
FIGURA 12 Montagem e Rotação do STS a Partir da Linha Central -----	22
FIGURA 13 Filtro Gaussiano e Montagem do STS -----	22
FIGURA 14 Diferenças entre os Limites em uma Mesma Imagem a) 0 a 96 b) 97 a 110 c) 111 a 130 d) 131 a 160 d) 161 a 190 e) 191 a 255 -----	24

FIGURA 15	Separação e Contagem de Clusters a) imagem original b) clusters maiores que 10 c)contagem das clusters-----	25
FIGURA 16	Ilhas de Rotação-----	26
FIGURA 17	Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Coluna Central na Montagem dos STS's-----	28
FIGURA 18	Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Coluna Central na Montagem dos STS's e um Filtro Gaussiano de Raio 3 -----	28
FIGURA 19	Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Coluna Central na Montagem dos STS's e um Filtro Gaussiano de Raio 6 -----	28
FIGURA 20	Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Linha Central na Montagem dos STS's -----	29
FIGURA 21	Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Linha Central na Montagem dos STS's e um Filtro Gaussiano de Raio 3 -----	30
FIGURA 22	Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Linha Central na Montagem dos STS's e um Filtro Gaussiano de Raio 6 -----	30
FIGURA 23	Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando uma Determinada Coluna na Montagem dos STS's -----	31
FIGURA 24	Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando uma Determinada Linhas na Montagem dos STS's-----	31
FIGURA 25	Análise em Clusters Maiores que 0 pixels ao Longo dos 5600 Frames, Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 -----	33

FIGURA 26 Análise em Clusters Maiores que 100 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 -----34

FIGURA 27 Distância entre os centros de massas das ilhas de rotação -----35

FIGURA 28 Análise em Clusters Maiores que 4000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 ----- F

FIGURA 29 Análise em Clusters Maiores que 8000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 ----- F

FIGURA 30 Análise em Clusters Maiores que 10000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 -----G

FIGURA 31 Análise em Clusters Maiores que 300 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 -----H

FIGURA 32 Análise em Clusters Maiores que 3000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 -----H

FIGURA 33 Análise em Clusters Maiores que 5000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 -----I

FIGURA 34 Análise em Clusters Maiores que 6000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 -----I

FIGURA 35 Análise em Clusters Maiores que 7000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 -----J

FIGURA 36 Análise em Clusters Maiores que 9000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255 -----J

ANEXOS

ANEXO B	Página
FIGURA 28 Análise em Clusters Maiores que 4000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255-----	F
FIGURA 29 Análise em Clusters Maiores que 8000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255-----	F
FIGURA 30 Análise em Clusters Maiores que 10000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255-----	G
FIGURA 31 Análise em Clusters Maiores que 300 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255-----	H
FIGURA 32 Análise em Clusters Maiores que 3000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255-----	H
FIGURA 33 Análise em Clusters Maiores que 5000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255-----	I
FIGURA 34 Análise em Clusters Maiores que 6000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre	

96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255-----I

FIGURA 35 Análise em Clusters Maiores que 7000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255-----J

FIGURA 36 Análise em Clusters Maiores que 9000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255-----J

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Luz coerente e não coerente.....	3
2.2 Scattering	4
2.3 Speckle e Bio-Speckle.....	5
2.3.1 THSP - Time History Speckle Pattern ou STS Spatial Temporal Speckle	6
2.3.2 MI - Momento de Inércia.....	7
2.4 Imagem Digital	9
2.4.1 Propriedades de um Pixel.....	9
2.5 Processamento de Imagens	10
2.5.1 Segmentação	11
2.5.2 Threshold ou Limiar	12
2.5.3 Filtragem digital	13
2.5.4 Análise de Partículas ou Clusters em Imagens.....	15
2.6 Ferramenta de Processamento de Imagens	15
2.7 Fenômeno Vórtex ou Vórtice.....	16
2.8 Técnicas de Análise de Sêmen.....	17
2.8.1 Métodos para a Avaliação da Qualidade do Sêmen	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Introdução	20
3.2 Ferramentas Utilizadas	20
3.3 Análise por Momento de Inércia.....	20

3.3.1 STS da Coluna Central	21
3.3.2 STS a partir da Linha Central.....	22
3.4 Técnicas de Segmentação	23
3.5 Análise do Vórtex	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Momento de Inércia.....	27
4.2 Momento de Inércia Utilizando a Coluna Central.....	27
4.2.1 Momento de Inércia Utilizando a Linha Central.....	29
4.2.2 Momento de Inércia de Colunas.....	30
4.2.3 Momento de Inércia de Linhas.....	31
4.3 Segmentação	32
4.3.1 Resultados das Análises dos Clusters	32
4.4 Vórtex.....	34
5 CONCLUSÕES.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

MI – Momento de Inércia

STS – Spatial Temporal Speckle

THSP – Time History Speckle Pattern

λ – Comprimento de Onda

MOC – Matriz de Coocorrência

MOCN – Matriz de Coocorrência Normalizada

RESUMO

ROCHA NETO, Antônio Elizeu da. **Estudo de técnicas de processamento de imagens para análise da atividade cinética em Sêmen de *Ovis aries***. 2007. 66p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola. Máquinas e Automação Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

As técnicas de processamentos de imagens têm sido muito utilizadas hoje nas mais diversas áreas para análise e monitoramento de diversos fenômenos. Na agropecuária contribui no processo de reprodução animal buscando eliminar a subjetividade humana na interpretação dos resultados durante a análise de qualidade das amostras. Na área de reprodução de ruminantes, entre os muitos atributos monitorados, tem-se analisado o turbilhão formado pela movimentação em massa dos espermatozoides. Este trabalho tem por objetivo apresentar alternativas para análise de imagens de sêmen de *Ovis aries* provenientes de microscopia óptica, utilizando técnicas, tais como momento de inércia, segmentação de imagens e vórtex. As técnicas foram avaliadas a partir de um filme de sêmen de *Ovis aries* o qual foi coletado durante o tempo de turbilhonamento do mesmo. A técnica de momento de inércia ajudou acompanhar o nível de atividade do sêmen ao longo do tempo. Foi possível observar um aumento do nível de atividade nos primeiros instantes e uma redução contínua nos instantes seguintes. Na técnica de segmentação de imagens foi possível a separação do sêmen em diversas sub-populações de níveis de intensidade de cinza oferecendo ao analista de sêmen mais informações para o julgamento de qualidade. O movimento do vórtex presente no sêmen permitiu também acompanhar o deslocamento cinético das ilhas de sêmen no turbilhão, agregando mais uma informação à análise de material.

* Comitê Orientador: Roberto Alves Braga Junior – UFLA/DEG(Orientador)
Giovanni Francisco Rabelo – UFLA/DEG(Co-orientador), João Bosco Barreto Filho(Co-orientador) – UFLA/DMV, Hector Jorge Rabal CIOp Argentina(Co-orientador)

ABSTRACT

ROCHA NETO, Antônio Elizeu da. **Study of image processing techniques for the *Ovis aries* semen's kinetic activity analysis.** 2007. 66p. Dissertation (Master Program in Agricultural Engineering: Machines and Agricultural Automation) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Image processing techniques have been widely used on the analysis and monitoring of several phenomena. In farming, it contributed with the process of animal reproduction, aiming to eliminate human subjectivity when interpreting results in quality analysis of samples. In the field of ruminants reproduction, among others supervised attributes, it was analyzed the whirl formed by the spermatozoon's massal movement. This work aims to present alternatives for analyzing *Ovis aries* semen images, available from optical microscopy, using techniques such as inertial moment, image segmentation and vortex. The techniques were evaluated through an *Ovis aries* film of semen which was collected during its life time. The inertial moment technique was able to follow the semen's activity levels through time. It was even possible to observe all the changes in the sample produced by temperature adjustment. The image segmentation technique enabled the separation of semen in miscellaneous grey levels, offering the analyst more information for quality analysis. The vortex movement present in semen were monitored following the kinetic displacement of the semen's islands in their vorticity behavior, adding more information to the analysis.

* Comitê Orientador: Roberto Alves Braga Junior – UFLA/DEG (Orientador)
Giovanni Francisco Rabelo – UFLA/DEG(Co-orientador), João Bosco Barreto Filho(Co-orientador) – UFLA/DMV, Hector Jorge Rabal CIOp Argentina(Co-orientador)

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de processamento de imagem surgiram com os tratamentos de imagens analógicas. O desenvolvimento de imagens digitais e a rápida evolução das tecnologias computacionais permitiram a aplicação destas técnicas em diversas áreas, como na biologia, defesa civil, indústria, segurança pública e militar, meteorologia, medicina, geologia, agropecuária, dentre outras.

Na agropecuária alguns pesquisadores têm trabalhado na busca da substituição da subjetividade humana por processos automáticos de análise de imagens como, por exemplo, na área de reprodução animal na determinação do movimento da célula espermática.

Sabe-se que o estado da arte na área de avaliação de sêmen e reprodução animal teve, nos últimos anos, um grande avanço na avaliação da integridade da estrutura do espermatozóide. Porém, a capacidade de estimar a fertilidade do sêmen ou do reprodutor não mudou muito. A estimativa da fertilidade é restringida por fatores diversos como, o tipo de célula, a capacidade da análise, o local de deposição do sêmen e pelo fato do ejaculado ser composto por diversas populações celulares.

A motilidade e a morfologia são características heterogêneas das células nas quais se refletem não só nas diferenças da fertilização, mas também pela habilidade do espermatozóide em permanecer fértil ao longo do tempo.

Os trabalhos sobre processamento de imagens para avaliação do sêmen animal encontrados na literatura mostram que os esforços têm sido direcionados tanto na análise das imagens provenientes dos procedimentos atuais, como naquelas vindas da microscopia óptica, bem como com o uso de aparatos mais sofisticados que utilizam o laser como base de instrumentação.

Na área de reprodução de ruminantes, um dos fenômenos que pode representar um atributo para a qualidade e a capacidade de fertilização do sêmen é o nível de turbilhonamento do mesmo, que pode ser observado a olho nu ou

por meio de microscópio óptico, recebendo nota de um analista, o que caracteriza este método como subjetivo.

O objetivo deste trabalho é analisar as imagens de sêmen de *Ovis aries*, provenientes de microscopia óptica, quanto ao nível de atividade cinética. Alguns métodos, de análise de imagem foram avaliados, tais como o Momento de Inércia, técnica de Segmentação de Imagens e o Vórtex.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Luz coerente e não coerente

Segundo Gallas (2007), a coerência é a medida da correlação entre as fases medidas em diferentes pontos de uma onda de luz. Entretanto, mesmo sendo esta uma propriedade de uma onda que se propaga, a coerência está diretamente relacionada às características da fonte da onda.

Quando descrevemos a coerência das ondas luminosas, existem dois tipos básicos de coerência:

- Coerência temporal - é a medida da correlação da fase da onda luminosa em diferentes pontos ao longo da direção de propagação – ela diz quão monocromática é a fonte;
- Coerência espacial - é a medida da correlação da fase da onda luminosa em diferentes pontos na direção transversal a direção de propagação – ela diz quão uniforme é a fase da frente de onda.

Como exemplo, considere uma fonte bastante incoerente: uma lâmpada de filamento incandescente.

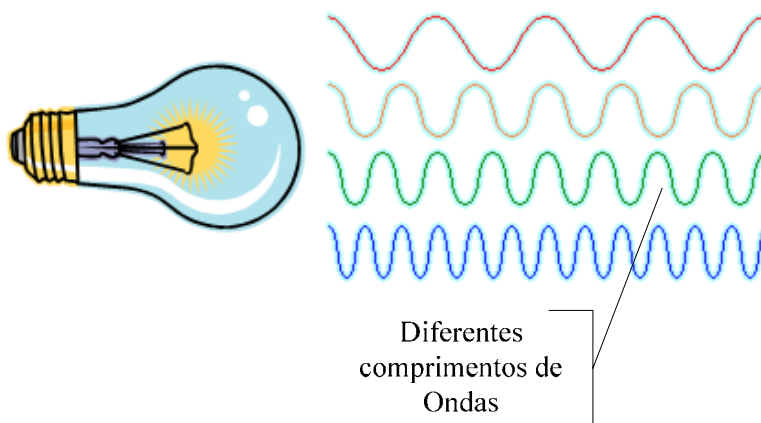


FIGURA 1 Fonte Incoerente

Abaixo temos um exemplo que ilustra como podemos filtrar espacialmente uma fonte incoerente de modo a aumentar sua coerência espacial, seguida por uma filtragem para aumentar sua coerência temporal.

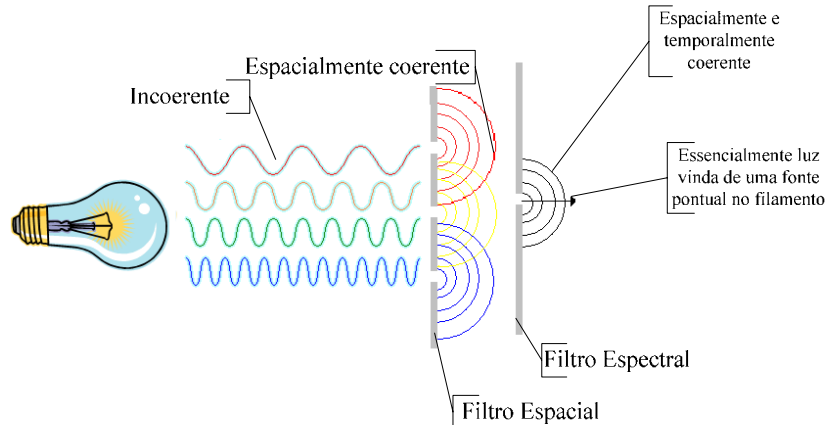


FIGURA 2 Aumento da Coerência de uma Fonte Incoerente

2.2 Scattering

O “scattering” foi definido por (Hecht, 1987) como a absorção e pronta remissão da radiação eletromagnética por elétrons associadas aos átomos e moléculas. Desta forma, os processos de transmissão, reflexão e refração da luz são manifestações macroscópicas do scattering, ocorrendo em um nível sub microscópico.

A absorção se relaciona à parcela de energia que persiste em um corpo após incidir sobre ele. Contrapõe-se às parcelas correspondentes à transmissão e à reflexão.

A Figura 1 mostra como se forma o scattering de um feixe de luz incidente em um átomo.

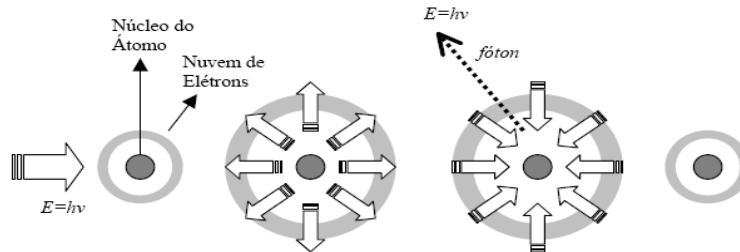


FIGURA 3 Esquema do Scattering

2.3 Speckle e Bio-Speckle

Considere um feixe de luz coerente incidindo sobre uma superfície rugosa com irregularidades comparáveis com o comprimento de onda (λ) da luz incidente. Os raios provenientes da fonte coerente atingem diferentes pontos da superfície e percorrem diferentes caminhos ópticos; devido a isso as ondas espalhadas pela superfície possuem fases e amplitudes aleatórias.

A interferência dessas ondas defasadas, mas coerentes, resulta em um padrão granuloso de espalhamento que é um padrão estacionário, o qual é chamado de granuloso óptico ou simplesmente de padrão de *speckle*.

O padrão de *speckle* pode ser visualizado em todo espaço e pode ser projetado sobre um anteparo colocado em qualquer posição do espaço tridimensional. Este fenômeno aparece também quando essa luz coerente atravessa um meio cujo índice de refração varia aleatoriamente. Quando o plano de iluminação atravessa o fluxo de fluido semeado com partículas, o fluxo comporta-se como um meio cujo índice de refração varia, e assim as ondas espalhadas possuem fases e amplitudes aleatórias, formando um padrão de *speckle*. Esse padrão é portador de informação da superfície ou do meio aleatório.

O *speckle*, que pode ser entendido como granuloso, é um fenômeno que inicialmente era considerado como um ruído que atrapalhava os trabalhos de óptica. Esse fenômeno ocorre somente pelo fato de a luz ser coerente, e que

quando ilumina um objeto observa-se algo diferente. A Figura 4 mostra um *speckle* formado por uma luz coerente.

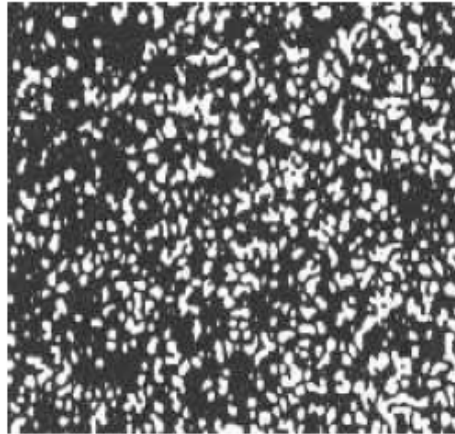


FIGURA 4 Padrão de speckle formado por iluminação laser de HeNe em um vidro
O efeito que se registra é a interferência dos diversos feixes que retornam do material iluminado. A figura de interferência muda, então, de acordo com o ponto de observação, mudando também se a superfície mudar de posição.

As pesquisas para eliminar o *speckle* dos resultados dos experimentos ópticos acabaram por conhecer melhor esse fenômeno, que passou a ser visto não mais como um fenômeno indesejado.

2.3.1 THSP - Time History Speckle Pattern ou STS Spatial Temporal Speckle

O speckle dinâmico passou a ser analisado por meio da manipulação das figuras de interferências, que modificando no tempo, permitiram a proposta de uma imagem denominada *Time History Speckle Pattern* (THSP), ou *Spatial Temporal Speckle* (STS), registrada em inúmeros trabalhos científicos como: Oulamara et al. (1989), Xu et al. (1995) e Arizaga et al. (1999).

Esta nova imagem passou a ser então analisada por metodologias baseadas em estatística de segunda ordem, como a autocorrelação ou o Momento de Inércia. A Figura 5 mostra uma imagem do THSP, na qual as colunas apresentam a evolução de um pixel no tempo, a referencia espacial é representada pelas linhas da matriz. A principal informação até então obtida dessa imagem está relacionada à quantificação da atividade por meio da mudança dos pixels no tempo. Desse modo, a questão espacial tem sido considerada como uma repetição do sinal, permitindo uma análise de média no final da análise, ou mesmo uma forma de coletar mais dados (Braga Jr. et al., 2007). O Momento de Inércia proposto por (Arizaga et al., 1999) tem sido uma ferramenta muito útil na medida de atividade a partir do THSP.

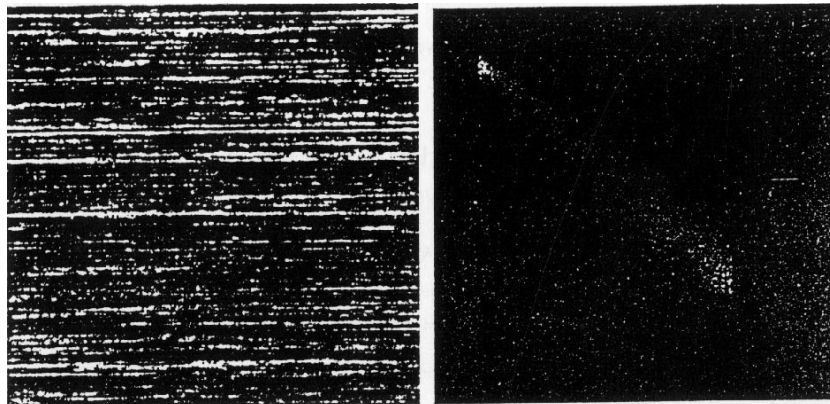


FIGURA 5 THSP e a Matriz de Co-ocorrência de um Material com Alto Nível de Atividade
Fonte: (Arizaga et al., 1999)

2.3.2 MI - Momento de Inércia

A análise de níveis de atividades em materiais biológicos usando o laser, retira informações dos *Spatial Temporal Speckle (STS)* proposto por Oulamara et al. (1989) e Xu et al. (1995). Segundo Arizaga et al. (1999), o cálculo do MI permite apresentar uma interpretação quantitativa para o STS, baseada nas ocorrências de valores das intensidades sucessivas dos pixels que compõem o STS. Este método forma uma matriz com as ocorrências de intensidade

sucessivas e que é denominada Matriz de Ocorrências (MOC), definida assim pela Equação 1:

$$MOC = [N_{ij}] \quad (\text{Equação 1})$$

$$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$MI = \sum M_{ij}(i - j)^2 \quad (\text{Equação 3})$$

Segundo Arizaga et al. (1999), nessa equação N_{ij} representa uma lógica que identifica quantas vezes ocorreu a intensidade i , seguida da intensidade j , e em uma matriz de 256×256 (de 0 a 255 faixas de intensidades codificada em 8 bits) faz-se o cômputo de todas as ocorrências. Uma vez montada a MOC, observa-se que a diagonal principal está relacionada com intensidades que não variaram no tempo, enquanto fora da mesma aparecem as ocorrências que caracterizam uma mudança no tempo. Dessa forma, quanto mais afastado da diagonal principal estiver a ocorrência maior a mudança na intensidade do pixel i para o pixel j .

A partir desta Matriz de Ocorrência é possível analisar o nível de alteração do speckle ao longo do tempo. O interesse é quantificar a mudança do padrão de speckle. A MOC é então utilizada para obter o momento de segunda ordem, assim denominado de Momento de Inércia.

A Equação 3 mostra a técnica utilizada, que consiste no somatório do produto dos valores de ocorrência pelo quadrado da diferença entre as coordenadas, que representa a distância da diagonal principal.

Antes de realizar o cálculo do momento de inércia pode ser realizada uma normalização da MOC. Após esta normalização cria-se a Matriz de Co-Ocorrência Normalizada Numericamente (MOCN). Essa matriz pode ser avaliada, segundo Arizaga et al. (1999), como mostra a Equação 2.

2.4 Imagem Digital

Segundo Falcão (2003), a imagem digital é a representação em duas dimensões de objetos do mundo real. Esta representação se dá a partir de um conjunto finito de valores chamados de pixels. A representação da imagem é dada a partir de uma matriz e cada elemento $M(x, y)$ da matriz é um pixel. Dependendo do tipo de imagem o pixel pode ser formado de várias componentes formadoras das imagens.

Para se determinar a qualidade de uma imagem digital levam-se em consideração os pontos por resolução e a quantidade de cores.

A determinação da resolução se dá pela quantidade de pontos por polegadas ou DPI (*dots per inch*) e a qualidade de cores se determina pelo número de níveis de intensidade que uma determinada imagem possui como, por exemplo, 256 níveis de cinza para uma imagem de 8-bits.

O tamanho dos arquivos de imagem depende do número de pixels, da gradação tonal de cada pixel e do armazenamento de outras informações junto com a imagem.

2.4.1 Propriedades de um Pixel

A palavra *Pixel* é a aglutinação de *Picture* e *Element*, ou seja, elemento de imagem, sendo *Pix* a abreviatura em inglês para *Picture*. Um pixel é o menor elemento num dispositivo de exibição, ao qual é possível atribuir-se uma cor, sendo que o conjunto de milhares de pixels forma a imagem inteira.

2.4.1.1. Conectividade e Vizinhança de um *Pixel*

A conectividade é uma propriedade de ligação entre dois pixels que faz com que sejam considerados parte de uma mesma região em uma imagem. A noção de conectividade entre pixels é uma noção particularmente importante para a detecção das bordas dos objetos e os pixels que as compõem. Dois pixels serão considerados como conectados, ou seja, pertencentes ao mesmo objeto se satisfazem dois critérios:

- O critério de similaridade (por exemplo, o mesmo nível de cinza); e
- O critério de vizinhança - se são adjacentes de acordo com alguma modalidade de vizinhança.

A vizinhança pode ser de 4 e 8 vizinhos, conforme a Figura 6, na qual é possível observar que a vizinhança pode ser constituída de pixels contíguos na vertical e horizontal, bem como de pixels na diagonal.

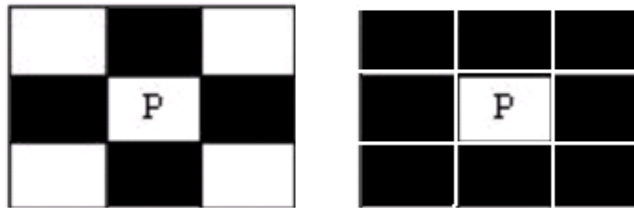


FIGURA 6 Vizinhanças 4 e 8 de um Pixel

2.4.1.2. Formatos de Imagens Digitais

Imagens capturadas eletronicamente por câmaras digitais, scanners, e/ou geradas por programa, são transferidas para um computador, onde ficam armazenadas em forma de arquivos. Estes arquivos foram padronizados de acordo com alguns fabricantes de equipamentos digitais e programas de computadores. O formato descreve como as imagens são organizadas dentro do disco ou da memória do computador.

2.5 Processamento de Imagens

Considera-se processamento de imagens como qualquer forma de processamento no qual a partir de dados de entradas e/ou saídas são geradas imagens, (Ian et al., 1995).

As técnicas de processamentos de imagens eram realizadas a partir de dispositivos ópticos e analógicos e, com o avanço das tecnologias e dos próprios

computadores, estas técnicas foram gradualmente substituídas por técnicas de processamentos a partir de imagens digitais (Rafael & Gonzalez et al., 1992).

A Figura 7 mostra as fases do processamento de imagem, sendo possível observar o início e o final de um processamento, ou seja, as entradas e saídas e os resultados.

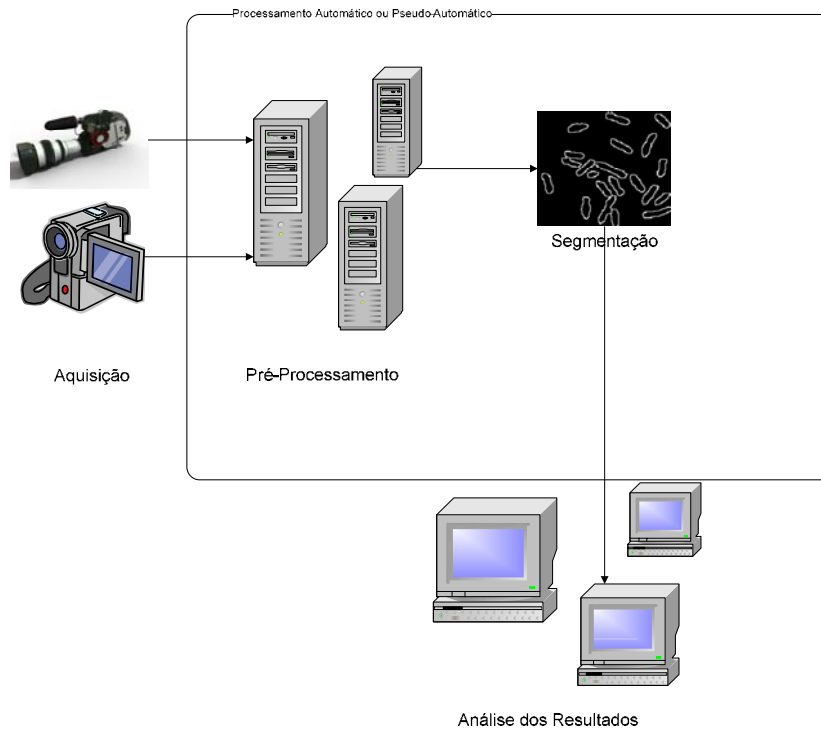


FIGURA 7 Etapas do Processamento de Imagens

Algumas funções básicas do processamento de imagens são apresentadas a seguir, entre elas a segmentação, o limiar, a filtragem e a análise de partículas ou clusters.

2.5.1 Segmentação

Segundo Wayne (2006), em seu manual, “a segmentação de imagens necessita de procedimentos eficazes para a extração de feições, os quais são de grande interesse na automação de processos, podendo ser utilizados em diversas

áreas, como Reconhecimento Automático, Visão de Máquina, Controle de Qualidade, etc.”

A segmentação tem por objetivo dividir uma imagem em diversas áreas de interesse. Esta pode ser realizada de algumas formas como, por exemplo, a descontinuidade e similaridade.

A técnica por detecção de descontinuidades procura regiões na imagem em que houve uma abrupta mudança no nível de intensidade de cinza nos pixels vizinhos. Esta alteração de tonalidade é chamada de contorno do objeto. Já a técnica por similaridade busca na imagem um objeto semelhante ao que está sendo procurado. A similaridade pode ser tanto de tonalidade como de formato, tamanho ou forma.

2.5.2 Threshold ou Limiar

Imagens de 8-bits possuem intensidades que podem variar entre 0 e 255 níveis de cinza. O processo de *threshold* divide imagens deste formato em 2 grupos: um formado por todos os pixels que possuem intensidades superiores a um valor estabelecido e outro grupo formado pelos pixels de intensidade inferiores. Este valor é pré-determinado com o objetivo de limitar a imagem analisada a possuir apenas tonalidades neste valor. Para isto define-se uma função limite, como pode ser observado a seguir:

$$F(x, y) = 1, \text{ se } f(x, y) \geq P$$
$$F(x, y) = 0, \text{ se } f(x, y) < P$$

Onde:

$F(x, y)$ – Função de atribuição de valor ao pixel na posição (x, y)

$f(x, y)$ – Função de valor do pixel na posição (x, y)

P – Limite de valor pré-determinado

O *threshold* permite, por exemplo, a separação do objeto analisado do fundo da imagem, como pode ser visto na Figura 8. Na Figura 8 (b) foi utilizado como limite entre 0 e 120 e na Figura 8 (c) foi utilizado como limite entre 120 e 255.

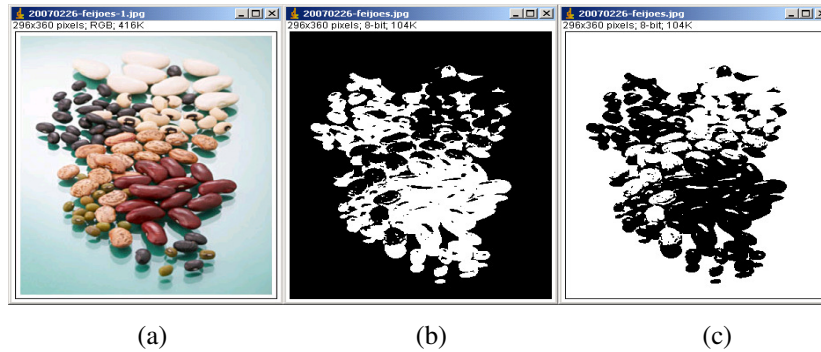


FIGURA 8 Diferentes threshold (a) Original (b) 0 a 120 (c) 120 a 255
 O *threshold* é uma técnica muito sensível, na qual é necessária a intervenção de um operador, que deverá separar algum objeto de um fundo, analisar qual o melhor valor de limite para realizar esta operação e aplicar a função de *threshold*. Se a escolha do limite não for boa a separação não ficará de acordo com o esperado.

2.5.3 Filtragem digital

A filtragem digital é considerada um conjunto de técnicas destinadas a corrigir, retirar características indesejáveis, e/ou realçar uma imagem, ou seja, acentuação de determinada característica. Nesta filtragem pode-se utilizar o processo de convolução, o qual calcula a intensidade de um determinado pixel em função da intensidade de seus vizinhos. Este cálculo pode ser baseado em ponderação, podendo utilizar pesos diferentes para vizinhos diferentes. Chama-se *kernel* da Convolução a matriz formada pelos pesos utilizados. A obtenção de um novo valor do pixel analisado é dada pela multiplicação do *kernel* pelo valor da imagem original em torno do pixel analisado, sendo feito elemento a elemento. Somando este valor encontra-se o pixel na nova imagem.

Os objetivos mais comuns de filtragem são:

- Melhoria na qualidade de uma imagem (realce - *sharpening - enhancement*);
- Eliminação de ruídos (*noise*);

- Corrigir imagens;
- Segmentar imagens;
- Eliminar ou provocar “distorções”;
- Criar efeitos artísticos.

Alguns tipos de filtrações encontrados são:

- Filtração no Domínio da Frequência:
 - Utilização da Transformada de Fourier.
 - Baseadas no teorema da convolução;
- Filtração Espacial:
 - Utilização de máscaras.

2.5.3.1. Filtro Gaussiano

Segundo Bonato et al. (2003), o filtro gaussiano é aplicado para melhorar a qualidade da imagem de entrada, eliminando características indesejáveis, as quais podem induzir a erros de análise. Este filtro suaviza os valores associados a cada pixel. Esta ação minimiza ou até elimina informações indesejáveis geradas por fatores externos.

O filtro usa uma janela de $N \times N$ pixels, computando o desvio do pixel central em relação aos seus vizinhos na janela. Todos os pixels são visitados e posicionados no centro da janela, e um novo valor para o pixel é obtido a partir da equação:

$$G(x,y) = 1/D \sum w(i,j) * g(x + j - (M-1), y + i - (N-1)/2)$$

Sendo:

$w(i,j)$ = Coeficiente de ponderação

$g(x,y)$ = Valor associado ao pixel

$G'(x,y)$ = Novo valor associado ao pixel

M,N = Dimensões da janela de vizinhança do pixel analisado

D = Soma de todos os valores da matriz de ponderação

2.5.4 Análise de Partículas ou Clusters em Imagens

Uma partícula ou *cluster* em processamento de imagem pode ser determinado pelo seu tamanho, ou seja, sua área, e esta é determinada em pixels. Para determinar um objeto, primeiro este deve ser segmentado, para que se possa encontrá-lo na imagem. Na seqüência é feita uma contagem da quantidade de pixels que a compõe e assim calcula-se a área do objeto ou do *cluster*.

2.6 Ferramenta de Processamento de Imagens

Ferramentas de processamento de imagens são programas que auxiliam no manuseio de imagens digitais. Existe uma série de ferramentas que permitem estas análises com distintas características e inúmeros recursos. Uma dessas ferramentas é o programa ImageJ, (Wayne, 1997) que apresenta uma série de funções pré-programadas, como também possui uma flexível plataforma para a construção de novos procedimentos por meio de macros ou *plug-ins*.

Uma macro é uma abreviação para um conjunto de comandos utilizados para simplificar uma tarefa repetitiva e/ou automatizar um processo, de forma que, ao invés de executar uma complicada seqüência de comandos, é possível executar somente uma macro.

Plugin é um termo que significa "de encaixe". Pode ser utilizado em situações quotidianas, como aparelhos eletrônicos, máquinas ou qualquer coisa. Na informática, um *plugin* ou *plug-in* é um, geralmente pequeno e leve, programa de computador que serve normalmente para adicionar funções a outros programas maiores, provendo alguma funcionalidade especial ou muito específica.

O ImageJ possui algumas ferramentas para editar, analisar, entre outras operações sobre imagens e, pode também montar pilhas, ou seja, seqüência de imagens, facilitando assim analisar várias imagens ao mesmo tempo. Pode realizar operações de transformações de 8, 16 e 32 bits e aceita a maioria de

formatos de imagens existentes, dentre eles tiff, gif, jpeg, bmp, entre outros, bem como formato natural do tipo *Raw*.

O programa é desenvolvido utilizando *multithreaded*, permitindo que sejam executadas várias tarefas em paralelo, e é escrito sobre a linguagem Java podendo ser executado em qualquer computador, desde que o mesmo possua uma máquina virtual Java.

2.7 Fenômeno Vórtex ou Vórtice

Segundo Vórtex (2007), o fenômeno do vórtex pode ser definido como um escoamento turbulento giratório onde as linhas de corrente apresentam um determinado padrão circular ou espiral de um centro de rotação. O surgimento é devido à diferença de pressões de duas regiões vizinhas. Quando ocorre esta diferença, o fluido tende a equilibrar o sistema e flui para uma destas regiões, mudando a direção original do escoamento e, com isso, gera a vorticidade.

O fenômeno do vórtex é comumente encontrado nos mais diversos locais da natureza, como: correntes circulares de água vindas de marés conflitantes, como quando se mexe uma xícara de café, furacões, tornados ou efeitos de ponta de asa, como pode ser visto na Figura 9. Este último é muito estudado pela indústria aeronáutica, pois sua geração aumenta o arrasto da aeronave.

Qualquer escoamento circular ou rotacional que possui vorticidade é chamado de vórtice. Isto é um conceito matemático muito utilizado na dinâmica dos fluidos e esta vorticidade pode ser entendida como a quantidade de circulações ou rotações de um fluido por unidade de área de um ponto no campo de escoamento.



FIGURA 9 Vortex de Asa
Fonte : (Vortex, 2007)

2.8 Técnicas de Análise de Sêmen

Segundo Fonseca et al. (1992), “os padrões andrológicos são características intrínsecas de cada espécie, inúmeros são os fatores que podem alterar cada parâmetro, sem, contudo, indicar alteração do quadro de estado de saúde do ponto de vista de potencial reprodutivo. Caberá ao técnico a correta interpretação dos resultados para chegar a um diagnóstico e prognóstico correto”.

Avaliação dos Aspectos Físicos do Sêmen

A avaliação física do sêmen pode ser realizada através do espermograma. Nele existem parâmetros que se relacionam:

- A cinética espermática: o turbilhonamento, ou movimento de massa, caracterizado pelo movimento em forma de ondas de evolução dos espermatozoides, resultante de concentração, vigor e motilidade elevados;

- O vigor, ou intensidade de movimentação, que influencia a velocidade dos espermatozóides;
- A motilidade individual, que representa a proporção de espermatozóides móveis no ejaculado.

O turbilhonamento e o vigor são características seminais medidas em uma escala de 1 a 5 e a motilidade individual em percentagem, segundo Fonseca et al. (1992).

De acordo com Al-Qarawi et al. (2002), a motilidade dos espermatozóides é um aspecto físico do sêmen avaliado no exame andrológico de mamíferos de diversas espécies, sendo considerada um dos principais fatores relacionados à fertilidade do macho.

2.8.1 Métodos para a Avaliação da Qualidade do Sêmen

Dentre os aspectos relevantes na avaliação seminal, a motilidade tem atraído a atenção dos pesquisadores. Várias técnicas têm sido idealizadas para estudar e descrever a motilidade quantitativa dos espermatozóides. A mais simples delas envolve uma avaliação visual do percentual de células móveis e da qualidade da motilidade individual do espermatozóide.

Segundo Hafez (1995), a baixa correlação entre motilidade espermática e fertilidade pode ser resultado de uma acuidade e precisão do método utilizado para a avaliação da motilidade espermática.

Visando eliminar a subjetividade da avaliação, para tornar a análise de sêmen um processo mais objetivo, alguns métodos foram desenvolvidos, tais como: a foto micrografia Fonseca et al. (1992); a técnica do swim-up Suttiyoutim, (1993); a técnica do funil óptico Kaneta et al. (2000); migração dos espermatozóides em meio sintético Verbeckmoes et al. (2002); a avaliação da cinética espermática por sistemas computadorizados Farrell et al. (1995), Al-Qarawi et al. (2002), Andersen et al. (2002), Suzuki et al. (2002).

Algumas destas técnicas foram alvos de proteção intelectual com patentes registradas como (University court of glasgow, 2005) e (Amnis corporation ortyn, 2006), que criam uma pilha com imagens do sêmen e verificam a parcela dos dados das imagens que corresponde à pilha de interesse. O deslocamento relativo da pilha no frame é comparado com o precedente e calculado para determinar a motilidade da pilha. Buscando também maneiras de automatizar o processo de verificação de motilidade espermática (UFLA, março 2007) propôs um método de observação da atividade motional de objetos biológicos e não-biológicos no espaço, entre outros trabalhos, visando calcular o movimento dos turbilhões presente no sêmen, procurando substituir a subjetividade humana, como procedimento de análise de imagens.

Trabalhos mais sofisticados que usam o laser como base de instrumentação, como é o caso do (Biophos Medical, 1994). O (PI401519-03), este ultimo utilizando método implementado em microcomputador para captura e processamento de imagem do *bio-speckle*.

Segundo Luz et al. (2000), testes laboratoriais para avaliação do sêmen são importantes não só para uma predição da fertilidade, mas também para o estudo de novos meios de sua preservação. A motilidade e o vigor para sêmen bovinos e ovinos são os mais utilizados pelos profissionais que realizam a preservação de sêmen.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Introdução

Este trabalho foi realizado na Universidade Federal de Lavras, nos Departamentos de Medicina Veterinária e de Engenharia.

O sêmen foi coletado de um *Ovis aries*, pelo método de vagina artificial, sendo que este possuía uma motilidade de massa e um vigor de grau 5, de acordo com o método proposto por (Fonseca et al., 1992), e uma concentração de 1.42 a 5.16×10^9 espermatozoides/ml. A motilidade individual registrada foi entre 85 a 90%, seu volume variou de 0,5 a 1 ml. A alíquota analisada foi de 10 μ l por meio de um microscópio da marca Olympus modelo BX41 com aumento de 20X do sêmen *in-natura*.

Para a captura do filme analisado foi utilizada uma câmera digital da marca NIKON acoplada ao microscópio; o sêmen foi filmado até que este apresentasse uma baixa atividade de acordo com o método de análise proposto por Fonseca et al. (1992); a câmera estava em foco e o vídeo foi RGB (colorido); o filme gerado teve uma duração de 6 minutos e 13 segundos.

3.2 Ferramentas Utilizadas

No trabalho realizado foi utilizado o ImageJ, Wayne (1997). Para as análises de imagens foram construídas macros no ambiente do ImageJ (Anexo A). Durante a análise, o filme foi transformado em uma seqüência de frames, gerando um total de 5600 imagens. Estas foram transformadas em 8bits para serem trabalhadas nos processamentos propostos.

3.3 Análise por Momento de Inércia

O Momento de Inércia foi calculado a partir de uma “pseudo” imagem de STS, uma vez que as imagens não se tratavam de padrões de *speckle* provenientes de iluminação de luz coerente. Cada imagem foi considerada um padrão de *speckle* e a partir da seqüência de imagens foram construídas as

histórias temporais (STS) com distintas abordagens. As variações na formação destas imagens representam a história temporal constituídas da montagem a partir da coluna central, da linha central e um de conjunto de colunas e linhas.

3.3.1 STS da Coluna Central

A montagem deste STS constitui-se da retirada da coluna central de cada imagem e a sua transformação em coluna no STS, como pode ser visto na Figura 10.

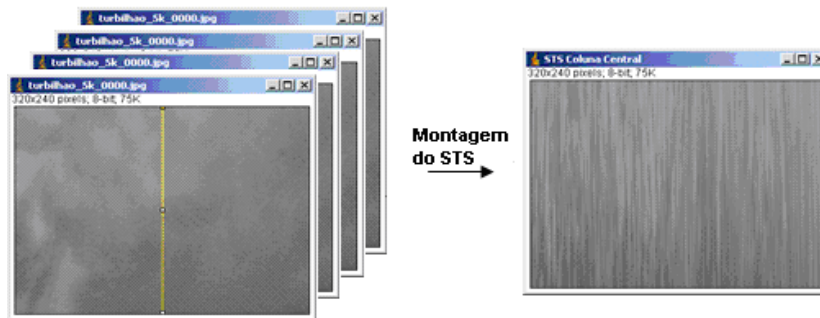


FIGURA 10 Coluna Central e STS Formado pela Composição da Coluna

Cada nova imagem constituída a partir de N imagens originais geraram uma matriz $X:Y$ pixels. As 5600 imagens produziram então 17STS's representando a evolução temporal do fenômeno.

3.3.1.1. STS da Coluna Central com Filtros Gaussianos

Para esta montagem a imagem passou por um filtro gaussiano; logo após a filtragem foi retirada a coluna central da imagem e foram montados os STS's, como pode ser visto na Figura 11.

Para a filtragem foi utilizado o kernel de raio 3 e 6, e cada nova imagem constituída a partir de X imagens originais gerando uma matriz $X:Y$ pixels.

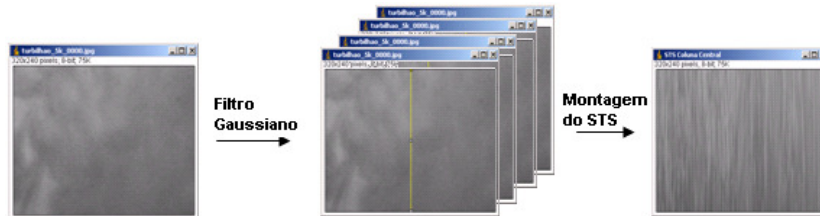


FIGURA 11 Filtro Gaussiano e Montagem do STS a partir da Coluna Central.

3.3.2 STS a partir da Linha Central

Para esta montagem foi extraída a linha central da imagem, como pode ser verificado na Figura 12 e montado o STS.

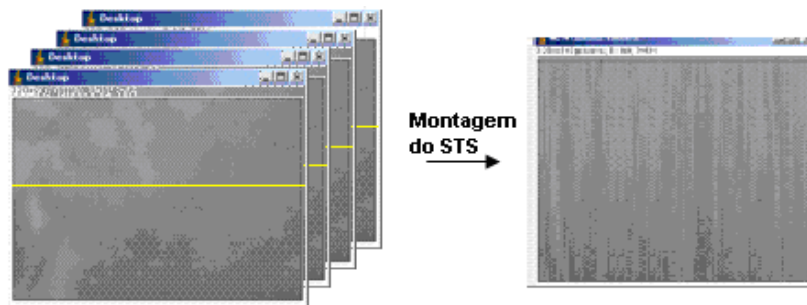


FIGURA 12 Montagem e Rotação do STS a Partir da Linha Central

3.3.2.1. STS a partir da Linha Central com Filtros Gaussianos

Nesta montagem a imagem utilizou filtro gaussiano de raio 3 e 6; logo após, foi extraída a linha central e montado o STS. A Figura 13 mostra esta montagem.

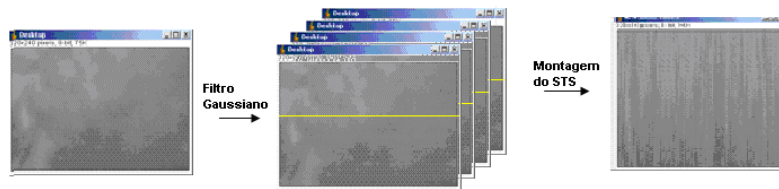


FIGURA 13 Filtro Gaussiano e Montagem do STS

3.3.2.2. STS Montado com Várias Colunas

A montagem de vários STS's utilizando colunas distintas dos frames foi realizada, sendo que as colunas escolhidas de forma aleatória foram: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240, gerando 17 STS para cada uma das 12 colunas escolhidas formando um total de 204 STS's.

3.3.2.3. STS Montado a Partir das Linhas

A montagem dos STS's a partir da tomada de linhas ao invés de colunas foi implementada a partir da coleta das mesmas. As linhas escolhidas de forma aleatória foram: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 e 240, gerando 17 STS para cada uma das 12 linhas escolhidas formando um total de 204 STS's.

3.4 Técnicas de Segmentação

As análises de níveis de atividade utilizando segmentação de imagem foram precedidas de etapas de filmagem do sêmen, separação do filme em frames, segmentação em distintas faixas de níveis de cinza finalizadas pela análise dos *clusters* resultantes.

3.4.1.1. Separação de Frames

O filme foi separado em *frames* e foi montada uma seqüência de imagens para a análise.

Para esta separação dos frames foi utilizado o ImageJ, utilizando a taxa de aquisição do filme garantindo a mesma seqüência entre o filme e a pilha de imagem. O resultado foi de aproximadamente 5600 imagens.

3.4.1.2. Threshold ou Limiar

A segmentação das imagens utilizou os distintos limiares de *thresholds*, escolhidos de forma aleatória, porém seqüencial: 0 a 96, 96 a 110, 110 a 130, 130 a 160, 160 a 190 e 190 a 255

A Figura 14 mostra uma comparação do comportamento do threshold em vários valores de limites, em apenas um frame.

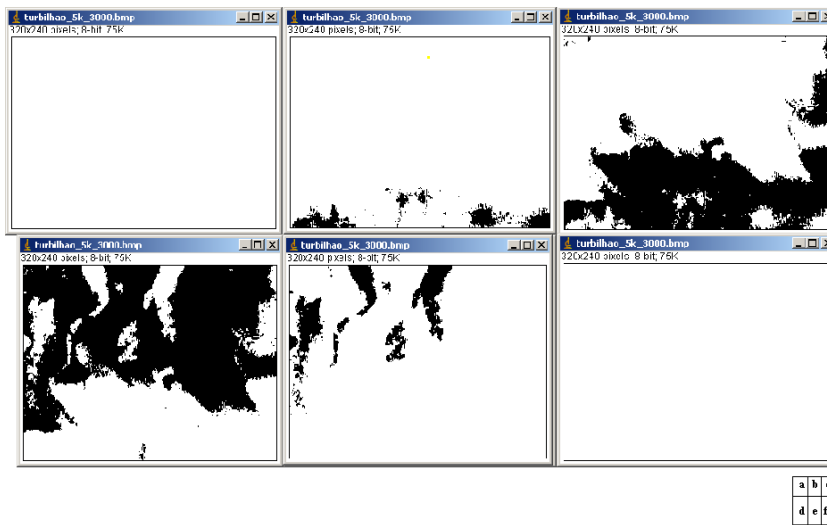


FIGURA 14 Diferenças entre os Limites em uma Mesma Imagem a) 0 a 96 b) 97 a 110 c) 111 a 130 d) 131 a 160 d) 161 a 190 e) 191 a 255

3.4.1.3. Análise de *Clusters*

Para a análise dos *clusters* ou partículas contidas no turbilhamento foram considerados, nos distintos limites de *threshold*, os clusters com tamanho maiores que as seguintes faixas de pixels: 0, 100, 300, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 18000 pixels.

A Figura 15 mostra as etapas de segmentação utilizadas. Primeiro determinou-se o *threshold*; depois somaram-se as áreas dos *clusters* que estavam no limite e que eram maiores que a faixa escolhida.

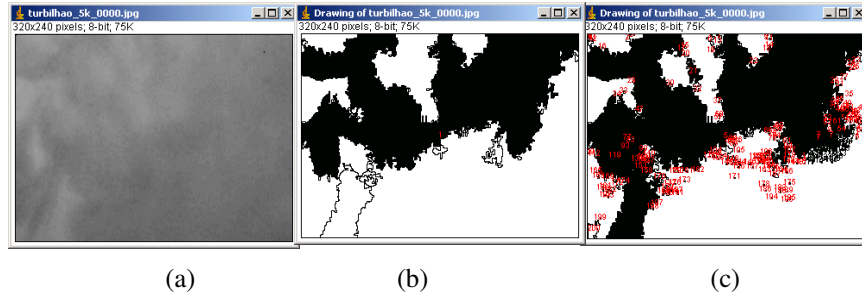


FIGURA 15 Separação e Contagem de Clusters a) imagem original b) clusters maiores que 10 c) contagem das clusters

3.5 Análise do Vórtex

A análise utilizando o fenômeno da vorticidade contida no líquido seminal contou com a estratificação das imagens em níveis de cinza, utilizando o mesmo procedimento de segmentação. Ou seja, foram considerados nos distintos limites de *threshold*, escolhidos de forma aleatória, porém seqüencial: 0 a 96, 96 a 110, 110 a 130, 130 a 160, 160 a 190 e 190 a 255.

Após a segmentação foi selecionada, de forma manual, a mesma ilha em *frames* consecutivos e calculado o quanto a ilha sucessiva se deslocou em relação à analisada. A Figura 16 mostra a análise de 4 *frames* consecutivos.

Em cada nível analisado as ilhas encontradas tinham centro de gravidade calculado usando referências x e y da ilha na imagem. Uma vez identificada, a ilha teve a coordenada do seu centro de gravidade comparada ao longo do tempo, gerando um vetor de deslocamentos sucessivos representados por $D(x, y)$.

Após a coleta das distâncias entre os centros de massas, estes foram montados de forma gráfica para cada nível de intensidade de cinza e analisado o comportamento dos mesmos.

A Figura 16 apresenta uma seqüência de quatro imagens com uma ilha em movimento com características similares a um vórtex com uma respectiva segmentação pra análise. Nesta figura existem setas que mostram o sentido de rotação da ilha escolhida.

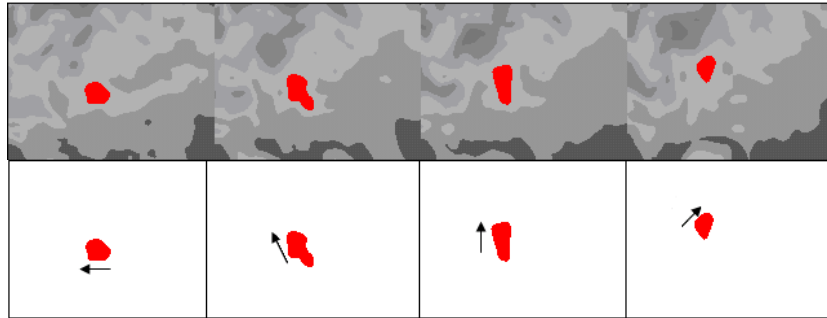


FIGURA 16 Ilhas de Rotação

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Momento de Inércia

As análises de momento de inércia serão apresentadas de acordo com a forma de montagem do STS, a partir da coluna central, depois da linha central, e várias colunas e linhas.

4.2 Momento de Inércia Utilizando a Coluna Central

O resultado do Momento de Inércia utilizando a coluna central pode ser verificado na Figura 17, na qual se observa uma tendência de aumento de atividade seguida de uma tendência de queda estável. A este comportamento atribui-se a transição de temperatura da amostra, que após ser colocada na placa aquecedora causa um aumento da atividade do conjunto para depois iniciar um processo esperado de redução da atividade. Foi possível observar que até o STS de número 8 obteve um comportamento oscilatório com tendência de subida, seguindo de uma curva que teve a tendência decrescente, porém estável. Esta curva mostra a diminuição da atividade do sêmen analisado.

Na tentativa de suavizar os resultados foi utilizado um filtro gaussiano de raio 3 e 6 na montagem dos STS. Estas análises podem ser verificadas nas Figuras 18 e 19, nas quais os resultados se mostraram similares aos resultados sem filtro, indicando que não há necessidade da utilização de filtros.

A habilidade da técnica proposta, de seguir os fenômenos esperados em uma amostra de sêmen, mostra sua potencialidade de análise de imagens provenientes de metodologia rotineira em laboratórios de reprodução animal.

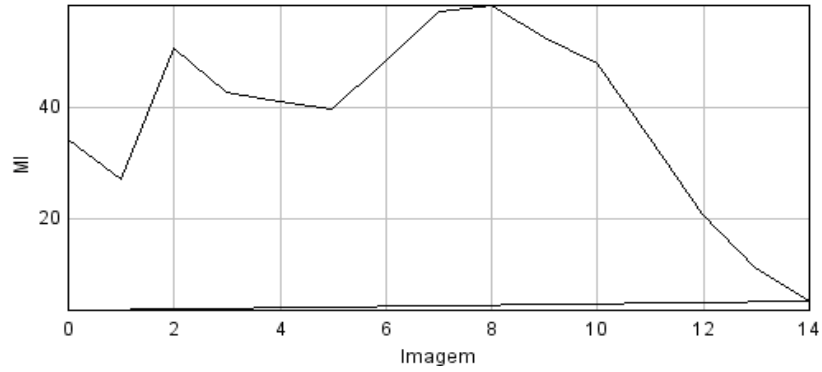


FIGURA 17 Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Coluna Central na Montagem dos STS's

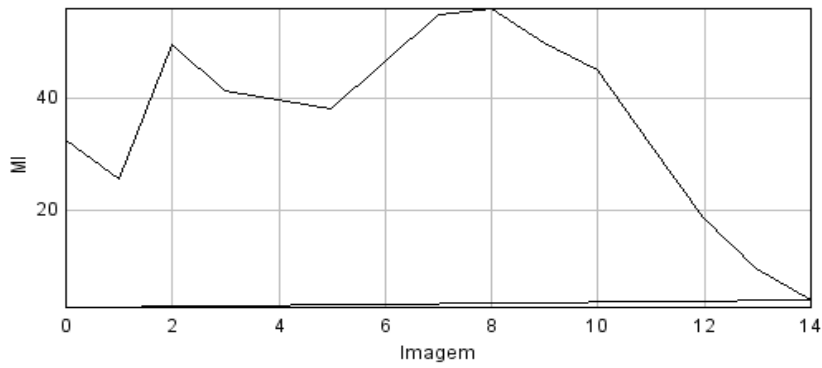


FIGURA 18 Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Coluna Central na Montagem dos STS's e um Filtro Gaussiano de Raio 3

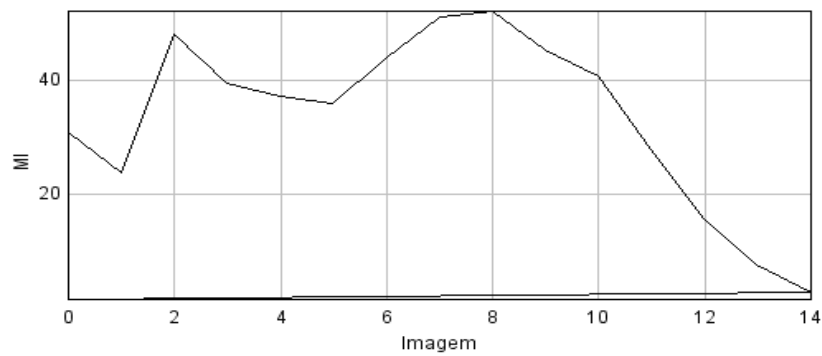


FIGURA 19 Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Coluna Central na Montagem dos STS's e um Filtro Gaussiano de Raio 6

4.2.1 Momento de Inércia Utilizando a Linha Central

O resultado do Momento de Inércia utilizando a linha central pode ser verificado na Figura 20, na qual se observa uma tendência inicial de subida de atividade, seguida de uma tendência de queda estável, similar àquele obtido a partir da coluna central. Foi possível observar que até o STS de número 10 obteve-se um comportamento oscilatório com tendência de subida, seguido de uma curva que teve a tendência decrescente e estável.

Na tentativa de suavizar os resultados foi utilizado um filtro gaussiano de raio 3 e 6. Estas análises podem ser vistas nas Figuras 21 e 22, nas quais os resultados se mostraram similares aos resultados sem filtro, mostrando que não há necessidade da utilização de filtros.

A similaridade dos resultados obtidos a partir das linhas e colunas evidencia a robustez da técnica.

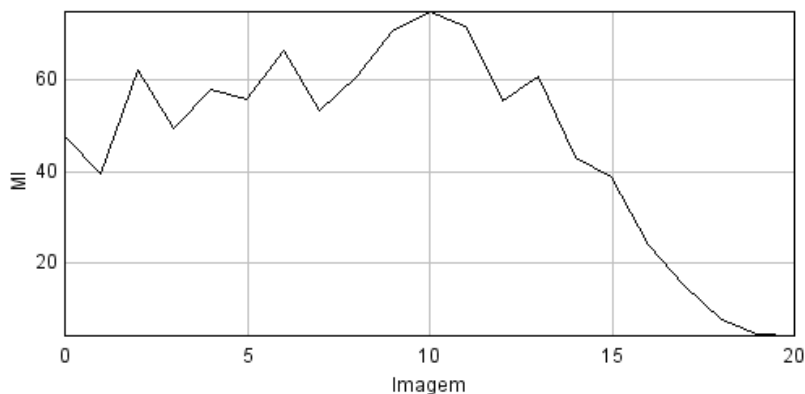


FIGURA 20 Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Linha Central na Montagem dos STS's

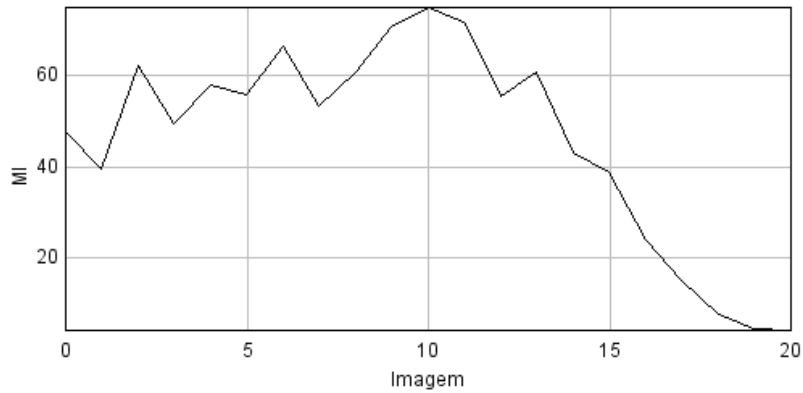


FIGURA 21 Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Linha Central na Montagem dos STS's e um Filtro Gaussiano de Raio 3

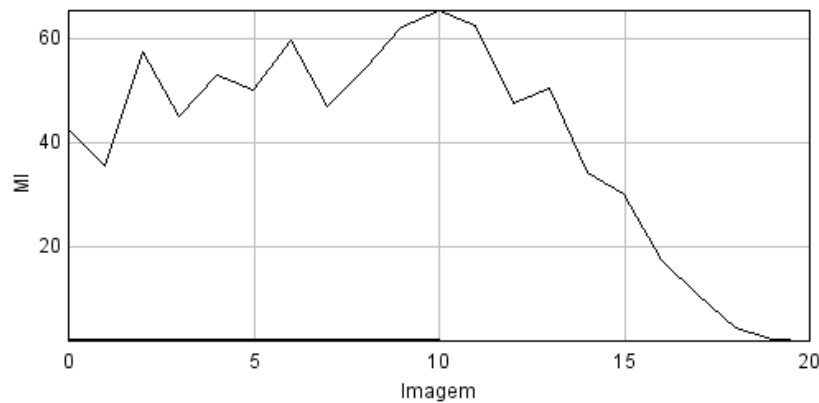


FIGURA 22 Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando a Linha Central na Montagem dos STS's e um Filtro Gaussiano de Raio 6

4.2.2 Momento de Inércia de Colunas

A Figura 23 mostra o resultado do momento de inércia nas análises dos STS's das colunas. O resultado mostrou que os comportamentos do momento de inércia nas colunas analisadas possuem o mesmo perfil de variação, porém com uma redução da amplitude máxima do MI ao longo do ponto de coleta da coluna na imagem original. Esta redução se deve ao escurecimento da imagem da esquerda para direita, não importando, assim, a coluna a ser analisada.

A manutenção do perfil da curva, independentemente do ponto de coleta da coluna na imagem original, incluindo a adicional mudança de nível de cinza, reforça a robustez da técnica.

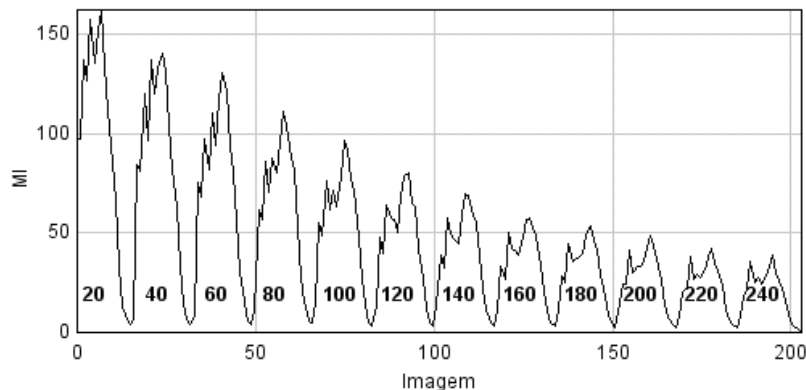


FIGURA 23 Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando uma Determinada Coluna na Montagem dos STS's

4.2.3 Momento de Inércia de Linhas

A Figura 24 mostra o resultado da análise da construção de diversos S das linhas. O resultado mostrou que os comportamentos do momento de inércia nas linhas analisadas possuem o mesmo perfil de variação, porém com uma redução da amplitude máxima do MI. Esta redução se deve ao escurecimento da imagem da parte superior para a inferior.

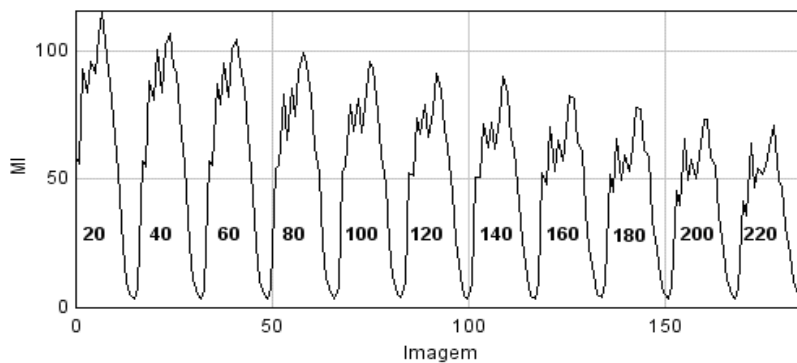


FIGURA 24 Evolução do Momento de Inércia dos 5600 Frames Utilizando uma Determinada Linhas na Montagem dos STS's

As considerações sobre a robustez podem ser também estendidas para o caso dos STS's, provenientes de distintas linhas.

4.3 Segmentação

Os resultados do cálculo das áreas dos *clusters* durante as segmentações podem ser vistos nas Figuras 25 e 26 e no Anexo B, sendo dispostos de forma gráfica onde cada faixa de contraste apresenta a evolução de tamanho destes *clusters* ao longo do tempo, conforme é descrito a seguir:

- Azul, valores entre 0 a 96;
- Verde, valores entre 96 a 110;
- Amarelo, valores entre 110 a 130;
- Vermelho, valores entre 130 a 160;
- Laranja, valores entre 160 a 190;
- Cinza, valores entre 190 a 255.

A seguir serão apresentados apenas alguns resultados, sendo que os restantes encontram-se no Anexo B devido à semelhança entre eles.

Foi possível notar um decaimento da área dos *clusters* em algumas das faixas de intensidade de níveis de cinza. Em outros houve um comportamento oscilatório. À medida que foi aumentando o tamanho dos *clusters* analisados, algumas áreas não foram notadas nos resultados, mostrando assim a sensibilidade na escolha de limites de *threshold* adequados.

A partir desta configuração foi possível a separação de grupos de faixas de níveis de intensidades de cinza, que possuíam o mesmo comportamento, tanto de velocidade quanto de tamanho.

4.3.1 Resultados das Análises dos Clusters

Nas Figuras 25 e 26, as faixas de limite da coloração azul juntamente com a coloração verde mostraram um comportamento de acréscimo seguido de um decaimento. A coloração verde possui maior amplitude, sendo que as duas

cores, no final do processo, passam a ter amplitudes menores em relação ao início; a verde manteve uma amplitude maior ao longo do tempo.

As cores amarela e vermelha começam com uma quantidade de *cluster* baixa e aumentam ao longo do tempo, mantendo-se alta até o final do processo.

A coloração cinza e laranja foram desprezíveis de acordo com a amplitude encontrada.

À medida em que se aumenta o tamanho dos *clusters* analisados, as amplitudes dos gráficos diminuem, porém mantendo o mesmo comportamento. O Anexo B apresenta os gráficos com diferentes valores para os *clusters*.

A seguir serão apresentados alguns resultados encontrados.

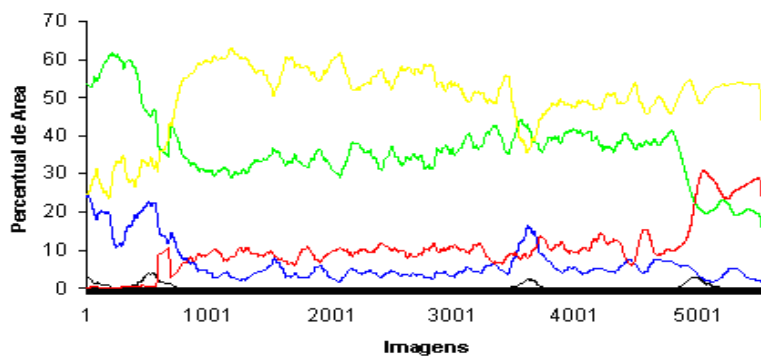


FIGURA 25 Análise em Clusters Maiores que 0 pixels ao Longo dos 5600 Frames, Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

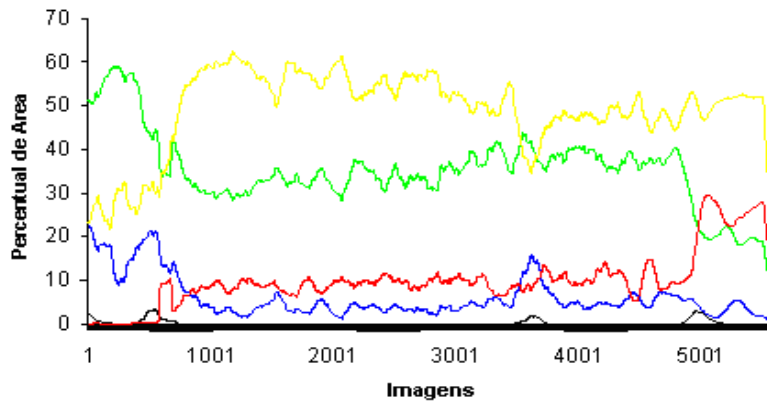


FIGURA 26 Análise em Clusters Maiores que 100 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

Os resultados de segmentação apresentam como uma alternativa para análise das imagens provenientes de microscopia óptica realizada como rotina em laboratório de reprodução animal.

A habilidade de seguir a evolução da atividade do material observado, adicionada à possibilidade apresentada de separação por faixas de níveis de cinza, pode melhorar ainda mais a viabilidade da técnica.

Caso seja possível correlacionar o comportamento das distintas faixas de nível de cinza com as sub-populações presentes em um sêmen, a técnica ganha outro fator de valorização de sua potencialidade.

4.4 Vórtex

A análise utilizando o vórtex contou com imagens segmentadas e com as ilhas previamente encontradas, sendo que a Figura 27 mostra a distância entre os centros de massas destas ilhas no turbilhão do sêmen ao longo de uma seqüência. No início houve um comportamento oscilatório das distâncias para algumas das faixas de contraste utilizadas na segmentação, mostrando

possivelmente a alta velocidade do turbilhão ou mesmo uma característica instável do mesmo. Ao passar o tempo esta diferença diminuiu, mostrando uma estabilidade do movimento do turbilhão.

O comportamento das faixas de contraste apresentou uma redução ao longo do tempo, porém de forma distinta em relação à oscilação no início e no final do período. Durante o processo de análise do sêmen estas características distintas podem ser atribuídas a comportamentos específicos que lembram subpopulações dentro de um mesmo material, caracterizadas por níveis de intensidade de cinza.

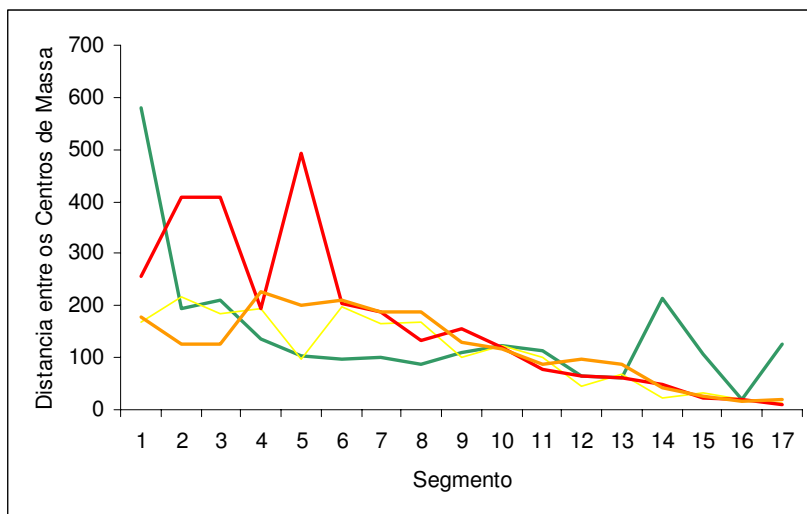


FIGURA 27 Distância entre os centros de massas das ilhas de rotação

A complexidade e alta demanda de intervenção humana nesta técnica demandam maiores esforços para que a mesma possa ser considerada como uma alternativa, apesar de o estudo deste fenômeno ser de grande relevância na análise de sêmen.

5 CONCLUSÕES

O trabalho permitiu o acompanhamento do nível de atividade do sêmen de *Ovis aries* utilizando análise de imagens com dados coletados por microscopia óptica, a partir de técnicas como Momento de Inércia, Segmentação e Vórtex.

A técnica de Momento de Inércia acompanhou o comportamento da atividade do sêmen no tempo. As diversas abordagens para os processamentos das imagens mostraram o quanto a metodologia comportou de forma semelhante e robusta nas diversas formas de análise.

Na técnica de segmentação foi possível separar os diversos comportamentos de acordo com os valores de limites de cinza, sendo que cada limite apresentava um comportamento ao longo do processo. A possível correlação de níveis de cinza com sub-populações cria uma perspectiva de melhoria dos resultados e aumento da complexidade da ferramenta de análise.

A técnica do Vórtex foi capaz de acompanhar o comportamento das ilhas segmentadas no tempo com distintas faixas de níveis de intensidade de cinza, este comportamento teve uma tendência de decréscimo ao longo de todo o vídeo. Porém, houve intervenção humana na seleção das ilhas, o que representa ainda uma limitação relativa à necessidade dos ajustes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-QARAWI, A.A.; ABDEL-RAHMAN, H.A.; EL-MOUGY, S.A.; EL-BELELY, M.S. Use of a new computadorized system for evaluation of spermatozoal motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls. **Animal Reproduction Science**, v.74, p.1-2, 2002.

AMNIS CORPORATION. ORTYN, W.; BASIJI, D. **Maging and analyzing parameters of small moving objects such as cells**. G01N 21/00. 30 Mar. 2006.

ANDERSEN, A.G.; ZIEBE, S.; JORGENSEN, N.; PETERSEN, J.H.; SKAKKEBÆK, N.E.; NYBOE ANDERSEN, A. Time to pregnancy in relation to semen quality assessed by CASA before and after sperm separation, **Human Reproduction**, v.17, n.1, p.173-177, 2002.

ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. **Optics and Laser Technology**, v.31, n.2, p.163-169, 1999.

BIOPHOS MEDICAL. RUDOLF, A.B.R. **Fertility analyzer**. G01J 3/44, G01P 3/80, G01P 13/00. PCT/SE1990/000707. 31 Oct. 1990. 12 Oct. 1994.

BONATO, V.; MOLZ, R. F.; MORAES, F. G.; FURTADO, J. C.; FERÃO, M. F. Proposta de um sistema para processamento de impressões digitais implementado em hardware. **Revista Eletrônica de Iniciação Científica**, v.3, 2003. Disponível em: <www.sbc.org.br/reic/revista.html>. Acesso em: 20 ago. 2007.

BRAGA JR., R.A.; SILVA, B.O.; RABELO, G.; COSTA, R.M.; ENES, A.M.; CAP, N.; RABAL, H.; ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; HORGAM, G. Reliability of biospeckle image analysis. **Optics and Lasers in Engineering**, v.45, n.3, p.390-395, 2007.

FALCÃO, A.X. **Introdução ao processamento de imagem digital**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003.

FARRELL, P.; TROUERN-TREND, V.; FOOTER, H.; DOUGLASHAMILTON, D. Repeatability of measurements on human, rabbit and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. **Fertility and Sterility**, v.64, p.208-210, 1995.

FONSECA, V.O.; VALLE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. **Procedimento para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 79p.

GALLAS, M.R. **Coerência da luz** Disponível em:
<http://www.optics.rochester.edu/academic_programs/bs/opt_100.html>.
Acesso em: 10 ago. 2007.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.

HECHT, E. **Optics**. 2.ed. Atlanta: A. Wesley, 1987. 676p.

IAN, T.; YOUNG, J.J. GERBRANDS, L.J. VAN VLIET, P. **Fundamentals of image processing**. Delft: Delft University of Technology, 1995. 110 p.

KANETA, T.; MISHIMA, N.; IMASAKA, T. Determination of motility forces of bovine sperm cells using an “optical funnel”. **Analytical chemistry**, v.72, p.2414-2417, 2000.

LUZ, S.L.N. da; NEVES, J.P.; GONCALVES, P.B.D. Parameters to evaluate ovine frozen semen for laparoscopic insemination. **Brazilian Journal Vet. Res. Animal Science**, São Paulo, v.37, n.2, 2000. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000200010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 out. 2007.

MEDEIROS, N.G.; SILVA, E.A.; NOGUEIRA, J.R. Segmentação morfológica de imagens utilizando gradiente morfológico multi-escala. **Revista Brasileira de Cartografia**, Rio de Janeiro, n.54, p.77-85, dez. 2002.

OULAMARA, A.; TRIBILLON, G.; DUVERNOY, J. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. **Journal of Modern Optics**, v.36, n.2, p.165-179, 1989.

RAFAEL, C. GONZALEZ, RICHARD, WOODS. **Digital image processing**. 2.ed. New Jersey: Pearson Education, 1992. 793p.

SUTTIYOTIM, P.; THWAITES, C.J. Evaluation of ram semen motility by a swim-up technique. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, p.339-345, 1993.

SUZUKI, T.; SHIBAHARA, H.; TSUNODA, H.; HIRANO, Y.; TANEICHI, A.; OBARA, H.; TAKAMIZAWA, S.; SATO, I. Comparison of the sperm quality analyzer IIC variables with the computer-aided sperm analysis estimates. **International Journal of Andrology**, v.25, p.49-54, 2002.

THE UNIVERSITY OF GLASGOW. GREEN, R. B.; GILLIES, E. A.; CANNON, R. Mc.; PACEY, A. A. **Analysis of cell morphology and motility**. G01N 15/14, G06F 19/00, G06K 9/00, G06T 7/20, 7/60. 16 Feb. 2005. 01 Sept. 2005.

VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DE PAUW, I.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A. Migration of bovine spermatozoa in a synthetic medium and its relation to in vivo bull fertility. **Theriogenology**, v.58, p.1027-1037, 2002.

VORTEX. In: Wikipédia: a enciclopédia livre. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/V%C3%B3rtice>> Acesso em: 10 jul. 2007.

WAYNE, R. **ImageJ**: manual. 2006 . Disponível em: <<http://rbp.fmrp.usp.br/downloads/ImageJManualEmPortugues.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

WAYNE, R. **ImageJ**: software. 1997 . Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

XU, Z; JOENATHAN, C.; KHORANA, B.M. Temporal and spatial proprieties of the time-varying speckles of botanical specimens. **Optical Engineering**, Redondo Beach, v.34, n.5, p. 1487-1502, 1995.

ANEXO A

MACROS

Macro do Momento de Inércia

Macro utilizado para o programa ImageJ

/*

Esta Macro foi desenvolvida com a necessidade de calcular o Momento de Inércia descrito por (Arizaga et al., 1999).

Autores: Antônio Elizeu da Rocha Neto - antonio-rocha@gmail.com

Roberto Alves Braga Júnior – roberto@ufla.br

Departamento de Engenharia da UFLA - Universidade Federal de Lavras

*/

```
y = newArray(nSlices);
pos = 0;
for ( k = 1; k <= nSlices ; k+=fator ){
    setSlice(k);
    moc = newArray(256*256);
    for(j=0;j<getHeight();j++){
        for (i=0; i < getWidth(); i++){
            if((i + 1) < getWidth()){
                px1 = getPixel(i,j);
                px2 = getPixel(i+1,j);
                r = getMatriz(moc, px1, px2);
                r += 1;
                setMatriz (moc, px1,px2,r);
            }
        }
    }
    mi = 0;
    miAux = 0;
    for(j = 0 ; j < 256 ;j++){
        somat = 256;
        for(i = 0 ; i < 256;i++){
            miAux = getMatriz(moc,i,j);
            mi += (miAux / 256) * (pow((i - j),2));
        }
    }
    mi = mi / 256;
```

```

        y[pos] = mi;
        pos++;
    }
    x = newArray(nSlices);
    for ( i = 0 ; i < x.length; i++){
        x[i] = i;
    }
    Plot.create("Semen Bovino Equalizado","Imagem","MI",x,y);

    function getMatriz(moc,x,y){
    return moc[(x * 255) + y];
    }

    function setMatriz(moc,x,y,value){
    moc[(x * 255) + y] = value;
    }

```

Macro STS coluna central

/**

Esta Macro foi desenvolvida com a necessidade de montar STS descrito por (Arizaga et al., 1999).

O resultado final é uma pilha contendo todas os STS's.

Montagem da coluna central.

Autores: Antônio Elizeu da Rocha Neto - antonio-rocha@gmail.com

Roberto Alves Braga Júnior - roberto@ufla.br

Departamento de Engenharia da UFLA - Universidade Federal de Lavras

*/

//Pega o tamanho das imagens

tamanho = getWidth();

//Quantidade de Imagens possui a Pilha

total = nSlices;

//Posição inicial que colocará a primeira coluna no STS montado

posicaoX = 0;

//Pegando a Coluna Central

coluna = (tamanho / 2);

//Este laço ira montar os STS's Pegando, cada STS é adicionado no final da pilha

for (k = 1; k < (total - (total % tamanho)) ; k+=1){

if(parseInt(posicaoX%tamanho) == 0){

setSlice(nSlices);

run("Add Slice");

```

        posicaoX = 0;
    }
    setSlice(k);
    y = newArray(getHeight());
        for(i = 0; i < getHeight();i++){
            y[i] = getPixel(coluna,i);
        }
    setSlice(nSlices);
    for(i = 0; i < getHeight();i++){
        setPixel(posicaoX,i,y[i]);
    }
    posicaoX= posicaoX + 1;
}
//Este Laço irá remover as primeiras imagens até chegar nos STS's montados
for ( k = 1; k <= total ; k+=1 ){
    setSlice(1);
    run("Delete Slice");
}

```

Macro STS linha central

```

tamanho = getWidth();
fator = nSlices / tamanho;
fator = parseInt(fator);
coluna = 1;
total = nSlices;
posicaoX = 0;
linha = getHeight();
for ( k = 1; k < (total - (total % tamanho)) ; k+=1 ){
    if(parseInt(posicaoX%tamanho) == 0){
        setSlice(nSlices);
        run("Add Slice");
        posicaoX = 0;
    }
    setSlice(k);
        y = newArray(getWidth());
        for(i = 0; i < getWidth();i++){
            y[i] = getPixel(i,linha);
        }
    setSlice(nSlices);
    for(i = 0; i < getWidth();i++){
        setPixel(posicaoX,i,y[i]);
    }
    posicaoX= posicaoX + 1;
}
for ( k = 1; k <= total ; k+=1 ){
    setSlice(1);
    run("Delete Slice");
}

```

```
}
```

Segmentação

```
img = getImageID();  
result = newArray(nSlices);  
x = newArray(nSlices);  
result[0] = 0;  
x[0] = 0;  
for( i = 1 ; i < nSlices; i++){  
    result[i] = 100;  
    x[i] = i;  
}  
Plot.create("Semen Ovino maior que  
18000", "Imagem", "Percentual Area", x, result);  
for(m = 0; m<5;m++){  
selectImage(img);  
if(m==0){  
resetThreshold();  
setThreshold(0, 96);  
}else if(m==1){  
resetThreshold();  
setThreshold(96, 110);  
}else if(m==2){  
resetThreshold();  
setThreshold(110, 130);  
}else if(m==3){  
resetThreshold();  
setThreshold(130, 160);  
}else if(m==4){  
resetThreshold();  
setThreshold(160, 190);  
}else{  
resetThreshold();  
setThreshold(190, 255);  
}  
run("Set Measurements...", "area display redirect=None  
decimal=3");  
for( i = 0 ; i < nSlices; i++){  
    result[i] = 0;  
    x[i] = i;  
}  
for(z = 1 ; z <= nSlices; z++){  
    setSlice(z);  
    run("Analyze Particles...", "size=18000-Infinity  
circularity=0.00-1.00 show=Nothing clear ");  
    totalArea = 0;
```

```
        for (j=0; j<nResults; j++) {
            totalArea += getResult("Area", j);
        }
        result[z - 1] = (totalArea
/(getHeight()*getWidth()))*100;
    }
    Plot.add("line",x,result);
    if(m==0){
    Plot.setColor("blue");
    }else if(m==1){
    Plot.setColor("green");
    }else if(m==2){
    Plot.setColor("yellow");
    }else if(m==3){
    Plot.setColor("red");
    }else if(m==4){
    Plot.setColor("orange");
    }else{
    Plot.setColor("gray");
    }
    }
```

ANEXO B

Imagens da Segmentação

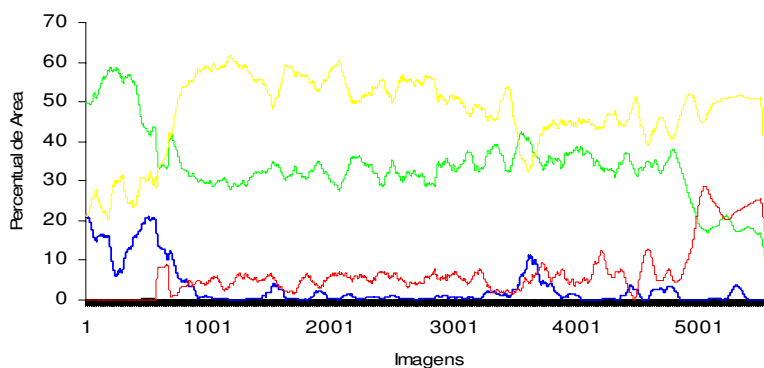


FIGURA 28 Análise em Clusters Maiores que 4000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

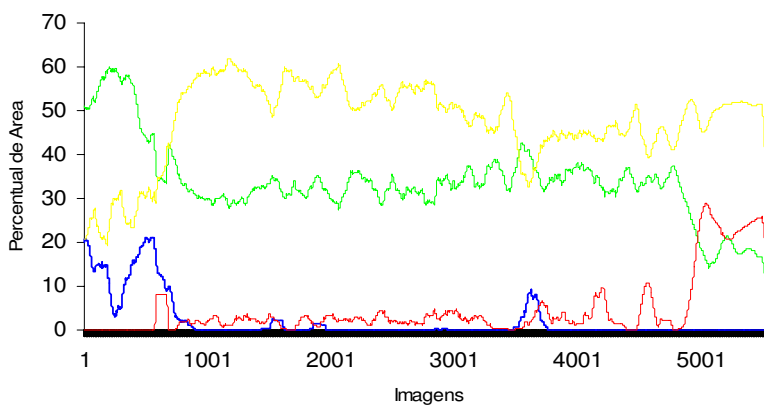


FIGURA 29 Análise em Clusters Maiores que 8000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

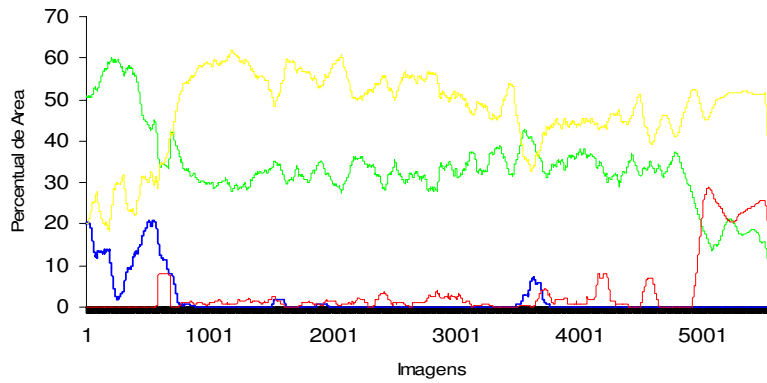


FIGURA 30 Análise em Clusters Maiores que 10000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

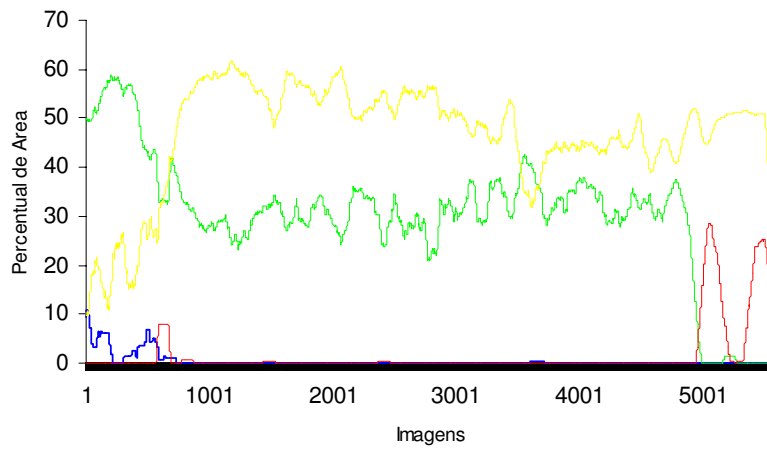


FIGURA 31 Análise em Clusters Maiores que 18000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

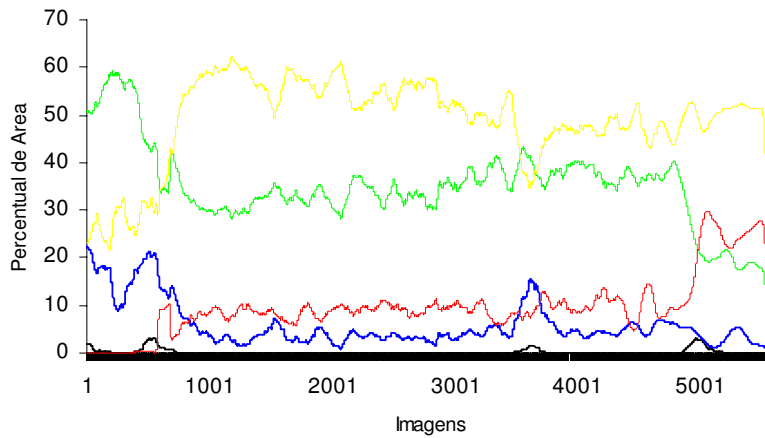


FIGURA 32 Análise em Clusters Maiores que 300 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

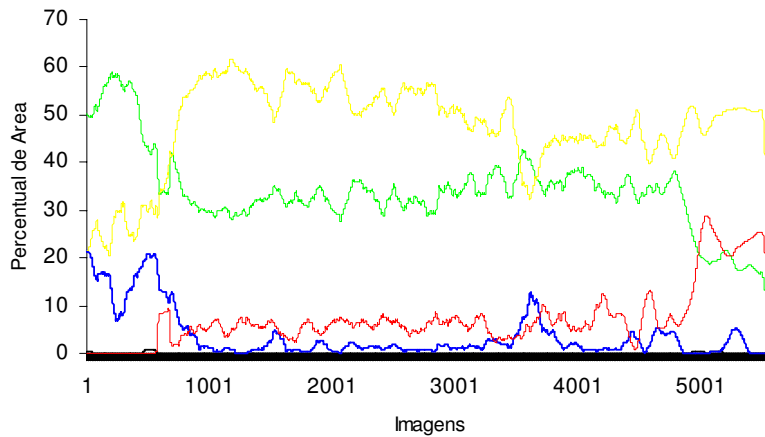


FIGURA 33 Análise em Clusters Maiores que 3000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

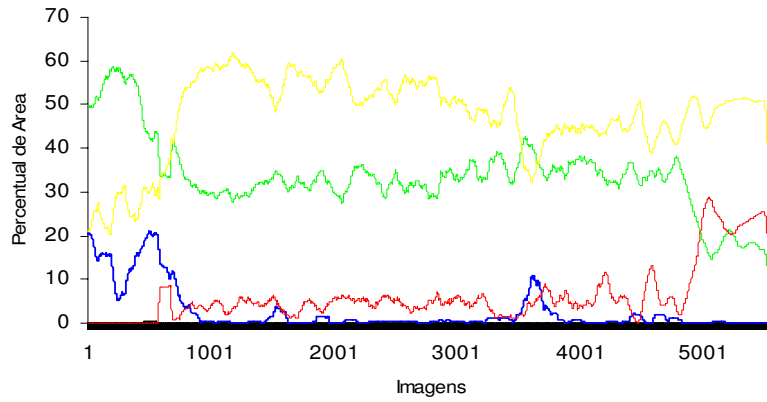


FIGURA 34 Análise em Clusters Maiores que 5000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

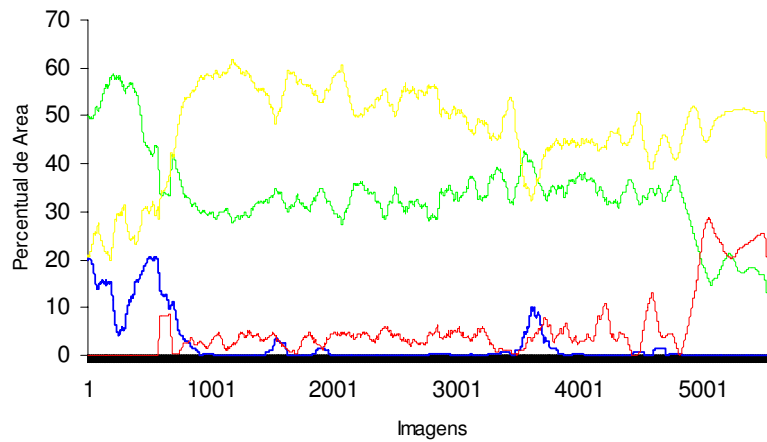


FIGURA 35 Análise em Clusters Maiores que 6000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

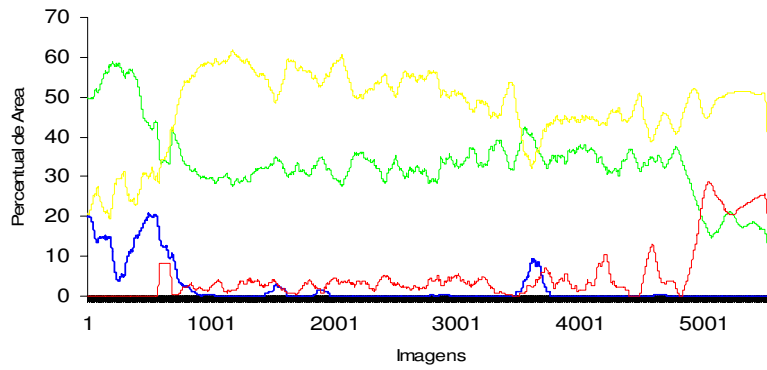


FIGURA 36 Análise em Clusters Maiores que 7000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255

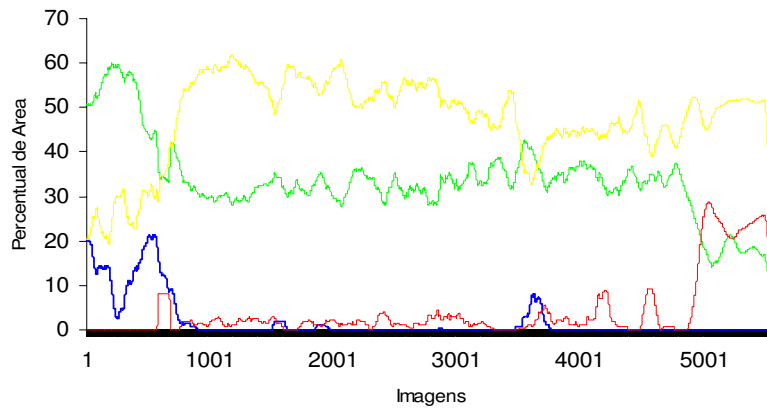


FIGURA 37 Análise em Clusters Maiores que 9000 pixels ao Longo dos 5600 Frames Sendo os Threshold em Azul para intervalo e entre 0 a 96; Verde entre 96 a 110; Amarelo entre 110 a 130; Vermelho entre 130 a 160; Laranja entre 160 a 190 e Cinza entre 190 a 255