



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA

**Utilização de técnicas fotométricas para estudo do
branqueamento e da quantidade de algas simbiontes em colônias
coralinas.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CLAUBER BONALUME

ORIENTAÇÃO
PROFA. DRA. INÉS JOEKES

Campinas
Dezembro de 2006

B64u

Bonalume, Clauber.

Utilização de técnicas fotométricas para estudo do branqueamento e da quantidade de algas simbiotas em colônias coralinas / Clauber Bonalume. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientadora: Inês Joekes

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Branqueamento. 2. Corais. 3. Zooxantela.
4. Análise multivariada de imagens. I. Joekes, Inês.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Photometric techniques on coral bleaching and symbiotic algae amount Study

Palavras-chaves em inglês: Bleaching, Coral, Zooxanthellae, Multivariate image analysis.

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Profa. Dra. Inês Joekes (orientadora), Profa. Dra. Rosane Gonçalves Ito, Prof. Dr. Pedro Antônio Muniz Vazquez.

Data de defesa: 18/12/2006

*“O homem não sabe mais que os outros animais; sabe menos.
Eles sabem o que precisam saber. Nós não.”
Fernando Pessoa*

Desde o nascimento o homem carrega o peso da gravidade em seus ombros. É aparafusado à terra. Mas o homem só tem que afundar abaixo da superfície e estará livre.
Jacques-Yves Cousteau

Dedico

a Soramy, minha esposa, amiga e companheira de tantos anos, que persistiu em me apoiar em direção ao sonho e compartilhá-lo comigo, apesar dos percalços do caminho. Sem sua participação, a maior motivação para perseverar também não existiria: nosso filho Joshua que, durante esse trabalho, encheu pela primeira vez seus pulmões de ar;

ao Joshua, por ser um cara incrível, bem-humorado, sorridente e companheiro. Por ter-me feito enxergar uma outra dimensão da vida, por renovar minha fé;

a meus pais por sentirem e terem feito por mim o que sinto e vou fazer pelo Joshua e isso não há palavra capaz de expressar (se você está lendo isso, ama seu cônjuge e não tem filhos, recomendo que pare a leitura agora e trate de providenciar a compreensão dessas palavras);

aos meus pais campineiros, sogros queridos, que com amor deram o suporte que necessitávamos para essa e outras empreitadas;

aos apaixonados pela natureza que compartilham comigo a audição do pedido de ajuda de nosso planeta.

Agradeço

a Deus;

à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa;

à Inés pelo entusiasmo, amizade e carinho, mas também à Profa. Dra. Inés Joeques pela orientação objetiva, compreensiva e compreensível;

ao pessoal do LQQA do Instituto de Química, em especial à Alessandra Borin pela paciência, presteza e interesse em ajudar com as análises multivariadas das imagens, ao Luiz Carlos Moutinho Pataca pela ajuda inicial e por direcionar a rotina de análise multivariada das imagens e ao Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi pela disposição em colaborar e pela autorização de uso de seu laboratório;

ao Dr. Carlos Jiménez e ao Zentrum fuer Marine Tropenoekologie pelas amostras de fatias de núcleos de corais fornecidas;

ao biólogo Osmar Luiz Júnior pelo apoio na elaboração das requisições das licenças do IBAMA e do Instituto Florestal, pelo auxílio na seleção das espécies que seriam amostradas e pela disposição em ajudar a estabelecer a metodologia de coleta das amostras;

à administração do Parque Estadual Marinho da Laje de Santos (PELMS) e ao IBAMA pela concessão das licenças de pesquisa;

aos membros da Coral-List, coral-list@coral.aoml.noaa.gov, em especial a Mark Eakin por sugestões de temas para o trabalho e a Dra. Alina Szmant pelos esclarecimentos prestados acerca das metodologias de determinação da densidade de zooxantelas;

ao grande amigo e parceiro de mergulho Maurício Rufo pela companhia alegre nos mergulhos de coleta e por perpetuar a lenda do “mordedor da Laje”;

à amiga Naná, ou melhor, Dra. Nádia C. Segre pelas orientações relâmpago nos momentos de aperto, pelos documentos entregues e pdf's enviados;

aos pessoal do grupo Adelino, Adriana, Atílio, Carla, Carol, Chrislaine, Cynthia, Dircelei, Euler, Flávia, Flávio, Jonathan, Ercília, Iara, Karen, Karla, Paula, Nelson e Willians, pela cooperação na manutenção da fertilidade das idéias;

ao Moa e ao Armandão, respectivamente das operadoras de mergulho Cachalote e Nautilus Dive, pela excelente operação de mergulho;

aos funcionários do Instituto de Química da Unicamp pelo auxílio inestimável;

a todos que de alguma maneira inspiraram ou colaboraram com esse trabalho, cujos nomes esqueci de listar, e que vierem me cobrar o porquê do esquecimento;

aos outros que não vierem me cobrar, por serem mais compreensíveis.

SÚMULA CURRICULAR

Clauber Bonalume

Formação Acadêmica:

- Licenciatura em Química pela UNICAMP (03/2004 – 12/2005);
- Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas pela UNICAMP (03/1991 – 01/1995);
- Engenharia Química – Escola Politécnica da USP (2,5 anos – não concluído).

Experiência Profissional:

- Sócio Diretor - Photo Claret Com. e Serv. Ltda. – Fórmula Foto – micro empresa do setor de varejo fotográfico (09/1995 – cargo atual);
- Professor do Curso Técnico de Química do SENAI de Paulínia (07/2005 – 12/2005);
- Professor de Química e Física do Colégio Integral – Campinas (04/2004 – 12/2005);
- Estagiário do Programa de Estágio Docente da UNICAMP (08/2003 – 12/2003)
- Professor de Química do Colégio Integral – Vinhedo e Indaiatuba (03/2003 – 12/2003);
- Analista Químico I – CIBA, divisão Biogalênica Química e Farmacêutica Ltda. (04/1995 a 07/1995);
- Bolsista de Iniciação Científica – UNICAMP – SAE (Serviço de Apoio ao Estudante) (03/1992 a 03/1993).

Cursos, Seminários e Palestras:

- Curso Capacitação de Prestadores de Serviços de Instrutoria do SENAI (07/2005);
- Curso Professor Multimídia Integral (02/2005);
- I Escola de Química Ambiental da UNICAMP (07/2004)
- Programa de Treinamento de Gerentes - Grupo Friedman, Desenvolvimento e Treinamento em Varejo (10/2002);
- Jornada Intensiva para Pequenas Empresas e Futuros Empreendedores – PEGN Desenvolvimento Empresarial (06/2001);
- Qualidade no Atendimento Visando o Encantamento de Clientes – SEBRAE Campinas (09/1998);
- Curso de Introdução ao Gerenciamento de Qualidade – Biogalênica Química e Farmacêutica Ltda. (05/1995).

Perfil Pessoal:

- Inglês fluente (oral e escrita);
- Usuário avançado de diversos softwares, incluindo planilhas, editores de texto, apresentações de slides, webdesign e manipulação de imagens; noções de configurações de hardware e de rede;
- Fácil relacionamento interpessoal; caráter; dinamismo; versatilidade e pro-atividade.

Outras Informações Relevantes:

- Instrutor Assistente de Mergulho pela Professional Association of Professional Divers – PADI (04/2002 – data atual);
- Redator e executor de projeto de pesquisa apoiado financeiramente pela FAPESP, com relatório final e prestação de contas aprovados (09/2003 – 09/2005)
- Monitor do Programa Ciência e Arte nas Férias – UNICAMP (01/2004).

Utilização de técnicas fotométricas para estudo do branqueamento e da quantidade de algas simbiotes em colônias coralinas.

Dissertação de Mestrado de Clauber Bonalume

Orientadora: Profa. Dra. Inés Joeques

Instituto de Química – UNICAMP - Cidade Universitária Zeferino Vaz

Cx Postal 6154 CEP 13084-971 Campinas – SP - Brasil

RESUMO

Corais marinhos do mundo inteiro estão ameaçados pelas alterações climáticas que vêm acontecendo nas duas últimas décadas. O aquecimento da superfície terrestre associado à intensificação do fenômeno El Niño têm causado prejuízos à saúde dos corais marinhos com intensidade, extensão e escala temporal sem precedentes. Quando expostos a situações de estresse ambiental, corais podem sofrer branqueamento, perdendo suas algas simbiotes, as zooxantelas, e morrer se não as recuperarem. Desta forma, métodos de avaliação da saúde dos corais tornam-se necessários.

Dois métodos fotométricos foram desenvolvidos neste trabalho. No primeiro, utilizou-se a técnica de reflectância difusa para estudo do histórico de branqueamento de fatias de núcleos de esqueletos coralinos através da análise da cor do núcleo na direção do crescimento do coral. Esse método mostrou-se sensível à variação de cor ao longo da amostra e foi capaz de evidenciar o histórico conhecido de branqueamento de 2 entre 3 amostras analisadas. O método é promissor para o estudo de esqueletos, mas depende sensivelmente do tratamento prévio das amostras.

No segundo, fotografaram-se amostras de *Mussismilia hispida* em seu ambiente natural na Laje de Santos. Foram colhidas amostras dos corais fotografados e foi determinada a densidade de zooxantelas em cada amostra. Utilizando o software MatLab e uma rotina específica de análise multivariada, estabeleceu-se uma correlação entre aspectos da imagem digital e a densidade de zooxantelas. A correlação obtida é boa, com erros menores que 35 % na estimativa da densidade de zooxantelas a partir das imagens digitais. O método é bastante promissor e tem a vantagem de ser não destrutivo.

Development of photometric techniques to assess the bleaching history and quantifying the density of symbiotic algae in coral colonies

Master Thesis of Claubert Bonalume

Advisor: Profa. Dra. Inés Joekes

Instituto de Química – UNICAMP - Cidade Universitária Zeferino Vaz

Cx Postal 6154 CEP 13084-971 Campinas – SP - Brazil

ABSTRACT

In the last two decades marine corals around the world have been threatened by weather global changes. Coral health is declining at unprecedented intensity, extension and temporal scale, by world surface heating associated with the strengthening of the El Niño Southern Oscillation. When exposed to environmental stresses coral can bleach, loosing their symbiotic algae, the zooxanthellae, and die if they are permanently lost. The development of methods capable to assess coral health is necessary.

Two photometric methods were developed. In the first one, diffuse reflectance spectrophotometry was used to analyze the bleaching history of slices of coral skeletons by color analysis along the growing direction of the colony. The method showed appropriate sensibility for measuring color changes along the samples and was able to disclose the bleaching history in two of the three samples studied. However, results depend strongly on the previous treatment of the skeleton samples.

In the second method, samples of *Mussismilia hispida* coral colonies were photographed in their natural habitat in the Laje de Santos marine conservation park. Small samples of the photographed coral were taken and the density of zooxanthellae in each sample was measured. Using the MatLab software and a specific algorithm for multivariate image analysis (MIA), a correlation between features of the images and the density of zooxanthellae was established. The correlation obtained is fairly good, with less than 35 % error in the estimation of zooxanthellae density from the digital images. The method is quite promising and has the advantage of being non-destructive.

Índice

1. Objetivo	1
2. Organização da dissertação	1
3. Introdução	1
4. Reflectância Difusa	5
4.1. Introdução	5
4.2. Parte Experimental	8
4.3. Resultados	10
4.4. Discussão	13
5. Análise de imagens	14
5.1. Introdução	14
5.2. Parte Experimental	17
5.3. Resultados	24
5.4. Discussão	36
6. Conclusões	37
7. Sugestões para trabalhos posteriores	38
8. Referências	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	3
Figura 2.	9
Figura 3.	9
Figura 4.	9
Figura 5.	10
Figura 6.	11
Figura 7.	11
Figura 8.	12
Figura 9.	12
Figura 10.	13
Figura 11.	13
Figura 12.	18
Figura 13.	19
Figura 14.	25
Figura 15.	25
Figura 16.	26
Figura 17.	26
Figura 18.	27
Figura 19.	27
Figura 20.	28
Figura 21.	28
Figura 22.	29
Figura 23.	29
Figura 24.	30
Figura 25.	30
Figura 26.	31
Figura 27.	31
Figura 28.	32
Figura 29.	33
Figura 30.	35

1. Objetivos

Propôs-se adaptar e otimizar a técnica de reflectância difusa para análise do histórico de branqueamento de colônias de corais marinhos além de investigar se a análise de imagens poderia ser utilizada como um método pouco invasivo de avaliação da saúde de colônias coralinas *in loco*.

2. Organização da dissertação

Após uma introdução geral, a dissertação foi subdividida em duas seções correspondentes a cada uma das técnicas utilizadas, e ao final apresentou-se uma conclusão geral.

3. Introdução

Corais são animais que normalmente vivem em colônias compostas por diversos indivíduos, os pólipos coralinos. O pólipo é um animal simples: um anel de tentáculos circunda a boca que leva o alimento para digestão na única cavidade corporal. Os tentáculos têm células especiais, chamadas de nematocistos, as quais possuem pequenos arpões que podem injetar nas presas capturadas pequenas doses de toxinas. Os tentáculos prolongam-se a partir da taça esquelética, chamada de coralito, quando o pólipo está se alimentando e retraem quando o coral sente-se ameaçado ¹.

O pólipo possui três camadas corporais: a epiderme, externa; a gastroderme, camada interna que recobre a cavidade corporal e, entre essas duas camadas, a mesoglea, uma camada de aspecto gelatinoso. Corais construtores de recifes, chamados de hermatípicos, normalmente hospedam na gastroderme minúsculas algas do gênero *Symbiodinium*, chamadas de zooxantelas devido sua coloração amarelo-amarronzada ¹.

As zooxantelas vivem em simbiose com os corais, auxiliando-os produção de seu esqueleto, além de prover parte da energia e nutrientes consumidos pelo pólipo ^{1 e 2}. Os corais hermatípicos retiram da água do mar grandes quantidades de carbonato de cálcio, que secretam na forma de seus esqueletos ³.

Alguns pólipos podem viver solitários e atingir tamanhos de até 25 cm. A maioria, no entanto vive em colônias e tem tamanhos de 1 a 3 cm. A diversidade na forma de crescimento dos corais gera muitas formas diferentes de colônias. Algumas colônias de coral podem atingir tamanhos enormes a partir de reprodução assexuada. Pólipos também podem reproduzir-se sexuadamente, produzindo uma larva livre-natante que irá fixar-se em um substrato e formar uma nova colônia coralina.

Quando os pólipos morrem, os restos de seu esqueleto são unidos por algas especiais chamadas de algas coralinas. Estas algas também produzem carbonato de cálcio. O esqueleto coralino coberto com algas coralinas fornece então o sólido substrato onde um novo pólipos poderá crescer. Esta seqüência gera um acúmulo de esqueletos coralinos que dá origem aos recifes de coral ¹.

A saúde de corais marinhos vem sendo estudada há muitos anos e nas últimas décadas esse interesse foi intensificado em função da observação, nos mares de todo o mundo, de colônias de corais que perderam sua coloração habitual, tornando-se esbranquiçadas⁴. Esse branqueamento está correlacionado com um declínio na saúde dos corais e uma grande quantidade de artigos recentes indica que esse declínio não tem precedentes ⁵.

Apesar de evidências indicarem que a degradação antropogênica dos ecossistemas recifais tenha iniciado muito antes do século XX, pesquisadores reunidos no Coral Reef Symposium de 2000 concluíram que os atuais humanos poderão ser os últimos a ver recifes de corais vivos ⁶.

Muitos corais branqueiam em situação de estresse ambiental, incluindo baixa salinidade, sedimentação, exposição à maré baixa, infecções, estresse oxidativo, elevados índices de radiação ultravioleta e elevação da temperatura da água do mar, causando a perda total ou parcial da população de zooxantelas ou a degradação dos pigmentos existentes nas mesmas ^{2, 7}. As espécies do gênero

Symbiodinium possuem clorofila *a* e *c*₂, além de diversos carotenóides, particularmente peridininas, responsáveis por sua coloração amarronzada. O branqueamento pode ser temporário, seguido de reincorporação das zooxantelas e conseqüente recuperação, ou pode levar à morte do coral ^{2, 8}.

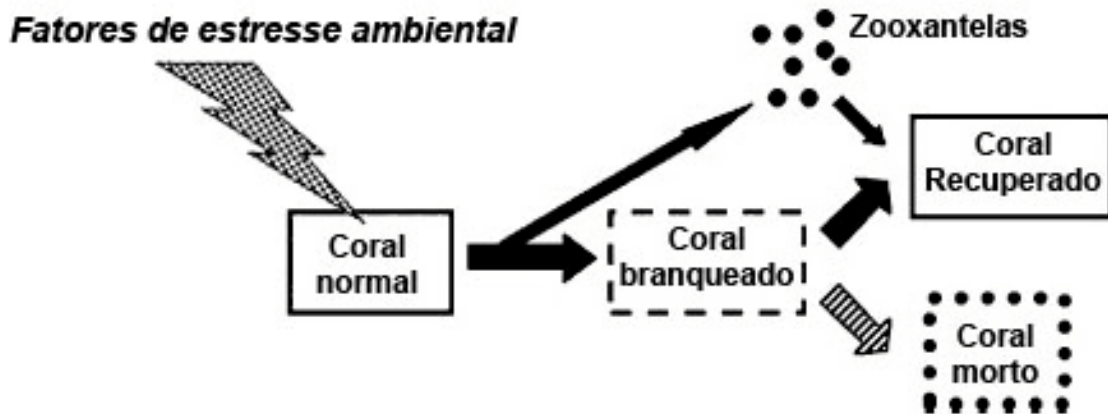


Figura 1: Possibilidades para corais branqueados: recuperação ou morte ⁸

Apesar de se conhecerem os fatores e condições que iniciam o processo de branqueamento, como apresentado no parágrafo anterior, ainda não existe uma explicação simples e coerente para suas causas, o mesmo acontecendo para o estudo do mecanismo de branqueamento. As informações disponíveis são fragmentadas e, dentre esses fragmentos incluem-se ²:

- dano e redução na proteína D1 do centro de reação do fotossistema II e interrupção da mediação da fixação de dióxido de carbono pelo ciclo de Calvin, ambos sugeridos como contribuintes ao branqueamento em resposta a elevadas temperaturas e irradiação;
- inibição da fotossíntese por células de *Symbiodinium* em resposta a uma toxina produzida pelo patógeno *Vibrio shiloi*;
- alterações nos padrões celulares da fosforilação protéica.

Um dos principais motivos para o declínio da saúde dos corais é a elevação da temperatura da água do mar, associada com a intensificação do fenômeno El Niño Southern Oscillation (ENSO). Esses dois fenômenos estão associados ao “aquecimento global”, termo que se refere ao efeito das atividades humanas, especialmente a queima de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e derivados) e

o desmatamento em grande escala, sobre o clima. Essas atividades geram emissões de grandes quantidades de gases do “efeito estufa”, dentre os quais o mais importante é o dióxido de carbono. Esses gases absorvem radiação infravermelha emitida pela superfície da Terra e atuam como isolantes térmicos, mantendo a temperatura superficial mais elevada. Outro efeito recentemente observado e freqüentemente ignorado é o de que o aumento das emissões de dióxido de carbono é acompanhado de um aumento da absorção desse gás pelos oceanos, o que já está reduzindo seu pH. Com os oceanos mais ácidos, a produção de carbonato poderá ser reduzida em até 80% em ambientes marinhos de águas rasas ^{6, 8-15}.

Durante o fenômeno ENSO de 1997-1998 foram registrados ao redor do mundo intensos eventos de branqueamentos em massa de corais, o que em algumas das áreas mais impactadas, resultou em mortandades da ordem de 90 a 95% das colônias ¹⁰.

Corais de gêneros diferentes apresentam diferentes susceptibilidades a eventos de branqueamento, existindo diferenças mesmo entre espécies do mesmo gênero. Como exemplo, corais de forma ramificada geralmente branqueiam mais intensamente do que corais maciços. Há trabalhos que relacionam a maior capacidade adaptativa de alguns corais à elevação da temperatura da água do mar com a associação a espécies de zooxantelas especialmente adaptadas a essas temperaturas mais elevadas ¹⁶⁻¹⁸.

Um dos parâmetros que se utiliza para o estudo da saúde de corais marinhos é a densidade de zooxantelas, que é a relação entre a quantidade de algas simbiontes por centímetro quadrado de superfície do coral. A determinação da densidade de zooxantelas, contudo, envolve a coleta da colônia, ou parte dela, o que por si só tem um impacto não desprezível, ainda mais se levarmos em conta que essas colônias já estão provavelmente, em algum aspecto, sob estresse ambiental.

Como alternativa não-destrutiva para o estudo da saúde de corais marinhos, Mattia propôs uma adaptação do método fotográfico desenvolvido por Thieberger para avaliar variações relativas na concentração de clorofila *a*, um dos pigmentos

utilizados pelas zooxantelas para a fotossíntese. O método originalmente desenvolvido por Thieberger utiliza imagens fotográficas em filme positivo que depois é analisado com um espectrofotômetro no comprimento de onda de 440 nm, sendo que variações de intensidade de leitura nesse comprimento de onda são correlacionados com variações na concentração de clorofila *a*. Mattia propôs a eliminação de interferências de outros comprimentos de onda na sensibilização do filme através do uso de iluminação artificial (flash eletrônico com filtro azul), filtro vermelho à frente das lentes e fotografando à noite ^{19, 20}. No entanto, tanto um quanto outro permitem medidas relativas da quantidade de clorofila *a* das colônias fotografadas. Não foi encontrada na literatura uma metodologia que permitisse quantificar a densidade de zooxantelas através de método não-destrutivo.

Considerando o branqueamento como a perda de algas simbiotes e/ou seus pigmentos, pode-se afirmar que corais branqueiam todos os anos, a despeito de seu aspecto ao olho humano ser branco, bege ou amarelo-amarronzado. Especula-se que esse padrão seja determinado pela variabilidade sazonal da temperatura e da incidência luminosa sobre os corais e algas ^{04, 21, 22}.

No Brasil ainda pouco se sabe sobre a extensão do branqueamento de suas colônias coralinas. Apesar de relativamente escassos, os trabalhos existentes relatam corais branqueados ao longo da região de ocorrência desses animais em nossos mares. A oscilação sazonal da densidade de zooxantelas ao longo do ano observada em outras regiões do planeta também pode ser observada nos corais brasileiros ²³.

4. Reflectância difusa

4.1 Introdução

À medida que os corais crescem, camadas de novos animais vão sobrepondo-se às camadas mais antigas. Embora o esqueleto desses animais seja basicamente constituído por carbonato de cálcio, o tecido que recobre este

esqueleto é, em condições normais, altamente pigmentado por clorofila a, clorofila c₂ e carotenos². Desta forma, espera-se que amostras de colônias de corais que sofreram branqueamento e que tiveram posterior recuperação apresentem menores resíduos de pigmentos em seus esqueletos nas regiões correspondentes à época de branqueamento da colônia.

A técnica utilizada é extremamente sensível a variações muito pequenas de cor²⁴⁻²⁵ e o que se propôs foi a verificação da sensibilidade da técnica para a análise de amostras de corais cujo histórico de branqueamento era conhecido.

A percepção de cor que surge na observação de um objeto pelo ser humano é um aspecto subjetivo, fruto da ação conjunta de três fatores que provocam esta impressão aos órgãos da visão²⁶:

1. Características espectrais da luz iluminante: foram padronizadas pela CIE (Comissão Internacional de L'Eclairage - 1931). Essa entidade aceita o uso de algumas fontes iluminantes considerando-as padrões: a CIE D₆₅ (lâmpada de xenônio), que corresponde à irradiação solar, porém com maior quantidade de radiação ultravioleta; a CIE A (lâmpada incandescente), que praticamente não possui radiação ultravioleta; a CIE B (luz solar), que representa a radiação solar direta e a CIE C, que representa a luz média do dia.

2. Características espectrais do objeto: um corpo não possuidor de luz própria e não translúcido poderá ser definido como possuidor de cor se exposto à radiação de uma fonte de luz. As radiações desta fonte incidirão sobre o objeto, que absorverá parte das radiações, refletindo e transmitindo outras partes.

3. Características espectrais do olho humano: o olho humano a energia luminosa refletida por um objeto iluminado é convertida em sinais nervosos por células receptoras existentes na retina, provocando no cérebro a impressão de cor. Existem dois tipos de células receptoras no olho humano: os bastonetes, responsáveis pela percepção da luminosidade e os cones, responsáveis pela percepção das cores. Através de experiências, principalmente com mistura de luzes coloridas, constatou-se que a percepção da cor pelo olho humano pode ser interpretada corretamente quando se imagina que existem apenas três centros nervais sobre a retina, com propriedades espectrais distintas. Em outras palavras,

a impressão de cor pode ser conduzida ao cérebro através de apenas três estímulos, de magnitude diferente para cada cor.

A alteração de qualquer um desses fatores leva a uma alteração na maneira como a luz é percebida. Além disso, a luz é percebida diferentemente por pessoas diferentes, possuindo portanto um forte caráter subjetivo. O propósito da medida de cor é quantificar esta sensação com o auxílio de medidas objetivas.

A espectrofotometria de reflectância difusa é uma técnica experimental que analisa a luz refletida por objetos. A reflexão, por sua vez, é a devolução da radiação eletromagnética por uma superfície, sem a modificação da frequência dos componentes monocromáticos dos quais a radiação é composta. A reflexão pode ser regular (especular) ou difusa.

A reflexão difusa ocorre em superfícies opacas ou rugosas, cujas irregularidades são grandes em comparação com o comprimento de onda da luz incidente. Pode ocorrer também em sistemas contendo pequenas partículas refletoras, onde cada partícula poderá agir como um refletor regular em separado, porém, de forma que a superfície das partículas esteja em planos distintos, refletindo a luz sob diversos ângulos.

A medida da radiação refletida por uma superfície fosca constitui, portanto, a área da espectroscopia conhecida como espectroscopia de reflectância difusa.

Esta técnica vem sendo intensamente utilizada neste grupo de pesquisa desde 1986, e entre suas aplicações destacam-se a quantificação de brilho e/ou cor de diversos materiais, tais como cabelo humano, cimento, crisotila (amianto) e materiais poliméricos.

Espectrofotômetros de reflectância analisam luz em uma determinada região do espectro eletromagnético e medem a luz que é refletida pela amostra. O equipamento utilizado neste projeto utiliza como fonte de luz uma lâmpada de xenônio pulsada e opera em intervalos de 10 nm na faixa espectral de 360 nm a 750 nm, abrangendo praticamente toda a região do visível, que é a porção do espectro compreendida entre 370 nm e 770 nm²⁷.

A análise define a quantidade de luz presente em cada comprimento de onda como uma fração da quantidade que seria refletida por um padrão branco, tal

como sulfato de bário ou óxido de magnésio. Os resultados definem a característica espectral da amostra e são expressos como porcentagens de luz refletida. Através de conexão com computador esses resultados são enviados e um programa então calcula outros valores importantes baseados nos dados de reflectância espectral, gerando, entre outras importantes ferramentas, um gráfico de cor absoluta. Tal gráfico representa a cor tridimensionalmente, de forma que a abscissa (Escala a (a^*)), quantifica as cores verde (valores negativos de a^*) ou vermelho (valores positivos de a^*), a ordenada (Escala b (b^*)), quantifica as cores azul (valores negativos de b^*) e amarelo (valores positivos de b^*), e a cota quantifica a luminosidade (L^*), ou seja, o atributo pelo qual uma cor percebida é avaliada como sendo equivalente a um membro da série contínua de cinzas variando de preto ($L^*=0$) a branco ($L^*=100$)²⁸.

4.2 Parte Experimental

Utilizou-se um espectrofotômetro GretagMacBeth modelo ColorEye 2180 UV para analisar 3 amostras de esqueletos coralinos com histórico de branqueamento conhecido, enviadas pelo Dr. Carlos Jiménez do Zentrum für Marine Tropenökologie, da Alemanha. As amostras foram posicionadas horizontalmente, na frente do porta-amostras do espectrofotômetro, e deslocadas de modo a obter medidas de cor a cada 2 milímetros, na direção de crescimento das colônias. Nas Figuras 2 a 4 essa direção está delimitada pela seção no papel milimetrado. As medidas foram realizadas em triplicatas, variando-se ligeiramente o posicionamento da amostra no sentido transversal ao de crescimento.

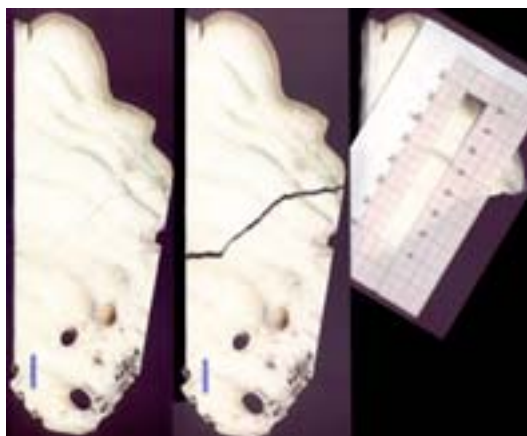


Figura 2: Esqueleto, amostra I, mostrando a fratura ocorrida no transporte, bem como a região onde foram feitas as medidas de cor, delimitada por papel milimetrado.



Figura 3: Esqueleto, amostra II, mostrando a região onde foram feitas as medidas de cor, delimitada por papel milimetrado.



Figura 4: Esqueleto, amostra III, mostrando a região onde foram feitas as medidas de cor, delimitada por papel milimetrado.

4.3 Resultados

Os resultados das medidas de cor nas amostras fornecidas foram tabelados e com eles traçados os gráficos das Figuras 5 a 7.

Com os dados utilizados para traçar os gráficos das Figuras 5 a 7 foram realizados ajustes polinomiais de 6ª ordem e os valores de máximos e mínimos das curvas de DE*, L*, a* e b* foram registrados.

As imagens fornecidas pelo Dr. Carlos Jiménez, delimitando em quadriláteros de cor vermelha as regiões das amostras que teriam passado por eventos de branqueamento (Figura 8), foram sobrepostas às imagens das Figuras 2 a 4, gerando as Figuras 9 a 11, nas quais foram indicadas as regiões das amostras que apresentavam máximos ou mínimos das curvas de regressão polinomial supra citada, a fim de verificar se houve concordância entre os resultados das análises de cor e os dados de histórico de branqueamento enviados pelo pesquisador.

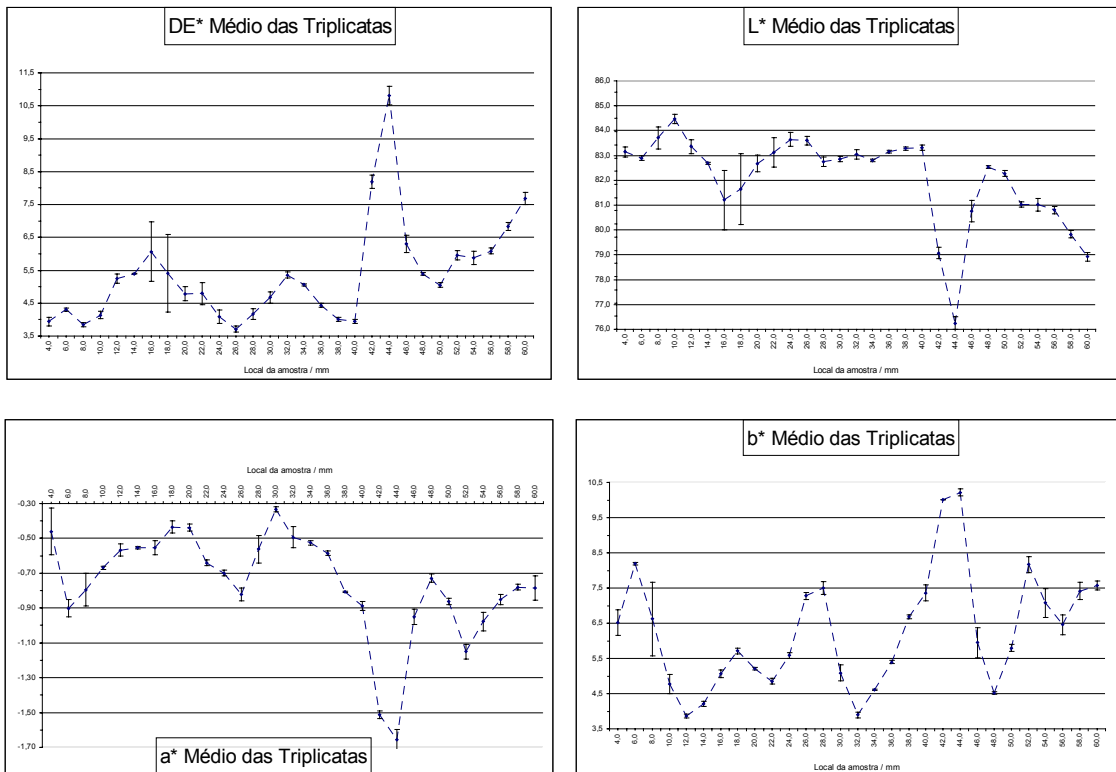


Figura 5: Gráficos dos parâmetros de cor na direção de crescimento da amostra I.

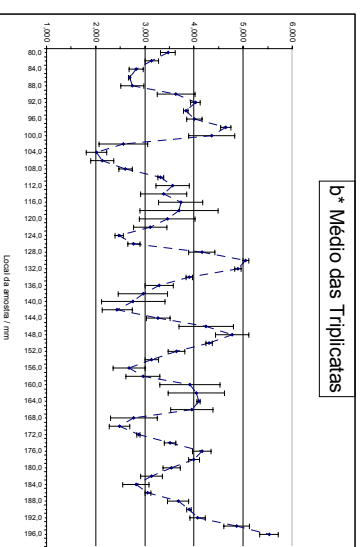
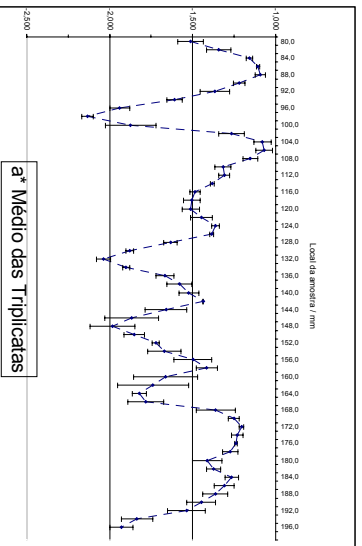
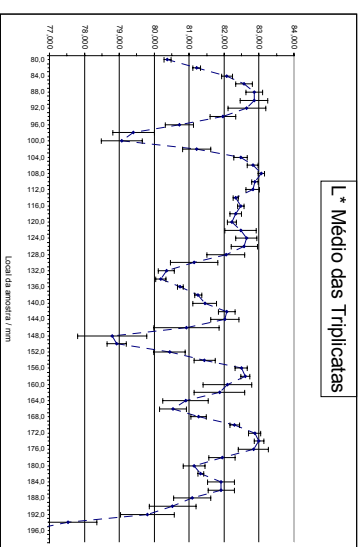
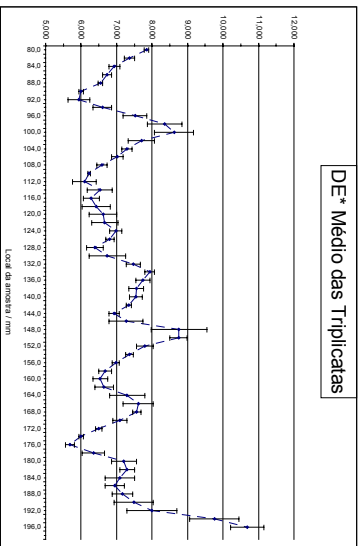


Figura 6: Gráficos dos parâmetros de cor na direção de crescimento da amostra II.

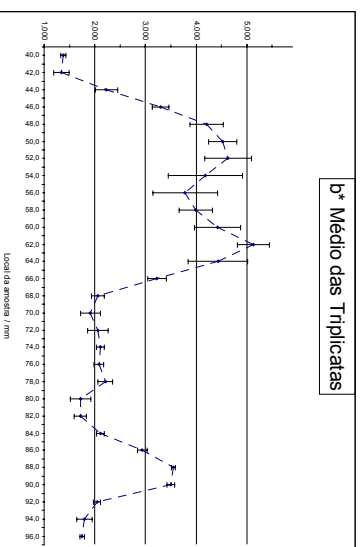
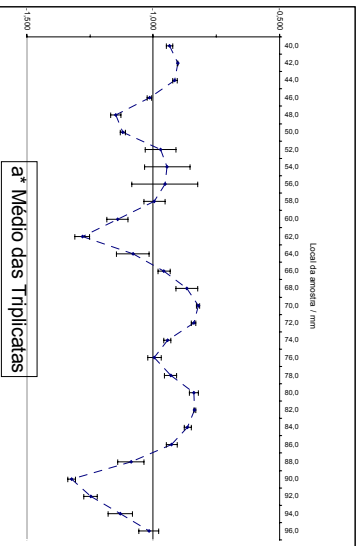
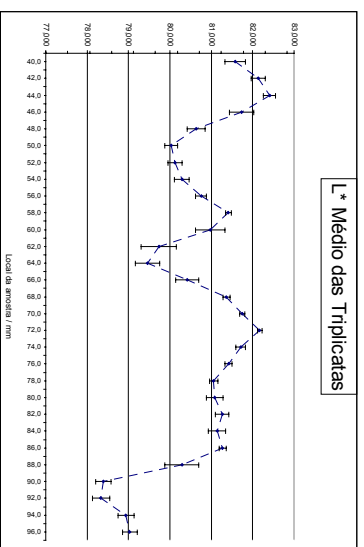
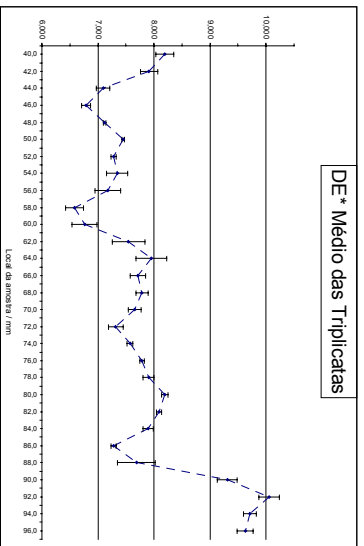


Figura 7: Gráficos dos parâmetros de cor na direção de crescimento da amostra III.

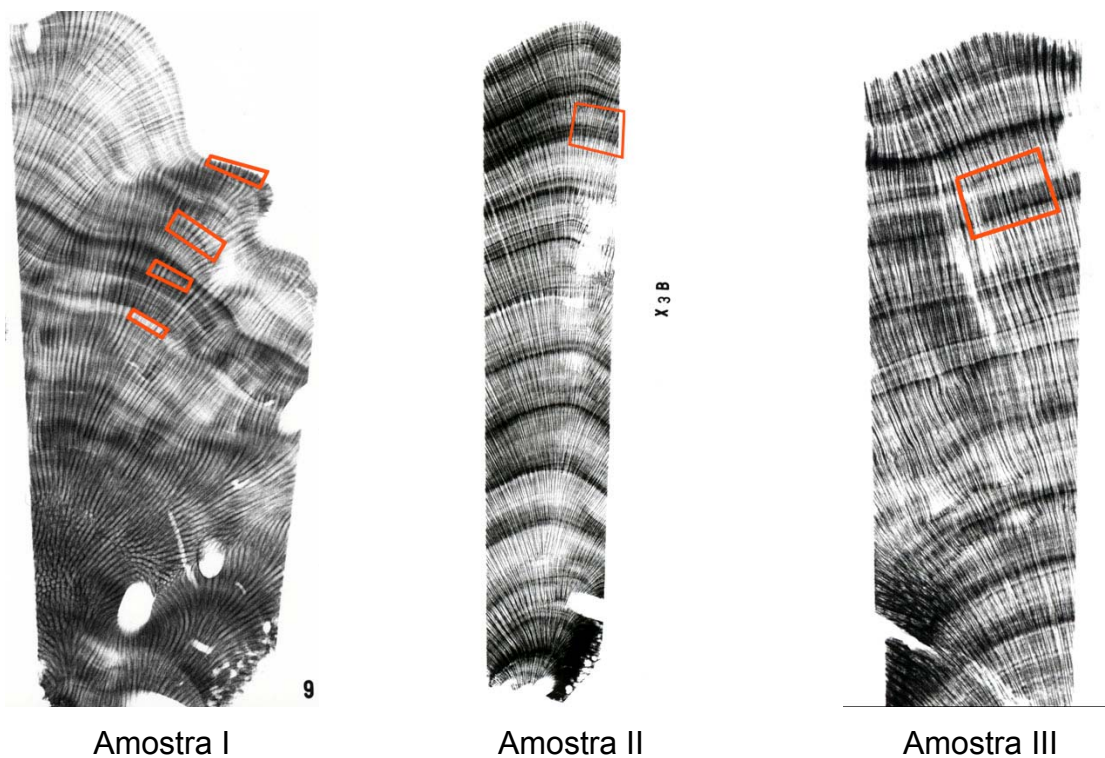


Figura 8: Imagens enviadas pelo Dr. Carlos Jiménez informando em quadriláteros vermelhos as regiões das fatias de núcleo de esqueleto que teriam passado por eventos de branqueamento.

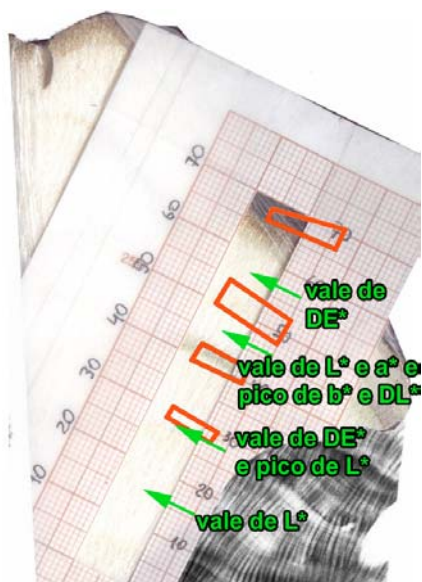


Figura 9: Esqueleto, amostra I, indicando em vermelho as regiões em que o doador das amostras afirma ter ocorrido branqueamento e, em verde as regiões com extremos nos parâmetros de cor.

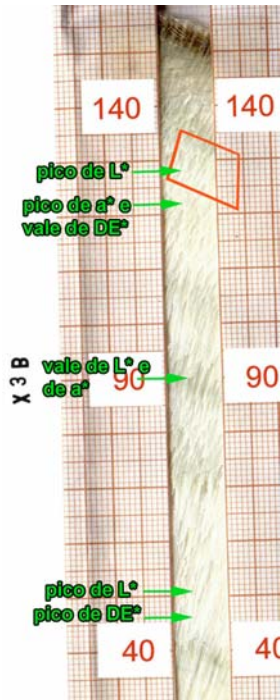


Figura 10: Esqueleto, amostra II indicando em vermelho: as regiões em que o doador das amostras afirma ter ocorrido branqueamento; em verde: as regiões com extremos nos parâmetros de cor.

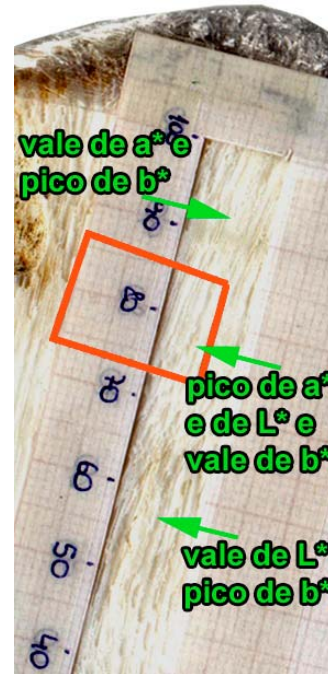


Figura 11: Esqueleto, amostra III, indicando em vermelho: as regiões em que o doador das amostras afirma ter ocorrido branqueamento; em verde: as regiões com extremos nos parâmetros de cor.

4.4 Discussão

Pode se ver nos gráficos das Figuras 5 a 7 que a espectrofotometria de reflectância difusa tem sensibilidade para detectar variações de cor ao longo da direção de crescimento das amostras analisadas. Um dos resultados que confirma essa observação é o de que variações no módulo de DE^* acima de 0,5 denotam sensibilidade da técnica e variações acima dessa foram observadas para as três amostras analisadas.

Para a maioria das amostras as curvas de regressão para o parâmetro L^* tiveram seus valores máximos nas regiões onde as amostras passaram por

eventos de branqueamento, como seria de se esperar, pois L^* é máximo ($L=100$) quando o brilho é máximo, ou seja, quando a amostra é branca.

Para a Amostra I, que passou por mais de um evento de branqueamento, o modelo de regressão utilizado não foi capaz de prever todos os episódios, apesar de ter previsto o primeiro evento.

Um fato importante a ser considerado é o de que as amostras possuíam uma história prévia de tratamento (por exemplo, remoção de matéria orgânica) que pode ter causado variações na sua cor.

Como a aplicabilidade do método foi considerada relativamente baixa, pelo fato das análises serem trabalhosas quando comparadas com técnicas existentes para a mesma finalidade, optou-se por não aprofundar o refinamento desse método, apesar de sua potencialidade, para que se pudesse dedicar à técnica a seguir, cuja aplicabilidade foi considerada muito maior e a característica de ser pouco invasiva mereceu atenção especial.

5. Análise de imagens

5.1 Introdução

As amostras de colônias de corais utilizadas nesse trabalho foram coletadas na Laje de Santos, uma rocha granítica cuja porção acima do nível do mar possui a forma de uma baleia e mede 33 m de altura, 185 m de largura e 550 m de comprimento. Conceitualmente, a denominação laje se refere a uma formação rochosa em área marinha que, acima dos níveis alcançados pela água do mar, praticamente não possui vegetação, à exceção de algumas gramíneas e outras espécies rasteiras, distinguindo-se assim das ilhas, onde se encontra vegetação arbustiva e arbórea. Difere também dos parcéis porque estes permanecem submersos, ao passo que as lajes sempre têm uma porção emersa²⁹. No seu topo há um farol instalado pela marinha, que é acionado automaticamente à noite por célula fotoelétrica. A “Laje”, como é chamada pelos freqüentadores do local, faz

parte do Parque Estadual Marinho da Laje de Santos, razão pela qual foi necessária a obtenção de licenças tanto do Instituto Florestal do Estado de São Paulo (Processo nº 42.701/2003) quanto do IBAMA (Autorização nº 036/2004) para pesquisa e coleta de amostras. O Parque foi fundado em 27 de setembro de 1993 pelo então Governador Luiz Antônio Fleury Filho, através do Decreto Estadual nº 37.537³⁰. A criação do parque teve como objetivo proteger da degradação antropogênica esse local de importância e características peculiares, conforme o seguinte fragmento extraído do decreto de fundação:

“Considerando a extraordinária diversidade e abundância da vida marinha existente na Laje de Santos, nos rochedos e parcéis próximos; considerando o valor científico da área, onde foi encontrada uma nova espécie de peixe, até então desconhecida pela ciência, além de outras nunca antes registradas no litoral sudeste e mesmo nos mares brasileiros; considerando a importância da área como local de pouso, alimentação e reprodução de aves marinhas, muitas delas migratórias, provenientes tanto do Hemisfério Norte como do Cone Sul; considerando a presença de mamíferos marinhos, golfinhos e baleias, nos arredores; considerando que a importância ecológica da área transcende suas imediações geográficas, uma vez que diversas espécies marinhas que a utilizam como local de alimentação, reprodução e crescimento realizam vastos deslocamentos ao longo da costa atlântica; considerando a beleza cênica das paisagens submarinas da área, tradicional ponto de mergulho do litoral brasileiro comparável aos melhores do mundo; considerando a rápida degradação que esta biota vem sofrendo devido à pesca de arrasto e à caça submarina predatórias, além da captura de peixes ornamentais e invertebrados marinhos para o mercado aquarífilo e de decoração de interiores, decreta:

Artigo 1º - Fica criado o Parque Estadual Marinho da Laje de Santos, no Município de Santos, com a finalidade de assegurar integral proteção à flora, à fauna, às belezas cênicas e aos ecossistemas naturais, marinhos e terrestres.

Artigo 2º - O Parque Estadual Marinho da Laje de Santos abrange uma área de 5.000,00 ha , assim descrita: “Inicia-se no vértice 01 nas coordenadas

geográficas 24°15'48" latitude S, 46°12'00" longitude W, daí segue com azimute de 90°00'00" e seca numa distância de 5.000,00m até o vértice 02 nas coordenadas geográficas 24°15'48" latitude S, 46°09'00" longitude W, daí deflete à direita e segue com azimute de 180°00'00" e seca numa distância de 10.000,00m até o vértice 03 nas coordenadas geográficas 24°21'12" latitude S, 46°09'00" longitude W, daí deflete à direita e segue com azimute de 270°00'00" e seca numa distância de 5.000,00m at o vértice 04 nas coordenadas geográficas 24°21'12" latitude S 46°12'00" longitude W, daí deflete novamente à direita e segue com azimute de 360°00'00" e seca numa distância de 10.000,00m até o vértice 01 onde teve início esta descrição, encerrando assim uma área de 5.000,00 ha (cinco mil hectares).” ”

A câmara digital utilizada para obtenção das imagens de colônias coralinas foi uma Nikon D100, que como a maioria das câmaras digitais, captura imagens no espaço de cor RGB (*Red, Green and Blue*). Cada pixel da imagem digital capturada pela câmara pode assumir 2^8 valores distintos para cada uma das três cores do espaço RGB (8 bits por cor, o que resulta em 256 valores possíveis para cada cor do espaço RGB).

Desta maneira, cada pixel é caracterizado por valores numéricos (normalmente números inteiros de 0 a 255) para cada uma das cores vermelho, verde e azul. Assim, por exemplo, um pixel com a cor azul pura teria os seguintes valores: R=0; G=0 e B=255. As demais cores da imagem digital são compostas pelas diversas combinações possíveis entre os valores de R, G e B ³¹.

A análise multivariada de imagens vem sendo cada vez mais utilizada em diversos processos, inclusive no controle de qualidade de inúmeros processos industriais. Por considerar diversas variáveis simultaneamente, a análise multivariada pode apresentar significativa vantagem em relação à análise individual de cada variável de um determinado processo ³².

Imagens digitais, independentemente da maneira como foram digitalizadas, podem ser analisadas por softwares específicos para este fim de forma que, por

exemplo, podem-se estabelecer correlações entre parâmetros de cor com determinadas propriedades do assunto cuja imagem foi capturada³³.

5.2 Parte Experimental

Utilizando o conjunto Nikon D100/lente Sigma Macro 105 mm em caixa estanque Ikelite DX100, com iluminação artificial proporcionada por um flash Ikelite DS-125 com Manual Controller Ikelite, foram capturadas imagens fotográficas com resolução de 6 megapixels (MP) de regiões definidas de colônias de três espécies de corais marinhos, *Mussismilia hispida*, *Madracis decatis* e *Palythoa caribeorum*, em seu habitat natural, o Parque Estadual Marinho da Laje de Santos.

Após serem fotografadas, essas colônias, ou parte delas, foram separadas do substrato onde encontravam-se fixadas com auxílio de uma marreta leve e um formão. A seguir, ainda no fundo, foram embaladas em sacos herméticos, que foram fechados de forma a armazenar o mínimo possível de água do mar, e colocadas em um grande saco próprio para coleta. Imediatamente após sua chegada à superfície foram então acondicionadas em caixa térmica com gelo seco e transportadas ao laboratório, onde foram armazenadas em freezer para posterior contagem de algas simbiotes nos pólipos fotografados.

Em local próximo à Laje de Santos foram também coletados 20 L de água marinha, que foram armazenados no laboratório, em galão fechado, à temperatura ambiente, para utilização no processo de remoção do tecido coralino.

O método de contagem de zooxantelas foi ajustado com o auxílio da Professora Alina Szmant da University of North Carolina at Wilmington, especialista em corais, que nos forneceu pormenores importantes que não constavam dos artigos consultados.

Cada amostra coletada foi descongelada em um béquer de 1 L à temperatura ambiente por uma hora e meia. A seguir removeu-se o tecido coralino da amostra utilizando uma pistola de pintura a ar comprimido adaptada para sugar água

marinha previamente filtrada com papel de filtro qualitativo. O tecido coralino removido pelo “spray” de água marinha foi coletado em um béquer de 400 mL.

Após a remoção do tecido, com o auxílio de um pequeno misturador elétrico comercial, homogeneizou-se a mistura coletada no béquer e rapidamente, com uma pipeta Pasteur, preencheu-se o volume da câmara de Neubauer, por capilaridade (Figura 12 B). O processo não deve ser lento pois as células das algas podem decantar dentro da pipeta Pasteur, aumentando a concentração de células na alíquota extraída.

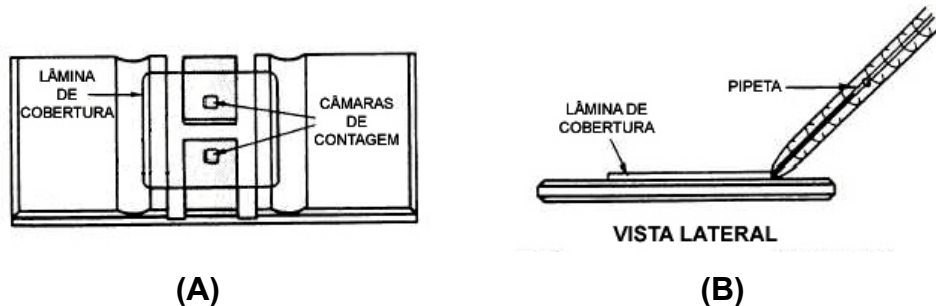


Figura 12: (A) Câmara de Neubauer, com suas duas câmaras de contagem; (B) Preenchimento de uma das câmaras de contagem

Deixou-se o homogenato repousando por dois minutos, a fim de permitir a decantação das zooxantelas na câmara de Neubauer. A seguir a câmara foi observada ao Estereoscópio Leica com aumento de 400 vezes para contagem direta das zooxantelas. O processo de contagem também não deve ser lento, pois a água retida entre lâmina e a lamínula da célula de contagem pode evaporar, inviabilizando a contagem.

As dimensões de uma grande seção de contagem da Câmara de Neubauer, conforme a Figura 13, são conhecidas: 0,10 cm × 0,10 cm × 0,01 cm. De onde o volume da grande seção é de $1,00 \times 10^{-4}$ cm³. A pequena seção também tem suas dimensões e volume conhecidos, a saber: 0,02 cm × 0,02 cm × 0,01 cm, volume

de $4,00 \times 10^{-6} \text{ cm}^3$. Sabendo-se o número de zooxantelas em uma seção de contagem, portanto, sabe-se a concentração de zooxantelas no homogenato.

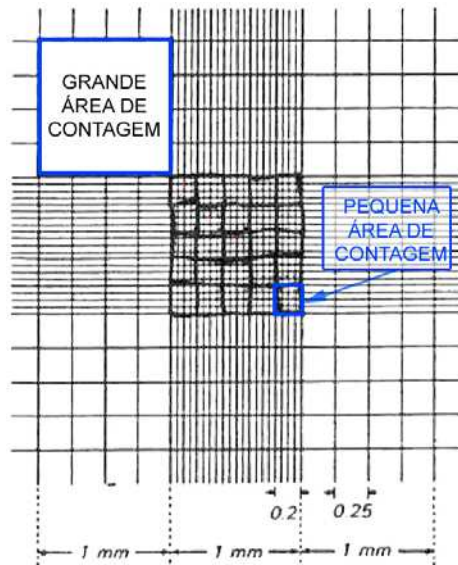


Figura 13: Áreas de contagem da Câmara de Neubauer, dimensões em mm.

Para cada amostra, determinou-se a quantidade de algas de vinte e cinco pequenas áreas de contagem, para maior controle estatístico, apesar do método descrito recomendar a contagem de apenas cinco. Fez-se a média dessas determinações para o cálculo da concentração de zooxantelas.

Mediu-se o volume de total de homogenato com uma proveta graduada. Sabendo-se a concentração e o volume de homogenato, calculou-se o número total de zooxantelas no tecido coralino. Sabendo-se a área da superfície do coral, determinou-se a densidade de zooxantelas, em células $\times \text{cm}^{-2}$ na amostra.

Determinação da área das amostras de coral.

Para se calcular a densidade de zooxantelas nas amostras, foi determinada a área da superfície da amostra, através do método da folha de alumínio^{33, 34}.

Cortaram-se com uma tesoura 6 pedaços de papel alumínio com áreas determinadas: 2 pedaços com $100,0 \text{ cm}^2$; dois pedaços com $49,0 \text{ cm}^2$ e dois

pedaços com 21,0 cm². Cada pedaço foi pesado em balança analítica e sua massa anotada.

Estabeleceu-se, por regressão linear, a relação entre a massa do pedaço de papel alumínio com sua área através de linearização simples. Os resultados encontram-se na Tabela I.

Tabela I: Dados referentes à calibração para determinação de área usando o método do papel de alumínio.

Pedaço nº	Área (cm ²)	Massa (g)
1	21,0	0,0612
2	21,0	0,0608
3	49,0	0,1405
4	49,0	0,1414
5	100,0	0,2881
6	100,0	0,2874

Reta de ajuste: $\text{Área} = - 0,18 + 349 \times \text{Massa do papel de alumínio}$

Recobriram-se as áreas das amostras com pedaços de papel de alumínio, recortando-se o excesso. Pesaram-se os papéis resultantes e usando a equação da reta de ajuste, determinou-se sua área. As amostras Laje 5 e Laje 7 são de *Palithoa sp* que não é hermatípico, ou seja, não possui esqueleto calcário, por isso, para essas duas amostras, foi pesado o pedaço de papel alumínio que recobria a amostra propriamente dita. A amostra Laje 18 teve seu esqueleto fragmentado em minúsculos pedaços, o que inviabilizou sua utilização neste trabalho. Os resultados encontram-se na Tabela II.

Tabela II: Massa dos pedaços de papel alumínio que recobriam completamente os esqueletos coralinos das amostras coletadas.

Amostra	Massa (g)	Amostra	Massa (g)
Laje 1 <i>Madracis decatis</i>	0,0932	Laje 12 <i>Mussismilia hispida</i>	0,1903
Laje 2 <i>Mussismilia hispida</i>	0,0503	Laje 13 <i>Mussismilia hispida</i>	0,2662
Laje 3 <i>Mussismilia hispida</i>	0,0672	Laje 14 <i>Mussismilia hispida</i>	0,1858
Laje 4 <i>Mussismilia hispida</i>	0,1377	Laje 15 <i>Mussismilia hispida</i>	0,2552
Laje 5 <i>Palythoa caribeorum</i>	0,1274	Laje 16 <i>Mussismilia hispida</i>	0,3331
Laje 6 <i>Mussismilia hispida</i>	0,3039	Laje 17 <i>Mussismilia hispida</i>	0,2855
Laje 7 <i>Palythoa caribeorum</i>	0,1105	Laje 18 <i>Madracis decatis</i>	---
Laje 8 <i>Madracis decatis</i>	0,4156	Laje 19 <i>Mussismilia hispida</i>	0,0648
Laje 9 <i>Madracis decatis</i>	0,2155	Laje 20 <i>Mussismilia hispida</i>	0,1630
Laje 10 <i>Madracis decatis</i>	0,1248	Laje 21 <i>Mussismilia hispida</i>	0,2477
Laje 11 <i>Madracis decatis</i>	0,1664	Laje 22 <i>Mussismilia hispida</i>	0,1450

Reta de ajuste: $\text{Área} = - 0,18 + 349 \times \text{Massa do papel de alumínio}$

Análise multivariada das imagens.

Por questões de tempo e disponibilidade de amostras, decidiu-se trabalhar com as imagens obtidas das colônias de *Mussismilia hispida*, que são os corais presentes na Laje de Santos com maior frequência na costa brasileira. Selecionaram-se seções das imagens de treze amostras de corais, do mesmo tamanho, 1.000 pixels por 1.000 pixels, de forma a minimizar possíveis interferentes na imagem, tais como corpos estranhos, irregularidades no relevo, etc.

Essas imagens foram importadas para o software Matlab e submetidas a uma série de operações, conforme o algoritmo adaptado por Patacca e Borin do LQQA, orientados do Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi, mostrado no Anexo I.

Quando a imagem é importada para o Matlab, ela é convertida em uma matriz tridimensional de dimensões 1.000 x 1.000 x 3 (1.000 pixels x 1.000 pixels x 3 cores). Na sequência o algoritmo desdobra a matriz tridimensional (*unfold*), tornando-a bidimensional, gerando uma matriz de dimensões 1.000.000 x 3 (1.000.000 de pixels x 3 cores). Nesse processo, as colunas de cada uma das três “fatias” de cores da matriz 3D são empilhadas umas abaixo das outras, desdobrando, então, cada fatia de cor em um vetor de uma única coluna, de dimensão 1.000.000 x 1. A seguir o algoritmo calcula uma série de parâmetros de cor que são incorporados à matriz desdobrada como colunas de mesma dimensão, 1.000.000 x 1. Também são incorporados à matriz desdobrada, os escores e pesos da análise de componentes principais (PCA) que o algoritmo faz.

A seguir, é calculado um vetor de distribuição de frequências com comprimento 256, considerando a cada pixel o valor para cada uma das 19 variáveis consideradas. Para fazer isso, a faixa de variabilidade completa de cada variável é considerada; por exemplo: a faixa de 0 a 255 é considerada para a variável R ainda que os valores 0 e 255 não sejam atingidos nesse caso particular. Os vetores de distribuição de cada uma dessas 19 variáveis são então unidos, adicionando-se ainda ao final os valores de três vetores de pesos (9 pontos) e de autovalores de três componentes principais, para todos os três modelos de PCA, para formar um sinal unidimensional, que é chamado “colorgrama” [18-21], de comprimento igual a 4900 pontos (256 x 19 + 36), que descreve as propriedades

de cor da imagem. A Tabela III contém o detalhamento de cada região do colorgrama.

Tabela III: Regiões presentes em um colorgrama, símbolos e definições ³⁶

Região	Símbolo	Definição
1-256	R	Curva de distribuição dos valores de vermelho
257-512	G	Curva de distribuição dos valores de verde
513-768	B	Curva de distribuição dos valores de azul
769-1024	L	Curva de distribuição dos valores de luminosidade: $L = R + G + B$
1025-1280	RR	Curva de distribuição dos valores relativos de vermelho: $RR = R / L$
1281-1536	RG	Curva de distribuição dos valores relativos de verde: $RG = G / L$
1537-1792	RB	Curva de distribuição dos valores relativos de azul: $RB = B / L$
1793-2048	H	Curva de distribuição dos valores de matiz: ver função <i>rgb2hsv</i> do Matlab
2049-2304	S	Curva de distribuição dos valores de saturação $S = [\max (R, G, B) - \min (R, G, B)] / \max (R, G, B)$
2305-2560	I	Curva de distribuição dos valores de intensidade: $I = \max (R, G, B)$
2561-2816	SC1RA W	Curva de distribuição do primeiro vetor de escores do PCA na matriz RGB bruta desdobrada
2817-3072	SC2RA W	Curva de distribuição do segundo vetor de escores do PCA na matriz RGB bruta desdobrada
3073-3328	SC3RA W	Curva de distribuição do terceiro vetor de escores do PCA na matriz RGB bruta desdobrada
3329-3584	SC1MC	Curva de distribuição do primeiro vetor de escores do PCA na matriz RGB desdobrada centrada na média
3585-3840	SC2MC	Curva de distribuição do segundo vetor de escores do PCA na matriz RGB desdobrada centrada na média
3841-4096	SC3MC	Curva de distribuição do terceiro vetor de escores do PCA na matriz RGB desdobrada centrada na média
4097-4352	SC1AS	Curva de distribuição do primeiro vetor de escores do PCA na matriz RGB desdobrada autoescalada
4353-4608	SC2AS	Curva de distribuição do segundo vetor de escores do PCA na matriz RGB desdobrada autoescalada
4609-4864	SC3AS	Curva de distribuição do terceiro vetor de escores do PCA na matriz RGB desdobrada autoescalada
4865-4900	LO_EV	Vetores de pesos e autovalores normalizados dos três modelos de PCA: bruto, centrado na média e autoescalado

Com os dados dos colorgramas foram realizados dois procedimentos para a seleção das amostras que fariam parte dos conjuntos de calibração multivariada e de validação: seleção através do algoritmo Kennard-Stone e seleção direta das amostras. Para cada uma dessas seleções foi realizada a calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS) e os erros relativos das calibrações foram determinados.

5.3 Resultados

As densidades de zooxantelas das amostras coletadas de *Mussismilia hispida* encontram-se na Tabela VIII.

Tabela IV: Dados usados para o cálculo da densidade de zooxantelas nas amostras de *Mussismilia hispida*.

Amostra	Volume de homogenato (mL)	Concentração (10^6 células mL ⁻¹)	Quantidade (10^6 células)	Área superficial (cm ²)	Densidade (10^6 células cm ⁻²)
Laje 2	223	0,815	182	17,3	10,5 ± 0,4
Laje 3	85,0	2,76	234	23,2	10,1 ± 0,3
Laje 4	82,0	5,21	427	47,8	8,94 ± 0,08
Laje 6	154	4,52	696	105,7	6,59 ± 0,31
Laje 12	115	4,24	487	66,1	7,37 ± 0,20
Laje 13	71,5	7,51	537	92,5	5,80 ± 0,09
Laje 14	109	4,13	450	64,5	6,97 ± 0,26
Laje 15	80,0	5,01	400	88,7	4,51 ± 0,06
Laje 16	116,0	7,67	890	115,8	7,68 ± 0,04
Laje 17	64,5	8,41	542	99,2	5,46 ± 0,15
Laje 19	41,0	2,75	113	22,4	5,03 ± 0,52
Laje 20	110,0	3,37	371	56,6	6,55 ± 0,47
Laje 21	117,0	5,89	689	86,1	8,00 ± 0,36
Laje 22	44,0	7,74	341	50,3	6,77 ± 0,17

Análise das imagens.

Nas Figuras 14 a 27, a seguir, são apresentadas as imagens de 6 MP capturadas das colônias de *Mussismilia hispida* e as seções de 1 MP das mesmas usadas para análise multivariada.



(A)



(B)

Figura 14: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 2; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)



(B)

Figura 15: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 3; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.

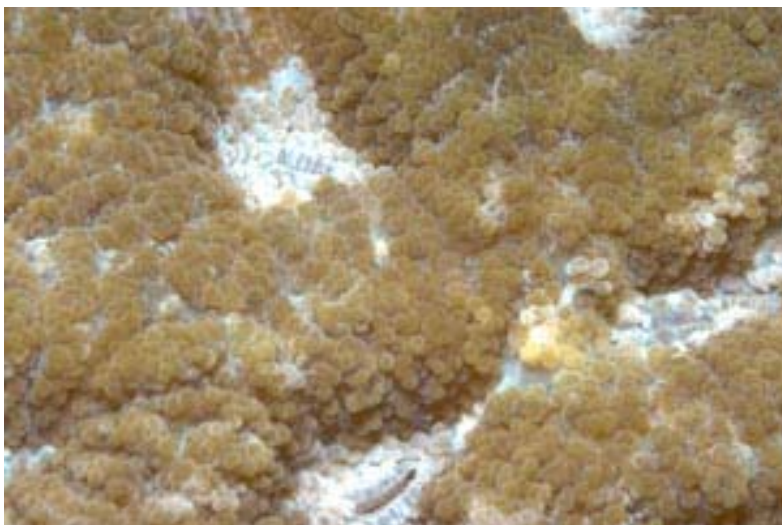


(A)



(B)

Figura 16: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 4; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)



(B)

Figura 17: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 6; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)



(B)

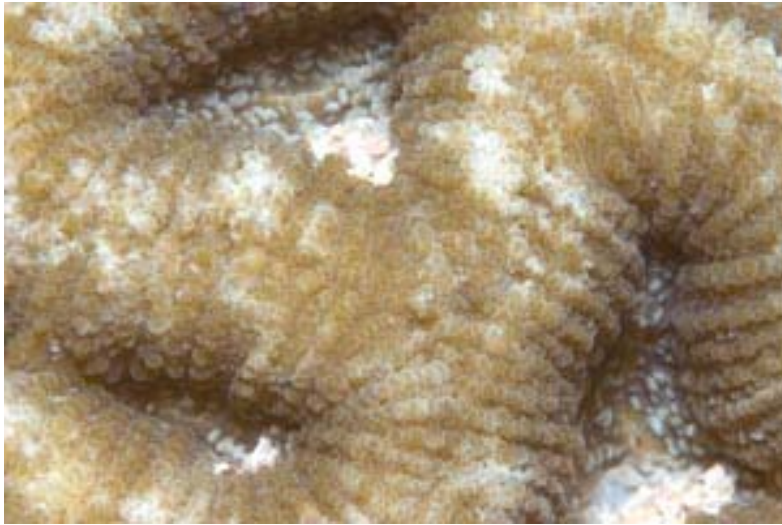
Figura 18: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 12; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)

(B)

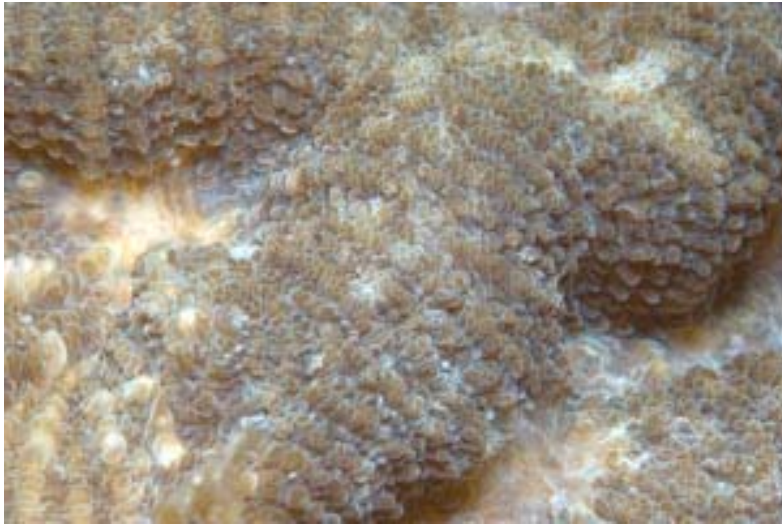
Figura 19: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 13; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)

(B)

Figura 20: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 14; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)

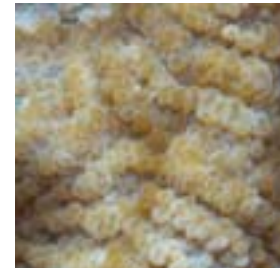


(B)

Figura 21: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 15; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)



(B)

Figura 22: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 16; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)



(B)

Figura 23: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 17; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)



(B)

Figura 24: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 19; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)



(B)

Figura 25: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 20; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.

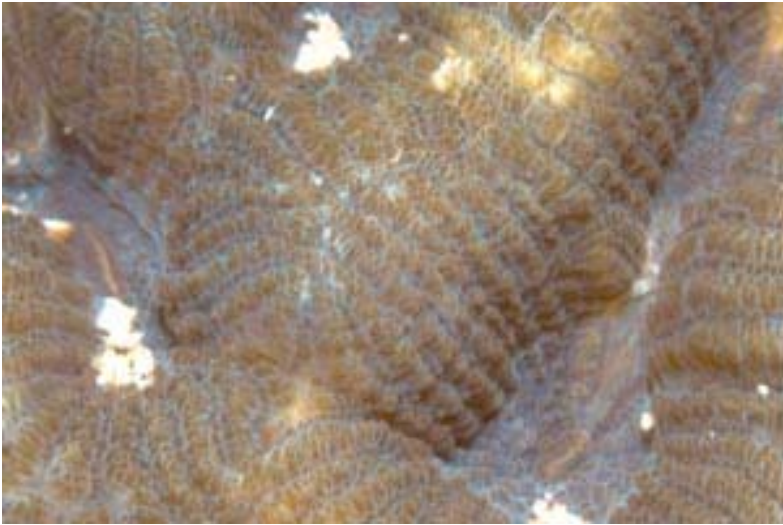


(A)



(B)

Figura 26: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 21; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.



(A)



(B)

Figura 27: (A) Imagem de 6 MP da amostra Laje 22; (B) Seção de 1 MP utilizada na análise multivariada dessa amostra.

Cada uma das imagens de 1 MP das Figuras 14 a 27 foi inserida no software MatLab e então processada gerando um colorgrama para cada imagem. Um exemplo de colorgrama é mostrado na Figura 28.

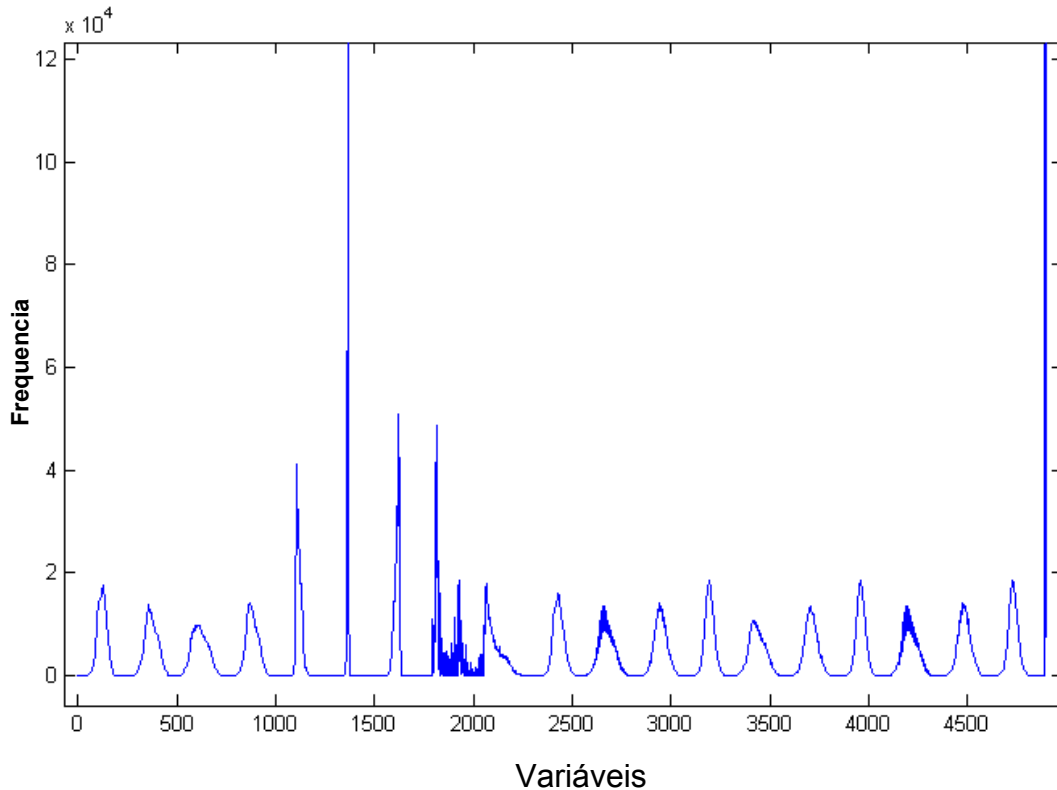


Figura 28: Colorgrama da imagem da amostra Laje 15.

Na abscissa do colorgrama tem-se as variáveis, conforme descrito na Tabela III. Na ordenada tem-se a freqüência de distribuição de cada variável. Desta forma, para as variáveis de 0 a 255, por exemplo, tem-se os valores possíveis de R (vermelho) e a ordenada para cada um desses possíveis valores corresponde a sua freqüência na imagem. O pico observado nessa região do colorgrama representa, portanto, o valor de R mais freqüente na imagem. O mesmo raciocínio deve ser extrapolado para as demais variáveis do colorgrama.

Os colorgramas sobrepostos são mostrados na Figura 29.

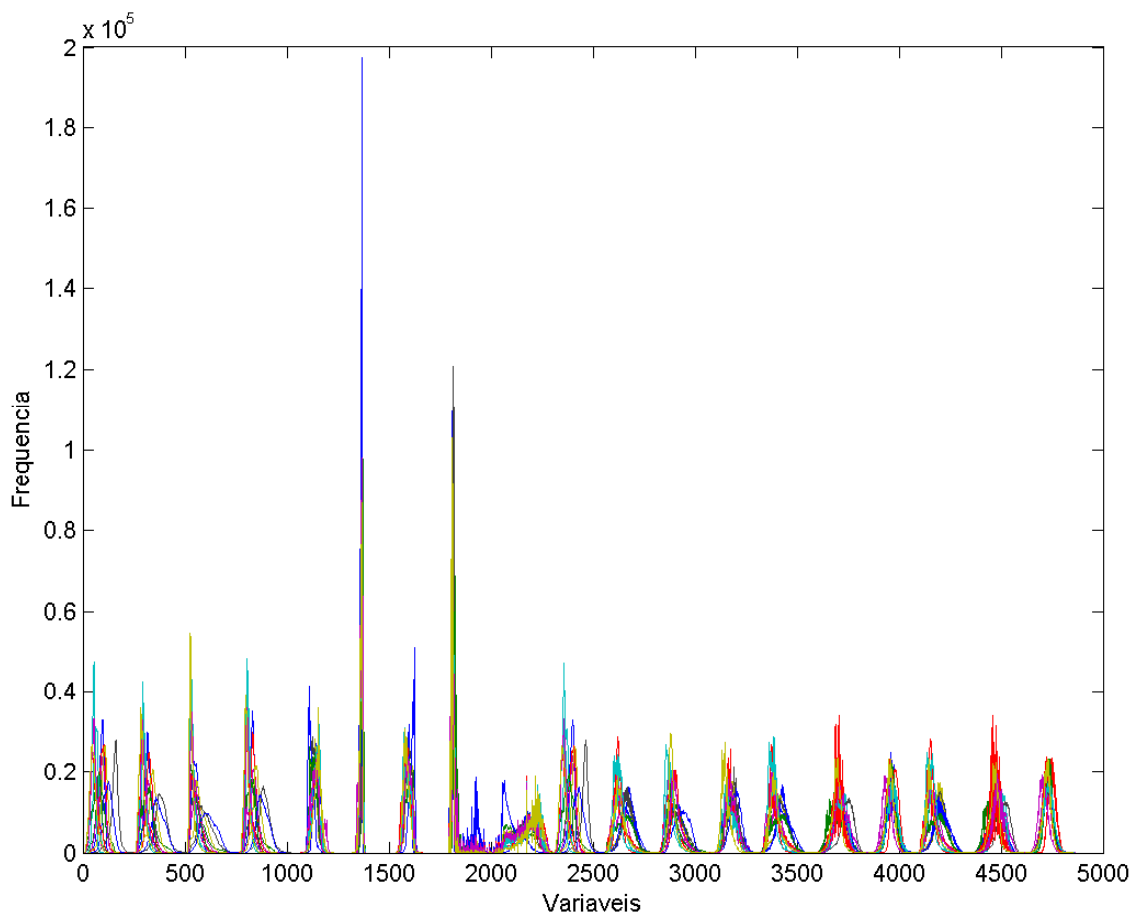


Figura 29: Colorgramas sobrepostos das imagens de 1 MP das Figuras 14 a 27.

Dois procedimentos para seleção de amostras foram adotados, um utilizando um algoritmo bastante conhecido para esta finalidade, o Kennard-Stone, e outro através da seleção direta, porém criteriosa, das amostras. Este último procedimento apenas foi possível em função da reduzida quantidade de amostras.

- Seleção de amostras pelo Kennard-Stone

O algoritmo Kennard-Stone faz uma seleção de amostras de maneira uniforme, dentro do campo amostral, sendo que as amostras Laje 2, 4, 6, 13, 14, 15, 16, 21 e 22 foram selecionadas para a calibração e para a previsão utilizaram-se as outras 5 amostras, Laje 3, 12, 17, 19 e 20.

A seguir utilizou-se um modelo de PLS (Partial Least Squares) para correlacionar as densidades de zooxantelas e os colorgramas das imagens.

As Tabelas V apresenta os dados obtidos na previsão da densidade de zooxantelas usando os colorgramas com as 4864 variáveis. A primeira coluna apresenta os dados obtidos da contagem, como apresentados na Tabela IV.

Tabela V: Resultados da análise multivariada dos colorgramas com 4864 variáveis e seleção de amostras por Kennard-Stone.

Amostra	Densidade medida (10^6 cél. \times cm^{-2})	Previsão com 8 variáveis latentes (10^6 cél. \times cm^{-2})	Módulo do erro relativo (%)
Laje 3	10,1	7,27	28,1
Laje 12	7,37	7,77	5,46
Laje 17	5,46	7,35	34,6
Laje 19	5,03	7,17	42,5
Laje 20	6,55	6,57	0,284

Pode-se ver que a previsão de densidade de zooxantelas é bastante razoável, com erro máximo de 42,5 %. Este é um resultado promissor, tendo em vista as características das amostras de natureza biológica, que por si só indicam a viabilidade do uso do método para a finalidade proposta.

Decidiu-se testar truncar o colorgrama em 2560 variáveis (Figura 30) a fim de tentar reduzir os erros, o que foi conseguido, conforme mostrado na Tabela VI. Com o truncamento, contudo, as amostras selecionadas pelo Kennard-Stone para calibração e validação foram outras: para validação foram selecionadas as amostras Laje 4, 12, 16, 17 e 20, sendo que as demais foram selecionadas para o conjunto de calibração.

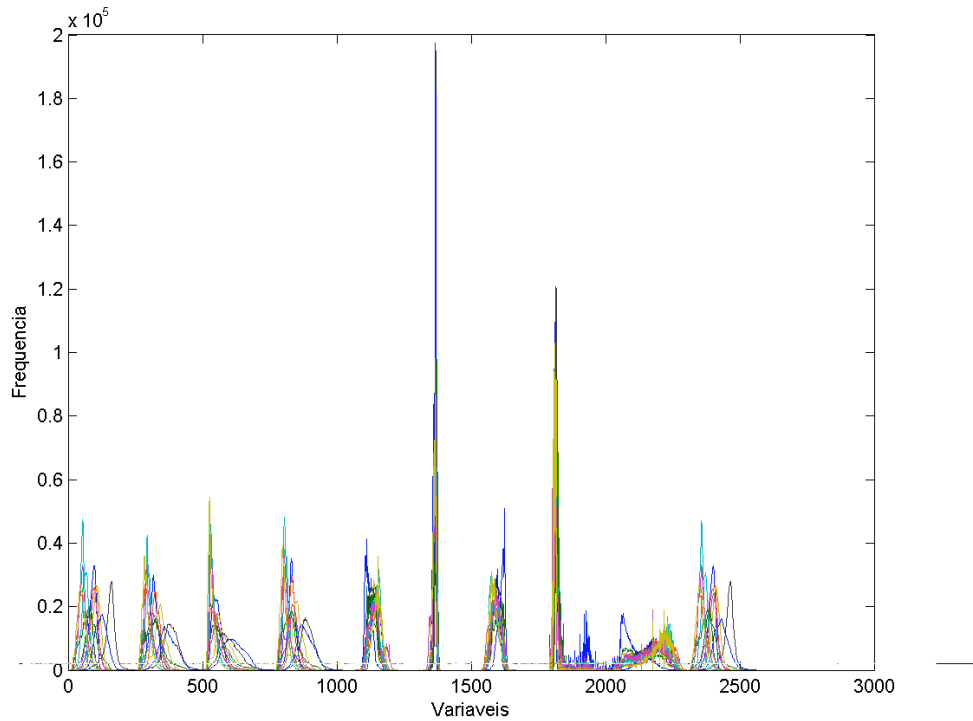


Figura 30: Colorgramas sobrepostos das imagens de 1MP das Figura 14 a 27, com truncamento em 2560 variáveis.

Tabela VI: Resultados da análise multivariada dos colorgramas com 2560 variáveis e seleção de amostras por Kennard-Stone.

Amostra	Densidade medida (10^6 cél. \times cm^{-2})	Previsão com 8 variáveis latentes (10^6 cél. \times cm^{-2})	Módulo do erro relativo (%)
Laje 4	8,94	9,21	2,97
Laje 12	7,37	8,23	11,7
Laje 16	7,68	10,2	32,5
Laje 17	5,46	7,67	40,6
Laje 20	6,55	6,48	1,05

Vê-se que o truncamento reduziu o erro médio, levando a resultados melhores que os obtidos com o número total de variáveis.

- Seleção direta de amostras

Selecionaram-se manualmente as 5 amostras que fariam parte do conjunto de validação, utilizando os seguintes critérios: não utilizar na validação as duas amostras das extremidades e procurar selecionar amostras que representassem a variabilidade das densidades encontradas em todo o conjunto amostral. As amostras selecionadas para validação foram: Laje 4, 6, 12, 13 e 16. As demais amostras foram utilizadas no conjunto de calibração.

Tabela VII: Resultados da análise multivariada dos colorgramas com 4864 variáveis e seleção direta de amostras.

Amostra	Densidade medida (10^6 cél. \times cm^{-2})	Previsão com 6 variáveis latentes (10^6 cél. \times cm^{-2})	Módulo do erro relativo (%)
Laje 4	8,94	10,9	21,4
Laje 6	6,59	7,42	12,6
Laje 12	7,37	8,67	17,7
Laje 13	5,80	7,76	33,9
Laje 16	7,68	7,44	3,13

5.4 Discussão

Os resultados das Tabelas V a VII mostram que o método de análise de imagens tem capacidade de estimar a densidade de zooxantelas. Os erros mostrados são bastante adequados a uma primeira aproximação. Ainda será necessário otimizar as variáveis usadas para as estimativas, mas ao todo os resultados já obtidos mostram a validade da nossa proposta.

Segundo Daszykowski a seleção de amostras (*data mining*) pode ser caracterizada como o processo de extração de informação útil a partir de uma ampla base de dados. Segundo o autor, o emprego de uma única técnica freqüentemente é insuficiente para determinada aplicação. O algoritmo Kennard-Stone é bastante conhecido no campo da quimiometria e já é utilizado em diversas aplicações. É um algoritmo de design uniforme, no qual amostras representativas são selecionadas a fim de cobrir uniformemente o espaço de dados ³⁷. Nesse trabalho, o algoritmo foi utilizado para selecionar quais amostras fariam parte do conjunto de calibração (amostras mais representativas do espaço amostral) e quais seriam utilizadas na validação.

As análises utilizando o algoritmo Kennard-Stone para seleção dos conjuntos de amostras mostraram que as previsões feitas utilizando 2560 variáveis do colorgrama resultaram em erros significativamente menores do que quando foram utilizadas 4864 variáveis. Uma possível explicação para esse fato resulta da observação de que as 2560 variáveis iniciais estão relacionadas a aspectos inerentes à cor e à luminosidade das amostras, enquanto as últimas variáveis estão relacionadas à Análise dos Componentes Principais (PCA) do modelo, que por alguma razão ainda não entendida, resultou muito similar para as imagens analisadas, o que não ocorreu com as variáveis da primeira porção do colorgrama.

A seleção direta de amostras permitiu reduzir sensivelmente a magnitude do erro relativo, o que denota que a seleção dos conjuntos amostrais é um fator importante na otimização do método.

6. Conclusões

- A técnica de reflectância difusa é sensível às diferenças de cor das amostras de fatias de núcleos coralinos ao longo de sua direção de crescimento;
- Para duas entre três amostras a regressão polinomial apresentou máximos do parâmetro L^* nas regiões indicadas como tendo passado por eventos de branqueamento;

- Foi possível estabelecer metodologia não-destrutiva, através do uso de imagens, para estimar a densidade de zooxantelas em amostras de *Mussismilia hispida* coletadas na Laje de Santos. Salvo melhor juízo, trata-se do primeiro método não destrutivo de avaliação quantitativa da saúde destes corais com efetiva possibilidade de aplicação em campo. A metodologia desenvolvida pode e deve ser aperfeiçoada, o que será feito em trabalho posterior.
- A metodologia utilizada na seleção de amostras representativas influenciou significativamente nos resultados.

7. Sugestões para trabalhos posteriores

- Utilizar outros algoritmos para seleção de amostras, como por exemplo o *OptiSim*;
- Avaliar a magnitude do erro na medida da área superficial pelo método da folha de alumínio, estimando através desse método a área de superfícies de poliedros cuja área pode ser calculada, e comparando os resultados;
- Avaliar qual a influência da conversão do arquivo com extensão “NEF” que é o formato bruto (*raw*) da Nikon D100 para o formato “JPG” nos resultados da análise multivariada. Para isso, um algoritmo capaz de capturar arquivos “NEF” no MatLab precisaria ser desenvolvido;
- Verificar se a superfície irregular exerce influência considerável nos resultados, fotografando superfícies lisas e superfícies irregulares, como uma parede chapiscada, pintadas com a mesma tinta e avaliando o resultado da análise multivariada dessas imagens;
- Desenvolver um método prático para selecionar diversas pequenas áreas descontínuas da imagem, ao invés de uma grande seção contínua da mesma, minimizando interferentes como relevo do animal e despigmentação do tecido próximo à boca, por exemplo;

- Elaborar uma escala de saúde de colônias de corais marinhos baseada em parâmetros de cor, em substituição à densidade de zooxantelas;
- Generalizar a metodologia para outras espécies de corais marinhos, especialmente espécies mais vulneráveis ao branqueamento.

8. Referências

1. R. D. Barnes, "Invertebrate Zoology", Saunders College, Philadelphia, 4th ed., 1980.
2. A. E. Douglas, "Coral bleaching-how and why?", *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 2003, 385-392.
3. G. D. Stanley, Jr., "The evolution of modern corals and their early story", *Earth-Science Reviews*, **60(3-4)**, 2003, 195-225.
4. W. K. Fitt; F. K. McFarland; M. E. Warner; G. C. Chilcoat," Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching", *Limnol. Oceanogr.*, **45(3)**, 2000, 677–685.
5. P. J. Mumby; J. D. Hedley; K. Zychaluk; A. R. Harborne; P. G. Blackwell, "Revisiting the catastrophic die-off of the urchin *Diadema antillarum* on Caribbean coral reefs: Fresh insights on resilience from a simulation model", *Ecological Modelling*, **196**, 2006, 131-148.
6. P. Hallock, "Global Change and modern coral reefs: New opportunities to understand shallow-water carbonate depositional processes", *Sedimentary Geology*, **175**, 2005, 19-33.
7. O. Hoegh-Guldberg, "Climate change coral bleaching and the future of the world's coral reefs", *Marine Freshwater Research*, **50**, 1999, 839-866.
8. D. O. Obura, "Resilience and climate change: lessons from coral reefs and bleaching in the Western Indian Ocean", *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **63**, 2005, 353-372.
9. R. B. Aronson; W. F. Precht; M. A. Toscano; K. H. Koltes, "The 1998 bleaching event and its aftermaths on a coral reef in Belize", *Marine Biology*, **141(3)**, 2002, 435-447.
10. U. Lindahl, "The 1997/1998 Mass mortality of Corals: Effects on Fish Communities on a Tanzanian Coral Reef", *Marine Pollution Bulletin*, **50(2)**, 2001, 127-131
11. P.W.Glynn, "Widespread coral mortality and the El Niño 1982/83 warming event", *Environmental Conservation*, **11**, 1984, 133-146.

12. C.R.Wilkinson, "Global and local threats to reef functioning and existence: reviews and predictions", *Marine Freshwater Research*, **50**, 1999, 867-878.
13. R. Berkelmans; J. K. Oliver, "Large-scale bleaching of corals on the Great Barrier Reef", *Coral Reefs*, **18**, 1999, 55-60.
14. L. Celliers; M. H. Schleyer, "Coral bleaching on high-latitude marginal reefs at Sodwana Bay, South Africa", *Marine Pollution Bulletin*, **44(12)**, 2002, 1380-1387.
15. Royal Society, "Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide", *Royal Society*, Document 12/05, 2005.
16. A. C. Baker; C. J. Starger; T. R. MacClanahan; P. W. Glynn, "Coral's adaptive response to climate change", *Nature*, **430**, 2004, 741
17. R. Rowan, "Thermal adaption in reef coral symbionts", *Nature*, **430**, 2004, 742
18. C. M. Mattia, "A non-destructive spectrophotographic method of assessing relative changes in coral health utilizing induced fluorescence", http://www.cbl.umces.edu/~mattia/SMProject/final_paper.html, último acesso em 26/11/2006
19. Y. Thieberger; Z. Kizner; Y. Achituv; Z. Dubinsky, "A novel, nondestructive bioassay for assessing areal chlorophyll a in hermatypic cnidarians", *Limnol. Oceanogr.*, **40 (6)**, 1995, 1166-1173.
20. J. Stimson, "The annual cycle of density of zooxanthellae in the tissues of field and laboratory-held *Pucillopora damicornis* (Linnaeus)", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **214**, 1997, 35-48.
21. Fagonee; H. B. Wilson; M. P. Hassel; J. R. Turner, "The dynamics of zooxanthellae populations: a long-term study in the field", *Science*, **283**, 1999, 843-845
22. C. B. Castro; D. O. Pires, "A bleaching event on a Brazilian coral reef", *Rev. Bras. Oceanogr.*, **47(1)**, 1999, 87-90.
23. D. B. Judd; G. Wyszecski, "Color in business, science and industry", John Wiley & Sons, New York, 3rd ed., 1975.
24. R. M. Johnston, "Pigment handbook", vol. 3, John Wiley & Sons, New York, 1973.
25. ASTM, E 308-66, "Spectrophotometry and description of color in CIE 1931 system".
26. M. Kerker, "The scattering of light and other eletromagnetic radiation", Academic Press, New York, 1968.
27. F. W. Billmeyer; Jr, M. Saltzman, "Principles of Color Technology", Interscience Publishers, New York, 1966.
28. <http://www.iflorestsp.br/pemls/pages/apresent.htm>, último acesso em 01/11/06

29. http://www.al.sp.gov.br/staticfile/integra_ddilei/decreto/1993/decreto%20n.37.537,%20de%2027.09.1993.htm, último acesso em 01/11/06
30. L. V. Agostini; I. S. Silva; S. Bampi, "Parallel color space converters for JPEG image compression", *Microelectronics Reliability*, **44**, 2004, 697-703.
31. Du. C.-J.; D.-W. Sun, "Comparison of three methods for classification of pizza topping using different colour space transformations", *Journal of Food Engineering*, **68**, 2005, 277-287.
32. S. P. Gurden; E. M. Lage; C. G. de Faria; I. Joekes; M. M. C. & Ferreira, "Analysis of video images from a gas-liquid transfer experiment: a comparison of PCA and PARAFAC for multivariate image analysis", *Journal of Chemometrics*, **17**, 2003, 400-412.
33. A. M. Szmant; N. J. Gassman, "The effects of prolonged bleaching of the reef coral *Montastrea annularis* on the tissue biomass and reproduction", *Coral Reefs*, **8**, 1990, 217-224.
34. J. Houghton, "Global Warming", *Rep. Prog. Phys.*, **68**, 2005, 1343-1403
35. D. K. Niyogi; W. M. Lewis, Jr.; D. M. McKnight, "Effects of Stress from Mine Drainage on Diversity, Biomass, and Function of Primary Producers in Mountain Streams", *Ecosystems*, **5**, 2002, 554-567.
36. A. Antonelli; M. Cocchi; P. Fava; G. Foca; G. C. Franchini; D. Manzini; A. Ulrici, "Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm", *Analytica Chimica Acta*, **515**, 2004, 3-13.
37. M. Daszykowski; B. Walczak; D.L. Massart, "Representative subset selection", *Analytica Chimica Acta*, **468**, 2002, 91-103.

Anexo I - Algoritmo do Colorgrama

```
function vetorcolor = sp_color(arquivo)
%SP_COLOR
%
% Este programa calcula o colorgrama para a imagem
% RGB do arquivo
%
% INPUT:
% arquivo = nome do arquivo de imagem
%
% OUTPUT:
% vetorcolor = histograma de frequencias conforme descrito em
%
%I/O: vetorcolor = sp_color(arquivo);
%
%Veja tambem: IMREAD
%
%Copyright Passoca & Shefa Research, Inc. 2005
% Licensee shall not re-compile, translate or convert "M-files" contained
% in SP_Toolbox for use with any software other than MATLAB, without
% written permission from Passoca & Shefa, Inc.
%
% Uso exclusivo dos desesperados para defender.
%
%
% Dedicamos esta rotina ao Waldomiro do LAQQA
%
% ""

z = imread(arquivo);
vetorcolor = reshape(z,[(size(z,1)*size(z,2)) 3]);
% Calcula L
l = sum(vetorcolor');
l = l';
vetorcolor(:,4) = l/3;

% Calcula R's
for j = 1:3;
l1 = 1./l;
y = double(vetorcolor(:,j)).*l1;
y = y*255;
vetorcolor(:,(4+j)) = y;
end

% Calcula H S V
```

```
y = rgb2hsv(z);  
vetorcolor(:,8:10) = 255*reshape(y,[size(z,1)*size(z,2) 3]);
```

```
% Calcula SCRAW - scores dos dados puros  
options.plots = 'none';  
options.display = 'off';  
v = double(vetorcolor(:,1:3));  
raw = pca(v,3,options);  
y = raw.loads{1};  
y = y - (ones(size(z,1)*size(z,2),1) * min(y));  
u = [255 255 255]./max(y);  
y = kr(y,u);  
vetorcolor(:,11:13) = y;
```

```
% Calcula SCMC - scores dos dados centrados na media  
options.preprocessing = 'mean center';  
mc = pca(v,3,options);  
y = mc.loads{1};  
y = y - (ones(size(z,1)*size(z,2),1) * min(y));  
u = [255 255 255]./max(y);  
y = kr(y,u);  
vetorcolor(:,14:16) = y;
```

```
% Calcula SCAS - scores auto escalados  
options.preprocessing = 'autoscale';  
as = pca(v,3,options);  
y = as.loads{1};  
y = y - (ones(size(z,1)*size(z,2),1) * min(y));  
u = [255 255 255]./max(y);  
y = kr(y,u);  
vetorcolor(:,17:19) = y;
```

```
% Criar histograma  
vetorcolor = hist(double(vetorcolor),[0:255]);
```

```
% Criar vetor  
vetorcolor = reshape(vetorcolor,[1 256*19]);
```

```
% Adiciona os loadings dos 3 modelos ao final do vetor  
y = raw.loads{2};  
vetorcolor(1,4865:4873) = reshape(y,[1 9]);  
y = mc.loads{2};  
vetorcolor(1,4874:4882) = reshape(y,[1 9]);  
y = as.loads{2};  
vetorcolor(1,4883:4891) = reshape(y,[1 9]);
```

```
% Adiciona os autovalores do primeiro modelo PCA
```



```
y = double(reshape(z,[size(z,1)*size(z,2) 3]));  
[sco,d,lo] = svd(y'*y);  
y = diag(d);  
vetorcolor(1,4892:4894) = y';
```

%Adiciona os autovalores do segundo modelo PCA

```
y = double(reshape(z,[size(z,1)*size(z,2) 3]));  
y = y - ones(size(z,1)*size(z,2),1)*mean(y);  
[sco,d,lo] = svd(y'*y);  
y = diag(d);  
vetorcolor(1,4895:4897) = y';
```

% Adiciona os autovalores do terceiro modelo PCA

```
y = double(reshape(z,[size(z,1)*size(z,2) 3]));  
y = auto(y);  
[sco,d,lo] = svd(y'*y);  
y = diag(d);  
vetorcolor(1,4898:4900) = y';
```