

4 Experimentos e Resultados

Neste capítulo apresentaremos as diversas avaliações que realizamos para medidas de fluorescência de pigmentos em água, tanto em laboratório quanto em campo. Em um primeiro momento iremos abordar e verificar as características do sinal de amostras de água pura para diferentes tempos de exposição à radiação de excitação e a dispersão da resposta de cada sensor. Nesta primeira etapa foi importante verificar diferentes formas de minimizar a relação sinal-ruído.

Avaliamos a sensibilidade do processo de determinação da concentração relativa de clorofila **a** para medições em campo onde as moléculas de clorofila se encontravam dentro de organismos vivos de diversas espécies. Verificamos a correlação das concentrações de clorofila **a** obtidas pelo LIDAR com as obtidas pelo laboratório LabMar-PUC-Rio.

Por fim, verificamos se os métodos adotados e implementados neste trabalho influenciariam nos parâmetros (posição e intensidade do pico) da banda de referência (espalhamento Raman da água) utilizada.

4.1. Estudo dos espectros de fluorescência obtidos pelo LIDAR

O atual sistema de aquisição de dados do LIDAR opera de forma automatizada, proporcionando maior eficiência na coleta de informações da amostra, e trabalha com espectros médios de 4 pulsos, ou seja, espectros que representam a média das informações adquiridas durante o intervalo de 4 pulsos do laser, a uma taxa de repetição de 1 Hz. Dois pontos podem ser apontados como negativos nesta aquisição: o primeiro deve-se ao fato desses espectros serem mais ruidosos que os espectros médios de 32 pulsos utilizados na versão anterior e o segundo refere-se ao tempo de processamento e dificuldade de manuseio dos dados, uma vez que, cada experimento passa a obter um maior número de

espectros que possuem individualmente cerca de 10^3 dados. Assim, nos itens a seguir serão discutidos meios de alcançarmos uma redução do número de dados mantendo a quantidade de informações adquiridas com esse sistema de aquisição e ainda estudos que avaliam se as informações extraídas dos espectros médios de 4 pulsos são equivalentes às informações extraídas de espectros de maiores intervalos de pulsos.

4.1.1.

Avaliação da integridade das informações do sinal com a redução da base de dados do espectro

O atual padrão de armazenagem dos espectros no sistema LIDAR possibilita o registro de muito mais informações devido à velocidade na aquisição de cada espectro, porém, trabalhar com bases de dados maiores exige maior capacidade de processamento computacional. Para minimizar esse problema avaliamos a possibilidade de trabalhar com bases de informações reduzidas que fossem capazes de preservar a integridade da informação contida em cada espectro registrado.

O primeiro passo foi identificar a região do sinal medido na qual as informações de interesse estavam contidas e excluir o sinal exterior ao intervalo identificado. Feito isso, passamos a trabalhar com um intervalo, em comprimento de onda, de 250 nm, contido entre 550 nm e 800 nm, que equivale, entretanto, a informação de quase 500 pixels.

O sistema de detecção do LIDAR trabalha com uma seqüência de 1020 detectores (pixels) dispostos linearmente, possibilitando uma resolução de aproximadamente 0,5 nm, bem inferior, portanto, a largura das bandas de fluorescência analisadas neste trabalho, que por sua vez, variam de 20 nm a 30 nm, como o exemplo mostrado na figura 34.

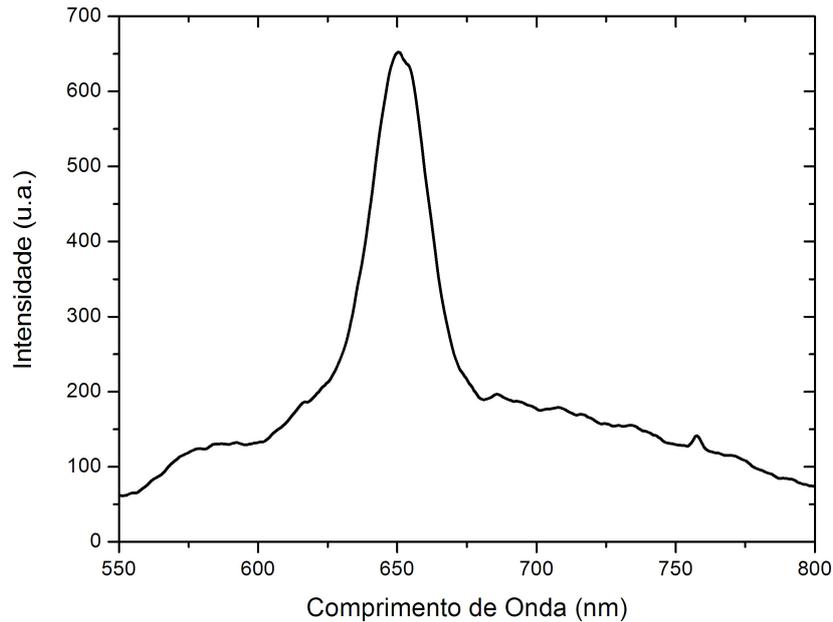


Figura 34 - Espectro característico do LIDAR para uma amostra de água; a banda de comprimento de onda do espalhamento Raman da água centrada em 650,9 nm possui uma largura média de 24 nm.

Assim, podemos considerar que detectores intermediários recebem basicamente a mesma radiação, que é bem aproximada através de uma interpolação linear, e poderíamos trabalhar com metade desses detectores, utilizando as informações medidas a uma razão de dois pixels a partir de 550 nm. Podemos observar, na figura 35, o espectro gerado a partir das informações medidas seguindo os procedimentos descritos anteriormente, sobreposto ao espectro da figura 34.

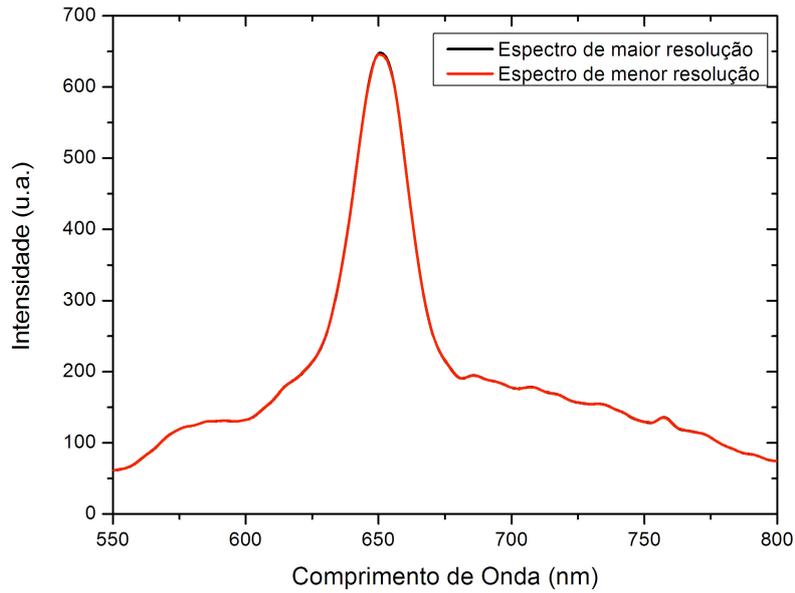


Figura 35 - O espectro de maior resolução é composto pelas informações de 454 detectores, enquanto que o espectro de menor resolução é composto pelas informações de 227 detectores.

Portanto, verificamos que reduzir a base de dados, entre 550 e 800 nm, a metade, não causa perda da informação no espectro original. Além disso, foi necessário averiguar se mantínhamos a mesma dispersão em torno da média das medidas de cada detector (figura 36).

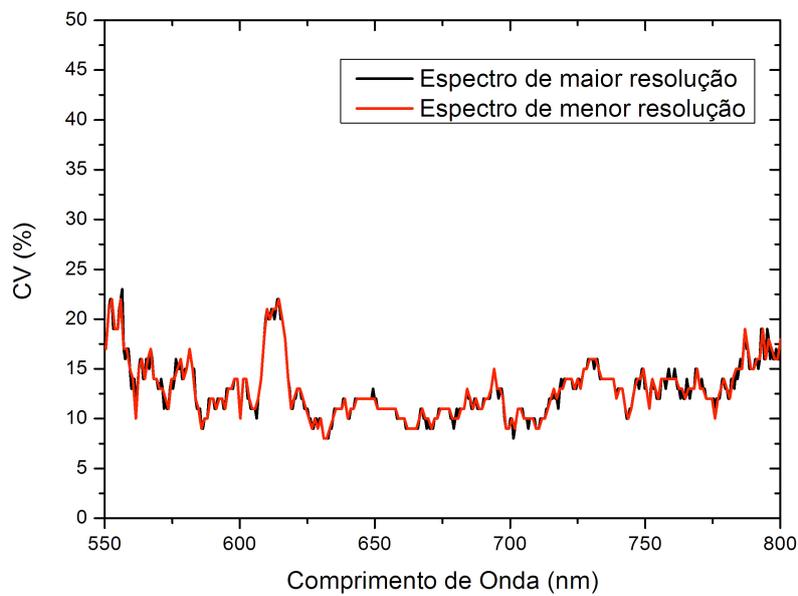


Figura 36 - Dispersão do sinal medido em todos os detectores.

Na figura 36 podemos observar o coeficiente de variação do sinal em cada detector no intervalo de 550 a 800 nm. Esse estudo nos permite afirmar que, de fato, as informações recebidas por detectores vizinhos seguem basicamente o mesmo padrão e que mesmo reduzindo a base de dados, de cada espectro, pela metade ainda mantemos a mesma distribuição em torno da média das medições pixel a pixel.

4.1.2. Espectro médio para diferentes números de pulsos

Na versão anterior do software de controle do equipamento o usuário determinava manualmente o número de pulsos necessários para construir um espectro, sendo estes potências de base 2. Observou-se em experimentos anteriores realizados no laboratório, com este logicial de controle, que espectros (obtidos após 32 pulsos do laser) seriam uma boa alternativa para a medição da fluorescência da clorofila por apresentarem os picos de interesse bem definidos e pouco ruidosos. Porém, optou-se, na versão atual por trabalhar com espectros de 4 pulsos que poderiam ser agrupados de 8 a 8 de modo a representar um espectro de 32 pulsos armazenado pelo sistema.

Com a finalidade de verificar a afirmação anterior, realizamos uma série de medições de uma amostra de água, obtendo espectros com diferentes números de pulsos (4, 8, 16 e 32 pulsos) mantendo, no entanto, constante o número total de pulsos para cada seqüência de medição. A figura 37 apresenta o espectro médio para cada uma dessas seqüências de medições.

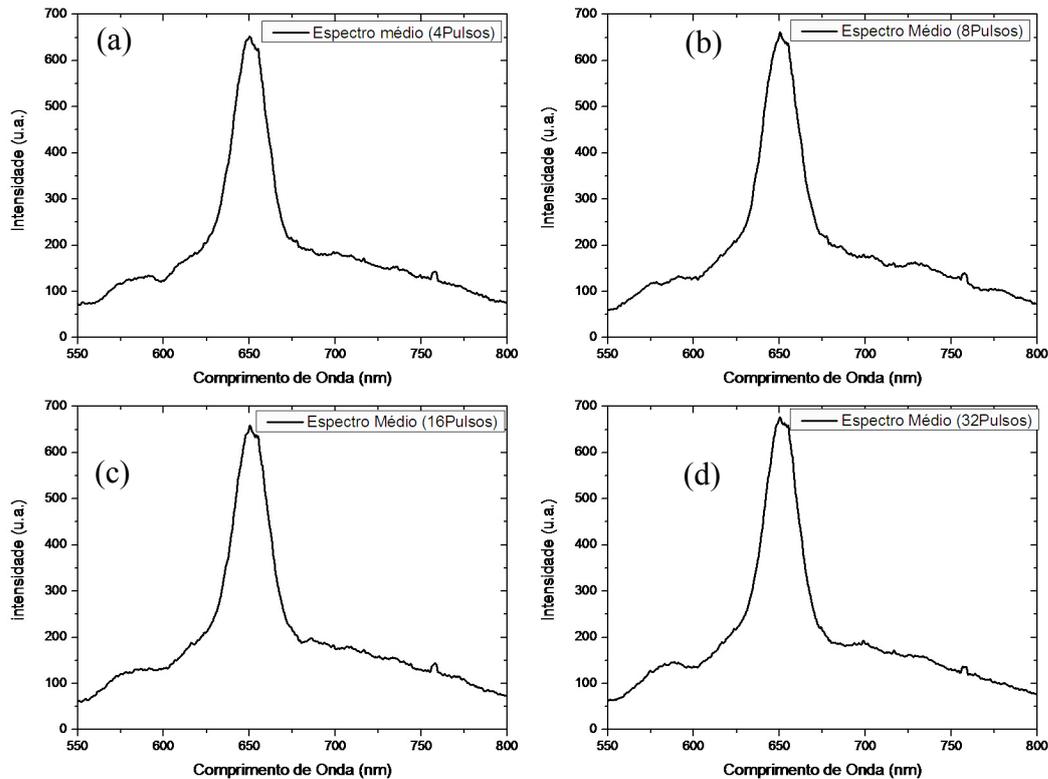


Figura 37 - Espectros médios de 320 pulsos do laser obtidos em intervalos de 4, 8, 16 e 32 pulsos do laser. (a) espectro médio de 80 espectros obtidos em intervalos de 4 pulsos do laser; (b) espectro médio de 40 espectros obtidos em intervalos de 8 pulsos do laser; (c) espectro médio de 20 espectros obtidos em intervalos de 16 pulsos do laser; (d) espectro médio de 10 espectros obtidos em intervalos de 32 pulsos do laser;

Comparando os espectros médios de cada seqüência de medição ao espectro médio de 32 pulsos encontramos um erro relativo da ordem de 4 % para os espectros de 4 e 8 pulsos e 3 % para o espectro de 16 pulsos. Portanto o espectro médio adquirido pelo equipamento, durante um mesmo intervalo de tempo (ou número de pulsos do laser), agrupados em 4, 8, 16 e 32 pulsos, apresentam basicamente as mesmas características.

4.1.3. Dispersão do sinal em cada detector

Como cada pixel equivale à medida de um sensor independente dos demais, foi importante verificar se a dispersão das várias medidas de um mesmo sensor,

durante uma seqüência de medição, seguiam o mesmo padrão nas outras seqüências.

Podemos observar, na figura 38, o coeficiente de variação¹¹ de cada sensor já calibrado para os comprimentos de onda correspondentes.

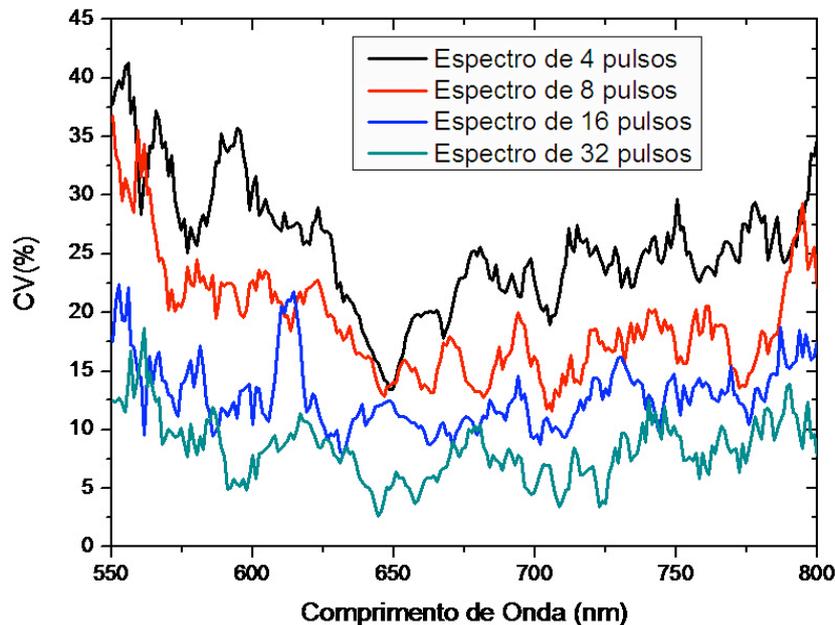


Figura 38 - Coeficiente de variação das medidas de cada detector para as diferentes seqüências de medição.

Podemos observar que em torno de 650 nm temos uma significativa queda do coeficiente de variação dos sensores, pois nesta região temos um sinal muito intenso atribuído ao espalhamento Raman da água. Porém, é fato que ocorre uma redução do coeficiente de variação com o aumento do número de pulsos dos espectros. Como dito anteriormente, quanto menor o número de pulsos mais ruidoso tornar-se-á o espectro, no entanto, o espectro médio de 4 pulsos é tão bem definido quanto o espectro médio de 16 ou 32 pulsos.

Como citado anteriormente, o padrão utilizado no laboratório refere-se aos espectros obtidos em um intervalo de 32 pulsos do laser, porém, espectros com 16 pulsos poderiam ser utilizados, apesar de apresentarem maior dispersão em cada detector e um sinal mais ruidoso. Trabalhar com espectros de 16 pulsos significa

¹¹ Coeficiente de Variação: Corresponde ao efeito da variação ou dispersão em relação à média e é definido por: coeficiente de variação = desvio padrão/média;

aumentar o número de informações em relação aos espectros de 32 pulsos, uma vez que, podem ser adquiridos em intervalos de tempo menores. Deste modo, realizamos algumas verificações com a finalidade de se obter espectros com menos números de pulsos que reproduzam as informações extraídas dos espectros de 32 pulsos.

Como já foi descrito no início deste capítulo, os espectros da nova versão do logicial de controle são obtidos em intervalos de 4 pulsos, e, portanto, apresentam uma grande dispersão nas medidas como pôde ser observado na figura 33. Com a finalidade de reduzir a dispersão dos espectros de 4 pulsos, agrupamo-los quatro a quatro, para tentar reproduzir as condições observadas em um espectro obtido em intervalos de 16 pulsos.

Como resultado desse agrupamento (ver figura 39) foi verificado que apesar de não se obter exatamente a mesma dispersão pixel a pixel, podemos trabalhar com a mesma ordem de dispersão e com um intervalo entre o valor máximo e o valor mínimo ($\Delta CV(\%)$) de 16% em oposição a um $\Delta CV(\%)$ igual a 14 % para os espectros efetivamente de 16 pulsos.

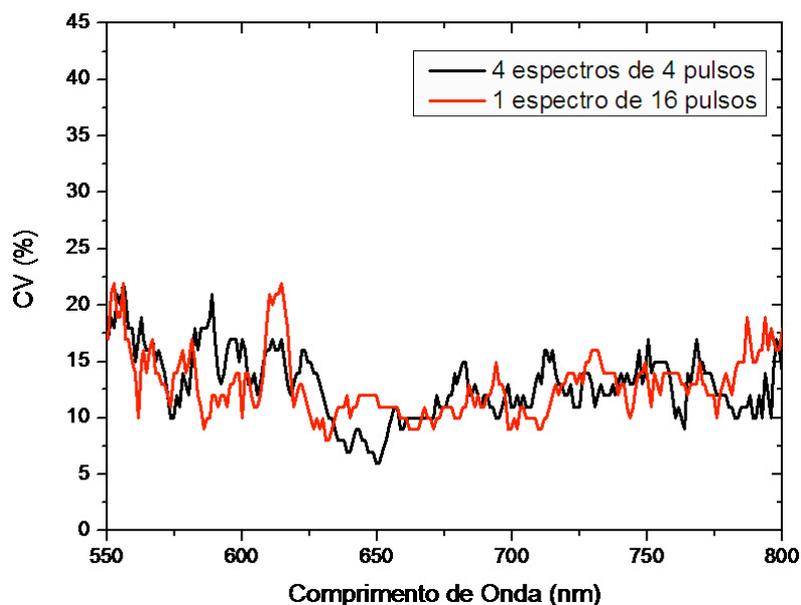


Figura 39 - Coeficiente de variação pixel a pixel de 20 espectros de 16 pulsos comparados à 80 espectros de 4 pulsos agrupados quatro a quatro.

Portanto, concluímos que agrupando espectros de 4 pulsos, externamente ao equipamento, obtemos resultados bem próximos dos espectros médios adquiridos a partir de médias efetuadas pelo próprio logicial de controle.

4.1.4.

Dispersão do sinal após a passagem de um filtro de média móvel

Tendo em vista que podemos reduzir a dispersão do sinal medido por cada sensor agrupando espectros subseqüentes, vamos avaliar, nesse ponto, a possibilidade de obtermos esse mesmo resultado utilizando um filtro de média móvel ao longo do próprio sinal. Testamos filtros, com médias de 3, 5, 7, 9, 15 e 31 pontos nos espectros com de 4, 8, 16 e 32 pulsos e notamos um alargamento e suavização dos mesmos quanto maior fosse o número de pontos utilizados na média móvel. Porém, isso não acarretou na redução da dispersão pixel a pixel, como pode ser observado nas figuras 40 e 41.

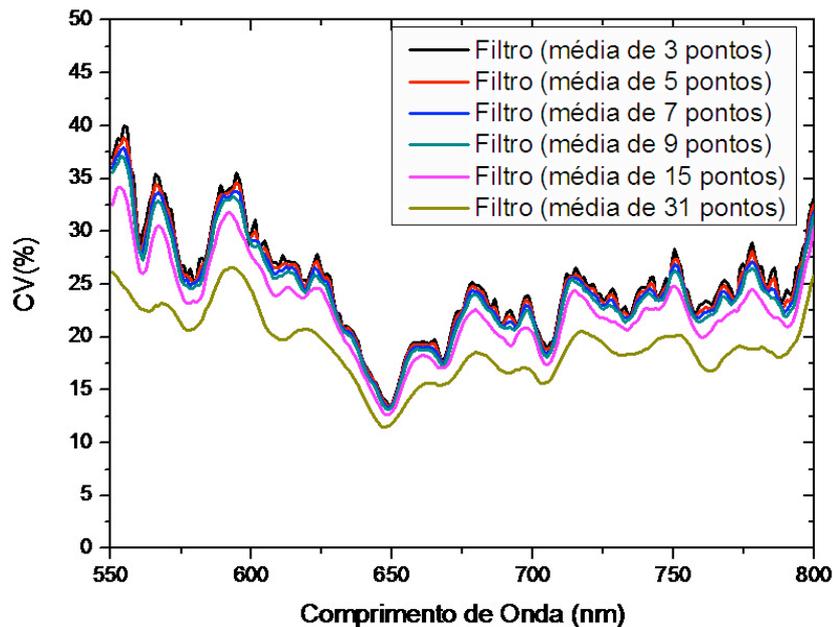


Figura 40 - Dispersão pixel a pixel de 80 espectros de 4 pulsos com diferentes filtros de média móvel.

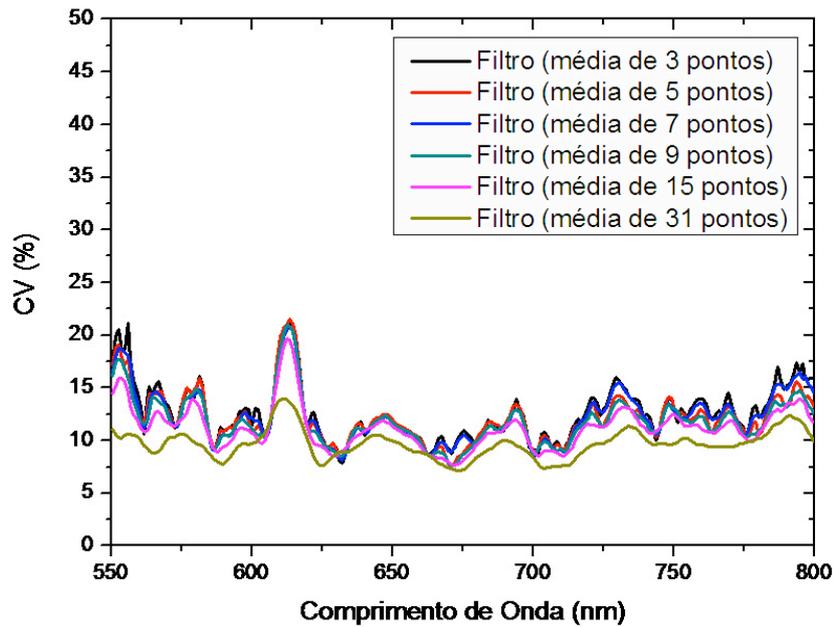


Figura 41 - Dispersão pixel a pixel de 20 espectros de 16 pulsos com diferentes filtros de média móvel.

Quando submetemos cada espectro medido em intervalos de 16 pulsos a um filtro de média móvel de 15 pontos observamos uma suave redução no coeficiente de variação máximo de 2 % (ver tabela 4).

É importante ressaltar que como o filtro de média móvel alarga o espectro poderíamos comprometer as informações contidas em bandas estreitas desse espectro, porém, como nossas bandas de interesse possuem uma largura de pelo menos 20 nm, as informações são bem conservadas com filtros de até 15 pontos.

Observamos na figura 39 que ao agrupar espectros de 4 pulsos, quatro a quatro, conseguimos reduzir a dispersão das medidas em torno do valor médio. Aplicamos, então, nesses espectros médios, o resultado do agrupamento de quatro espectros de 4 pulsos e um filtro de média móvel de 15 pontos, portanto, idêntico ao que fora utilizado anteriormente, como mostrado na figura 42.

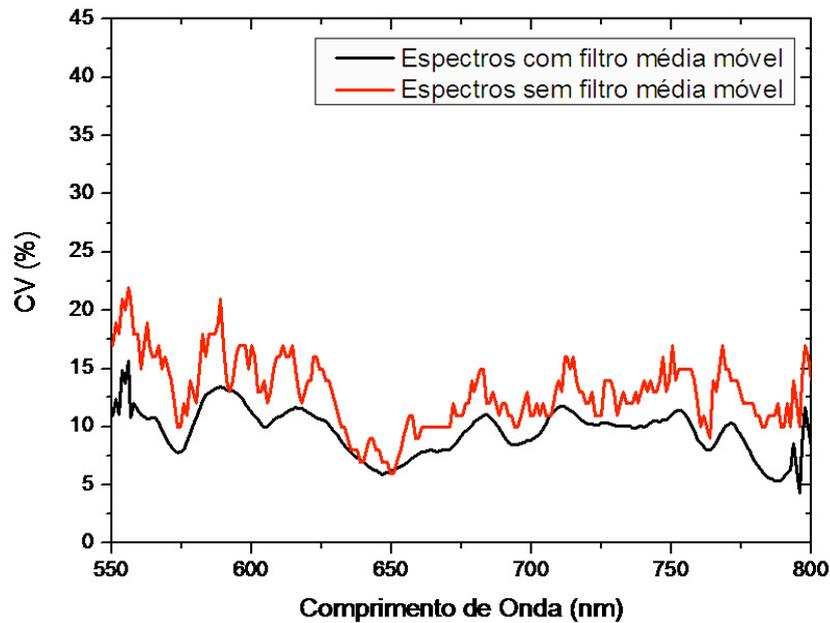


Figura 42 - Dispersão das medidas de cada detector em torno da média para espectros de 4 pulsos agrupados de quatro em quatro espectros. Em ambos os grupos foram mantidos o número total de 320 pulsos.

Observamos com esses estudos que a dispersão das medidas em torno da média, nos espectros de 4 pulsos, diminui, significativamente, quando associamos o agrupamento desses espectros com a passagem de um filtro de média móvel de 15 pontos, nos permitindo chegar a resultados melhores do que na dispersão das medidas dos espectros de 16 pulsos e até mesmo 32 pulsos, como organizados na tabela 4.

Tabela 4 - 4p – espectros adquiridos em intervalos de 4 pulsos do laser; 4 x 4p – agrupamento dos espectros de 4 pulsos quatro a quatro; 4 x 4 p c/ filtro – passagem de um filtro média móvel de 15 pontos no espectros de 4 pulsos agrupados quatro a quatro; 16p – espectros adquiridos em intervalos de 16 pulsos do laser; 16p c/ filtro – passagem de um filtro média móvel de 15 pontos no espectros de 16 pulsos; 32p – espectros adquiridos em intervalos de 32 pulsos do laser.

Intervalo de pulsos	Coef. de variação		$\Delta CV(\%)$
	máximo (%)	mínimo (%)	
4 p	42	13	29
4 x 4 p	22	6	16
4 x 4 p c/ filtro	13	5	8
16 p	22	8	14
16 p c/ filtro	20	8	12
32 p	19	3	16

4.2. Concentração relativa de clorofila a

Neste trabalho desenvolvemos um processamento que visa a extração da concentração relativa de clorofila a do sinal de fluorescência de medições em água, como foi descrito no capítulo anterior.

Processar um espectro de fluorescência da clorofila significa extrair valores que representem, de certo modo, um quantitativo deste pigmento. É importante frisar que um aumento na concentração de clorofila não significa, necessariamente, um aumento populacional de uma ou outra espécie de alga, mas sim um aumento na atividade fluorescente do pigmento, que pode estar ligado ou não a um aumento populacional ou ainda ao crescimento da alga.

Chamamos o resultado extraído do espectro medido de concentração relativa porque este não representa absolutamente a concentração de clorofila contida na amostra. Esta informação nos fornece quantitativos de uma banda contida no espectro em relação a outra banda do mesmo espectro. Este procedimento de normalização dos espectros por uma banda de referência é que nos permite comparar os resultados de diferentes espectros.

4.2.1. Comparação dos resultados com média móvel para determinação da concentração de clorofila a em amostras de água costeiras

Com o objetivo de verificar a sensibilidade do processamento utilizado na determinação da concentração relativa de clorofila a, processamos dados de um experimento anterior realizado em águas costeiras, que apresentam uma maior concentração de clorofila. Foram analisadas 11 subamostras diluídas com água do mar, previamente filtrada, geradas a partir de uma amostra de água costeira (figura 38). Outra subamostra foi filtrada com filtro de membrana Millipore[®] *HAWP04700* e extraída a concentração absoluta de clorofila a a partir do método fluriométrico (Barbosa, 2003).

Extraímos dos espectros medidos a concentração relativa de clorofila a para diferentes diluições (ver figura 43), utilizando os procedimentos do processo já estabelecido e utilizado no laboratório para o processamento de sinais do LIDAR. Em seguida, comparamos tais medidas com as concentrações de clorofila extraídas a partir do processo desenvolvido neste trabalho, acrescentando os estudos das médias móveis ao longo do espectro. Em ambos os casos trabalhamos com espectros com metade do número de pixels como sugerido no início deste capítulo.

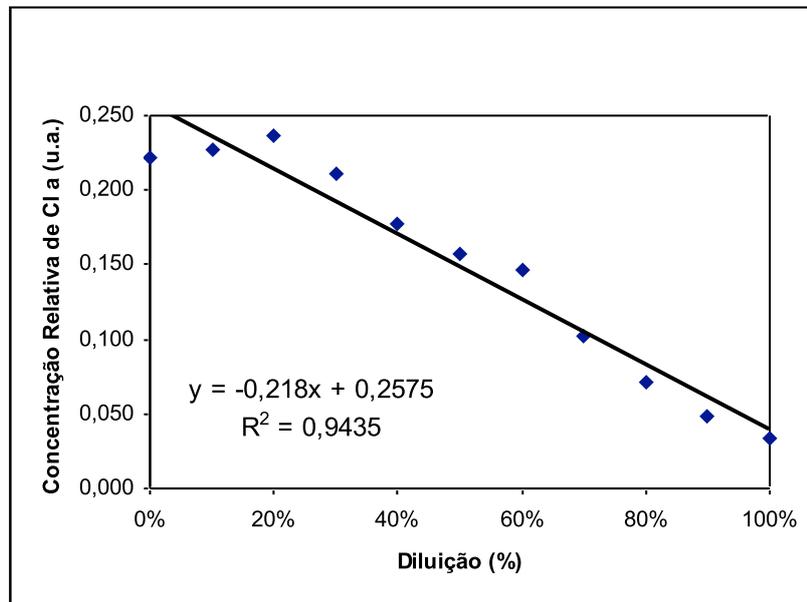


Figura 43 - Concentrações relativas de clorofila a para diferentes diluições obtidas a partir do processo padrão adotado no laboratório.

Como mostrado na figura 43, ao aumentarmos o número de pontos na média móvel o processo utilizado na extração da concentração relativa de clorofila a apresenta-se menos sensível. Contudo, podemos verificar que com filtros de média móvel de até 15 pontos temos uma perda pouco significativa na sensibilidade deste processo (ver figura 44).

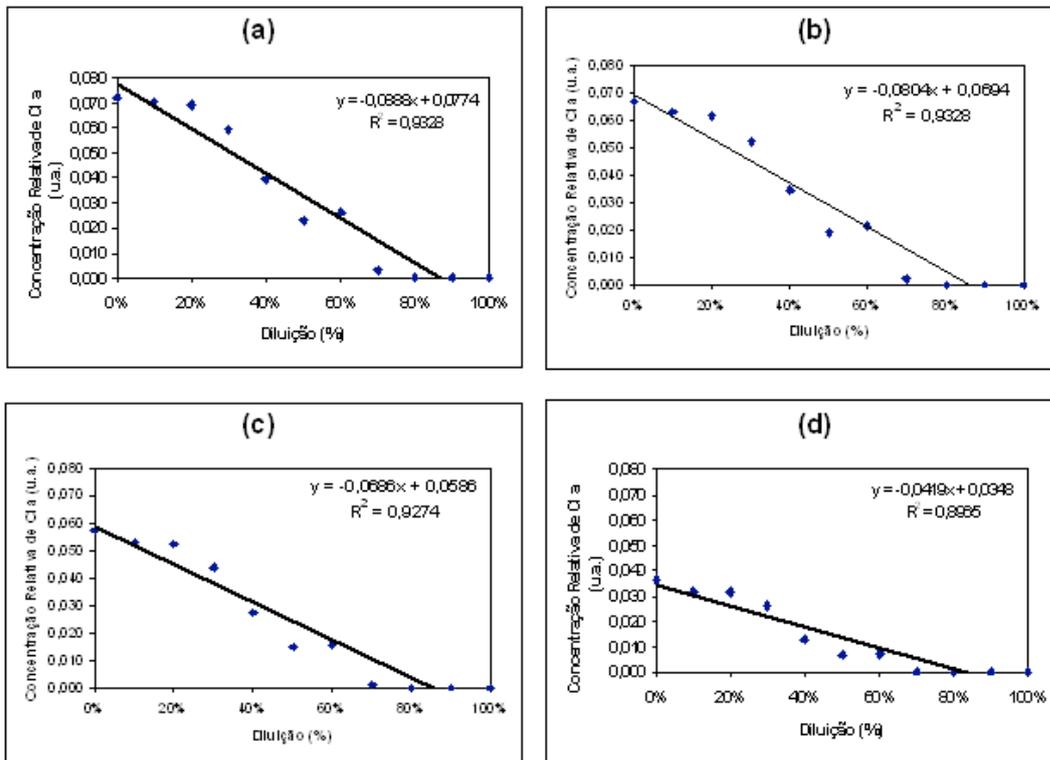


Figura 44 - Concentrações relativas de clorofila a para diferentes diluições obtidas, a partir do processo desenvolvido neste trabalho. (a) sem filtro de média móvel; (b) com filtro de média móvel de 7 pontos; (c) com filtro de média móvel de 15 pontos; (d) com filtro de média móvel de 31 pontos;

Anteriormente, pudemos verificar que espectros adquiridos a partir de amostras de água pura poderiam ser filtrados com um filtro média móvel de até 15 pontos sem que houvesse perdas significativas de qualquer informação contida em bandas com largura superior a 10 nm. Porém, naquele estudo a banda observada era a do espalhamento Raman da água, cuja largura é maior que 20 nm.

Ampliando a abordagem anterior verificamos o espectro médio para medições de águas costeiras com os espectros médios com filtros de média móvel de 7, 15 e 31 pontos. Podemos observar na figura 45 que o filtro de média móvel proporciona um alargamento do espectro acompanhado de uma perda de intensidade. Contudo, o filtro de 7 pontos reproduz um espectro bem próximo do espectro médio original.

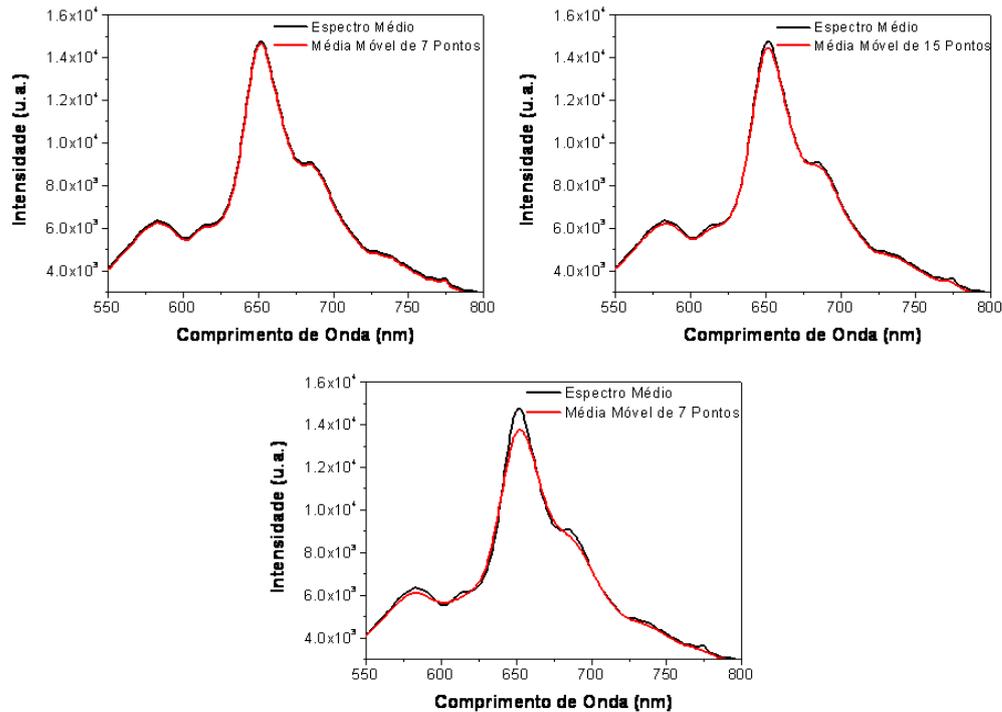


Figura 45 - Espectros médios obtidos a partir de amostras de águas costeiras; (a) espectro com filtro de média móvel de 7 pontos; (b) espectro com filtro de média móvel de 15 pontos; (c) espectro com filtro de média móvel de 31 pontos;

4.2.2.

Comparação dos resultados com média móvel para determinação da concentração de clorofila a em amostras de água oceânicas

A eficiência do LIDAR no sensoriamento remoto depende da interpretação do espectro medido e da conversão deste em dados que descrevam o organismo ou a estrutura analisada. Com a finalidade de conferir confiabilidade e sensibilidade as medições do equipamento, avaliamos alguns parâmetros intrínsecos ao sinal medido em águas da Bacia de Campos durante uma expedição que contou com a participação de empresas e outras instituições. Esta campanha contou com o monitoramento de aeronaves, imagens de satélite, coletas de material em pontos pré-determinados (estações) e o LIDAR-PUC.

O equipamento foi montado na embarcação e realizou medições contínuas das águas da Bacia de Campos no intervalo de 4 km de cada estação. Este sistema

de aquisição de informações nos levou a acumular uma base de mais de 13000 espectros, dos quais validamos 10555. É relevante ressaltar que cada espectro contém cerca de 1000 dados.

Quando realizamos medições em águas oceânicas observamos outras bandas referentes a pigmentos e estruturas presentes nestas amostras, entre elas está a clorofila. A banda associada à clorofila nestas águas é bem menos intensa. Deste modo, precisamos tomar certo cuidado ao utilizar filtros de média móvel, pois estes podem ocultar a banda referente à clorofila, assim como, de outros pigmentos. Com o intuito de verificar se as observações realizadas em uma água pura são aplicáveis a uma amostra de água oceânica, filtramos alguns destes espectros (80 espectros agrupados quatro a quatro) com filtros de média móvel de 7 e 15 pontos, como pode ser observado na figura 46.

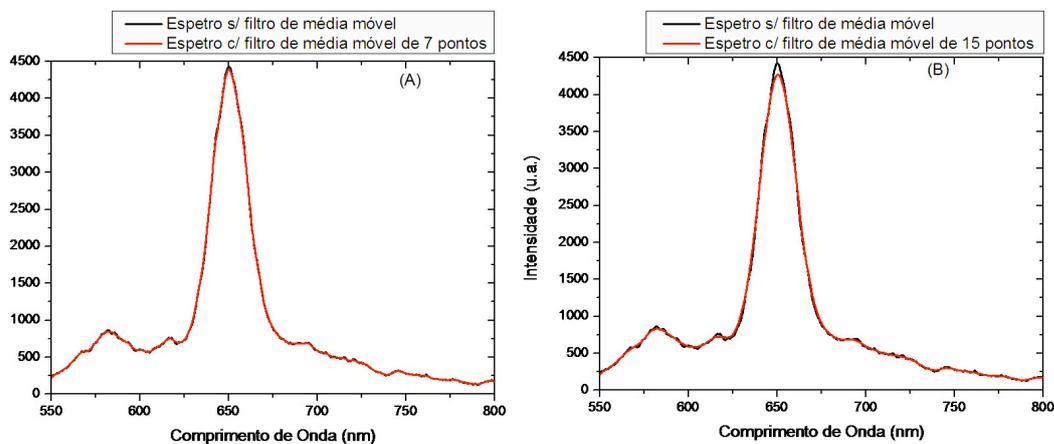


Figura 46 - Espectros obtidos a partir de medições de amostras de água do mar; (A) espectro com filtro de média móvel de 7 pontos; (B) espectro com filtro de média móvel de 15 pontos;

Podemos observar que as bandas visíveis nos espectros filtrados com (A) e (B) são as mesmas, das quais podemos destacar a MOD ($\lambda = 580$ nm), o espalhamento Raman da água ($\lambda = 650$ nm) e a clorofila a ($\lambda = 695$ nm). Tanto no espectro (A) quanto em (B) podemos perceber uma sutil perda de intensidade na banda do espalhamento Raman da água, o que nos chamou atenção para verificar se esta perda é significativa para determinação da concentração de clorofila.

No gráfico da figuras 47 observamos a distribuição das medidas de clorofila para um conjunto de espectros filtrados com as diferentes médias citadas.

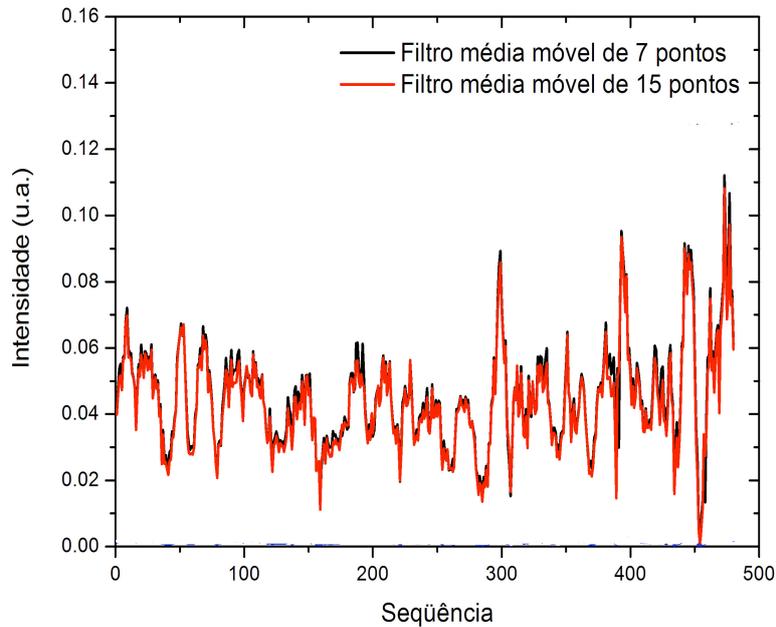


Figura 47 - Distribuição das medidas de concentração da clorofila a para um conjunto de espectros obtidos de amostras de água oceânicas e filtrados com filtros média móvel de 7 e 15 pontos.

As concentrações relativas de clorofila a observadas nos espectros filtrados com 7 e 15 pontos estão bem próximas, como pode ser analisado na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração relativa média de clorofila a para diferentes filtros de média móvel.

Média de Pontos	\bar{x}_{cl} (u.a.)	s_{cl} (u.a.)	CV (%)
7	0,0450	0,0154	34,33
15	0,0434	0,0149	34,27

Portanto, como verificado para amostras de água pura, um filtro média móvel de até 15 pontos conserva as informações contidas no sinal medido. Além disso, esse filtro de média móvel apresentou uma menor dispersão em torno da média (coeficiente de variação), ainda que sutil para as medidas de clorofila a.

4.2.3.

Correlação entre as concentrações relativas de clorofila a

Para ser significativa, uma análise de fluorescência induzida por laser deve comparar suas medidas a resultados obtidos pelas técnicas convencionais. Deste modo, o sensoriamento remoto com o LIDAR deve estar aliado à coleta de amostras das quais seja possível extrair o parâmetro a ser comparado. Portanto, as medidas obtidas com o LIDAR são na realidade medidas relativas que para representarem absolutamente os parâmetros de interesse, devem ser transformadas a partir dos resultados das coletas.

Processamos os 10555 obtidos durante o experimento extraindo as concentrações relativas de clorofila a através do processo desenvolvido neste trabalho. Com o objetivo de verificar se os diferentes filtros de média móvel influenciariam nos valores de concentração de clorofila verificamos a correlação entre o processo sem qualquer filtro e com filtros de média móvel de 7, 15 e 31 pontos.

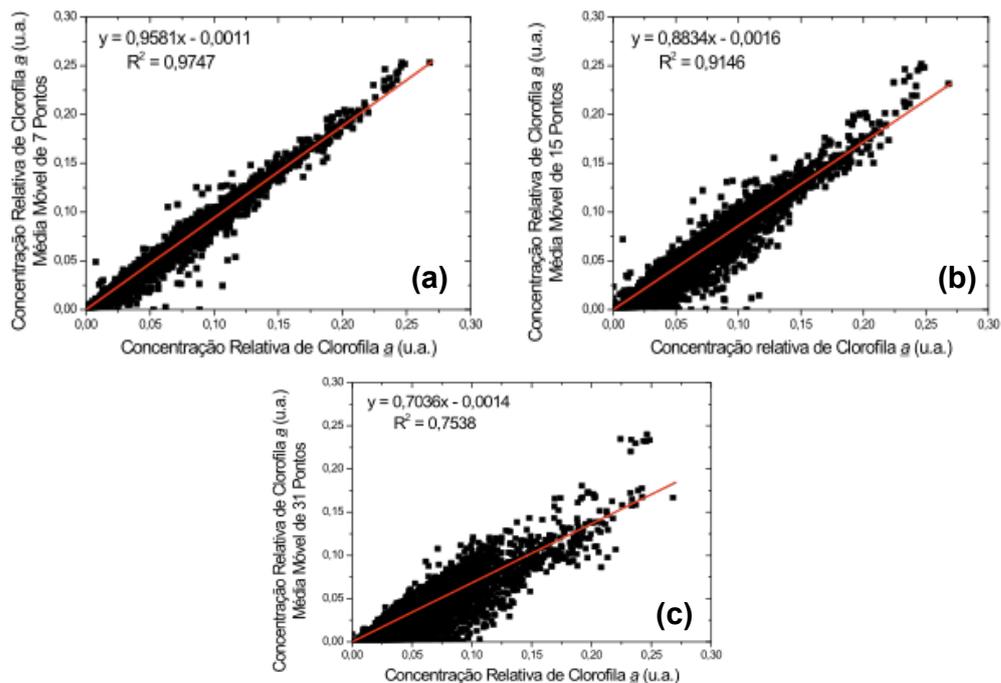


Figura 48 - Correlação entre os processos de extração da concentração de clorofila a com e sem filtros de média móvel. (a) média móvel de 7 pontos; (b) média móvel de 15 pontos; (c) média móvel de 31 pontos.

Fica evidenciado na figura 48 que a informação referente a concentração da clorofila é satisfatoriamente preservada para filtros de média móvel de 7 pontos, sendo muito bem correlacionado com a informação extraída do espectro bruto.

4.2.4. Avaliação da sensibilidade do processo em relação à banda de clorofila a

Em medidas de campo podemos encontrar uma grande diversidade de populações de algas com diferentes pigmentos, resultando em variações da posição da banda de fluorescência da clorofila a. Como uma alternativa de melhorar a correlação entre a concentração da clorofila nos processos abordados neste trabalho desenvolvemos estudos nos quais variamos a posição do máximo e a largura da banda de clorofila e, comparamos os resultados de concentração, obtidos através do processo padrão adotado no laboratório e do processo desenvolvido neste trabalho. Na tabela 6, podemos observar o coeficiente de correlação para cada uma destas variações.

Tabela 6 - Coeficiente de correlação para as diferentes bandas de clorofila a.

$\Delta\lambda$ (nm)	Posição do Máximo (nm)	Coeficiente de Correlação (R)
20	675	534%
20	680	666%
20	685	748%
20	690	786%
20	695	756%
25	675	539%
25	680	622%
25	685	690%
25	690	728%
25	695	736%
30	675	633%
30	680	693%
30	685	749%
30	690	788%
30	695	729%
35	675	614%
35	680	658%
35	685	691%
35	690	722%
35	695	730%
40	675	641%
40	680	675%
40	685	696%
40	690	715%
40	695	721%

Este estudo evidenciou que quanto menor a largura da banda estabelecida para clorofila, maior a sensibilidade do processo utilizado neste trabalho para diferentes posições do máximo desta banda. A melhor correlação obtida foi igual a 78,8 %, para uma banda de clorofila a com largura de 30 nm e posição do máximo em 690 nm. Embora tenhamos encontrado uma melhor correlação que a utilizada anteriormente, a diferença é pouco significativa, contudo, nos mostra um

sutil deslocamento da posição da banda de clorofila a previamente estudada em outros experimentos.

4.3.

Estudo dos parâmetros associados à banda do espalhamento Raman da água

Como descrito no capítulo anterior, utilizamos, para medições em água, a banda do espalhamento Raman, que traz informações da turbidez da água como referência para todo o espectro medido. Para que esta seja uma boa referência é necessário conhecer muito bem o comportamento dos parâmetros associados a ela. Para tal, avaliamos neste trabalho a flutuação da posição do máximo do espalhamento Raman mediante a variação de temperatura, de tensão da fonte de alimentação e do intensificador de imagem e da calibração do equipamento, além, de verificar a correlação entre os máximos do espalhamento Raman e da gaussiana a ela ajustada. Esta avaliação nos permite calcular a incerteza de medição associada à posição do máximo da banda do espalhamento Raman da água levando em consideração possíveis fontes de erro.

4.3.1.

Correlação entre os máximos do espalhamento Raman da água e da gaussiana

Por estar posicionado bem próximo à banda da clorofila a no espectro de fluorescência característico de medições em água, geralmente subtraímos do espectro medido, a banda referente ao espalhamento Raman da água, a fim de isolar a banda de clorofila. Porém, para efetivar esse procedimento precisamos ajustar uma curva que descreva bem esse parâmetro. Observamos que uma curva gaussiana poderia ser um bom ajuste e, portanto, é desta forma que descrevemos a banda do espalhamento Raman.

Realizamos uma série de medições em uma amostra de água pura a fim de se obter medidas do máximo do espalhamento Raman. Como medimos somente

amostras água, podemos afirmar que o máximo do espectro medido é pertinente ao máximo do espalhamento Raman da água. Em cada espectro ajustamos à curva gaussiana que melhor descrevesse a banda do Raman e verificamos uma ótima correlação entre estes dois parâmetros, com um coeficiente de correção de 99 % (figura 49).

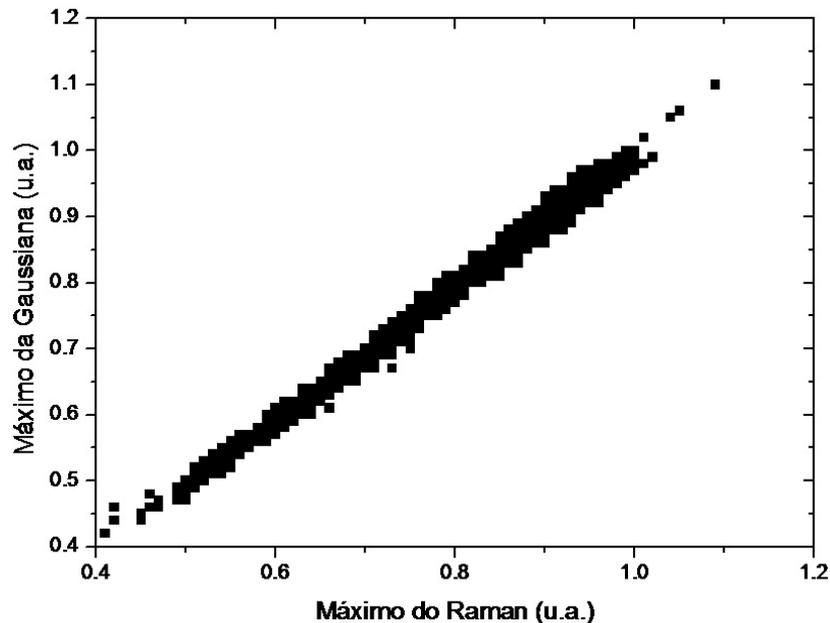


Figura 49 - Correlação entre o máximo do espalhamento Raman da água e o máximo da gaussiana ajustada a esta banda.

4.3.2.

Varição da posição do máximo do espalhamento Raman com parâmetros do equipamento

Dois parâmetros têm uma relevante importância para composição do sinal característico do sistema LIDAR: a tensão da fonte de alimentação, que está diretamente associada a potência do laser que, por sua vez, está associada ao número de moléculas excitadas, na amostra, pela radiação do laser; e o intensificador de imagem, que amplifica o sinal recebido pelo telescópio newtoniano.

O intensificador de imagem tem como função amplificar o sinal que chega ao telescópio newtoniano, porém, apesar desta amplificação ser fundamental à

visualização do sinal medido, ela não lhe é exclusiva, ou seja, ao se amplificar o sinal amplificar-se-á o ruído eletrônico.

Realizamos medições, com o LIDAR, de uma amostra de água pura, a temperatura constante, obtidas em intervalos de 32 pulsos do laser. As medidas obtidas no processo são referentes a 3 diferentes configurações da fonte de alimentação do laser e do intensificador de imagem, sendo uma delas a configuração usual de trabalho.

Tabela 7 - Configurações da fonte de alimentação e do intensificador de imagem para cada 10 medições.

Configurações	Fonte de Alimentação (F_A)	Intens. de Imagem (I. I.)
C1	450 V	900 V
C2	500 V	750 V
C3	550 V	680 V

Observamos que a posição média do máximo do espalhamento Raman decresce de forma sutil com o aumento da tensão da fonte de alimentação do laser e a da diminuição na tensão do intensificador de imagem, como pode ser visualizado no gráfico da figura 50.

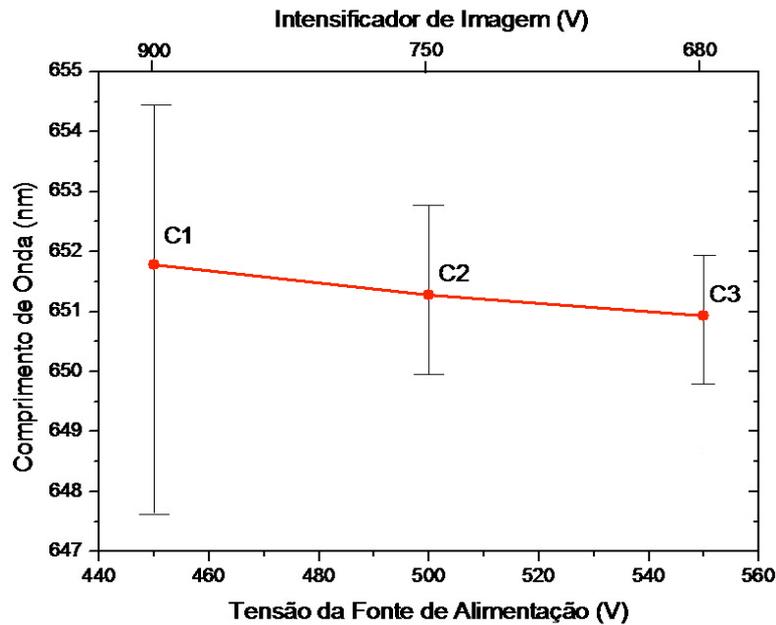


Figura 50 - A distribuição das medidas de posição do máximo do espalhamento Raman para as três configurações descritas na tabela 2. Os pontos vermelhos representam o valor médio da posição do máximo do Raman em cada distribuição.

É válido ressaltar, que de maneira similar a posição média do máximo do Raman, também se obtém um decréscimo da dispersão das medidas deste parâmetro de C1 para C3, ou seja, a dispersão das medidas aumenta quanto maior o ganho do intensificador de imagem e menor a tensão da fonte de alimentação. Esta observação era esperada, pois, os espectros característicos da configuração C1 são mais ruidosos.

4.3.3. Cálculo da incerteza de medição¹² da posição do máximo da banda do espalhamento Raman

Nas 20 repetições da medição realizadas em uma amostra de água, em intervalos de 16 pulsos do laser, obtivemos uma distribuição das medidas da

¹² A incerteza de medição é um parâmetro que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao mensurando e está associada ao resultado de uma medição (VIM, 2003).

posição do máximo do espalhamento Raman da água, como mostrado na figura 51.

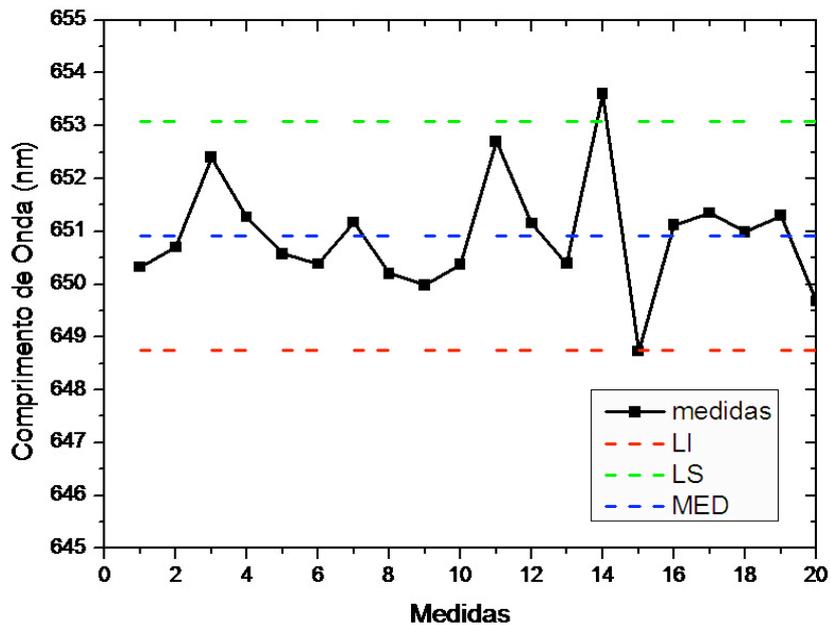


Figura 51 - Distribuição das 20 repetições da medição da posição do máximo da banda do espalhamento Raman da água para o intervalo de 16 pulsos, onde LI é o limite inferior, LS é o limite superior e MED é o valor médio. ($F_A = 500$ V; I.I. = 750 V; $\bar{\lambda} = 650,92$ nm)

Os limites inferior (LI) e superior (LS) foram estabelecidos, como sendo, duas vezes o desvio padrão. Como obtivemos apenas 20 repetições de medição aplicamos o coeficiente t-Student, para calcular a incerteza padrão do tipo A deste parâmetro, pois esta distribuição leva em consideração o fato de utilizarmos uma pequena amostragem. Dessa forma, a incerteza padrão do tipo A é dada por:

$$u_A = t(v) \times \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

onde s é o desvio padrão, n é o número de medições e $t(v)$ é o coeficiente t-Student.

O desvio padrão da distribuição da figura 51 é igual a 1,0838 nm e o número de medidas (n) é igual a 20. Consultando a tabela do coeficiente t-Student para um nível de confiança de 95,45%, obtivemos $t_{95,45\%}(20) = 2,14$, assim, temos que a incerteza do tipo A para essas observações é dada por:

$$u_A = 2,14 \times \frac{1,0838}{\sqrt{20}}$$

$$u_A = 0,51862 \text{ nm} \quad (10)$$

As incertezas padrão do tipo B consideradas para estas medidas devem-se à calibração dos detectores, a possíveis instabilidades da fonte de alimentação do laser, ao intensificador de imagem e à temperatura da amostra.

Podemos obter a incerteza padrão do tipo B através da seguinte equação:

$$u_B(y) = |c_i| \times u(x) \quad (11)$$

onde $|c_i|$ é o coeficiente de sensibilidade e é descrito como $c_i = \frac{\partial y}{\partial x}$.

O coeficiente de sensibilidade descreve como a estimativa de saída varia com as alterações nos valores das estimativas de entrada.

Como verificado no item 2.3.1 a posição do máximo do espalhamento Raman muda devido à variação de temperatura. Deste modo, utilizamos a equação de ajuste linear sob o gráfico da figura 5 para calcular o coeficiente de sensibilidade deste parâmetro.

$$y_t = 0,0395 x_t + 650,52$$

$$c_t = \frac{\partial y_t}{\partial x} = 0,0395 \quad (12)$$

Como o instrumento utilizado para monitorar a temperatura tem uma resolução de 0,5 °C concluímos que a incerteza padrão do tipo B da posição do máximo do Raman associada à temperatura é dada por:

$$u_B(t) = 0,01975 \quad (13)$$

Seguindo os mesmo cálculos descritos anteriormente calculamos a incerteza padrão do tipo B associada à fonte de alimentação do laser e ao intensificador de imagem, obtendo $u_B(t_f) = 0,085$ nm.

A calibração dos detectores, que associa cada pixel a um comprimento de onda do espectro eletromagnético, também foi levada em consideração, utilizando a curva de calibração e a resolução espacial de um pixel para calcular a incerteza padrão do tipo B associada a este parâmetro, como mostrada a seguir.

$$\begin{aligned} y_c &= 0,561 x_c + 356,73 \\ c_c &= \frac{\partial y_c}{\partial x_c} = 0,561 \\ u_B &= 0,561 \text{ nm} \end{aligned} \quad (14)$$

A incerteza padrão combinada é dada pela equação descrita abaixo:

$$u_c^2 = \sum_{i=1}^N u_i^2 \quad (15)$$

Substituindo em (16) as incertezas padrões calculadas anteriormente, obtemos a seguinte equação:

$$u_c = \sqrt{(0,51862)^2 + (0,01975)^2 + (0,085)^2 + (0,561)^2} \quad (16)$$

$$u_c = 0,77 \text{ nm}$$

A incerteza expandida é determinada multiplicando-se a incerteza combinada pelo fator de abrangência k . Para calcular o valor de k , com um nível de confiabilidade metrológica de 95,45 %, precisamos calcular, inicialmente, o grau de liberdade efetivo da combinação dessas incertezas.

O número de graus de liberdade efetivo é caracterizado pelo número de graus de liberdade associado à incerteza padrão combinada. Utilizamos a equação (17) de Welch-Satterthwaite (ISO-GUM, 1998), descrita a seguir, para estimar o número de graus de liberdade efetivo.

$$\frac{u_c^4}{v_{ef}} = \frac{u_1^4}{v_1} + \frac{u_2^4}{v_2} + K + \frac{u_i^4}{v_i} \quad (17)$$

Substituindo as incertezas padrão calculadas anteriormente e os graus de liberdade na equação 17, temos:

$$\frac{(0,77)^4}{v_{ef}} = \frac{(0,51862)^4}{19} + \frac{(0,01975)^4}{25} + \frac{(0,085)^4}{2} + \frac{(0,561)^4}{\infty} \quad (18)$$

$$v_{ef} = 91$$

Consultando a tabela t-Student, encontramos um valor de k , para esse nível de confiabilidade metrológica, igual a 2,02. Assim, a incerteza expandida (U) é igual a 1,6 nm.

Com a finalidade de compararmos a incerteza de medição associada a este parâmetro, obtivemos 80 medidas da mesma amostra de água em intervalo de 4 pulsos, sob as mesmas condições ambientais, agrupando-as quatro a quatro. Calculamos a média de cada grupo de modo que correspondessem a uma medição em intervalo de 16 pulsos, cuja distribuição pode ser observada na figura 52.

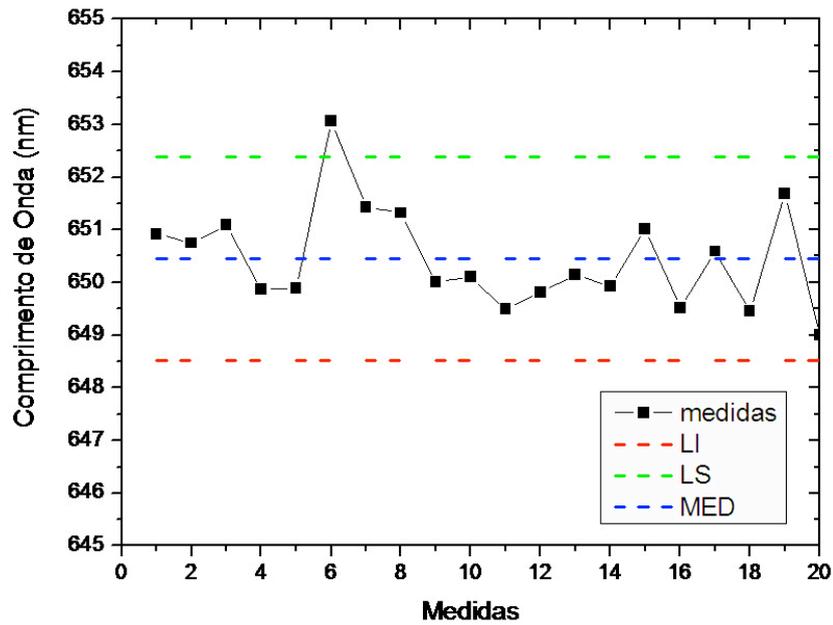


Figura 52 - Cada ponto da distribuição corresponde à média de quatro medições da posição do espalhamento Raman da água no intervalo de 4 pulsos. Os limites superior (LS) e inferior (LI) distam $\pm 2\sigma$ da média (MED). ($F_A = 500$ V; I.I. = 750 V; $\bar{\lambda} = 650,45$ nm)

Calculando a incerteza padrão do tipo A para a distribuição da figura 52 obtemos o seguinte resultado:

$$u_A = 2,14 \times \frac{0,9681}{\sqrt{20}} \quad (19)$$

$$u_A = 0,4633 \text{ nm}$$

Sendo as incertezas padrões do tipo B as mesmas calculadas anteriormente chegamos a uma incerteza padrão combinada igual a 0,73 nm. O fator de abrangência k associado a um grau de liberdade efetivo igual a 473 e nível de confiabilidade metrológica de 95,45 % é igual a 2,00. Multiplicando a incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência k, temos a incerteza expandida (U) igual a 1,5 nm.

Os resultados das medições da amostra de água descrita neste item são mostrados na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da medição da posição do espalhamento Raman da água.

Posição do máximo da banda do espalhamento Raman:	k	Resultado da Medição
Para espectros adquiridos em intervalos de 4 pulsos agrupados quatro a quatro.	2	$650,5 \pm 1,5 \text{ nm}$
Para espectros adquiridos em intervalos de 16 pulsos.	2,02	$650,9 \pm 1,6 \text{ nm}$

4.3.4.

Estudo da variação da posição do espalhamento Raman devido à passagem dos filtros de média móvel

Assim como realizado para banda associada à clorofila avaliamos os efeitos dos filtros de média móvel na banda do espalhamento Raman da água. Esta banda possui intensidade bem maior que qualquer outra no espectro de fluorescência medido pelo LIDAR, sendo mais evidenciada alteração na posição de seu máximo. Nos gráficos das figuras 53 comparamos a posição do espalhamento Raman da água sem e com filtro de média móvel para 7 e 15 pontos. Podemos perceber, também, que apesar do filtro de média móvel da interferir na distribuição das medidas, é responsável por deslocar a posição do máximo do espalhamento Raman da água, contribuindo para um possível erro ao se estimar a concentração de clorofila a.

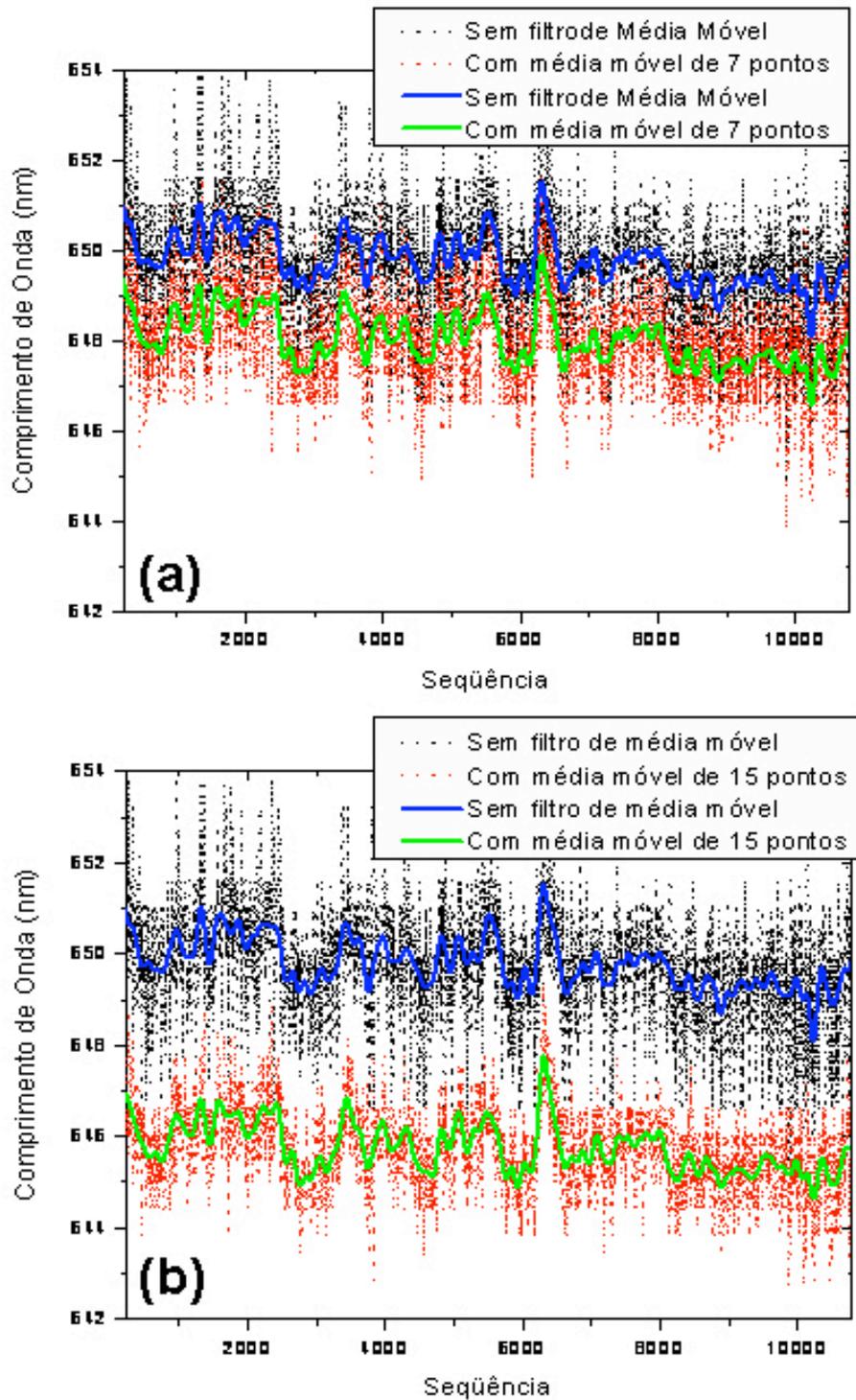


Figura 53 - Distribuição das posições do máximo do espalhamento Raman da água. (a) filtro de média móvel de 7 pontos; (b) filtro de média móvel de 15 pontos;

4.3.5.

Estudo das distribuições da concentração de clorofila a, MOD e intensidade do Raman para medições em águas oceânicas

No experimento com águas oceânicas percebemos certas anomalias nas distribuições das medidas de concentração de clorofila a, MOD e intensidade do espalhamento Raman da água para todas as estações de medição. Foi interessante perceber que estas anomalias pareceriam correlacionadas para estas grandezas. Pudemos verificar, ainda, que as características apresentadas pelo sinal de fluorescência detectado pelo LIDAR nestas estações anômalas seguiam o mesmo padrão de uma estação (Xoil 5), em particular, na qual foi observado sobre a água um filme fino, supostamente, correspondente a uma mancha de óleo. Contudo, este filme não foi observado visualmente nas outras estações.

Na figura 54 podemos perceber uma correlação entre a matéria orgânica dissolvida (MOD) e a clorofila a. Esta correlação poderia está associada *a priori* a um aumento populacional das algas, porém, não poderíamos descartar a possibilidade deste fenômeno estar associado a possíveis manchas de óleo na água.

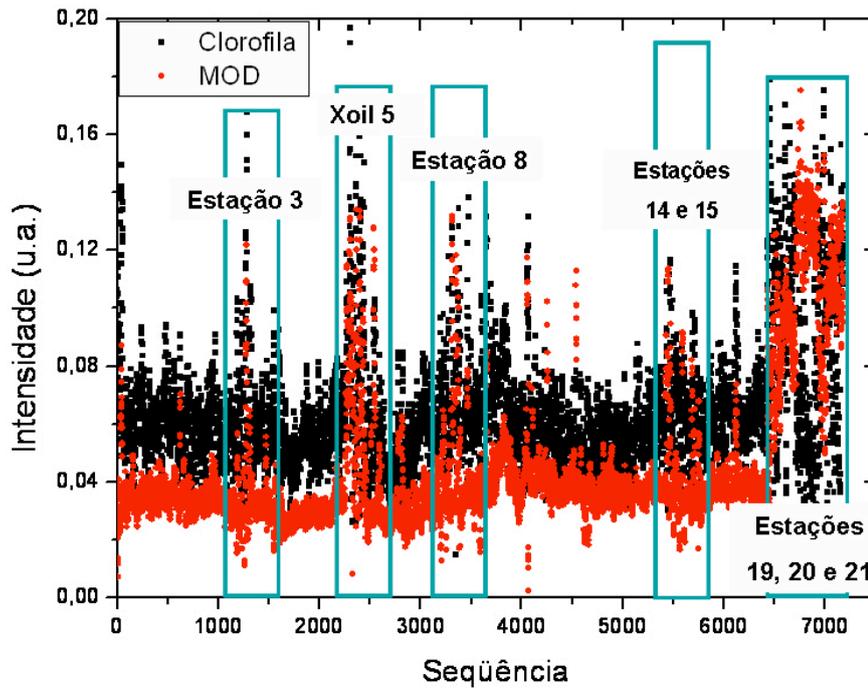


Figura 54 – Distribuição da concentração relativa de clorofila a e da concentração relativa da MOD para todas as estações medidas pelo LIDAR. As estações em destaque apresentam certa anomalia em relação às demais.

A teoria da presença de um filme fino de óleo foi reforçada quando deparamos nestas estações anômalas com a queda da intensidade do sinal do espalhamento Raman (figuras 55 e 56), o que poderia estar associada a uma baixa penetração do feixe do laser na água.

Nas figuras 55 e 56 percebemos que a queda do sinal do espalhamento Raman da água está associado ao aumento da concentração de clorofila a e da MOD. O curioso destes dados é que a presença de um filme de óleo deveria além reduzir a penetração do feixe do laser, aumentar a emissão fluorescente da matéria orgânica, porém não necessariamente, aumentar a emissão fluorescente da clorofila. É interessante destacar que as coletas realizadas em cada estação e processadas pelo Laboratório de Hidrobiologia da UFRJ não apresentaram um aumento populacional das espécies de algas analisadas.

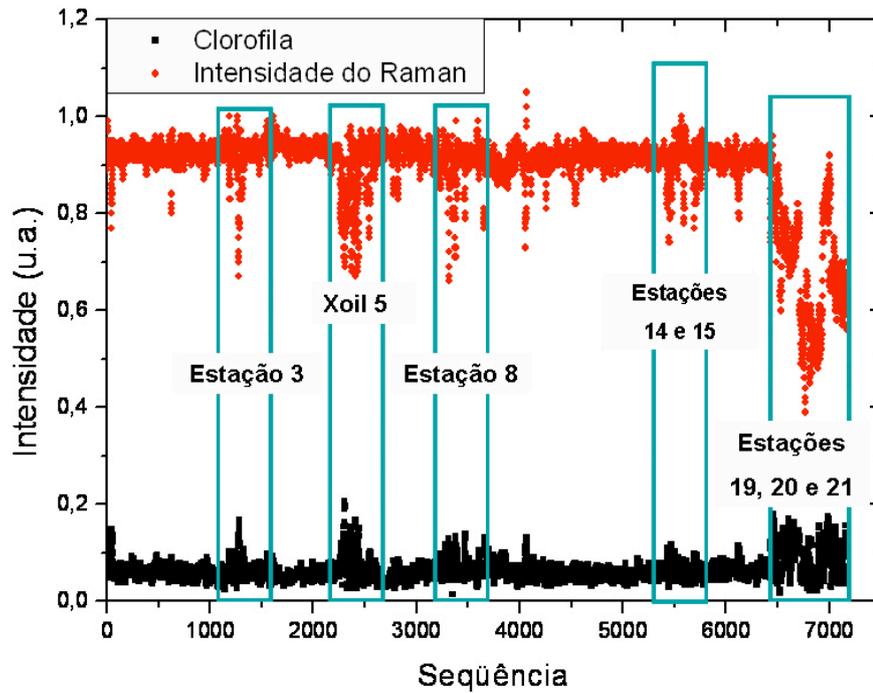


Figura 55 - Distribuição da concentração relativa de clorofila a e da intensidade do espalhamento Raman da água para todas as estações medidas pelo LIDAR. As estações em destaque apresentam resultados diferentes das demais.

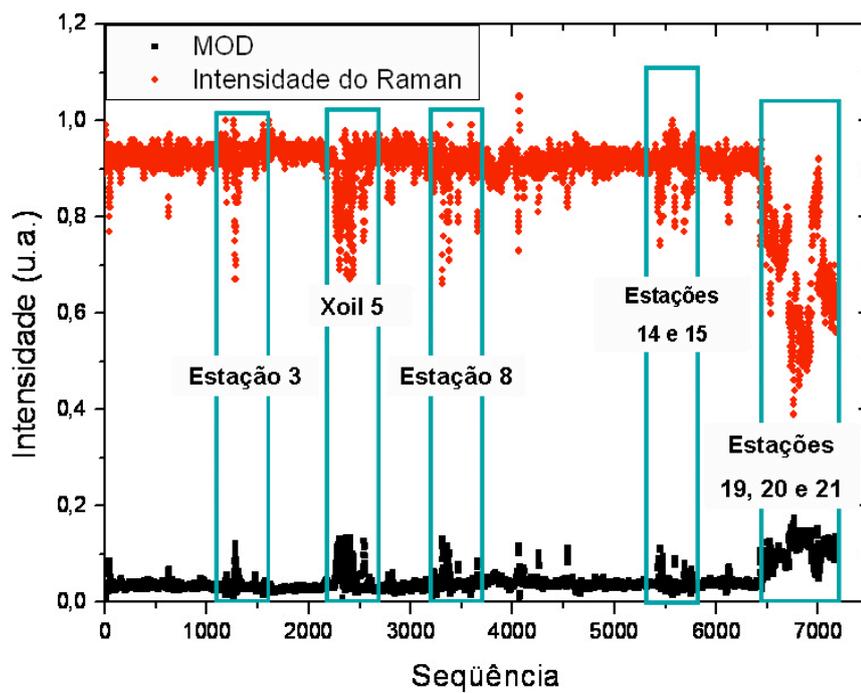


Figura 56 - Distribuição da concentração relativa de MOD e da intensidade do espalhamento Raman da água para todas as estações medidas pelo LIDAR. As estações em destaque apresentam resultados diferentes das demais.