

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIA DE LA COMPUTACIÓN

*Análisis de la movilidad de los microcrustáceos en presencia
de Agentes Contaminantes: Un enfoque basado en Deep
Learning*

Seminario de Tesis II

Autor: Nelson Steven Sanabio Maldonado

Asesor: Manuel Castillo Cara

Coasesora: Yesenia Pastrana Alta

Marzo, 2021

Resumen

Los microcrustáceos constituyen la base de la cadena alimenticia marina y desempeñan un gran papel por su valor nutricional, pero también son frecuentemente utilizados para analizar los cambios en las zonas costeras; además, nos ayuda a medir la toxicidad en aguas contaminadas. Una medición es la velocidad del movimiento en el agua como criterio de la valoración de la conducta para su aplicación en estudios de ecotoxicología. Como consecuencia, existe una fuerte necesidad de desarrollar sistemas altamente eficientes, que permitan observar a estos microcrustáceos. Un nuevo sistema de monitoriamiento de *Artemias Salinas* es presentado. Fue desarrollado y optimizado para un monitoriamiento continuo para 4 *Artemias Salinas*. El sistema propuesto está compuesto por 3 niveles: adquisición de vídeos, redes neuronales convoluciones y seguimiento del objeto. El equipamiento óptico es utilizado para grabar imágenes de las *Artemias Salinas* inmersas en el flujo de agua dentro de una cubeta UV por un tiempo de 2 minutos. La detección de los objetos es realizado por un modelo de red neuronal convolucional (VGG16) con Transfer Learning, donde se escogen filtros que realizan a las *Artemias Salinas* para realizar la sustracción de fondo y para cada *Artemia Salina* se le asignó un identificador único para el seguimiento del objeto. El método propuesto, cuenta y almacena las posiciones de las *Artemias Salinas* de cada imagen en el tiempo que dura el vídeo, independientemente de cada microcrustáceo en un archivo CSV. El método fue testeado con 3 metales pesados (Cd, Zn y Hg) en diferentes concentraciones. Los resultados demuestran la capacidad del sistema para detectar con precisión y medir la rapidez promedio de los nauplios.

Palabra Clave – red neuronal convolucional, transfer learning, sustracción de fondo, seguimiento del objeto, *Artemia Salina*

Índice general

Resumen	III
1. Introducción	1
1.1. Motivación	1
1.2. Objetivos	3
1.3. Estructura del Seminario	3
2. Estado del Arte	5
2.1. Bioindicadores acuáticos	5
2.2. Deep Learning en química computacional	5
2.3. Temas Relacionados con el procesamiento de imágenes	6
2.3.1. El método <i>otsu</i> en la segmentación de la imagen digital . .	6
2.3.2. Operaciones morfológicas para el análisis de la imagen digital	6
Dilatación	7
Erosión	7
Apertura y Cierre	7
2.3.3. Transfer Learning	9
3. Metodología y Herramientas	11
3.1. Metodología química	11
3.1.1. Condiciones óptimas de eclosión	11
3.1.2. Toxicidad letal	12
3.1.3. Determinación de los índices de lipoperoxidación	12
3.2. Metodología computacional	12
3.2.1. Caso 1: Implementación de un sistema portátil basado en procesamiento de imágenes	12

3.2.2.	Caso 2: Solución para el sistema portátil basado en Transfer Learning	14
	Equipo Óptico	14
	Parte mecánica del equipo MESP	15
3.2.3.	Dataset	17
3.2.4.	Red Neuronal Convolutacional	17
3.3.	Enfoque basado en Deep Learning	19
3.3.1.	Conversión de formatos de vídeo	19
3.3.2.	Escala grises	19
3.3.3.	Región de interés	20
3.3.4.	Filtros del modelo VGG16	21
3.3.5.	Binarización y Morfología Matemática	24
3.3.6.	Seguimiento del objeto	24
3.4.	Tecnologías	28
3.4.1.	Python	28
3.4.2.	OpenCV	28
3.4.3.	Tensorflow y Keras	28
3.4.4.	Anaconda	29
3.4.5.	Quiver	29
3.4.6.	Decord	29
4.	Resultados y Discusiones	31
4.1.	Caso 1: Implementación de un sistema portátil basado en procesamiento de imágenes	31
4.2.	Caso 2: Solución para el sistema portátil basado en Transfer Learning	33
4.3.	Discusión	36
5.	Conclusiones y Trabajo Futuro	39
5.1.	Conclusiones	39
5.2.	Trabajo Futuro	40

Índice de figuras

2.1. Dilatación como expansión: (a) Imagen de entrada en negro, dilatación en gris, (b) elemento estructurante. Fuente: Edward, Roberto [1].	7
2.2. Erosión como disminución: (a) Imagen de entrada en gris y erosión en negro, (b) Elemento estructurante. Fuente: Edward, Roberto [1].	8
2.3. (a) Elemento estructurante, (b) Imagen de entrada, (c) Erosión, (d) Apertura. Fuente: Edward, Roberto [1].	8
2.4. (a) Elemento estructurante, (b) Imagen de entrada, (c) Dilatación, (d) Cierre. Fuente: Edward, Roberto [1].	9
2.5. La configuración de Transfer Learning. Fuente: https://ruder.io/transfer-learning/	9
3.1. Sistema portátil ensamblado. Fuente: Nelson S. et al. [2]	13
3.2. Equipo MESP. Fuente: Elaboración propia.	15
3.3. Equipo óptico. Fuente: Elaboración propia.	15
3.4. La arquitectura de VGG-16. Fuente: Abhijeet [3].	18
3.5. Modelo de la arquitectura VGG16. Fuente: Abhijeet [3].	18
3.6. Una imagen en escala de grises. Fuente: Elaboración propia.	20
3.7. Se observa las curvas en el eje X e Y de una imagen. (i) El color rojo representa la suma de intensidad de las columnas; y (ii) El color azul representa la suma de intensidades de las filas. Fuente: Elaboración propia.	20
3.8. Una imagen recortada de la imagen original. Fuente: Elaboración propia.	21
3.9. Se muestra las 64 salidas de la imagen recortada del modelo VGG16. Fuente: Elaboración propia.	22

3.10. Entrenamiento hasta el primer bloque de la primera convolución. Fuente: Elaboración propia.	23
3.11. (A) Filtro 19, (B) Filtro 32, (C) Filtro 36. Fuente: Elaboración propia.	23
3.12. Entrenamiento hasta el segundo bloque de la primera convolución. Fuente: Elaboración propia.	23
3.13. (A) Filtro 7, (B) Filtro 43, (C) Filtro 54. Fuente: Elaboración propia.	24
3.14. (A) Imagen luego de la sustracción de fondo (Imagen con ruido), (B) Operador de erosión, (C) Operador de dilatación. Fuente: Elaboración propia.	25
3.15. Imagen binarizada utilizando componentes conexas. Fuente: Elaboración propia.	26
3.16. Data almacenada en un archivo CSV para una <i>Artemia</i> con ID 1 con la solución de Zinc cuya concentración es de 1000 μmolL^{-1} y la siguiente columna es el tiempo en segundo. Fuente: Elaboración propia.	27
4.1. Lipoperoxidación ($EqCHP/g$), tasa de mortalidad (%), rapidez (mms^{-1}) de la <i>Artemia Salina</i> de ion metal. $[Cd^{2+}] = 0-380$ μmolL^{-1} . Fuente: Nelson S. et al. [4]n	32
4.2. Lipoperoxidación ($EqCHP/g$), tasa de mortalidad (%), rapidez (mms^{-1}) de la <i>Artemia Salina</i> de ion metal. $[Hg^{2+}] = 0-20$ μmolL^{-1} . Fuente: Nelson S. et al. [4]	32
4.3. Lipoperoxidación ($EqCHP/g$), tasa de mortalidad (%), rapidez (mms^{-1}) de la <i>Artemia Salina</i> de ion metal. $[Zn^{2+}] = 0-3000$ μmolL^{-1} . Fuente: Nelson S. et al. [4]	33
4.4. Rapidez - procesamiento de imágenes (mms^{-1}), tasa de mortalidad (%), rapidez - Transfer Learning (mms^{-1}) de la <i>Artemia Salina</i> de ion metal. $[Hg^{2+}] = 0 - 20 \mu\text{molL}^{-1}$. Fuente: Elaboración propia.	34
4.5. Rapidez - procesamiento de imágenes (mms^{-1}), tasa de mortalidad (%), rapidez - Transfer Learning (mms^{-1}) de la <i>Artemia Salina</i> de ion metal. $[Cd^{2+}] = 0 - 380 \mu\text{molL}^{-1}$. Fuente: Elaboración propia.	35

4.6. Rapidez - procesamiento de imágenes ($mm s^{-1}$), tasa de mortalidad (%), rapidez - Transfer Learning ($mm s^{-1}$) de la <i>Artemia Salina</i> de ion metal. $[Zn^{2+}] = 0 - 3000 \mu mol L^{-1}$. Fuente: Elaboración propia.	35
---	----

Índice de Tablas

3.1. Especificaciones del sistema portátil. Fuente: Elaboración propia.	14
3.2. Especificaciones del sistema portátil. Fuente: Elaboración propia.	16

Índice de Acrónimos

CNN	Red Convolution Neural Network
VGG	Visual Geometric Group
CPU	Central Processing Unit
GPU	Graphic Processing Unit
SO	Sistema Operativo
LPO	Lipoperoxidación
DNN	Deep Neural Network
ILSVRC	ImageNet Large Scale Visual Recognition Competition
API	Application Programming Interface
LRN	Layer Response Normalization
LC50	Lethal Concentration 50

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por la paciencia y la confianza depositada en mí en la elaboración de este trabajo de investigación.

A mi asesor por la guía, el apoyo, paciencia y enseñanza que me ha estado brindado a lo largo de este trabajo de investigación.

Al grupo BIOMET en especial al Dr. Héctor Aguilar Vitorino y Dra. Roxana Yesenia Pastrana Alta, quienes me brindaron la información y ayuda necesaria para el desarrollo de esta investigación.

A mi colega Alexander Gonzalo Guillén Vásquez del grupo BIOMET, quien me brindó los planos del nuevo equipo portátil y su amistad desde el inicio del trabajo de esta investigación.

A mi colega Giuliana Ñañez del grupo BIOMET, quien me brindó las soluciones de los metales pesados junto con las eclosiones de la *Artemias Salinas*.

Capítulo 1

Introducción

Es este capítulo se presenta en dar una visión general de cómo mejorar la problemática sobre la toxicidad en aguas contaminadas mediante la conducta locomotora de las *Artemias Salinas* que puede utilizarse como un indicador de estrés en estudios ecotoxicológicos utilizando técnicas de Deep Learning de una manera óptima y eficiente. Así mismo, nos abre el panorama de cómo Deep Learning puede solucionar el problema de identificar a los microcrustáceos utilizando la técnica de Transfer Learning para el procesamiento de imágenes.

1.1. Motivación

La necesidad de aplicar ensayos biológicos en el monitoreo ambiental está ampliamente aceptada. La combinación de ensayos biológicos y químicos es un enfoque eficaz para obtener una imagen más realista de los impactos de los contaminantes en el medio ambiente. Se han centrado un volumen considerable de trabajo en criterios de valoración ecotoxicológicos que proporcionan índices fiables de los efectos de los compuestos tóxicos. Las respuestas conductuales (locomoción, etc) pueden generar indicadores de estrés más sensibles que los puntos finales convencionales, como la supervivencia, el crecimiento y la reproducción [5]. La alteración del comportamiento es una respuesta integrada de todo el organismo que puede vincular la fisiología y la ecología de un organismo con su entorno [6]. La movilidad es un determinante fundamental del comportamiento para la mayoría de los organismos acuáticos que pueden verse directamente afectados por el estado fisiológico. Por tanto, los cambios en la conducta locomotora pueden utilizarse como un indicador de estrés en estudios ecotoxicológicos [7]. En este proyecto se desarrolla un nuevo bioensayo de toxicidad del comportamiento mediante la prueba

de alteración de velocidad de nado de la *Artemia Salina*. La prueba se realiza utilizando un sistema de grabación del comportamiento su rapidez, un sistema basado en un sistema portátil junto con un algoritmo diseñado específicamente para rastrear y analizar la velocidad lineal de invertebrados acuáticos.

Las redes neuronales convolucionales (CNN) del Deep Learning han aportado numerosas tecnologías, entre ellas está la detección de objetos con el análisis de vídeo y la compresión de imágenes. Los métodos tradicionales de detección de objetos se basan en extraer un conjunto de características hechas a mano y arquitecturas poco profundas que se pueden entrenar. Su propósito se basa en construir conjuntos complejos que combinan múltiples características de imagen de bajo nivel con contexto de alto nivel de detectores de objetos y clasificadores de escena [8]. Las metodologías tradicionales del Machine Learning es que los datos de entrenamiento, datos de prueba y los datos de validación se toman del mismo dominio, de modo que el espacio de características de entrada y las características de distribución de datos son las mismas. Sin embargo, hay acontecimiento en los que los datos de formación son costosos o difíciles de recopilar (e.g Imágenes), por lo tanto, surgió la necesidad de crear aprendizaje de alto rendimiento capacitados con datos obtenidos más fácilmente de diferentes dominios [9]. Esta metodología se el conoce como *Transfer Learning*. Transfer Learning se ha aplicado a muchas aplicaciones del mundo real. Algunas aplicaciones bien representadas incluyen la clasificación de imágenes y la clasificación de conceptos de vídeo. Se ha convertido en una práctica estándar utilizar modelo previamente entrenados. Estos se pueden utilizar para extraer características generales útiles de imágenes digitales y también se pueden ajustar y adaptar a las características específicas para el nuevo dominio. Para la clasificación de imágenes existen grandes aportaciones como son los modelos VGG16, AlexNet, LeNet-5, ResNet50, entre otros, que son capaces de clasificar hasta 100 clases de objetos de imágenes y entrenadas con la base de imágenes ImageNet. Para este trabajo de investigación utilizamos el modelo VGG16 mediante el método de Transfer Learning para realizar el procesamiento de imágenes, que nos permite realizar los píxeles de las *Artemias Salinas* en cada imagen de vídeo. Con este procedimiento detectamos y determinamos la rapidez de cada *Artemia Salina* en distintas concentraciones de diferentes metales pesados que sirven como parámetro de evaluación para estudios ecotoxicológicos.

1.2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo del seminario de tesis es:

- Implementar un algoritmo de detección de objeto utilizando una red neuronal convolucional mediante el Transfer Learning para el procesamiento de imágenes; y evaluar la rapidez de los microcrustáceos en diversas concentraciones con soluciones acuosas de metales pesados.

Los objetivos específicos del seminario de tesis son:

- Diseñar e imprimir un sistema portátil para la adquisición de vídeos.
- Elegir qué filtros del modelo VGG16 determinan visualmente a las *Artemias Salinas* en las imágenes.
- Calcular la rapidez media en distintas concentraciones de los metales pesados.
- Comparar y analizar los resultados del movimiento de las *Artemias Salinas* en los metales pesados.

Y los objetivos con respecto a las competencias académicas desplegadas en el trabajo son:

- Representación y búsqueda avanzada del conocimiento y razonamiento, evaluar las posibilidades de simulación de la inteligencia para lo cual se estudió las técnicas de modelización del conocimiento.
- Construir una noción de inteligencia que soporte después tareas de su simulación.

1.3. Estructura del Seminario

Para brindar al lector una idea global del contenido de este trabajo, a continuación se hace una breve descripción del propósito de cada capítulo presente en este seminario de tesis.

■ Introducción:

Es este capítulo se presenta en dar una visión general de cómo mejorar la problemática sobre la toxicidad en aguas contaminadas mediante la conducta

locomotora de las *Artemias Salinas* que puede utilizarse como un indicador de estrés en estudios ecotoxicológicos utilizando técnicas de Deep Learning de una manera óptima y eficiente. Así mismo, nos abre el panorama de cómo Deep Learning puede solucionar el problema de identificar a los microcrustáceos utilizando la técnica de Transfer Learning para el procesamiento de imágenes.

■ **Estado del Arte:**

En este capítulo se muestra la teoría relacionada a las redes neuronales convolucionales, procesamiento de imágenes y el mapeo de imagen a mundo real. Además, trabajos relacionados que se han desarrollado en el área las redes neuronales convolucionales.

■ **Metodología y Herramientas:**

En este capítulo se centra en la descripción de la estructura y diseño, y herramientas que se utilizó para la adquisición de vídeo e implementación del algoritmo, que tiene como finalidad determinar el promedio de las rapidez de la *Artemia Salina* en soluciones acuosas de metales pesados.

■ **Resultados y Discusiones:**

Se muestra los resultados del primer y segundo caso, donde se evaluó las rapidez de las soluciones con metales Zn, Cd y Hg del grupo IIB, en diversas concentraciones. Además, se evaluó la tasa de mortalidad y la lipoperoxidación, para determinar la correlación con el nuevo parámetro hallado.

■ **Conclusiones y Trabajo a Futuro:**

En este capítulo se detallan las conclusiones de los resultados obtenidos de manera experimental y pruebas del algoritmo propuesto. Además, se describen las modificaciones y desarrollos que podrían en un futuro mejorar el algoritmo propuesto por algún investigador que este interesado en seguir la línea de toxicología.

Capítulo 2

Estado del Arte

En este capítulo se muestra la búsqueda bibliográfica relacionada con el uso de los bioindicadores, la química computacional, las redes neuronales convolucionales, procesamiento de imágenes y el mapeo de imagen para obtener los valores reales al utilizar un método de conversión de unidades digitales.

2.1. Bioindicadores acuáticos

La investigación con *Artemia Salina*, *Daphnia Magna* tiene un amplio espectro que va desde la evaluación de compuestos tóxicos o esenciales en los quistes [10, 11] hasta la exposición tóxica aguda a diferentes productos químicos, la detección de tóxicos en productos comestibles y farmacéuticos, estudios de modelos de acción tóxica de sustancias y de transferencia tóxica de contaminantes. La toxicidad de estos metales es fácilmente absorbida por los seres vivos, la posibilidad de ocasionar lipoperoxidación (LPO) a través de estrés oxidativo y retención por los diferentes órganos (riñón, hígado, pulmón y otros) genera desequilibrios en reproducción, morfología y ciclo de vida. Por ello, se utiliza a la *Artemia Salina* como modelo de bioindicador para evaluar la toxicidad. Por otro lado, los sistemas portátiles cada vez están dejando de lado las metodologías demoradas y costosas, de la misma forma los equipos están pasando a tener aplicaciones a través de celulares o software portátiles que faciliten a tiempo real los resultados.

2.2. Deep Learning en química computacional

En química se siguen usando métodos tradicionales que pueden ser transformados en un mecanismo automatizado utilizando aprendizaje automático basado en redes

neuronales multicapa para ayudar al investigador en las pruebas que realiza y obtener los mismos o mejores resultados. Según los resultados de varios estudios recientes, se ha observado una amplia aplicación del aprendizaje profundo en muchos subcampos de química computacional, incluido el diseño de fármacos asistido por computadora, la biología estructural computacional, la química cuántica y el diseño de materiales [12]. Se ha demostrado el rendimiento del modelo basado en Deep Neural Network (DNN) es con frecuencia superior a los algoritmos tradicionales de aprendizaje automático.

2.3. Temas Relacionados con el procesamiento de imágenes

A efectos de este estudio, el enfoque teórico-científico se dirige hacia las técnicas utilizadas de binarización (segmentación) y morfología matemática.

2.3.1. El método *otsu* en la segmentación de la imagen digital

Otsu es un método que sirve para segmentar y asilar partes de la imagen, separando el fondo de los elementos que se muestran en primer plano. A través de un procedimiento estadístico y el empleo de histogramas bimodales divide en tramos según el valor del nivel digital de los píxeles por medio del cálculo de los valores mínimos y máximos del umbral, de forma automática, sin requerir otra información que no sea la imagen binarizada [13]. Esto supone, el pre-procesamiento de la imagen a color ya binarizada y convertida a escala de grises para, desagregar el fondo dejándolo en color blanco y el objeto de interés en color negro. Esta técnica exige que la imagen sea de fondo uniforme, no difuso sin muchas sombras, sin variaciones de luminosidad que impidan la distinción entre imagen y fondo.

2.3.2. Operaciones morfológicas para el análisis de la imagen digital

Durante el pre-procesamiento, la segmentación o la extracción de características puede ocurrir el análisis de la imagen binaria, con niveles de grises o a color. Se efectúa basándose en las propiedades de la forma, o sea, su morfología las simplifica y preserva su forma [14]. Se distinguen dos operaciones básicas: erosión y dilatación; de ellas proceden la apertura y el cierre. Todas ellas se utilizan, según sea el caso, para reducir, aumentar, eliminar, rellenar elementos que no forman parte del fondo de la imagen. Su salida es una imagen binaria.

Dilatación

La dilatación trata del crecimiento progresivo de los elementos de la imagen que significa, muchas veces, pérdida en los detalles de la forma. Además, rellena los espacios que existen entre dos elementos llegando, en ocasiones, a fusionar objetos diferentes que están cercanos [14]. Este algoritmo une los valores agregando píxeles blancos en los bordes, un ejemplo se observa en la Figura 2.1. La imagen de en negro se engrosa, aumenta por los bordes; en el recorrido píxel a píxel busca el píxel blanco y al encontrarlo realiza la unión con el color blanco.

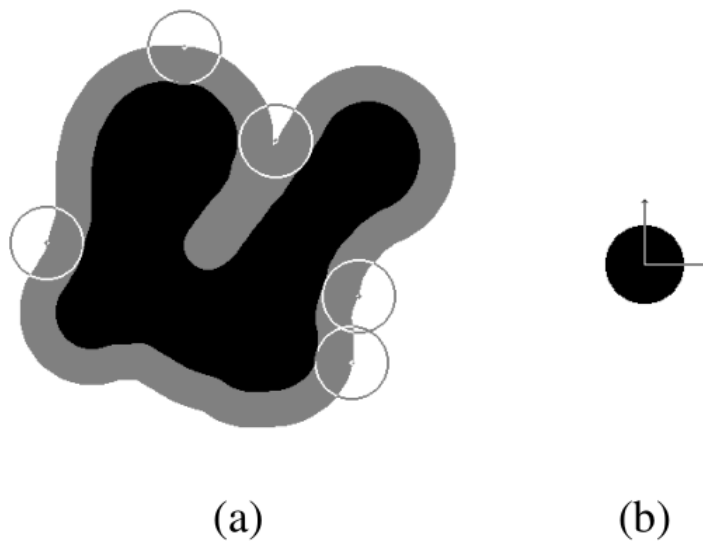


FIGURA 2.1: Dilatación como expansión: (a) Imagen de entrada en negro, dilatación en gris, (b) elemento estructural. Fuente: Edward, Roberto [1].

Erosión

La erosión se utiliza para eliminar el ruido digital, es decir, las variaciones indeseadas de brillo o color; también, para quitar los elementos más diminutos dejando solo los de mayor volumen y para separar objetos al deshacer los píxeles que los relacionan. Al ejecutar este algoritmo se eliminan píxeles blancos de los bordes y se difuminan, ver la Figura 2.2.

Apertura y Cierre

El fin de las transformaciones de apertura y cierre es mantener el tamaño del objeto. En primer lugar, la apertura consiste en erosionar y, luego dilatar la imagen;

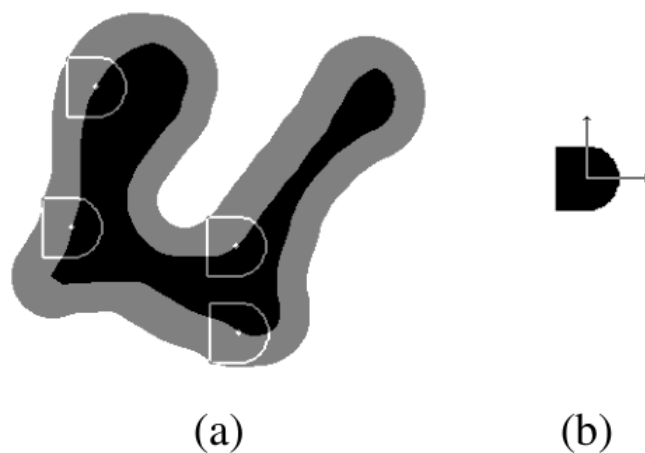


FIGURA 2.2: Erosión como disminución: (a) Imagen de entrada en gris y erosión en negro, (b) Elemento estructurante. Fuente: Edward, Roberto [1].

al erosionar desaparece el ruido, disminuye la imagen; al dilatar la imagen aumenta y los detalles que no fueron quitados al ser erosionados se resaltan [14]. Este algoritmo tiene como entrada una imagen original que resulta en una imagen dilatada mediante el elemento estructurante y, finalmente, en una imagen binaria suavizada en sus contornos eliminando los píxeles aislados, ver Figura 2.3. Si al hacer el recorrido se encuentra un hueco en la parte interna del objeto de tamaño de un píxel lo abre, caso contrario lo cierra.

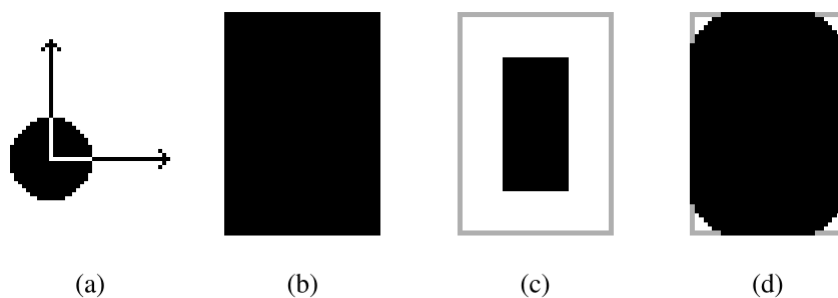


FIGURA 2.3: (a) Elemento estructurante, (b) Imagen de entrada, (c) Erosión, (d) Apertura. Fuente: Edward, Roberto [1].

Por otro lado, el cierre reside en dilatar y después, erosionar la imagen. Como se explicó, al dilatar la imagen crece y al erosionar vuelve a un tamaño similar al original. Con este algoritmo se rellenan las hendiduras, ver Figura 2.4, se eliminan detalles oscuros, también quitan las rugosidades huecas de los bordes.

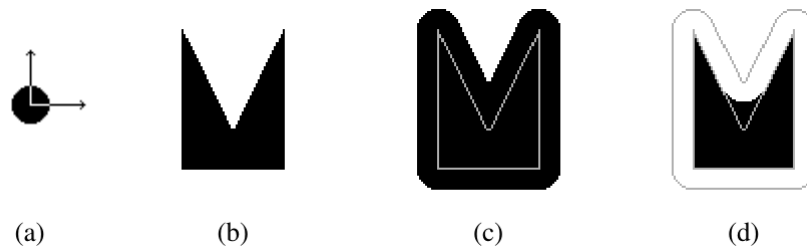


FIGURA 2.4: (a) Elemento estructurante, (b) Imagen de entrada, (c) Dilatación, (d) Cierre. Fuente: Edward, Roberto [1].

2.3.3. Transfer Learning

Es una técnica del Deep Learning mediante la cual un modelo de red neuronal se entrena primero en un problema similar al problema que se esté resolviendo. Luego, una o más capas del modelo entrenado se utilizan en un nuevo modelo entrenado en el problema de interés [15]. Esto se entiende típicamente en un contexto de aprendizaje supervisado, donde la entrada es la misma pero el objetivo puede ser de una naturaleza diferente. Por ejemplo, se puede aprender sobre un conjunto de categorías visuales, como gatos y perros, en el primer entorno, y luego aprender sobre un conjunto diferente de categorías visuales como hormigas y avispas, en el segundo entorno, como se observa en la Figura 2.5.

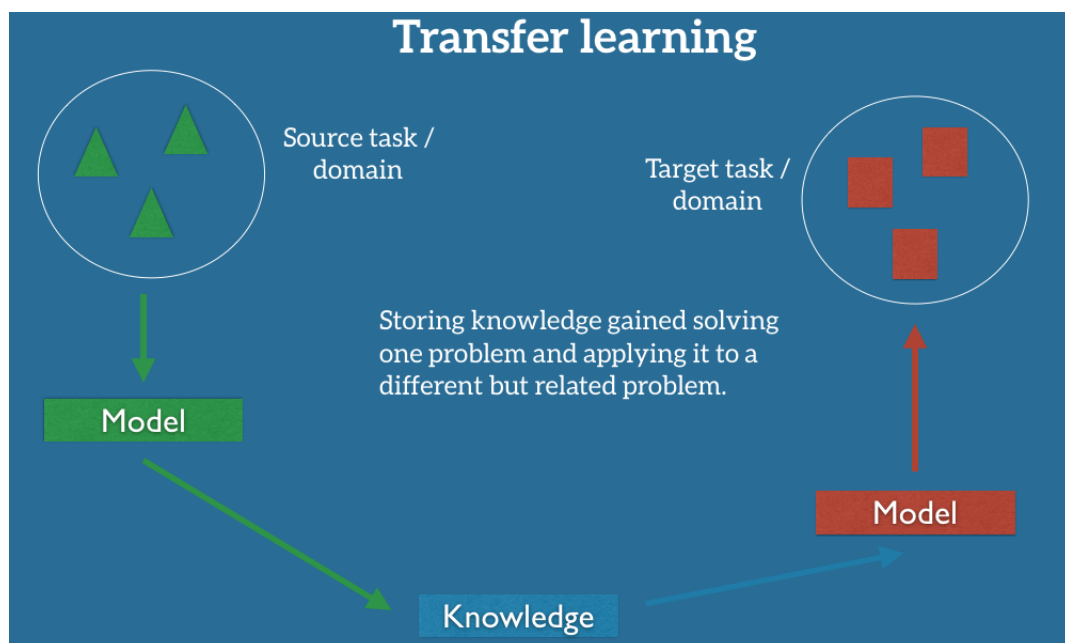


FIGURA 2.5: La configuración de Transfer Learning. Fuente: <https://ruder.io/transfer-learning/>

La finalidad es aprovechar los datos del primer entrenamiento para extraer información útil al aprender. Además, tiene el beneficio de disminuir el tiempo de entrenamiento para un modelo de red neuronal y pueda resultar en un menor error de generalización.

Capítulo 3

Metodología y Herramientas

En este capítulo se detalla la metodología química sobre las *Artemias Salinas*, como también el equipo óptico diseñado en 3D para la adquisición de imágenes y la implementación del algoritmo.

3.1. Metodología química

La evaluación con metales pesados como Zn, Cd y Hg, fueron escogidos debido a que poseen propiedades similares, ya que comparten un mismo grupo en el tabla periódica (grupo 12), al mismo tiempo; el Zn es un metal esencial en sistemas biológicos; el Cd es un metal esencial conocido por su gran capacidad de bioacumulación; y el Hg, debido a su gran toxicidad y letalidad en la mayoría de sistemas vivos.

3.1.1. Condiciones óptimas de eclosión

Se utilizaron quistes de *Artemia Salina*. Estos quistes tienen que eclosionar bajo condiciones controladas de temperatura, salinidad, aireación, luz, y pH que se describe a continuación [16]. Para la eclosión se instaló un acuario (2L) de vidrio de temperatura a 29 - 30°C (calentador para acuario, Vigo Aire, 2.5W), iluminación normal (lámpara fluorescente de 12V, 13W, 673 lúmenes), bomba de aire (ACO-551). La preparación del agua fue con una salinidad 2.5 % y pH 8.3. Finalmente, se añadió aproximadamente 0.2g de quistes de *Artemia* al sistema estabilizado y se dejó por 48 horas hasta conseguir la total eclosión. El procedimiento fue realizado según la literatura [17] con pequeñas modificaciones, teniendo en cuenta las diferencias en temperatura y tiempo de eclosión de los animales (29 - 30°C, 24h), para obtener una eclosión homogénea posible, así como la estabilidad de los crustáceos en estudio.

3.1.2. Toxicidad letal

La toxicidad en los bioindicadores es ensayada con la finalidad de determinar los valores del 50 % de la concentración letal [18]. Para esto los bioindicadores (*Artemia Salina*) son expuestos a los contaminantes (Zn, Cd, Hg). Se realizó gráficos (Mortalidad vs Concentración del metal) ajustados mediante cálculos matemáticos utilizando el software Origin 2019, para finalmente determinar los valores exactos de CL_{50} . Este valor sirvió para establecer un parámetro de toxicidad letal que es comparado con los valores de toxicidad subletal (movimiento o velocidad de nado del bioindicador).

3.1.3. Determinación de los índices de lipoperoxidación

La degradación inducida por los metales en los tejidos de los bioindicadores son evaluadas, a través de biomarcadores de detección de peroxidación lípidica, mediante el método de FOX (naranja de xilenol), este es un colorante sensible a las oxidaciones de hierro, específico por presentar un color naranja. [19] Este método consiste en la oxidación del Fe^{2+} por los lípidos oxidados del tejido, para Fe^{3+} en medio ácido . El producto final forma un complejo colorido que es detectado en el espectro visible (580nm). Estos valores son comparados con la capacidad de oxidación por un oxidante estable Cumeno hidroperóxido (CumOOH) usado ampliamente en protocolos bien descritos.

3.2. Metodología computacional

Se explica el desarrollo de la implementación de un sistema portátil basado en procesamiento de imágenes el cual es catalogado como caso 1 y para el caso 2 se mejora el desarrollo utilizando el método de Deep Learning llamado Transfer Learning.

3.2.1. Caso 1: Implementación de un sistema portátil basado en procesamiento de imágenes

Este sistema tiene el propósito de medir la rapidez de las *Artemias Salinas* mediante un prototipo óptico para la visualización de estos microcrustáceos utilizando procesamiento de imágenes. Se compone de un hardware con sistema operativo Raspbian, que está conectado a una cámara infrarroja con un campo visual de 130 grados a una distancia de 3cm con respecto a la posición de la cubeta UV. Esta

contienen 4 *Artemias Salinas*, las cuales se desplazan al interior de la cubeta y dichos movimientos son registrados en formato vídeo (.mp4) por 2 minutos y almacenadas en una micro SD del hardware. Se utilizó un led infrarrojo que está localizado en la parte superior de la cubeta UV, se utilizó para iluminar la parte interna de la cubeta y, así mismo, detectar a las *Artemias Salinas* en la oscuridad. En la Figura 3.1, se observa la disposición del sistema portátil.

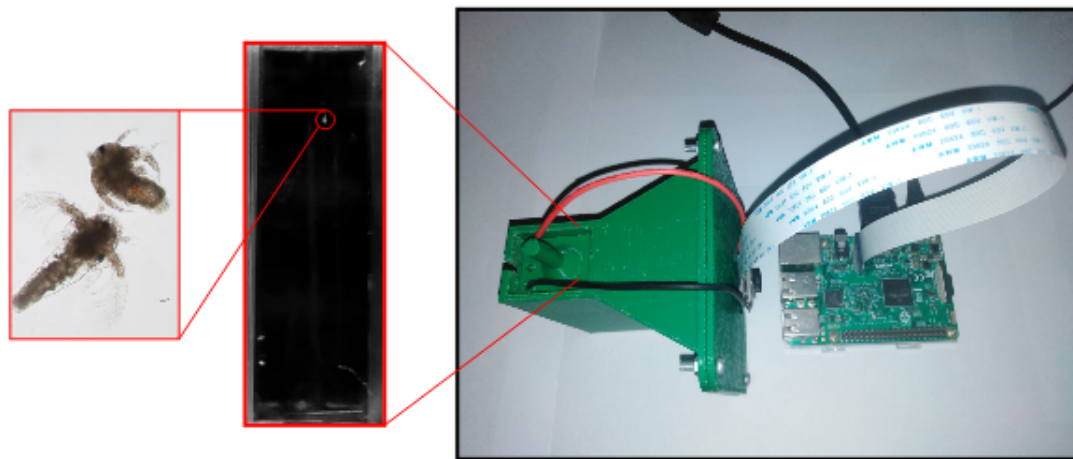


FIGURA 3.1: Sistema portátil ensamblado. Fuente: Nelson S. et al. [2]

En este primer sistema propuesto se utilizó los parámetros que delimitan la cubeta UV. Una vez determinado la región de interés se aplicó subtracción de fondo mediante la binarización de las imágenes; donde se calculó una nueva imagen que se halló mediante el promedio de todas las imágenes. Con esta nueva imagen se realizó la resta con todas las imágenes, logrando obtener las *Artemias Salinas* con ruido, este ruido era ocasionado por pequeños píxeles de mayor intensidad que se localizaban en los bordes de la cubeta y eran producidos por la sensibilidad de la cámara. Por otro lado, se implementó otro algoritmo para el seguimiento de las *Artemias Salinas*, donde se utilizó componentes conexas para asignar a las *Artemia Salina* un valor de identidad (ID) en cada imagen mediante sus centroides. Así mismo, se hallaron la rapidez utilizando la distancia euclidiana de dos imágenes consecutivas cada 25 frames que corresponde a un segundo. Estas rapideces son almacenados en un archivo Excel para su posterior análisis estadísticos. En la Tabla 3.1, se observa las características que se utilizaron para el sistema portátil.

TABLA 3.1: Especificaciones del sistema portátil. Fuente: Elaboración propia.

Especificaciones del equipo	
Dispositivo	Características
Hardware	Raspberry Pi modelo B+
Cámara IR	Fisheye gran angular 5 MP 1080P visión nocturna
Disipador de calor	ES-H15B-RPI Easycargo - Verde Aluminio Disipador de calor 14x14x8mm
Led infrarojo	LED 3W IR 850nm
Lente	Wide
Prototipo óptico	Impreso en 3D

3.2.2. Caso 2: Solución para el sistema portátil basado en Transfer Learning

Equipo Óptico

El aparato electrónico llamado Measure the speed of Microcrustaceans (MESP), es un equipo ergonómico que permite a los investigadores automatizar una amplia gama de pruebas sobre el comportamiento de las Artemias Salinas. Está diseñado para rastrear y registrar la rapidez promedio de las mismas. Para este análisis, cuenta con un software que ofrece al investigador condiciones experimentales controladas para obtener resultados confiables. En la Figura 3.2, se observa la disposición del equipo MESP.



FIGURA 3.2: Equipo MESP. Fuente: Elaboración propia.

Parte mecánica del equipo MESP

Se brinda el diseño como se muestra en la Figura 3.3 y las funciones de cada parte del equipo óptico en la Tabla 3.2.

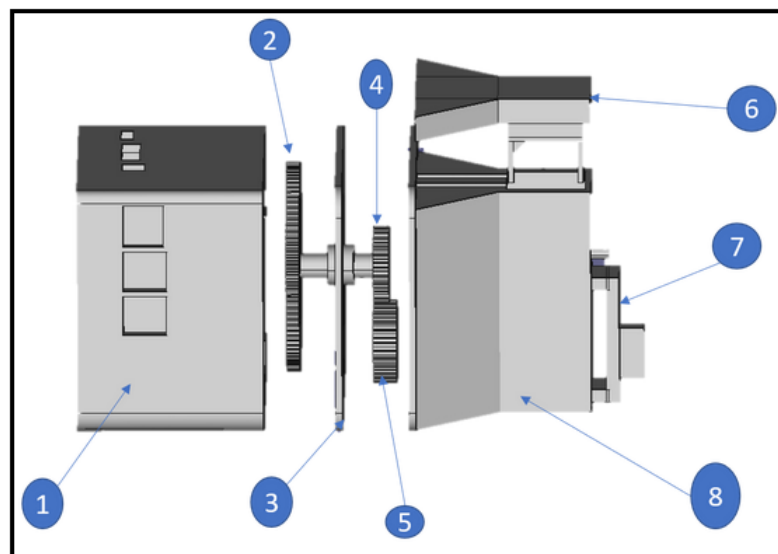


FIGURA 3.3: Equipo óptico. Fuente: Elaboración propia.

TABLA 3.2: Especificaciones del sistema portátil. Fuente: Elaboración propia.

Nº	Nombre	Descripción
1	Soporte de Raspberry PI	Almacenar el hardware
2	Engranaje con 81mm de diámetro	Permitir calibrar el enfoque de la cámara
3	Soporte para la cámara y eje de engranaje	Permitir soportar la cámara y el eje del engranaje que realiza el enfoque
4	Engranaje con 30mm de diámetro acoplado a un eje	Transmitir el movimiento de la cámara mediante el engranaje de diámetro de 81 mm
5	Engranaje con 30mm de diámetro	Soportar la cámara y la lente para realizar el enfoque
6	Soporte para el Led infrarrojo	Soportar el led infrarrojo
7	Soporte para la cubeta UV	Sostener la cubeta UV ingresada
8	Escenario de visualización oscura	Visualizar a las <i>Artemias Salinas</i>

La implementación de este nuevo sistema es porque en la primera versión se tuvo como problemas:

- La regulación del enfoque de la cámara.
- La distancia de la cámara con respecto a la cubeta UV.
- La vulnerabilidad de los componentes electrónicos y la estructura del equipo frente a cualquier sustancia del laboratorio.

- La inestabilidad de la cubeta UV al insertar al equipo.

Debido a todas estas observaciones se optó por usar un material más resistente y compacto. Por ello, se usó PLA y con la ayuda del software FreeCad v.018 se realizó el diseño del equipo mejorado. Por consiguiente, se realizó la impresión 3D con el software Cura v.4.7.

Con las mejoras se cuenta con un equipo que es capaz de registrar en vídeo el desplazamiento de las *Artmeias Salinas* al interior de la cubeta sin comprometer ningún componente del equipo a cualquier factor externo del laboratorio, brindándole una ergonomía y permitiendo que su uso sea fácil, portable y muy práctico.

3.2.3. Dataset

ImageNet es un conjunto de datos de más de 15 millones de imágenes etiquetadas de alta resolución que pertenecen a aproximadamente 22.000 categorías. Las imágenes fueron recopiladas de la web y etiquetadas por personas que utilizan la herramienta de búsqueda colectiva Mechanical Turk de Amazon. A partir de 2010, como parte del Pascal Visual Object Challenge, se llevó a cabo una competencia anual llamada ImageNet Large-Scale Visual Recognition Challenge (ILSVRC). ILSVRC utiliza un subconjunto de ImageNet con aproximadamente 1000 imágenes en cada una de las 1000 categorías. En total, hay aproximadamente 1,2 millones de imágenes de formación, 50.000 imágenes de validación y 150.000 imágenes de prueba. ImageNet consta de imágenes de resolución variable. Por lo tanto, las imágenes se han reducido a una resolución fija de 256×256 . Dada una imagen rectangular, la imagen se redimensiona y se recorta el parche central de 256×256 de la imagen resultante.

3.2.4. Red Neuronal Convolutacional

VGG es un modelo de una red neuronal convolutacional propuesto por K. Simonyan and A. Zisserman de la Universidad de Oxford en el artículo "*Very Deep Convolution Networks for Large-Scale Image Recognition*". VGG16 es una red con 16 capas con parámetros entrenables. Esta arquitectura fue la primera finalista presentado a ILSVRC-2014. El modelo alcanza una precisión de prueba del 92.5 % de un conjunto de datos de más de 14 millones de imágenes que pertenecen a 1000 clases. VGG16 se entrenó durante semanas y estaba usando NVIDIA Titan Black GPU [20], se observa en la Figura 3.4 su arquitectura.

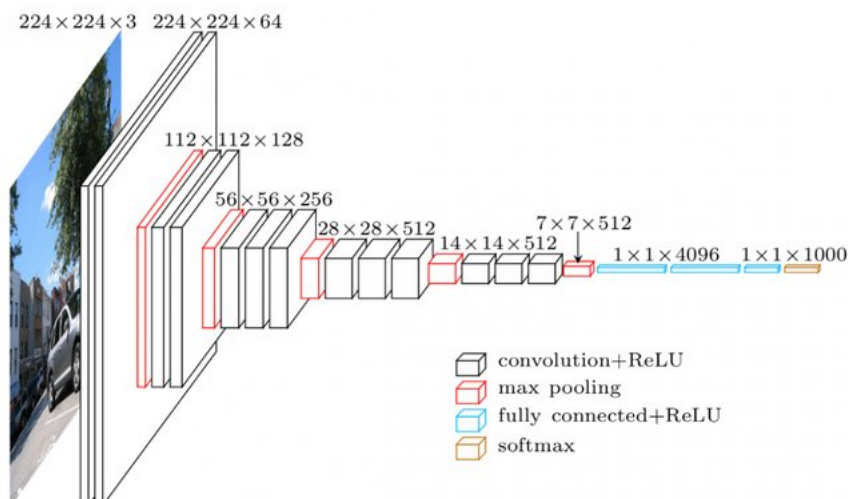


FIGURA 3.4: La arquitectura de VGG-16. Fuente: Abhijeet [3].

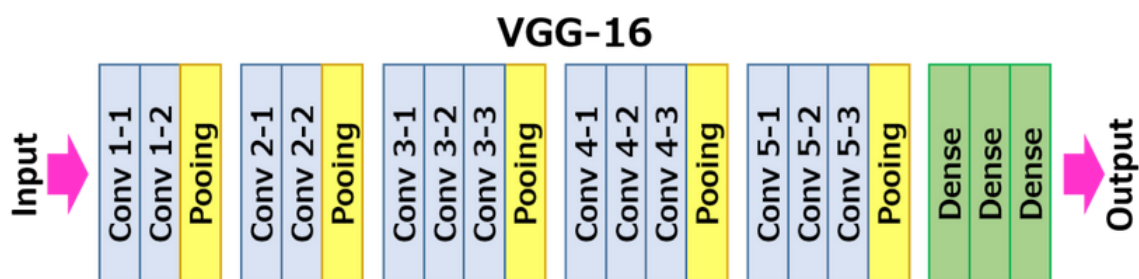


FIGURA 3.5: Modelo de la arquitectura VGG16. Fuente: Abhijeet [3].

En la Figura 3.5, la entrada a la capa *conv1* es de imagen RGB de tamaño fijo 224×224 . La imagen pasa a través de una pila de capas convolucionales (*conv.*), Donde los filtros se usaron con un campo receptivo muy pequeño: 3×3 . En una de las configuraciones, también utiliza filtros de convolución 1×1 , que se pueden ver como una transformación lineal de los canales de entrada. El *stride* de convolución se fija en 1 píxel; la entrada del *padding* de convolución es tal que la resolución espacial se conserva después de la convolución, es decir, el relleno es de 1 píxel para 3×3 *conv.* de capas. La agrupación espacial se lleva a cabo mediante cinco capas de agrupación máxima, que siguen algunas de las *conv.* de capas. La agrupación máxima se realiza en una ventana de 2×2 píxeles, con paso 2.

Tres capas completamente conectadas (FC) siguen una pila de capas convolucionales (que tiene una profundidad diferente en diferentes arquitecturas): las dos primeras tienen 4096 canales cada una, la tercera realiza una clasificación ILSVRC

de 1000 vías y, por lo tanto, contiene 1000 canales (uno para cada clase). La última capa es la capa con función de activación softmax. La configuración de las capas completamente conectadas es la misma en todas las redes.

Todas las capas ocultas están equipadas con la función de activación rectificación lineal (ReLU). También se observa que ninguna de las redes (excepto una) contiene Normalización de respuesta local (LRN), dicha normalización no mejora el rendimiento en el conjunto de datos ILSVRC, pero conduce a un mayor consumo de memoria y tiempo de cálculo.

3.3. Enfoque basado en Deep Learning

El nuevo sistema propuesto está orientado al cálculo y análisis sobre la rapidez de las *Artemias salinas* utilizando métodos de transfer learning del modelo VGG16. El primer proceso es la recolección de vídeos que fue desarrollado con el equipo óptico. Los vídeos fueron grabados con la solución de Cadmio, Mercurio y Zinc en diferentes concentraciones.

3.3.1. Conversión de formatos de vídeo

Los vídeos están en formato .h264 debido a que el hardware solamente soporta ese codec. Se puede trabajar, pero se usaría otros comandos para la obtención de las imágenes y almacenarlas en una carpeta, esto demanda tiempo y almacenamiento. Por ello, convertimos al formato .mp4, porque la librería *decord* trabaja con el formato .mp4 y tiene una función, la cual nos devuelve las imágenes en un vector sin tener que almacenar las imágenes en el disco.

3.3.2. Escala grises

Se realizó la transformación de RGB a escala de grises de las imágenes, ver Figura 3.6, debido a que no se aprecia el color de las *Artemias Salinas*; aparte que la sensibilidad de la cámara está en automático. Por lo tanto, se obtendrá en algunos fotogramas altas intensidades y esto ocasiona ruido en las imágenes al calcular la mediana para la sustracción de fondo.

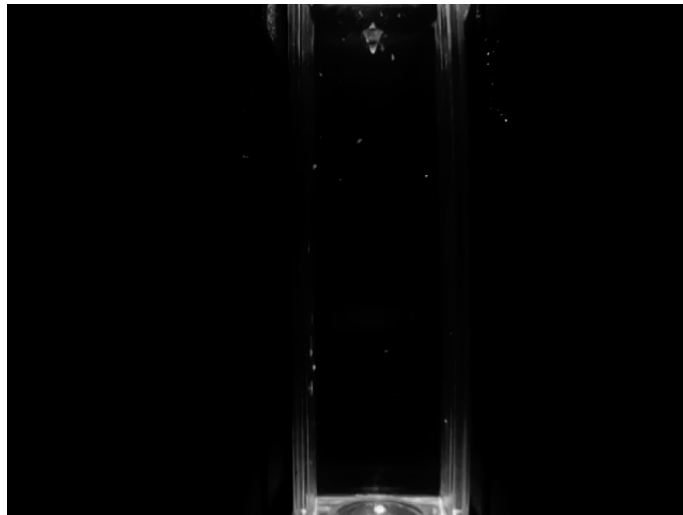


FIGURA 3.6: Una imagen en escala de grises. Fuente: Elaboración propia.

3.3.3. Región de interés

El objetivo es centrarnos solamente en la cubeta UV donde se localizan las *Artemias Salinas*. Por ende, se contabiliza los píxeles verticales (eje X) y horizontales (eje Y) de la imagen, como se observa en la Figura 3.7.

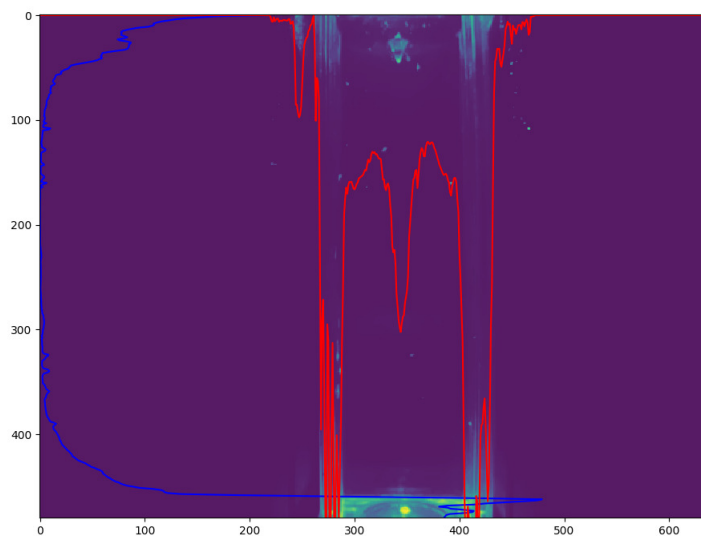


FIGURA 3.7: Se observa las curvas en el eje X e Y de una imagen. (i) El color rojo representa la suma de intensidad de las columnas; y (ii) El color azul representa la suma de intensidades de las filas. Fuente: Elaboración propia.

Una vez determinado la región de la cubeta UV, se procedió a recortar y almacenar las imágenes, como se observa en la Figura 3.8.



FIGURA 3.8: Una imagen recortada de la imagen original. Fuente: Elaboración propia.

3.3.4. Filtros del modelo VGG16

La arquitectura del modelo VGG16 tiene 5 niveles de los cuales se usó el primer nivel (este incorporará 2 convoluciones y un *pooling*; el número de filtros para este nivel es 64). Esto se realizó para conservar las dimensiones de las imágenes de la entrada. Además, se usó el modelo VGG16 de Keras, donde se efectuó algunos cambios en la configuración de su estructura.

Se trabajó con la base de datos *ImageNet* para el entrenamiento de la red convolucional y se modificó la dimensión de acuerdo a la imagen recortada. Se analizó los 64 filtros del nivel 1, como se observa en la Figura 3.9.

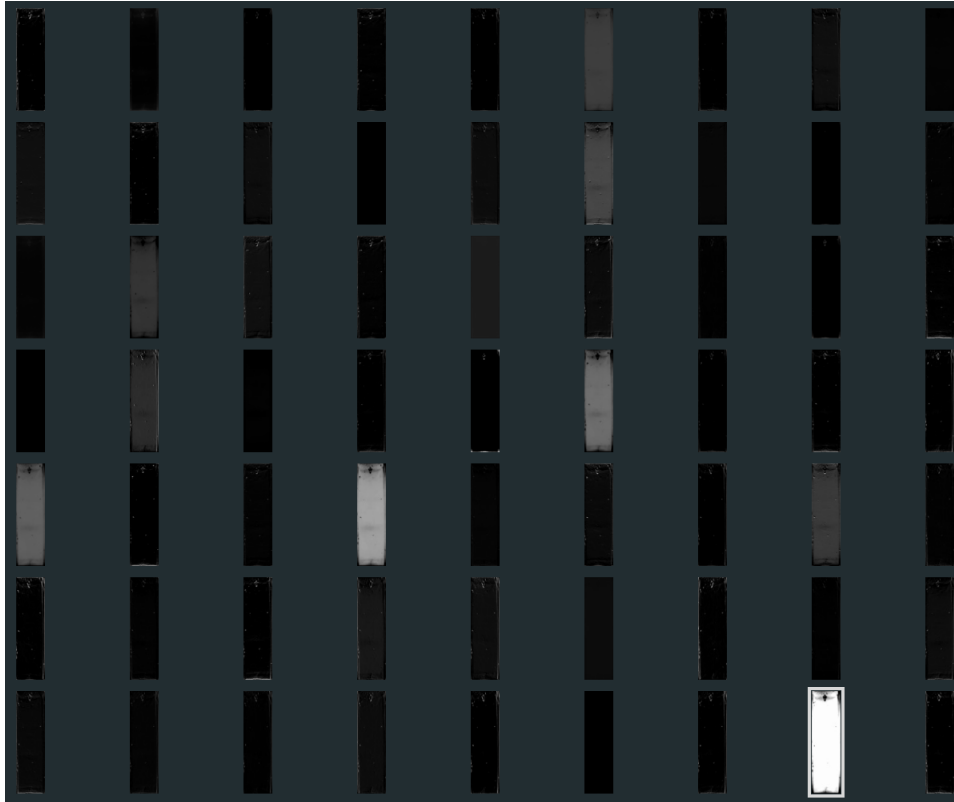


FIGURA 3.9: Se muestra las 64 salidas de la imagen recortada del modelo VGG16. Fuente: Elaboración propia.

Para elegir los filtros adecuados se procedió a analizar un vídeo, de las cuales se obtuvo 64 vídeos de los filtros. El análisis consistió en observar cada vídeo la segmentación que realiza la red neuronal convolucional en las *Artemias Salinas*. Los filtros que segmentaron correctamente fueron 19, 32, 36, 7, 43 y 54; estos filtros agregaban intensidad en las *Artemias Salinas*. Se beneficia cuando los microcrustáceos tienden a localizarse en la profundidad que es casi imposible de observar pero por la red neuronal es capaz de segmentarlos.

Para la primera convolución del nivel 1 del modelo VGG16, se reconfiguró su estructura para los filtros 19, 32 y 36; como se observa en la Figura 3.10.

Layer (type)	Output Shape	Param #
input_1 (InputLayer)	(None, 284, 171, 3)	0
block1_conv1 (Conv2D)	(None, 284, 171, 64)	1792
Total params: 1,792		
Trainable params: 1,792		
Non-trainable params: 0		

FIGURA 3.10: Entrenamiento hasta el primer bloque de la primera convolución. Fuente: Elaboración propia.

A continuación mostramos los resultados de las salidas de los filtros, como se observa en la Figura 3.11.

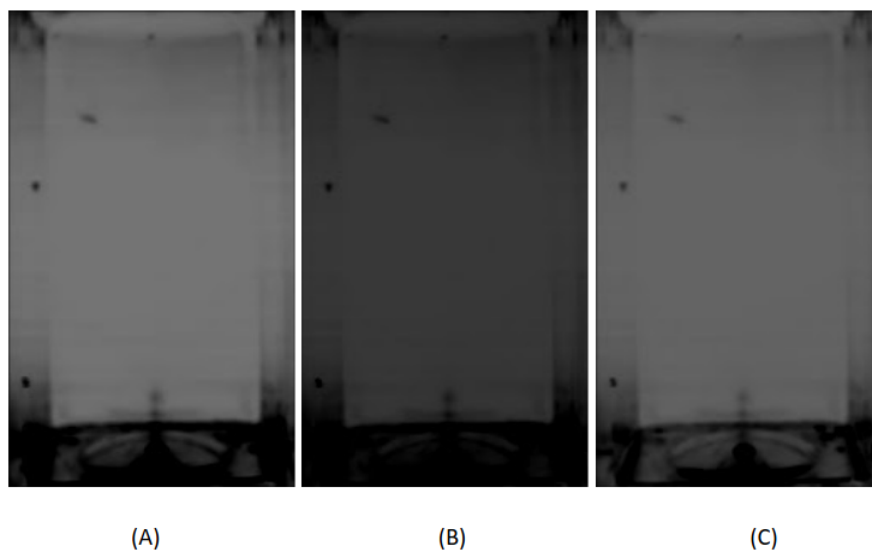


FIGURA 3.11: (A) Filtro 19, (B) Filtro 32, (C) Filtro 36. Fuente: Elaboración propia.

Para la segunda convolución del nivel 1 del modelo VGG16, se reconfiguró su estructura para los filtros 7, 43 y 54; como se observa en la Figura 3.12.

Layer (type)	Output Shape	Param #
input_1 (InputLayer)	(None, 364, 169, 3)	0
block1_conv1 (Conv2D)	(None, 364, 169, 64)	1792
block1_conv2 (Conv2D)	(None, 364, 169, 64)	36928
Total params: 38,720		
Trainable params: 38,720		
Non-trainable params: 0		

FIGURA 3.12: Entrenamiento hasta el segundo bloque de la primera convolución. Fuente: Elaboración propia.

A continuación mostramos los resultados de las salidas de los filtros, como se observa en la Figura 3.13.

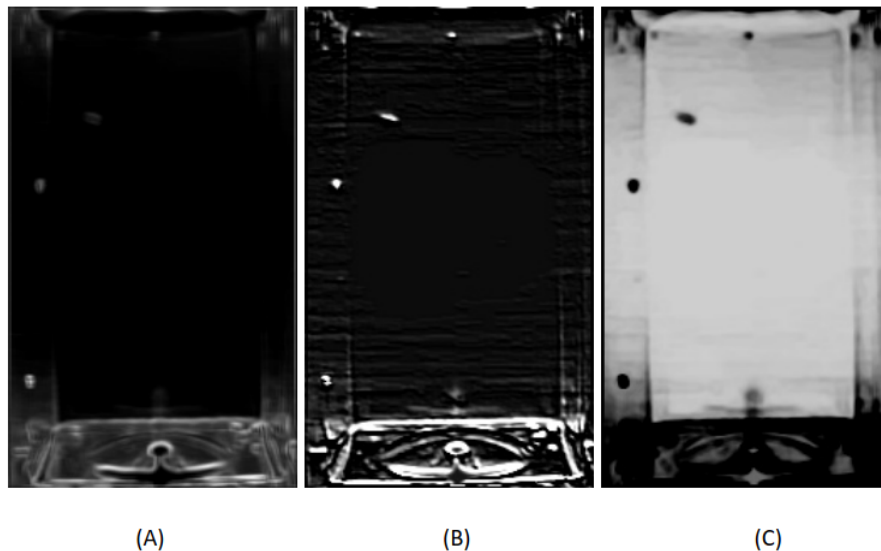


FIGURA 3.13: (A) Filtro 7, (B) Filtro 43, (C) Filtro 54. Fuente: Elaboración propia.

Con estos filtros se procesó a calcular la mediana de todas las imágenes del vídeo, obteniéndose una sola imagen de fondo para restarse con cada una de las imágenes.

3.3.5. Binarización y Morfología Matemática

Las imágenes resultantes son transformadas en imágenes binarias, es decir, el fondo tiene píxel 0 (negro) y las Artemias Salinas tienen píxel 1 (blanco). En cada imagen se tuvo ruido utilizando el método Otsu. Este ruido es ocasionado por la sensibilidad de la cámara. Son pequeños puntos blancos que no forman parte de las Artemias Salinas donde se aplicó morfología matemática en especial dos operadores de erosión y dilatación que disminuye e incrementan la estructura del objeto segmentado respectivamente, como se observa en la Figura 3.14.

Se observa que hay 3 Artemias en la cubeta UV. Con esta información, se utilizó los operadores morfológicos para eliminar el ruido.

3.3.6. Seguimiento del objeto

Se implementó un algoritmo de seguimiento que calcula el centroide para cada *Artemia Salina* en cada imagen. El vídeo consta de 2 minutos de grabación con un fps de 25, es decir, un segundo es cada 25 imágenes. Se asignó un conjunto de centroides

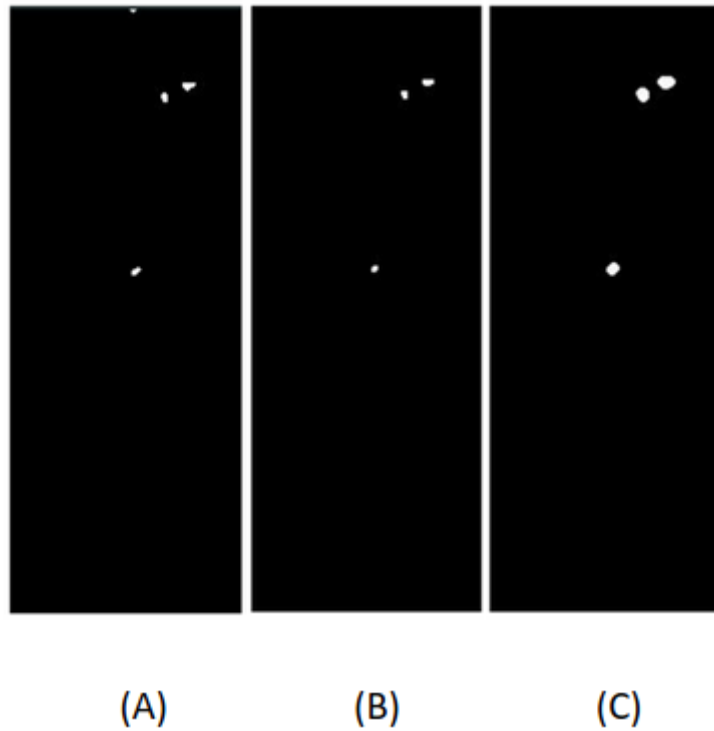


FIGURA 3.14: (A) Imagen luego de la sustracción de fondo (Imagen con ruido), (B) Operador de erosión, (C) Operador de dilatación. Fuente: Elaboración propia.

(x,y) para cada *Artemias Salina* detectado en cada imagen con su identificador único (ID). Estos centroides se calcularon utilizando componentes conexas. Este consiste en escanear la imagen y etiquetar a un grupo de píxeles en componentes basados en la conectividad de píxeles, es decir, todos los píxeles de un componente conectado comparten valores de intensidad de píxeles similares y de alguna manera están conectados entre sí, como se observa en la Figura 3.15.



FIGURA 3.15: Imagen binarizada utilizando componentes conexas.
Fuente: Elaboración propia.

Para la primera imagen es el primer fotograma del vídeo se halló los centroides iniciales, luego de 25 imágenes se calcula nuevamente el centroide y se realizó la diferencia entre las posiciones de cada *Artemia Salina* con su identificación única (ID). Para el siguiente cálculo de la distancia, la segunda imagen es el primer fotograma y se elige luego de 25 imágenes la siguiente imagen, y así sucesivamente se realiza la operación. Estas distancias calculadas son almacenadas en una lista para su post-procesamiento.

Para calcular el movimiento real capturada por la cámara, debemos saber la distancia (a) de la cámara con respecto a la cubeta UV y el ángulo diagonal, esto es 6cm y 130° respectivamente, por lo tanto:

$$b = \frac{a \sin(\theta)}{\sin(90 - \frac{\theta}{2})} \quad (3.1)$$

Para mapear la imagen se debe conocer las dimensiones de la imagen, es decir, el ancho (w) y alto (h) en píxeles.

$$x = \frac{b}{w}x' \quad (3.2)$$

$$y = \frac{b}{h}y' \quad (3.3)$$

Donde x' y y' son los desplazamientos almacenados por la diferencia de las posiciones. Con esta transformación se calculó la distancia euclidiana, lo cual lo denominamos *Desplazamiento* y el *Tiempo* es de 25 imágenes, ya que, equivale a un 1 segundo. Finalmente, se obtuvo el cálculo de la rapidez para cada *Artemia Salina* en milímetros.

$$Velocidad = \frac{Desplazamiento}{Tiempo} \quad (3.4)$$

Estos valores son almacenados en un archivo CSV para cada fotograma con su respectiva rapidez cada 25 fotogramas, como se observa en la Figura 3.16.

Zinc 1000 - 1	Tiempo
1.675	1
3.55	2
2.45	3
2.575	4
3.75	5
1.8	6
0.65	7
3.625	14
2.425	15
1.925	16
4.375	17
2.85	18
5.275	19
4.425	20
3.025	21
3.675	22
3.05	23
5.55	24
4.9	25
2.475	26
2.55	27
6.725	28
2.85	29
2.15	30
4.275	31
2.925	32
1.1	33
3.55	34
2.8	35
2.2	36

FIGURA 3.16: Data almacenada en un archivo CSV para una *Artemia* con ID 1 con la solución de Zinc cuya concentración es de $1000 \mu\text{molL}^{-1}$ y la siguiente columna es el tiempo en segundo. Fuente: Elaboración propia.

Se obtuvo 3 archivos de formato CSV para dicha solución de Zinc que contiene 4 Artemias Salinas, luego se calculó el promedio de la rapidez de cada Artemia Salina para evaluar el valor cuantitativo de las rapidez y determinar si la solución a tal concentración está generando estrés oxidativo en su organismo.

3.4. Tecnologías

Se detalla las herramientas y recursos utilizados para el desarrollo de este proyecto.

3.4.1. Python

Python es uno de los lenguajes de programación más populares en el contexto de procesamiento de imágenes y Deep Learning, debido a su fácil entendimiento. Además de contar con muchas librerías elaboradas por grandes comunidades y desarrolladores en todo el mundo que son para mejorar, resolver ciertos problemas o tareas específicas.

3.4.2. OpenCV

Es una librería que esta disponible en varios lenguajes de programación. Se utilizó la versión 4.1.1, debido a que es la más actualizada además de proporcionar una carpeta de ejemplos para el tema visión artificial. Es una de las librerías más útiles porque tiene muchas herramientas para procesar y transformar imágenes, comparado con otras librerías que realizan lo mismo, éstas no son optimas en el tiempo de ejecución.

3.4.3. Tensorflow y Keras

Para temas de Deep Learning existen muchas APIs, entre ellas esta TensorFlow. La cual es una librería que puede ser utilizada desde python. TensorFlow es un módulo que está diseñado para el desarrollo de modelos de Machine Learning y Deep Learning. Por su simplicidad de uso y alto número de funciones aplicadas a las redes neuronales. Esta librería o modulo tiene integrada a Keras, el cual ofrece la creación de modelos de redes neuronales de forma rápida y sencilla. Por lo tanto, para el trabajo se aprovecho estas dos librerías para la parte del Transfer Learning con el modelo VGG16.

3.4.4. Anaconda

Anaconda es una distribución de Python para computación científica (ciencia de datos, aprendizaje automático, etc); tiene como objetivo simplificar la administración e implementación de paquetes. Son administradas por el sistema de administración de paquetes Conda. Este tiene una versión bootstrap llamada **Miniconda**. Por lo tanto, se creo un espacio de trabajo para el desarrollo de este proyecto con las librerías necesarias como TensorFlow, Keras, Numpy, etc.

3.4.5. Quiver

Es una plataforma interactiva para la visualización de una red neuronal convolucional, para este trabajo se analizó el modelo VGG16.

3.4.6. Decord

Es una librería que fue diseñado para manejar una experiencia incómoda de reproducción aleatoria de vídeos con el fin de brindar experiencias fluidas similares al cargador de imágenes aleatorias para el aprendizaje profundo.

Capítulo 4

Resultados y Discusiones

Se muestra los resultados del primer y segundo caso, donde se evaluaron la rapidez de las soluciones con metales Zn, Cd y Hg del grupo IIB, en diversas concentraciones. Además, se evaluó la tasa de mortalidad y la lipoperoxidación, para determinar la correlación con el nuevo parámetro hallado.

4.1. Caso 1: Implementación de un sistema portátil basado en procesamiento de imágenes

Se realizó una presentación oral en el Encuentro de Ciencia y Tecnología (ECITEC) 2019 en Lima (Perú), donde se añaden las gráficas resultantes con fines didácticos. En los 3 gráficos (ver Figura 4.1, 4.2 y 4.3), la concentración $0 \mu\text{molL}^{-1}$ representa el control tanto para la lipoperoxidación y la tasa de mortalidad, es decir, no fueron expuestas a un metal que dañen su movilidad.

En la Figura 4.1 y 4.2, la lipoperoxidación a diferentes concentraciones no disminuye debido a que el metal no es esencial para el organismo, es decir, que no participa en procesos bioquímicos esenciales para el organismo de la *Artemia Salina*. Para altas concentraciones, intensifican la lipoperoxidación, así como la tasa de mortalidad, ocasionando una disminución en la rapidez debido a los cambios fisiológicos que produce la toxicidad.

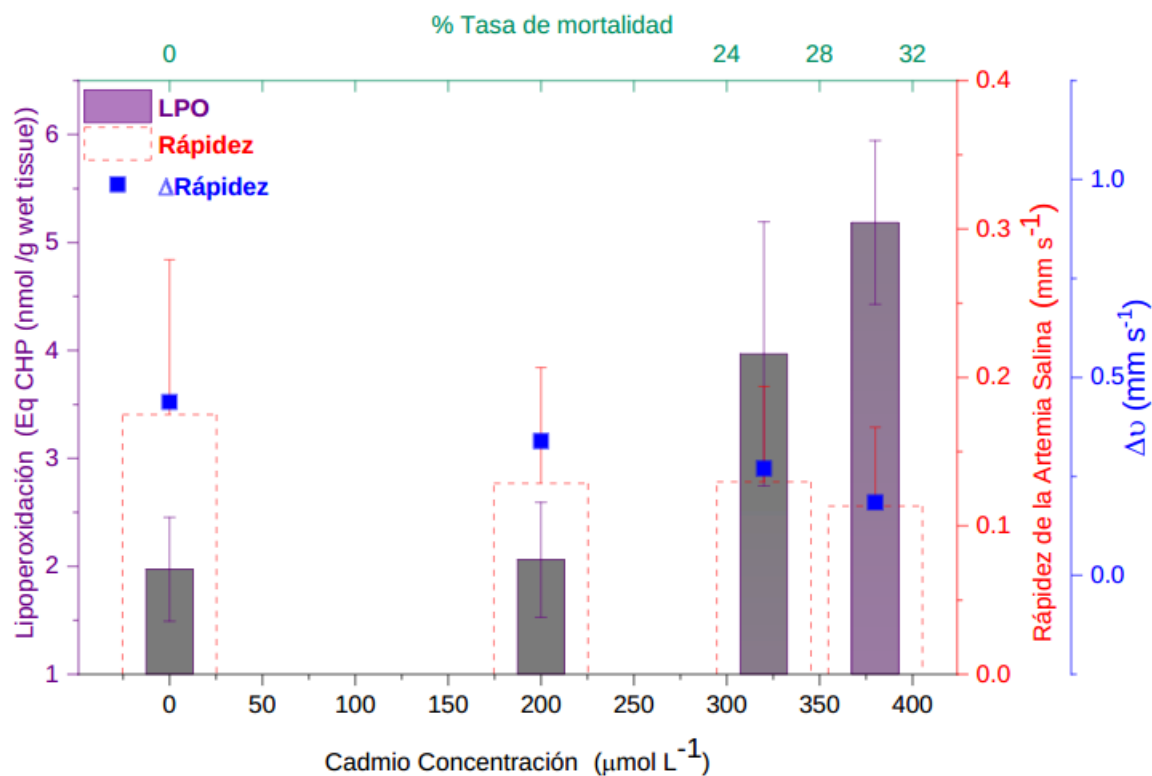


FIGURA 4.1: Lipoperoxidación (Eq CHP/g), tasa de mortalidad (%), rapidez (mm s^{-1}) de la *Artemia Salina* de ion metal. $\text{Cd}^{2+} = 0\text{--}380 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fuente: Nelson S. et al. [4]

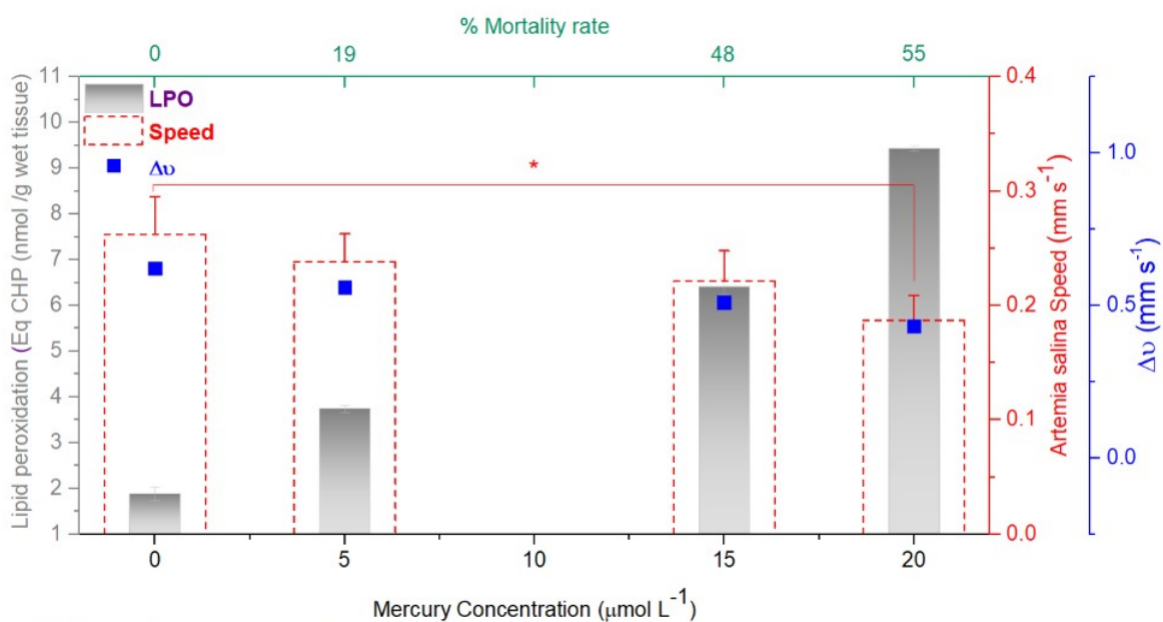


FIGURA 4.2: Lipoperoxidación (Eq CHP/g), tasa de mortalidad (%), rapidez (mm s^{-1}) de la *Artemia Salina* de ion metal. $\text{Hg}^{2+} = 0\text{--}20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fuente: Nelson S. et al. [4]

En la Figura 4.3, el Zinc es un metal esencial para el organismo de los seres vivos,

donde la lipoperoxidación no se intensifica como en el caso de Cadmio y Mercurio y se verifica con la tasa de mortalidad que asciende lentamente, comparando con la Figura 4.1 y 4.2, aquí se evalúa hasta $3000 \mu\text{mol L}^{-1}$.

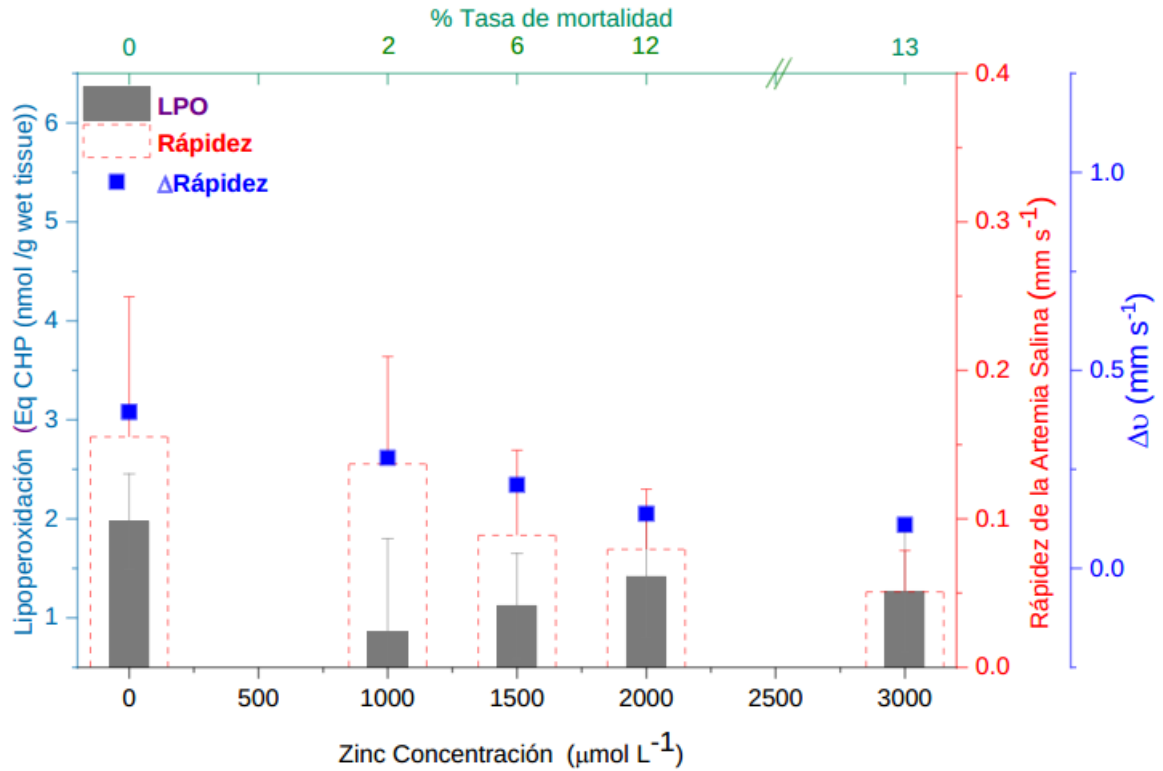


FIGURA 4.3: Lipoperoxidación (Eq CHP/g), tasa de mortalidad (%), rapidez (mm s^{-1}) de la *Artemia Salina* de ion metal. $\text{Zn}^{2+} = 0\text{-}3000 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fuente: Nelson S. et al. [4]

4.2. Caso 2: Solución para el sistema portátil basado en Transfer Learning

Para esta propuesta se utilizaron los vídeos almacenados del caso 1.. Con el nuevo algoritmo implementado basado en Transfer Learning del modelo VGG16, se obtuvo buenos resultados, ya que, los filtros elegidos aumentaban las intensidades de las *Artemias Salinas*, por consiguiente, el seguimiento del objeto era constante, es decir, en todo momento cada ID pertenecía a su respectiva *Artemia Salina*. Con estos filtros se logró binarizar y visualizar a los microcrustaceos.

Estos filtros fueron utilizados con una sensibilidad automática (ISO) de la configuración de la cámara, esto generó que en algunas imágenes del vídeo se

produzcan ruido ocasionando un falso objeto. Esto impidió lograr obtener la rapidez de algunas *Artemias Salinas* en las diversas concentraciones de metales pesados. Sin embargo, para cada vídeo generado por los filtros, se tuvo que evaluar de forma visual el seguimiento de cada una de los microcrustáceos y elegir que ID está realizando un seguimiento correcto.

Se muestra los resultados (ver Figura 4.4, Figura 4.5 y Figura 4.6) obtenidos con el nuevo algoritmo basado en Transfer Learning, también se muestra la curva de la rapidez del algoritmo basado en procesamiento de imágenes que se realizó en el Seminario de Tesis I.

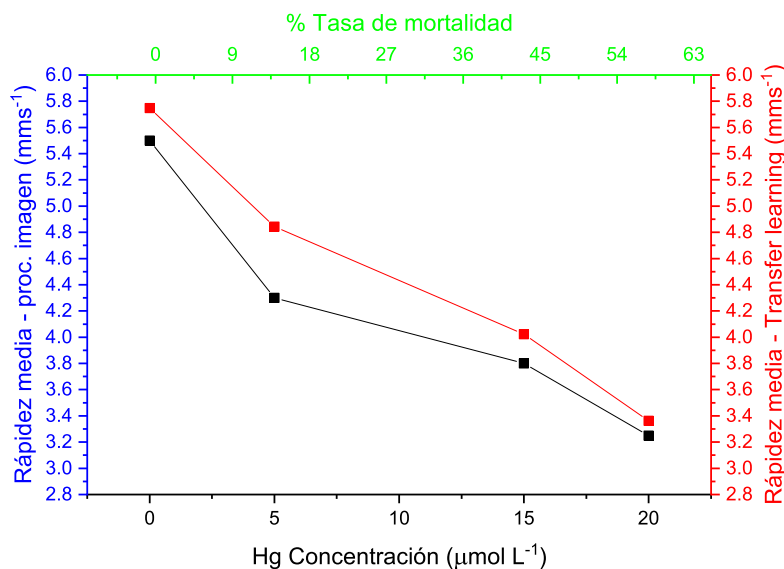


FIGURA 4.4: Rapidez - procesamiento de imágenes (mms^{-1}), tasa de mortalidad (%), rapidez - Transfer Learning (mms^{-1}) de la *Artemia Salina* de ion metal. $[\text{Hg}^{2+}] = 0 - 20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fuente: Elaboración propia.

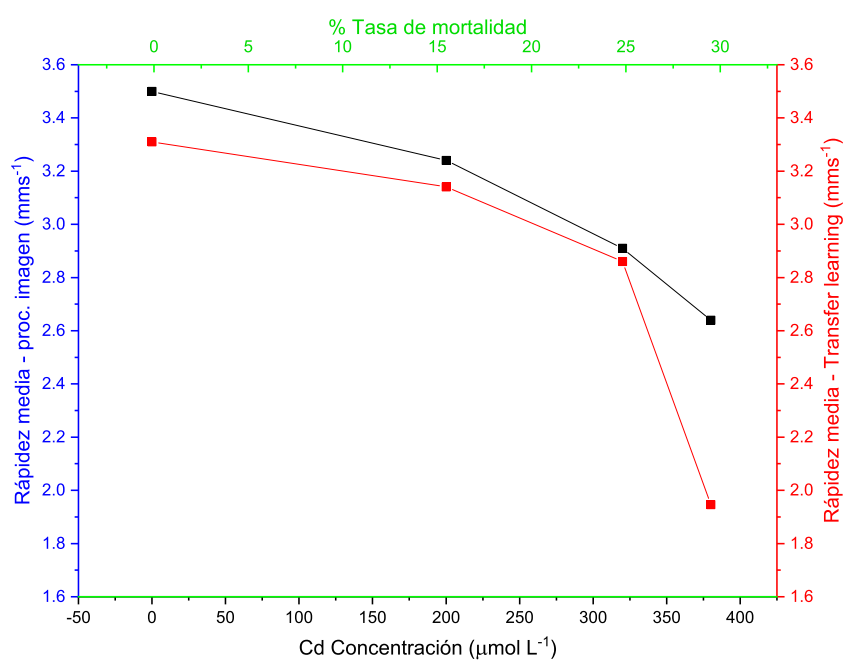


FIGURA 4.5: Rapidez - procesamiento de imágenes (mms^{-1}), tasa de mortalidad (%), rapidez - Transfer Learning (mms^{-1}) de la *Artemia Salina* de ion metal. $[Cd^{2+}] = 0 - 380 \mu mol L^{-1}$. Fuente: Elaboración propia.

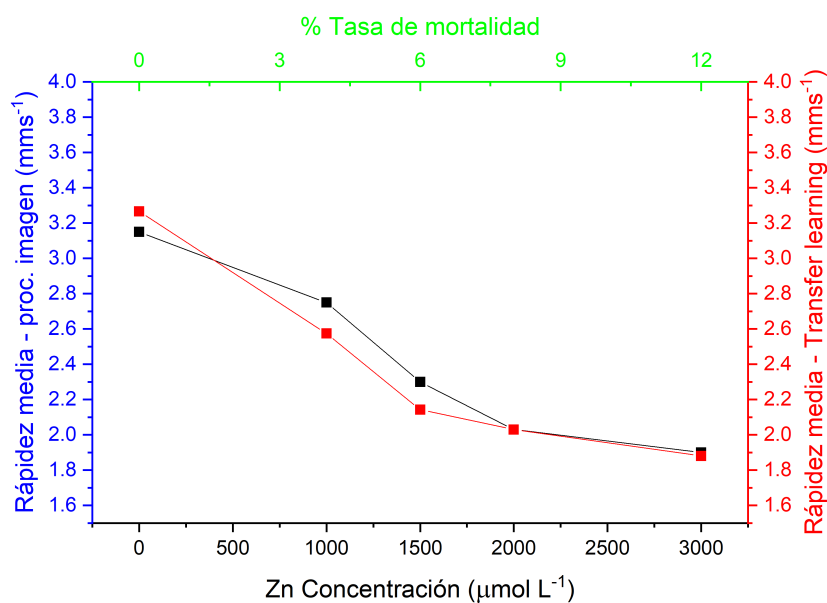


FIGURA 4.6: Rapidez - procesamiento de imágenes (mms^{-1}), tasa de mortalidad (%), rapidez - Transfer Learning (mms^{-1}) de la *Artemia Salina* de ion metal. $[Zn^{2+}] = 0 - 3000 \mu mol L^{-1}$. Fuente: Elaboración propia.

4.3. Discusión

El Zinc (Zn), el Cadmio (Cd) y el Mercurio (Hg) tienen una abundancia bastante baja en la corteza terrestre y pertenecen al grupo 12 de la tabla periódica. Su toxicidad de Cd y Hg es bien conocida, mientras que el Zn tiene importancia biológica [21].

El Cd y Hg causaron un mayor efecto de inhibición de la eclosión en los quistes de *Artemia Salina* que el Zn. Además, tanto el aumento de la mortalidad y los peróxidos de lípidos como la disminución de la velocidad de nado mostraron modales dependientes de la concentración. Sin embargo, se sugieren estudios más detallados sobre la serie de estos metales del grupo 12, con respecto a su toxicidad para una predicción específica utilizando el nuevo equipo óptico.

Tener en cuenta, que no se utilizaron replicas como se debería realizar, sin embargo, con la poca cantidad de vídeos que tenemos almacenados, se logró observar la relación del caso 1 y 2.

En la Figura 4.4, la diferencia se debe a la baja iluminación del vídeo, este no permite visualizar claramente a los microcrustáceos. Para el caso 1, existían en algunos instantes de tiempo del vídeo que no se detectaba a las *Artemias Salinas*. No eran muy visibles, por eso se generaba ruido al momento de calcular la rapidez promedio de cada *Artemia Salina*. Por el contrario, en el caso 2, se obtuvo mejores resultados porque los filtros resaltaban a las *Artemias Salinas* en la profundidad y permitía obtener más información de la movilidad.

En la Figura 4.5, sucede al igual que la figura anterior, sin embargo, se observa que las curvas están relacionadas, solo varía en la concentración $380 \mu\text{molL}^{-1}$ donde hubo una diferencia sobre los datos de rapidez. Esto es debido a que la *Artemia Salina* se sitúa en la parte inferior de la cubeta donde la iluminación genera un resplandor en la base y llega en un instante de tiempo que se pierde su visualización porque tienen el mismo color blanco.

En la Figura 4.6, se observa que hay una relación del caso 1 y 2. Esto se debe que las *Artemias Salinas*, se mueven en la sección central de la cubeta evitando llegar a la

parte inferior, donde existe un resplandor generado por la iluminación. Las pequeñas variaciones, se debe a que las *Artemias Salinas* eran localizadas en la parte superior. Para el caso 1, el seguimiento generaba pequeños desviaciones con respecto a la rapidez pero en el caso 2, se realizó un seguimiento adecuado, ya que, los filtros resaltaban a los microcrustáceos añadiendo más intensidad en los píxeles de las *Artemias Salinas* dentro de las imágenes para que sean fácilmente localizadas y visualizadas.

Capítulo 5

Conclusiones y Trabajo Futuro

En este capítulo se detallan las conclusiones de los resultados obtenidos de manera experimental y pruebas del algoritmo propuesto. Además, se describen las modificaciones y desarrollos que podrían en un futuro mejorar el algoritmo propuesto por algún investigador que este interesado en seguir la línea de toxicología.

5.1. Conclusiones

El problema planteado es determinar la rapidez de las *Artemias Salinas* mediante un algoritmo que se basa en obtener una buena visualización para aquellos microcrustáceos que se mueven hacia la profundidad de la cubeta UV. Esto se solucionó utilizando una parte de la red convolucional del modelo VGG16, la cual se escogió el primer nivel porque mantiene las dimensiones de la imagen. Con este modelo VGG16, se logró intensificar las intensidades de los píxeles de las *Artemias Salinas*. Se usaron los vídeos del seminario de tesis I para la evaluar con el algoritmo implementado y observar cómo mejora respecto al algoritmo anterior. Además, se imprimió el equipo óptico para realizar las pruebas de los 3 metales pesados, pero el contexto actual de la pandemia por el COVID19 se suspendieron las pruebas. Por tal motivo, se realizaron con los vídeos almacenados. Por otro lado, se añadió un nuevo parámetro en la parte de la pruebas toxicológicas, para determinar si la sustancia está contaminada mediante la evaluación de la rapidez de las *Artemias Salinas*. En sí, podemos resumir los siguientes puntos:

- Se diseñó e implementó el equipo óptico para la adquisición de vídeos, sin embargo, no se usó para la evaluación de este trabajo de investigación.

- Se analizaron los 64 filtros y se escogieron 3 filtros de la primera convolución y 3 filtros de la segunda convolución del nivel 1 para el modelo VGG16; donde la segunda convolución le añade más intensidad a las *Artemias Salinas*. Sin embargo, en algunos vídeos la primera convolución dio mejores resultados que la segunda convolución.
- Se calculó la rapidez media de las *Artemias Salinas* para cada metal pesado en distintas concentraciones.
- Se compararon los resultados de los metales del grupo 12, donde $Zn < Cd < Hg$ tiene de menor a mayor toxicidad.

Los resultados demuestran la capacidad de la nueva implementación para detectar con precisión y en un corto período de tiempo los nauplios en agua contaminada por metales en solución. La detección de la movilidad y la lipoperoxidación se determinaron antes de LC50. Este enfoque es significativamente más sensible que los ensayos de niveles de Lipoperoxidación y basados en la mortalidad. Por lo tanto, para Zn, Cd y Hg la rapidez de movilidad se detectó significativamente en 3000, 380 y $20 \mu mol L^{-1}$, respectivamente. Este novedoso enfoque en base a Transfer Learning constituye un instrumento más asequible para detectar y visualizar rápidamente la toxicidad en el sistema acuático.

5.2. Trabajo Futuro

Los resultados muestran un rendimiento aceptable, lo que se comprueba con las pruebas realizadas. Sin embargo, se utilizaron los vídeos almacenados con el dispositivo portátil del Seminario I. Para la continuidad de la obtención de un mayor rendimiento de este trabajo de investigación, se realizará lo siguiente:

- Realizar la evaluación de toxicidad a mayor rango de metales para obtener una correlación mucho más realista.
- Realizar pruebas con el nuevo Equipo óptico para evaluar la eficiencia del algoritmo.
- Acoplar una segunda cámara para el análisis de la movilidad en el eje Z.
- Reconfigurar y fijar la sensibilidad de la cámara.

Bibliografía

- [1] Roberto A. L. Edward R. D. *Hands-on Morphological*. SPIE PRESS, Washington USA, 2003.
- [2] Nelson S. M. Giuliana Ñ. Jesús P. M. Roxana Y. P. and Héctor A. V. Portable system for microcrustacean detection by digital image processing: mobility as an indicator of lipid peroxidation in toxic metal-contaminated environments. In *IV ENCUENTRO INTERNACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA ECITEC 2019*, Lima, Perú., 2019. https://www.researchgate.net/publication/343690266_Portable_system_for_microcrustacean_detection_by_digital_image_processing_mobility_as_an_indicator_of_lipid_peroxidation_in_toxic_metal-contaminated_environments?channel=doi&linkId=5f3a32d4458515b729276798&showFulltext=true, Accedido el 1 Febrero de 2021.
- [3] Abhijeet K. Transfer learning using feature extraction from trained model: Food images classification. 2019.
- [4] Nelson S. M. Giuliana Ñ. Jesús P. M. Roxana Y. P. and Héctor A. V. Mobility as an indicator of lipid peroxidation in metal-contaminated environments: A portable system for its identification. In *Journal of environmental bioinorganic and toxicology research (Cebitor 2019)*, Sao Paulo, Brasil, 2019. https://www.researchgate.net/publication/343689603_MOBILITY_AS_AN_INDICATOR_OF_LIPID_PEROXIDATION_IN_METAL-CONTAMINATED_ENVIRONMENTS_A_PORTABLE_SYSTEM_FOR_ITS_IDENTIFICATION?channel=doi&linkId=5f3a050e92851cd302fe0af3&showFulltext=true, Accedido el 1 Febrero de 2021.
- [5] De Bisthoven L. J. & Soares A. M. V Gerhardt, A. Evidence for the stepwise stress model: *Gambusia holbrooki* and *daphnia magna* under acid mine drainage and

- acidified reference water stress. *Environmental Science & Technology*, 39:4150–4158, 2005.
- [6] Wood. C. M. Toxic responses of the gill. In *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts : Organs* (ed. Daniel Schlenk, W. H. B.), pages 1–89. CRC Press, 2017.
- [7] S. E. Little, E. E. & Finger. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9:13–19, 1990.
- [8] Zhong-Qiu Zhao, Peng Zheng, Shou-tao Xu, and Xindong Wu. Object detection with deep learning: A review. *CoRR*, abs/1807.05511, 2018.
- [9] Khoshgoftaar T.M. Wang D. Weiss, K. A survey of transfer learning. *Journal Big Data*, 3, 2016.
- [10] Rodríguez-Grimón R. Arencibia G., Tizol R. Toxicidad de nauplios de artemia franciscana a dos piretroides de uso comercial. *Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 27:47–53, 2010.
- [11] Maeda-Martinez AM Murugan G Vazquez-Botello A. Gonzalez-Lozano MC, Mendez-Rodriguez LC. Evaluation of toxicity of polluted marine sediments from bahia salina cruz, mexico. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.*, 45:121–7, 2010.
- [12] Abhinav V. Garrett B. G., Nathan O. H. Deep learning for computational chemistry. *Journal of Computacional Chemistry*, 38:1291–1307, 2017.
- [13] H. Á. Górriz. *Procesamiento digital de imagen para caracterización morfométrica de la de la especie Frankliniella Occidentalis*. 2017.
- [14] Escalera A. (Edits.) Alegre E., Pajares G. *Conceptos y métodos en visión por computador*. 2016.
- [15] Courville A. Goodfellow I., Bengio Y. *Deep Learning*. 2016.
- [16] Claus C. Vanhaecke P., Persoone G. and Sorgeloos P. Research on the development of a short term standard toxicity test with the artemia nauplii. *The Brine Shrimp Artemia*, 1, 1980.

-
- [17] Zanotto FP. Espósito BP. Vitorino HA., Mantovanelli L. Iron metallogrugs: Stability, redox activity and toxicity against artemia salina. *PLoS One*, 2:36–45, 2011.
- [18] Hector A. Roxana P. Zanotto F. and Espósito B. Evaluation of iron loading in four types of hepatopancreatic cells of the mangrove crab *ucides codatus* using ferrocene derivatives and iron supplements. *Scopus*, 2018.
- [19] Hector A. Roxana P. and Priscila O. Lipid peroxidation in hepatopancreas, gill, and hemolymph of male and female crabs *platyxanthus orbigny* after air exposure. *Journal of Marine Science and Engineering (MDPI)*, 7(10), 2019.
- [20] Andrew Z. Karen S. Very deep convolution networks for large-scale image recognition@article. *ICLR*, 2015.
- [21] Arun B. Kabata-Pendias, Alina. Trce elements of group 12 (previously group iib). *Springer Berlin Heidelberg*, pages 283 – 319, 2007.