



**Paulo Cesar de Campos Barbosa**

**Aplicações de Fluorescência Induzida por Laser em  
Monitoramento Ambiental**

**Tese de Doutorado**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-  
Graduação em Física da PUC-Rio.

Orientador: Raul Almeida Nunes

Rio de Janeiro, julho de 2003



**Paulo Cesar de Campos Barbosa**

## **Aplicações de Fluorescência Induzida por Laser em Monitoramento Ambiental**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Física da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

**Prof. Raul Almeida Nunes**

Orientador

Departamento de Ciências dos Materiais e Metalurgia - PUC-Rio

**Dra. Heloísa Vargas Borges**

IBAMA

**Prof. Isabel Cristina dos Santos Carvalho**

Departamento de Física - PUC-Rio

**Dr. José Antônio Moreira Lima**

Petrobras

**Profa. Margareth Simões Penello Meirelles**

UERJ

**Prof. Rodolfo Pinheiro da Rocha Paranhos**

UFRJ

**Prof. Ney Augusto Dumont**

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 13 de agosto de 2003

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

### **Paulo Cesar de Campos Barbosa**

Graduado em Física pela PUC-Rio em 1997, mestre em Física pela PUC-Rio em 1999. Analista de sistemas do Centro de Pesquisas da Petrobras, trabalha com automação de laboratórios e outros desenvolvimentos de sistemas.

#### Ficha Catalográfica

Barbosa, Paulo Cesar de Campos

Aplicações de fluorescência Induzida por laser em monitoramento ambiental / Paulo Cesar de Campos Barbosa; orientador: Raul Almeida Nunes. – Rio de Janeiro : PUC, Departamento de Física, 2003.

[19], 120 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física.

Inclui referências bibliográficas.

1. Física – Teses. 2. Fluorescência. 3. Laser. 4. Fitoplâncton. 5. Meio ambiente. 6. Clorofila. 7. Lidar. 8. Sensoriamento remoto. I. Nunes, Raul Almeida. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física.

CDD: 530

À Silvia, pelo apoio e a Felipe e Ana Clara, pela inspiração.

A minha mãe, pela força. A meu pai, pelo exemplo.

## Agradecimentos

Ao Rodolfo Paranhos, pelo apoio imprescindível. À Eliane Gonzales pela abertura para cooperação. À Cristina Bentz, pela pronta e prestimosa cooperação.

Ao Flávio, Délio, Fernando José e demais colegas do Cenpes, pelo apoio descompromissado.

À Capes, à Petrobras e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado. Ao programa RHAE-MCT, ao IEAPM e à FEEMA que também apoiaram esta iniciativa.

A todos os professores e funcionários da PUC-Rio com os quais interagi, em particular ao Marcos Henrique, pela ajuda e pelo conhecimento disponibilizado.

Ao Raul, especialmente, pelo exemplo, pela capacidade de compreender, pela sensibilidade ao distender e pressionar nas horas certas, pelo engajamento às boas causas e, sobretudo, pelo privilégio do convívio e da amizade. E pelo excelente café...

## Resumo

Barbosa, Paulo Cesar. **Aplicações de Fluorescência Induzida por Laser em Monitoramento Ambiental**. Rio de Janeiro, 2003. 139p. Tese de Doutorado – Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A tomada de consciência dos riscos ambientais em escala global e o desenvolvimento científico e tecnológico têm incrementado a demanda pelo sensoriamento das condições ambientais marítimas.

A distribuição da população do fitoplâncton é o indicador mais utilizado para avaliar a qualidade e a biomassa de ambientes marinhos. Uma característica diferencial do fitoplâncton é a presença da clorofila *a*, que apresenta fluorescência *in vivo* na região do vermelho do espectro visível, e que permite o uso de técnicas de sensoriamento remoto para sua detecção.

Um radar-laser baseado na detecção da fluorescência do alvo é mais comumente denominado LIF-LIDAR (*Laser Induced Fluorescence - Light Detection And Ranging*) e se constitui em uma ferramenta útil para o monitoramento da distribuição de clorofila *a* nos oceanos, principalmente quando se utiliza uma radiação laser na faixa de comprimento de onda associada à cor verde.

O LIDAR-PUC, cuja fonte de excitação é o 2<sup>o</sup> harmônico de um laser de Nd-YAG, foi ajustado para a detecção e discriminação espectral de emissões inelásticas decorrentes da excitação a 532nm; em especial, a fluorescência da clorofila *a*.

Nesta tese foram desenvolvidos algoritmos para a extração de parâmetros de interesse ambiental, em especial a concentração relativa da clorofila *a*. Estas metodologias foram testadas quanto a sua repetitividade, linearidade e aplicabilidade em ambiente real. Finalmente, os valores calculados foram analisados em conjunto, indicando sua utilidade para o monitoramento efetivo de ambientes marinhos.

## Palavras-chave

Fluorescência; laser; sensoriamento remoto; LIDAR; clorofila; meio ambiente; fitoplâncton; LIF

## Abstract

Barbosa, Paulo Cesar. **Applications of Laser Induced Fluorescence to Environmental Monitoring**. Rio de Janeiro, 2003. 139p. PhD Thesis - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Global scale environmental risks and scientific and technological development have increased demands on marine environment monitoring.

Phytoplankton distribution is the most frequently used marker employed to assess biomass in marine environment. Analysis of chlorophyll-a plays a central role on phytoplankton studies once this pigment, present in every phytoplankton algae species, exhibits fluorescence in the red region of visible spectrum, thus allowing its detection by remote sensing techniques.

A radar-laser based on fluorescence detection, usually called a LIF-LIDAR (Laser Induced Fluorescence - LIght Detection And Ranging), is a valuable tool for monitoring chlorophyll-a distribution in ocean waters, especially when green light lasers are employed.

LIDAR-PUC was settled to function with its second harmonic Nd-YAG laser as excitation source. The equipment was adjusted for detection and spectral discrimination of inelastic emissions resulting from excitation at 532nm, with special attention to chlorophyll a fluorescence.

In this study, algorithms were developed for the extraction of environmental parameters such as relative chlorophyll a concentration. These algorithms were analyzed regarding the following aspects: repeatability, linearity and applicability to the real world. Finally, ensembles were analyzed, pointing to their usefulness for effective marine environment monitoring.

## Palavras-chave

Fluorescence; laser; remote sensing; LIDAR; chlorophyll; environment; phytoplankton; LIF

## Sumário

1 Introdução	20
2 Objetivos	27
3 Aspectos Teóricos	29
3.1. Espalhamentos Inelásticos	29
3.1.1. Fluorescência	29
3.1.2. Espalhamento Raman	36
3.2. Fotossíntese	40
3.3. Normalização de sinal de fluorescência pelo espalhamento Raman da água	46
4 Materiais e Métodos	50
4.1. LIDAR-PUC	50
4.2. Configuração e montagem	53
4.2.1. Medidas Embarcadas	56
4.2.2. Medidas em laboratório	57
4.3. Medidas com fluorímetro e espectrofotômetro	58
4.4. Extração das bandas de interesse	59
4.5. Estatística Espacial	62
4.5.1. Semivariograma	62
4.5.2. Kriging	63
4.5.3. Coeficiente de correlação e coeficiente de correlação localizado	65
4.6. Fator de ajuste para equação linear	65
4.7. Desconvolução de espectros	66
5 Experimentos	71
5.1. Variação da posição do pico do espalhamento Raman com a Temperatura	71



5.2. Estudo de replicatas	74
5.3. Avaliação da correlação entre concentrações relativa e absoluta de clorofila <u>a</u>	75
5.3.1. Avaliação de linearidade das concentrações relativa e absoluta de Clorofila <u>a</u> em águas costeiras	75
5.3.2. Medidas sobre culturas de algas	76
5.3.3. Estudo de mesocosmo – simulação da Baía de Guanabara	80
5.3.4. Medidas temporais de águas de uma mesma localidade	83
5.3.5. Comparação entre medidas <i>in situ</i> e amostras testemunho	86
5.4. Mapas Sinóticos	88
5.4.1. Região do entorno da plataforma de Pargo	90
5.4.2. Região do emissário da estação de tratamento de efluentes de Cabiúnas	97
5.4.3. Região do emissário submarino de Ipanema	108
5.4.4. Região de alto mar, Bacia de Campos	114
6 Discussão e Conclusões	125
7 Referências Bibliográficas	133

## Abreviações

[Cl-abs] – Concentração absoluta de clorofila a

[Cl-rel] – Concentração relativa de clorofila a

DPR% – Desvio Padrão Relativo percentual

IEAPM – Instituto de Estudos Oceanográficos Almirante Paulo Moreira

LIDAR – *Light Detection And Ranging*

LIF – *Laser Induced Fluorescence*

MOD – Matéria Orgânica Dissolvida.

UTM – Sistema de coordenadas *Universal Transverse Mercator*.

## Lista de figuras

- Figura 1 - A função de onda vibracional no estado eletrônico excitado com maior coincidência com a função de onda vibracional anterior, no estado fundamental, terá maior probabilidade de ocorrer. 30
- Figura 2 - Esquema de excitação e decaimento dos elétrons. Os níveis excitados à esquerda exemplificam estados singletos. O nível eletrônico excitado da direita representa um tripleto. 32
- Figura 3 - Possibilidades de composição de spins para um par de elétrons 32
- Figura 4 - Espectro de fluorescência de água costeira medido pelo LIDAR-PUC. O pico da emissão Raman está em 651nm (excitação em 532nm). 37
- Figura 5 - Esquema dos espalhamentos Rayleigh (elástico) e Raman(inelástico).40
- Figura 6 - Cloroplasto. Os tilacóides são os filamentos observados, em geral agrupados nos grana. 41
- Figura 7 - Espectros de absorção de diferentes pigmentos presentes nas membranas tilacóides, comparados com o espectro da luz do sol que atinge a superfície da Terra 43
- Figura 8 - Esquema da disposição das estruturas moleculares nas membranas tilacóides. 44
- Figura 9 - Diagrama do LIDAR: (1) Oscilador dos pulsos de *strobe*, (2) sistema de controle do CCD, (3) Câmera CCD, (4) Conjunto de lentes, (5) intensificador de imagem, (6) monocromador, (7) cabo de fibra óptica, (8) filtro, (9) telescópio, (10) Espelho rotativo, (11) filtro, (12) gerador de 3º harmônico, (13) dobrador de frequência, (14) laser, (15) sistema de refrigeração, (16) fonte de alimentação do laser, (17) eletrônica de controle do LIDAR, (18) Computador. 51
- Figura 10 - Linha superior: Controle da lâmpada; linha do meio: controle do *Q-switch*; linha inferior: controle do intensificador de imagens. Os valores embaixo de cada coluna especificam a duração de cada intervalo de tempo.53
- Figura 11 – Espectros dos leds de calibração 55
- Figura 12 - Esquema de instalação do LIDAR no navio Astro-Garoupa 56

Figura 13 - Esquema de funcionamento do LIDAR em laboratório	57
Figura 14 - As linhas verdes representam a configuração coaxial e as linhas azuis a configuração não-coaxial.	58
Figura 15 - Ajuste de uma curva gaussiana à banda do espalhamento Raman para águas oceânicas (oligotróficas).	60
Figura 16 - Faixas de interesse das bandas de clorofila $a$ e MOD após a subtração da emissão Raman.	60
Figura 17 – Composição do espectro do LIDAR para águas costeiras.	61
Figura 18 – Curva de transmissão do filtro QC13, utilizado para impedir que a radiação do 2° harmônico do laser de Nd-YAG atinja o detector.	69
Figura 19 – Espectro do LIDAR, com presença da radiação do laser retroespalhada elasticamente (área em destaque). O pico do laser foi utilizado como função de transferência do sistema de detecção.	69
Figura 20 – Espectro original, espectro corrigido pela distorção do filtro QC13 e espectro desconvoluído e corrigido.	70
Figura 21 – Sobreposição dos picos de espalhamento Raman de monômeros e polímeros da água. A salinidade e a temperatura interferem na formação das pontes de hidrogênio que afetarão os modos vibracionais da molécula de água, alterando a relação entre os dois picos.	72
Figura 22 - Relação entre a temperatura e a posição do pico da gaussiana ajustada à banda do espalhamento Raman.	74
Figura 23 - Ajuste linear entre concentração clorofila $a$ x concentração relativa de clorofila $a$	76
Figura 24 - Ajuste linear para as relações entre concentração relativa e concentração absoluta de clorofila $a$ para as diferentes culturas de algas.	78
Figura 25 - Bandas de clorofila $a$ com gaussiana ajustada. A área preenchida é a utilizada na integração da contribuição da clorofila $a$ no espectro de fluorescência.	80
Figura 26 - relação da clorofila $a$ relativa, obtida com o LIDAR e clorofila $a$ absoluta (método fluorimétrico). Os pontos azuis indicam medidas realizadas no 1° dia, vermelho no 3° dia, amarelo no 5° dia, preto no 6° dia e verde no 7° dia.	81
Figura 27 - Intensidades comparadas entre os dias. Os espectros obtidos em cada	

dia foram somados e normalizados pela altura do pico do espalhamento Raman, para comparação. Azul: 1° dia; vermelho: 3° dia; amarelo: 5° dia; verde: 7° dia. 82

Figura 28 – Variação da temperatura com o tempo. A linha vermelha indica o limite da temperatura para caracterização de águas do tipo ACAS. 85

Figura 29 – Ajuste de curvas para o conjunto de dados de amostras coletadas em um mesmo local. Os conjuntos foram classificados como “anterior” e “posterior” à linha de corte definida na Tabela 4. 85

Figura 30 - Ajuste linear para concentrações absoluta e relativa de clorofila a para medidas realizadas em alto mar. 87

Figura 31 - Ajuste linear para as concentrações absoluta e relativa para águas costeiras 88

Figura 32 – Legenda de cores utilizada para os mapas. As cores foram distribuídas entre os valores mínimo e máximo de cada *grid*. 89

Figura 33 – Mapa da bacia de Campos com as regiões estudadas. 1- Entorno da plataforma de Pargo. 2- Próximo à estação de tratamento de efluentes de Cabiúnas, 3- Região superior próxima à foz do rio Paraíba do Sul. 90

Figura 34 - Mapa sinótico gerado por *kriging* simples - valor máximo: 0,1488; valor mínimo: 0,0830. 91

Figura 35 - Mapa sinótico de concentração relativa de clorofila a, gerado por *kriging* ordinário - valor máximo: 0,1559; valor mínimo: 0,0540. 92

Figura 36 – Variação dos valores da concentração relativa de clorofila a interpolada (por *kriging* ordinário) para diferentes seções no mapa da Figura 35. 93

Figura 37 - Valores da concentração relativa de clorofila a obtidos a partir dos espectros (observado) e valores recalculados, para os mesmos pontos, da concentração relativa clorofila a a partir do modelo gerado por *kriging* simples (calculado). 93

Figura 38 –Valores da concentração relativa de clorofila a obtidos a partir dos espectros (observado) e valores recalculados, para os mesmos pontos, da concentração relativa clorofila a a partir do modelo gerado por *kriging* ordinário (calculado). 94

Figura 39 - Mapa sinótico de concentração relativa de MOD, gerado por *kriging*

simples. valor máximo: 0,0439; valor mínimo: 0,0303.	95
Figura 40 - Mapa sinótico de concentração relativa de MOD, gerado por <i>kriging</i> ordinário - valor máximo: 0,0552; valor mínimo: 0,0217.	95
Figura 41 - Coeficiente de correlação entre MOD e clorofila <u>a</u> relativa, localizado. Raio de definição de proximidade: 550m.	96
Figura 42 - Mapa de distribuição de [Clorofila <u>a</u> ] superposto com a informação da correlação localizada entre as concentrações relativas de MOD e clorofila <u>a</u> . Coeficiente de correlação entre clorofila <u>a</u> e MOD de medidas próximas (550m, conforme o círculo). Coeficiente de +correlação: maior que 0,35 (● - correlacionados), entre 0,35 e -0,35 (● - descorrelacionados) e menor que -0,35 (● - anticorrelacionados). O fundo colorido mostra a variação da concentração relativa de clorofila <u>a</u> .	97
Figura 43 - Valores observados e calculados de clorofila <u>a</u> relativa utilizando <i>kriging</i> simples.	98
Figura 44 – Mapa de clorofila <u>a</u> relativa gerado por <i>kriging</i> ordinário. Os <i>transects</i> coloridos indicam a posição das seções utilizadas na Figura 46.	99
Figura 45 - Valores observados e calculados de clorofila <u>a</u> relativa utilizando <i>kriging</i> ordinário.	100
Figura 46 – Valores interpolados da concentração relativa de clorofila <u>a</u> para os pontos das seções ilustradas na Figura 44.	101
Figura 47 – Valores de concentração relativa de clorofila <u>a</u> interpolada para seções sobrepostas à trajetória do barco. As barras pretas acompanham a transição para região com menor população fitoplanctônica.	102
Figura 48 - Locais de amostragem de testemunhos. O asterisco mostra a posição do dispersor do emissário da estação de tratamento de efluentes de Cabiúnas.	103
Figura 49 - Relação entre concentração relativa de clorofila <u>a</u> e concentração absoluta de clorofila <u>a</u>	103
Figura 50 - Mapa de concentração absoluta de clorofila <u>a</u> . A barra à direita mostra a relação entre as cores apresentadas e a concentração de clorofila <u>a</u>	104
Figura 51 – Intensidade do pico do espalhamento Raman para cada uma das medidas realizadas.	105
Figura 52 - Mapa de distribuição de MOD gerado por <i>kriging</i> ordinário	106

- Figura 53 - Mapa de distribuição de [Clorofila a] superposto com a informação da correlação localizada entre as concentrações relativas de MOD e clorofila a. Coeficiente de correlação entre clorofila a e MOD de medidas próximas (1500m, conforme o círculo). Coeficiente de +correlação: maior que 0,35 (● - correlacionados), entre 0,35 e -0,35 (● - descorrelacionados) e menor que -0,35 (● - anticorrelacionados). O fundo colorido mostra a variação da concentração relativa de clorofila a. Correlação MOD x clorofila a relativa. Os valores dos coeficientes de correlação estão coligidos na Figura 54, com os pontos coloridos como referenciados neste mapa. 107
- Figura 54 - Coeficiente de correlação localizada entre concentrações relativas de MOD e clorofila a. Raio de definição de proximidade: 1500m. 108
- Figura 55 - Valores observados e calculados de clorofila a relativa utilizando *kriging* simples. 109
- Figura 56 - Valores observados e calculados de clorofila a relativa utilizando *kriging* ordinário 110
- Figura 57 - Mapa de clorofila a relativa gerado por *kriging* ordinário 110
- Figura 58 - Mapa de distribuição de [Clorofila a] superposto com a informação da correlação localizada entre as concentrações relativas de MOD e clorofila a. Coeficiente de correlação entre clorofila a e MOD de medidas próximas (550m, conforme o círculo). Coeficiente de +correlação: maior que 0,35 (● - correlacionados), entre 0,35 e -0,35 (● - descorrelacionados) e menor que -0,35 (● - anticorrelacionados). O fundo colorido mostra a variação da concentração relativa de clorofila a. Correlação MOD x clorofila a relativa. Os valores dos coeficientes de correlação estão coligidos na Figura 59, com os pontos coloridos como referenciados neste mapa. 111
- Figura 59 - Coeficiente de correlação localizado entre concentrações relativas de MOD e clorofila a. Raio de definição de proximidade: 550m. 112
- Figura 60- Valores observados e calculados de concentração relativa de MOD utilizando *kriging* ordinário. 113
- Figura 62 – Comparação de espectros. O espectro em vermelho foi obtido na região de maior fluorescência de clorofila (n. 12). O espectro em verde foi obtido nesta campanha em região mais próxima à costa. O espectro em preto é característico de áreas costeiras. O espectro em azul é característico de alto

- mar (águas oligotróficas). 114
- Figura 63 - Mapa de clorofila  $a$  relativa gerado por *kriging* ordinário 115
- Figura 64 - Valores observados e calculados de clorofila  $a$  relativa utilizando *kriging* ordinário. 116
- Figura 65 - Coeficiente de correlação entre MOD e clorofila  $a$  relativa, localizado. Raio de definição de proximidade: 1500m. 117
- Figura 66 - Mapa de distribuição de [Clorofila  $a$ ] superposto com a informação da correlação localizada entre as concentrações relativas de MOD e clorofila  $a$ . Coeficiente de correlação entre clorofila  $a$  e MOD de medidas próximas (1500m, conforme o círculo). Coeficiente de +correlação: maior que 0,35 (● - correlacionados), entre 0,35 e -0,35 (● - descorrelacionados) e menor que -0,35 (● - anticorrelacionados). O fundo colorido mostra a variação da concentração relativa de clorofila  $a$ . Correlação MOD x clorofila  $a$  relativa. Os valores dos coeficientes de correlação estão coligidos na Figura 65, com os pontos coloridos como referenciados neste mapa. 117
- Figura 67 - Comparação entre concentração relativa de clorofila  $a$  e coeficiente de correlação localizado entre concentração relativa de clorofila  $a$  e concentração relativa de MOD. As intensidades de concentração estão associadas ao eixo vertical esquerdo (azul) e os coeficientes de correlação estão associados ao eixo direito (preto). O eixo horizontal apresenta a distância entre os locais de medição adjacentes. 118
- Figura 68 – Localização dos pontos de amostragem tendo como fundo o mapa da concentração relativa da clorofila  $a$ . A altura das hastes representa a intensidade da concentração absoluta de clorofila  $a$ . 119
- Figura 69 – Comparação entre as médias locais (raio de 2500m) das concentrações relativas de clorofila  $a$  (preto) e MOD (azul) 120
- Figura 70 – Imagem RADARSAT – modo ScanSAR Narrow A - da região de estudo. As manchas escuras foram ressaltadas. 121
- Figura 71 – Mapa de concentração relativa de clorofila  $a$ , sobreposto à imagem de radar. A razão de aspecto do mapa foi transformada para a apresentação de pixel quadrado, conforme a imagem de satélite. 122
- Figura 72 – *Transects* nos mapas gerados. 1° mapa: região de Cabiúnas, *transect* 1; 2° mapa: região da plataforma de Pargo, *transect* 2; 3° mapa: região de alto



mar, *transect* 3.

129

Figura 73 – Comparação dos valores calculados da concentração relativa de clorofila  $a$  nos *transects* apresentados na Figura 72. Os *transects* não estão em escala. O *transect* 1 tem 14,5km, o *transect* 2 tem 4,0km e o *transect* 3 tem 63,8km. Em relação aos mapas, os *transects* estão com seus pontos aqui alinhados da esquerda para a direita.

130

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Concentração de clorofila, em $\mu\text{g/l}$ , da cultura padrão.	77
Tabela 2– Tabela com as equações dos ajustes lineares apresentados na Figura 24, com seus fatores de ajuste respectivos.	78
Tabela 3– Lista dos coeficientes de correlação entre as concentrações relativas de MOD e clorofila $a$ .	82
Tabela 4 – Dados comparativos entre concentração relativa e concentração absoluta de clorofila $a$ .	84
Tabela 5 – Concentração absoluta de clorofila $a$ para as amostra de testemunho	119

Desaprender 8 horas por dia  
Ensina os princípios.

Manoel de Barros