

1 Introdução

Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície terrestre e, compreensivelmente, têm papel fundamental no equilíbrio ecológico do planeta. As atividades humanas não poupam de interferência qualquer ecossistema e avançam cada vez mais sobre o ambiente marinho. Sob esta pressão histórica e econômica, a sociedade é instada a melhor conhecer e monitorar os mares, tanto para a exploração de suas riquezas quanto para a preservação de seus recursos. A disseminação da compreensão da interligação dos fenômenos naturais em escala global reforça esta necessidade, trazendo à pauta de nossa civilização a busca de estabilidade nas condições ambientais e de equilíbrio na utilização de energia.

A cada ano, 10^{17} kJoule de energia livre do sol é capturada e utilizada para biossíntese pelos organismos fotossintéticos. Isto é mais de dez vezes o consumo anual mundial de energia gerada por combustível fóssil (mesmo este, produtos de fotossíntese ocorrida a milhões de anos).

As células fotossintetizadoras produzem O_2 e carboidratos às expensas de CO_2 e H_2O produzidos pelas células heterotróficas, que, por sua vez, consomem O_2 e carboidratos. Portanto, os organismos heterotróficos e os fotossintetizadores vivem em equilíbrio na biosfera. O ser humano, imerso neste ambiente, depende fundamentalmente de suas interações com os organismos fotossintetizadores para a continuidade de sua sobrevivência. O desenvolvimento de equipamentos e metodologias que quantifiquem a massa orgânica existente, em diferentes escalas, e a sua dinâmica *in vivo* (controlada pela variação de diversos parâmetros) é requisito básico para a compreensão dos processos de produção natural de energia e equilíbrio ambiental.

Estes processos de quantificação devem se valer dos fenômenos naturais que podem ser diretamente observados no meio físico. A fluorescência é a denominação que se dá ao espalhamento inelástico de luz gerado pelo decaimento de estados excitados para o estado fundamental em intervalo de tempo menor que 10^{-5} s [Skoog & Leary, 1992]. As principais estruturas moleculares que exibem fluorescência são as moléculas com anéis de carbono com ligações duplas. Os

aparatos fotossintéticos presentes tanto nas plantas superiores como no fitoplâncton, incluindo as cianobactérias, contém proteínas diretamente associadas à captura de fótons (pigmentos-antena), que dispõem de anéis de carbono e que apresentam fluorescência. A clorofila *a* é um desses pigmentos e está presente em todos os seres que executam a fotossíntese [Raven et *alli*, 1978].

Como o fitoplâncton (incluindo as cianobactérias) é o único material em suspensão nos oceanos que contém clorofila, este pigmento tem sido utilizado como marcador da biomassa fitoplanctônica [Falkowski & Kolber, 1995]. A fluorescência natural da clorofila *a*, que apresenta um máximo em torno de 685nm, é um parâmetro utilizado para se estimar a quantidade de clorofila *a* presente em uma determinada amostra.

Apesar de se saber que a razão carbono/clorofila das comunidades fitoplanctônicas naturais é variável, a baixíssima concentração de pigmentos na água do mar faz da fluorescência da clorofila *a* o sinal mais específico que pode ser convenientemente medido em tempo real (e associado à biomassa), seja *in situ* ou remotamente [Falkowski & Kolber, 1995], e uma medida padrão para se estimar a biomassa nos oceanos.

Monitorar a fluorescência dos pigmentos para obter informações do sistema fotossintético de produção primária de energia é uma idéia com virtudes: a fluorescência é percebida externamente ao organismo fotossintetizante, podendo ser detectada de maneira não invasiva e não destrutiva; além disso, pode ser detectada à distância, permitindo, assim, o uso de técnicas de sensoriamento remoto. Medidas de fluorescência podem ser realizadas em diferentes escalas, tanto espaciais (de micrômetros a quilômetros) como temporais (de microssegundos a meses).

Medidas em tempo-real são particularmente interessantes para entender as respostas fotossintéticas do fitoplâncton uma vez que essas algas não são fixas no espaço. Relacionar seu movimento com a hidrodinâmica dos oceanos requer medições em escalas temporal e espacial adequadas.

A tomada de consciência dos riscos ambientais em escala global e o desenvolvimento científico e tecnológico têm incrementado a demanda por sensoriamento das condições ambientais de grandes áreas do mar. O impacto dessas pesquisas vão desde a previsão de “marés vermelhas” (ocorrências explosivas de crescimento de algas tóxicas, ingeridas por moluscos que podem

ser, eventualmente, ingeridos pelos homens) que provocam intoxicação em milhares de pessoas todos os anos, até a organização de turismo sustentável nesses ambientes. Os sistemas para sensoriamento remoto desenvolvidos para estes fins estão, geralmente, embarcados em satélites ou aeronaves, mas conjuntos de bóias ou equipamentos instalados em navios também já são utilizados para compor redes de informação ambiental.

Para avaliar remotamente a quantidade de clorofila a presente em reservatórios naturais de água, duas categorias de medições são empregadas: as técnicas passivas e as ativas. Os métodos passivos procuram medir as alterações da radiação eletromagnética proveniente da água, seja ela absorvida ou espalhada (elástica ou inelasticamente), sem fazer incidir sobre o alvo qualquer fonte artificial de radiação, e correlacioná-la à concentração de clorofila. Em óbvia contrapartida, os métodos ativos utilizam um fonte de “excitação” artificial.

O espectro de emissão luminosa natural das massas d’água é afetado por um grande número de fatores físico-químicos. A radiação solar, as condições atmosféricas e a latitude, além da própria composição da matéria orgânica e inorgânica presente são alguns dos principais fatores de interferência. A identificação da assinatura da clorofila a , através de seu espectro de absorção é complexa e nem sempre categórica. Diversos trabalhos foram e estão sendo desenvolvidos para modelar o espectro de emissão natural [CoastLooc Server] para diferentes aplicações, uma vez que esta medida é atualmente a metodologia mais adequada a ser empregada quando utiliza-se equipamentos embarcados em satélites. Em termos gerais, algumas faixas espectrais são convenientemente escolhidas, de acordo com os espectros de absorção da água do mar, da clorofila a e, eventualmente, de algum outro pigmento acessório importante. De acordo com esses espectros, é criado um modelo de irradiação correlacionando as faixas selecionadas e os pigmentos. Então, um grande conjunto de medidas com provas de campo é efetuado e o modelo é ajustado empiricamente, através de métodos de regressão linear, para calcular a quantidade de clorofila. Esta metodologia já se mostra bastante eficiente em seus resultados para águas oligotróficas, onde a composição da matéria orgânica dissolvida é praticamente toda devida à decomposição do próprio fitoplâncton e, portanto, as intensidades das diferentes faixas espectrais apresentam-se de alguma forma correlacionadas com a quantidade da clorofila presente. A detecção da fluorescência naturalmente

induzida da clorofila a é uma tecnologia que parece ser promissora para ser embarcada em satélites. Seu maior entrave é a dificuldade de distinguir o baixo sinal decorrente da fluorescência do restante da radiação de fundo.

Considerando as técnicas ativas: a utilização de uma fonte artificial de luz gera no meio uma conseqüente perturbação. Um sistema detector irá registrar a excitação gerada pela fonte artificial superposta à emissão natural. Este sinal de fundo poderá ser subtraído medindo-se com o mesmo detector a emissão em um instante próximo anterior, portanto não submetido à fonte artificial, minimizando os efeitos de uma série dos fatores que alteram a composição da radiação retroespalhada desde a massa d'água até o detector.

Para medir remotamente a fluorescência da massa d'água é desejável uma alta potência de excitação. Lasers pulsados são adequados para esta finalidade. Algumas características dos lasers devem ser levadas em conta na análise de sua utilização no sensoriamento de clorofila a : por um lado, a excitação a partir de fótons com energia bem definida no espectro de excitação gera um espectro de emissão bem definido, associado à frequência (portanto, à energia) desses fótons e, deste modo, comparável aos dados laboratoriais (ao contrário da luz solar, que excita os fluoróforos com todo o espectro de excitação). Por outro lado, a dificuldade de sintonizar frequências diferentes, com a potência de radiação desejada, é um fator limitante. A pouca divergência do feixe do laser, fundamental para uma adequada relação de potência por unidade de área excitada, produz medidas pontuais; este fato deve ser levado em conta no tratamento estatístico das informações. O tempo de duração do pulso de luz pode ser um fator importante quando se desejar obter discriminação espacial (em profundidade) da emissão da fluorescência.

Um LIDAR (Light Detection And Ranging), ou radar-laser, como preferem alguns autores, é basicamente composto por um laser como fonte emissora de luz, um sistema de detecção, que inclui um telescópio e equipamento optoeletrônico de alta sensibilidade para discriminação/detecção de fótons, e um sistema de hardware e software para controle e sincronismo do conjunto microprocessado para aquisição de dados. O objetivo deste aparato é analisar os meios atravessados pelo feixe do laser através da medida dos espalhamentos, absorções ou reemissões decorrentes. A utilização de um LIDAR, instalado em um helicóptero, para monitoramento da clorofila a no oceano, data de 1973 [Kim, 1993]. Empregou-se,

neste caso, um laser de corante (emitindo em 590nm) como fonte de excitação e fotomultiplicadora acoplada a um dos dois filtros (centrados em 685nm e 735nm) utilizados para a seleção da faixa espectral de interesse. Neste primeiro experimento, em que pese os problemas para quantificar a fluorescência e associá-la a alguma referência de concentração de clorofila *a*, a possibilidade de detecção remota da fluorescência foi demonstrada.

Porém, o problema básico do monitoramento remoto com um LIDAR é o fato de ser necessário encontrar algum procedimento de calibração, baseado em parâmetros contidos no próprio sinal detectado, para que se possa obter medidas quantitativas. É impossível calibrar um LIDAR da mesma forma que, por exemplo, um espectrofluorímetro, pois as condições de propagação da luz (e de sua interação com o meio) não podem ser controladas. Desta forma, é necessário algum padrão interno ao próprio sinal para a calibração e todas as medidas quantitativas devem ser extraídas através de razões (ou diferenças) de pelo menos duas bandas espectrais do mesmo sinal, uma delas sendo o sinal de calibração. No caso da fluorescência da água do mar, a normalização do sinal da fluorescência pelo espalhamento Raman da água [Klysko & Fadeev, 1978][Bristow et alii, 1981], decorrente da mesma excitação pelo laser, possibilitou a leitura de um resultado livre de uma série de fatores ópticos não controláveis que alteram a intensidade do espectro de emissão de fluorescência. A partir de 1980 [Hoge & Swift, 1981], algumas iniciativas empregando esta metodologia começaram a apresentar resultados consistentes [Demidov, 1995].

A interpretação dos espectros de fluorescência deve levar em conta os processos físicos, químicos e biológicos que alteram este tipo de emissão. A fluorescência é um fenômeno que compete com a conversão fotossintética no aproveitamento dos fótons absorvidos pelos pigmentos-antena; se o mecanismo de aproveitamento de fótons para a fotossíntese sofre alguma mudança, aumentando sua eficiência ou diminuindo-a, a intensidade da fluorescência também se alterará. Um grande número de fatores altera o processo da fotossíntese (espécie, idade, temperatura e disponibilidade de luz, água ou nutrientes são alguns desses fatores). Deste modo, o estudo da fluorescência dos pigmentos (como as clorofilas) presentes no aparato fotossintético é um desenvolvimento complexo mas revelador da produtividade fitoplanctônica. A utilização simultânea de técnicas passiva e ativa, através de um LIDAR, para obtenção de concentração de

clorofila *a* já foi realizada [Hoge et *alli*, 1986]. A divergência entre as duas medidas pode indicar uma alteração das condições ambientais.

Outros procedimentos para análise da fluorescência da clorofila *a*, como o monitoramento do tempo de decaimento [Guignon et *alli*, 1997] ou processos de saturação da emissão [Fadeev et *alli*, 1997], já foram propostos e realizados *in situ* e *in vivo*. A adaptação destas técnicas ou a criação de opções para o monitoramento remoto da dinâmica dos sistemas fotossintetizantes é um campo ainda em aberto.

Concomitantemente com o desenvolvimento da técnica da detecção da fluorescência da clorofila, sistemas LIDAR foram também empregados para monitoramentos com outras finalidades [Hoge & Swift, 1986b]. Através da fluorescência de outras espécies moleculares foram realizados estudos para a detecção de óleo [Hoge & Swift, 1983] [Hengstermann & Reuter, 1990] [Piskozub et *alli*, 1997] e da matéria orgânica dissolvida (MOD) na água [Bristow et *alli*, 1985], além da detecção de concentração de corante [Hoge & Swift, 1981b] para análises de diluição e correntes. Pela detecção da intensidade do sinal devido ao espalhamento Raman da água [Hoge & Swift, 1983b], o grau de turbidez da água foi inferido.

Aplicações sobre a vegetação terrestre enfocaram a determinação de stress por meio da fluorescência das clorofilas *a* e *b*. Utilizando-se da razão de intensidades de determinadas faixas espectrais [Valentini et *alli*, 1993] foi possível discriminar diferentes espécies vegetais e também identificar stress natural (como falta de água ou deficiência de nutrientes) em partes de plantações [Barbini et *alli*, 1993] [Nunes et *alli*, 1997].

Entre outras aplicações, os sistemas LIDAR foram empregados em estudos sobre a concentração de clorofila *a* e outros fluoróforos em águas costeiras ou submetidas a influências antropogênicas [Reuter et *alli*, 1993], para validação de dados gerados por satélite [Schmitz-peiffer et *alli*, 1990] e para monitoramento de derrames de óleo [Brown et *alli*, 1997].

Nos últimos anos, novos sistemas LIDAR estão sendo desenvolvidos. É importante citar o sistema construído para gerar imagens através de escaneamento de áreas [Fingas & Brown, 2002] e o LIDAR super-ativo [Wright, 1996] [Chekalyuk, 2003]. Neste sistema dois pulsos de laser são lançados sincronizados

sobre um mesmo local, um logo após o outro. A radiação retroespalhada gerada pelos dois pulsos é analisada. A interação do primeiro pulso com o fitoplâncton produz uma reação de fechamento dos centros de reação da fotossíntese. Desta forma, o segundo pulso encontra esses centros de reação fechados, o que resulta em uma alteração na fluorescência observada (em relação ao primeiro pulso), indicativa do máximo de fluorescência possível. Esta técnica é conhecida como “*Pump & Probe*”. A razão da fluorescência gerada pelos dois pulsos fornece informações adicionais sobre o fitoplâncton e sua atividade fotossintética.