



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM GEOCIÊNCIAS APLICADAS E GEODINÂMICA

LUCÉLIA SOUZA DE BARROS

**FLUORESCÊNCIA NA ESTIMATIVA DE CLOROFILA-A EM MANANCIAS DE
ABASTECIMENTO PÚBLICO NO CERRADO, BRASIL**

Dissertação de Mestrado nº 187

Área de Concentração: Geoprocessamento e Análise Ambiental

Brasília – DF

2021

LUCÉLIA SOUZA DE BARROS

**FLUORESCÊNCIA NA ESTIMATIVA DE CLOROFILA-A EM MANANCIAS DE
ABASTECIMENTO PÚBLICO NO CERRADO, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geociências Aplicadas e Geodinâmica (Área de concentração Geoprocessamento Análise Ambiental) do Instituto de Geociências da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Rejane Ennes Cicerelli
Orientadora

Tati Almeida
Co-orientadora

Brasília – DF

2021

LUCÉLIA SOUZA DE BARROS

**FLUORESCÊNCIA NA ESTIMATIVA DE CLOROFILA-A EM MANANCIAS DE
ABASTECIMENTO PÚBLICO NO CERRADO, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geociências Aplicadas e Geodinâmica do Instituto de Geociências da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Geociências Aplicadas e Geodinâmica, na área de concentração e Geoprocessamento e Análise Ambiental.

29/10/2021

Data da aprovação

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Rejane Ennes Cicerelli (Orientadora – UnB)

Profª. Dra. Luciana de Resende Londe (CEMADEN)

Profº. Dr. Henrique Llacer Roig(UnB)

Dissertação apresentada na forma de artigo científico conforme Art. 35 do Regimento da Pós-graduação do Instituto de Geociências da Universidade de Brasília.

DEDICATÓRIAS

Dedico a toda a minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a muitas pessoas que contribuíram pela consolidação desta pesquisa. Em primeiro lugar, agradeço a Deus e a senhora de Nazaré, por passar a frente e proteger os meus passos durante essa caminhada.

A minha Mãe e ao meu irmão, Lucia e Diego, pelo amor, incentivo e apoio incondicional na minha vida. Aos meus tios, Emanuel e Fabiano, por todo carinho e acolhimento. A minha tia do coração, Tereza, pelos conselhos e apoio.

Aos meus melhores amigos, Aline, Leonardo e Ewelyn, por ouvirem minhas angústias e pelas palavras incentivadoras que me mantiveram forte para encarar os desafios.

Agradeço muito ao professor Giuliano Sant'Anna Marotta, por estender a mão e criar uma ponte entre mim e a professora Rejane, porque sua atitude me possibilitou a ter oportunidade e a honra de realizar esse mestrado ao lado dela.

A minha orientadora, Rejane Ennes Cicerelli, por me receber de braços abertos nessa jornada. Sou muita grata por, ao longo dessa caminhada, ter acreditado em mim, por toda sua paciência e sabedoria perante minhas crises de insegurança e choro em sua sala, pelos incentivos diante das dificuldades, por me apresentar a novos conhecimentos e instigar a buscar sempre parcerias profissionais. Agradeço imensamente pelo seu apoio profissional e pessoal ao me orientar e acolher em muitos momentos.

A minha co-orientadora, Tati Almeida, pela confiança, paciência, incentivo e ao privilégio de sua orientação e a contribuição de seu conhecimento para a realização deste trabalho. Obrigada professoras, Rejane e Tati, por todo carinho e ensinamento nesses dois anos de mestrado. Tenho uma grande admiração e carinho por vocês.

À CAESB, pela parceria, apoio técnico e logístico. Em especial, agradeço muitíssimo aos excelentes profissionais, Bruno, Dina, Paulo, Clayton, Otávio e Firmino, por toda assistência nas campanhas de campo e laboratorial.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Geociências Aplicadas e Geodinâmica do Instituto de Geociências, pela oportunidade da realização desta pesquisa e dissertação. Aos professores, por todo conhecimento compartilhado, e aos colegas de Pós-Graduação e dos laboratórios LAGEQ e LSRAE, pela parceria e troca de conhecimento.

Ao projeto “uso do VANT para o monitoramento de recursos hídricos no âmbito CT-HIDRO 01/2013 – AQUAVANT” vinculado ao FINEP 01.14.0114.00 e ao projeto FAPDF (193.001.531/2017) pelo apoio e auxílio na pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Grata pelo apoio de todos.

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.

Charles Chaplin

“Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem uma grande beleza”

Marie Curie

RESUMO

Um monitoramento preciso e acurado da biomassa fitoplanctônica é fundamental para escolha da melhor estratégia de manejo, prevenção e avaliação da qualidade da água. A estratégia habitualmente usada é o uso de métodos limnológicos tradicionais de quantificação de clorofila-*a*, que envolvem uma série de etapas e análises laboratoriais onerosas e morosas, que podem limitar um diagnóstico mais rápido e preciso. Naturalmente, todo o processo, muitas vezes, pode retardar a caracterização do ambiente e atrasar ações preventiva ou corretiva. Logo, estabelecer técnicas para monitorar os ambientes aquáticos de forma rápida, acurada e precisa é um grande desafio. Diante disso, novas tecnologias de monitoramento são desenvolvidas baseadas no princípio da fluorescência, as quais permitem quantificar os pigmentos fotossintetizantes presentes na água sem a degradação do fitoplâncton (in vivo). Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi analisar e avaliar métodos de estimativa de clorofila-*a* por meio da fluorescência em corpos d'água no cerrado brasileiro. Para tanto, foram realizadas coletas simultâneas para estimativa de clorofila-*a* por meio do espectrofluorímetro e por meio da técnica laboratorial tradicional espectrofotometria. Ao todo foram coletadas 82 amostras que permitiram a comparação das técnicas. No decorrer do trabalho, análises estatísticas foram aplicadas para avaliar comportamento e acurácia advindos de forma absoluta e relativa. Para os dados relativos, propôs-se a aplicação de uma regressão linear para quantificação de clorofila-*a* a partir das combinações de bandas fluorimétricas. Os resultados dos dados absolutos mostraram uma forte correlação entre métodos. Contudo, o modelo gerado a partir de do valor de fluorescência apresentou correlação significativamente forte ($r=0.88$; $R^2=0.78$), quando comparado com dados absolutos. As validações realizadas comprovaram a eficiência do modelo. No geral, concluímos que a estimativa de clorofila-*a* por meio de dados relativos apresentou melhor resultado dos que os estimados por meio dos dados absolutos estimados diretamente pelos modelos fornecidos pelas sondas fluorimétricas. As medidas fluorimétricas relativas mostram ser uma melhor opção para quantificação da concentração de clorofila-*a*, quando comparado com o uso de modelos pré-estabelecidos, que compõem as estimativas absolutas. Portanto, a fluorescência mostra-se um método altamente promissor para monitoramento da qualidade de água nos corpos d'água e a adaptação dos modelos a realidade local é altamente recomendável.

Palavras-chave: Fluorescência. Estimativa de Clorofila-*a*. Ambientes Aquáticos Tropicais.

ABSTRACT

Precise and accurate monitoring of the phytoplanktonic biomass is essential for choosing the best water quality management, prevention and assessment strategy. The strategy commonly used is the use of traditional limnological methods for quantifying chlorophyll-*a*, which involve a series of costly and time-consuming laboratory tests and steps, which can limit a faster and more accurate diagnosis. Naturally, the entire process can often delay the characterization of the environment and delay preventive or corrective actions. Therefore, establishing techniques to monitor aquatic environments quickly, accurately and precisely is a great challenge. Therefore, new monitoring technologies are developed based on the principle of fluorescence, which allow the quantification of photosynthetic pigments present in water without phytoplankton degradation (*in vivo*). Given the above, the objective of this research was to analyze and evaluate methods for estimating chlorophyll-*a* through fluorescence in water bodies in the Brazilian cerrado. Therefore, simultaneous collections were carried out to estimate chlorophyll-*a* by means of a spectrofluorimeter and by means of the traditional laboratory technique spectrophotometry. In all, 82 samples were collected that allowed the comparison of techniques. During the work, statistical analyzes were applied to evaluate behavior and accuracy arising in an absolute and relative way. For the relative data, it was proposed the application of a linear regression to quantify chlorophyll-*a* from the combinations of fluorimetric bands. The results of the absolute data showed a strong correlation between methods. However, the model generated from the fluorescence value showed a significantly strong correlation ($r=0.88$; $R^2=0.78$), when compared with absolute data. The validations carried out proved the efficiency of the model. In general, we concluded that the estimation of chlorophyll-*a* through relative data presented better results than those estimated through absolute data estimated directly by the models provided by fluorometric probes. Relative fluorimetric measurements show to be a better option for quantifying the concentration of chlorophyll-*a*, when compared with the use of pre-established models, which make up the absolute estimates. Therefore, fluorescence is a highly promising method for monitoring water quality in water bodies and adapting the models to local reality is highly recommended.

Keywords: Fluorescence. Estimate of Chlorophyll-*a*. Tropical Water Environments.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 01- INTRODUÇÃO	15
1.1-Objetivos	17
1.2-Objetivo específico	17
1.3- Organização do volume	17
CAPÍTULO 02 - FUNDAMENTAÇÃO TEORICA.....	19
2.1- A importância do monitoramento aquático.....	19
2.2- Fitoplâncton: pigmentos fotossintetizantes.....	20
2.2- Influência dos fatores controladores e limitantes.....	22
2.3- Comportamento fluorescente do pigmento fotossintetizante – Clorofila- <i>a</i>	24
2.4-Técnicas de estimativa da biomassa fitoplanctônica (clorofila- <i>a</i>) por fluorescência	26
CAPÍTULO 3- MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1-Áreas de estudo	29
3.2-Aquisição de dados	30
3.3-Técnicas de estimativa	31
3.4-Disponibilização de dado absoluto e relativo	34
3.5-Análise exploratória dos dados absolutos	35
3.6-Análise comparativa dos dados absolutos.....	36
3.7-Descrição do modelo – Dados relativos.....	37
3.8-Validação do modelo	38
CAPÍTULO 4 – ANÁLISE PRELIMINAR DOS DADOS	39
4.1-Análise limnológica e meteorológica.....	39
4.2-Análise estatística dos dados absolutos.....	40
CAPÍTULO 5 – FLUORESCÊNCIA NA ESTIMATIVA DE CLOROFILA-A EM MANANCIAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO NO CERRADO, BRASIL.....	45
1- Introdução	46
2- Materiais e Métodos.....	48
2.1- Localização.....	48
2.2- Delineamento amostral e métodos de estimativa	49
2.3- Análises Estatísticas e modelagem.....	51
2.4- Validação dos dados	53
3- Resultados e Discussão	54
3.1- Análise dos valores Absolutos	54
3.2- Análise dos valores relativos	58
4- Conclusão.....	63

5- Agradecimentos	63
6- Referências.....	64
CAPÍTULO 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	71
APÊNDICE I- Método de validação (<i>Jackknife</i>).....	79
APÊNDICE II-Script dos gráficos- (Linguagem R)	82
ANEXO- Summary of fluorometers of in situ chlorophyll measurement	85

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Introdução

Figura 1: Fluxograma metodológico do artigo	18
--	----

Capítulo 2: Fundamentação teórica

Figura 1: Fatores que influenciam no desenvolvimento na produtividade algal eutrofização antropogênica, mudança climática global, fatores bióticos e abióticos.....	22
--	----

Figura 2: Princípios básicos do fenômeno de excitação e emissão e as diferenças entre a excitação espectral (absorção) e emissão espectral (fluorescência) da luz absorvida por moléculas de pigmentos da clorofila a.....	24
---	----

Figura 3: Espectro de absorção e fluorescência da clorofila-a.	25
--	----

Figura 4: Ilustração da função tecnológica de medição de fluorescência in situ.....	27
--	----

Capítulo 3: Materiais e Métodos

Figura 1: Mapa de localização dos locais de coleta.....	29
--	----

Figura 2: Componentes e funcionamento do fluorômetro BBE.	34
---	----

Figura 3: Fluxograma dos dados.....	35
--	----

Figura 4: Fluxograma da fase inicial da pesquisa.....	36
--	----

Figura 5: Fluxograma da análise comparativa entre os três métodos avaliados.	37
--	----

Capítulo 4: Análise preliminar dos dados

Figura 1: Boxplot dos dados de clorofila-a para os três métodos coletados.....	41
---	----

Figura 2: Equações de regressão entre os métodos avaliados.....	42
--	----

Capítulo 5: Fluorescência na estimativa de clorofila-a em mananciais de abastecimento público no Cerrado, Brasil

Figura 1: Mapa de localização dos lagos em estudo.....	49
---	----

Figura 2: Distribuição dos dados de clorofila-a, para os métodos coletados.....	56
--	----

Figura 3: Equações de regressão linear entre os métodos avaliados.	58
--	----

Figura 4: Reta de regressão de calibração para a estimativa de clorofila-a.....	61
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2: Fundamentação teórica

Tabela 1: Classificação dos corpos d'água e padrões para água doce para concentração de clorofila- <i>a</i>	21
Tabela 2: Distribuição de pigmentos e grupos de organismos	21

Capítulo 3: Materiais e Métodos

Tabela 1: Aquisição de dados	30
Tabela 2: Combinação de bandas de fluorescência de emissão	37

Capítulo 4: Análise preliminar dos dados

Tabela 1: Condições meteorológicas gerais dos campos.....	39
Tabela 2: Variáveis limnológicas medidas nos campos.....	39
Tabela 3: Estatística descritiva das concentrações de clorofila- <i>a</i>	40
Tabela 4: Pontos de validação- amostras triplicadas.....	44

Capítulo 5: Fluorescência na estimativa de clorofila-*a* em mananciais de abastecimento público no Cerrado, Brasil

Tabela 1: Data da aquisição dos dados.....	50
Tabela 2: Combinação de bandas de fluorescência de emissão.....	52
Tabela 3: Estatística descritiva das concentrações de clorofila- <i>a</i> , para os métodos coletados.....	54
Tabela 4: Fatores de subestimação do fluoroprobe relatados na literatura científica.....	57
Tabela 5: Os resultados dos melhores índices.....	59
Tabela 6: Métodos de validação.....	62

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB277f Barros, Lucélia Souza de
Fluorescência na estimativa de clorofila-a em mananciais de abastecimento público no Cerrado, Brasil / Lucélia Souza de Barros; orientador Rejane Ennes Cicerelli; co orientador Tati Almeida. -- Brasília, 2021.
86 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Geociências Aplicadas) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. Fluorescência. 2. Estimativa de Clorofila-a. 3. Ambientes Aquáticos Tropicais. I. Cicerelli, Rejane Ennes , orient. II. Almeida, Tati, co-orient. III. Título.

CAPÍTULO 01- INTRODUÇÃO

O aumento populacional e a expansão de atividades socioeconômicas têm aumentado à contaminação dos corpos hídricos e, conseqüentemente, a deterioração da qualidade da água. Logo, proteger, monitorar e preservar os mananciais, rios e lagos é essencial para a manutenção da vida dos ecossistemas terrestres e para atividades humanas (Mustafa *et al.*, 2020). No Brasil, tem se observado a poluição dos corpos d'água por essas fontes pontuais e difusas, que causam assoreamento, estimulam o processo de eutrofização artificial e induzem a proliferação de fitoplâncton para níveis que afetam a utilização normal e desejável da água.

Trata-se de cenário comum em grandes centros urbanos, portanto, um desafio para definição das estratégias de monitoramento que garantam entendimento do funcionamento do ecossistema aquático. Dentre variáveis limnológicas, clorofila-a, encontrada na biomassa do fitoplâncton é o elemento utilizado como indicador para avaliar os níveis de eutrofização, portanto, um alvo importante para o monitoramento (Lorenzen 1967; Harmann *et al.*, 2019). Quantificar esse pigmento de forma rápida e precisa é fundamental para a atuação das ações preventivas e corretivas diante do diagnóstico das condições da qualidade da água.

Inúmeras são as abordagens utilizadas para mensurar e quantificar o pigmento fotossintetizante, clorofila-a. As técnicas espectrofotométricas ou de cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography*-HPLC) são as tradicionalmente utilizadas (Marino 2017; Batista e Fonseca 2018; Garrido *et al.*, 2019). Referem-se a metodologias (*in vitro*) que envolvem vários procedimentos e análises laboratoriais. Esses métodos tradicionais são confiáveis e aceitáveis, embora muito debatidos pela comunidade científica, pois envolvem uma série de etapas laboratoriais (processos químicos e maceração) que podem deteriorar as algas no momento da extração (Lorenzen 1967; Marino. 2017). Além disso, as análises consomem tempo, requerem grandes volumes de amostra e implicam alta logística e altos custos analíticos (Ferreira *el at.*, 2012; Kuha *el at.*, 2020). O que pode retardar a caracterização do ambiente e atrasar o potencial de resposta dos órgãos responsáveis para ações de prevenção, controle e fiscalização.

Para suprir essa lacuna espaço-temporal, novas tecnologias são propostas com capacidade de captura de dados em tempo real (Loisa *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2018; Cremella *et al.*, 2018; Garrido *et al.*, 2019; Panchenko *et al.*, 2020; Silva e Garcia 2021). Dentre as diversas tecnologias, destacam-se os sensores ópticos, que se baseiam no princípio da fluorescência, que, por meio dos comprimentos de ondas de excitação e emissão distintos, têm a capacidade fornecer informações quantitativas dos pigmentos após o contato dos sensores com a água (Beutler 2002). Expresso em

outros termos, a técnica fundamenta-se no princípio de que cada pigmento possui faixas espectrais de excitação e emissão, que, no caso da clorofila-*a*, é absorvida em comprimentos de onda menores que 675 nm (453-440, 620-635 e 672-675 nm) e reemitida por volta de 685 nm (Shin *et al.*, 2020; Choo *et al.*, 2018; Suggett *et al.*, 2010; Seppala 2007; Lohrenz *et al.*, 2003). Essas faixas (bandas fluorimétricas) têm um papel importantíssimo na obtenção de um resultado confiável na detecção dos pigmentos e até mesmo identificação dos grupos de algas. As pesquisas de Ferreira *et al.* (2012) Ling *et al.* (2018) e Garrido *et al.* (2019) confirmaram tal constatação, as quais obtiveram ótimos resultados a partir do uso de canais espectrais de emissão de fluorescência diversos. O Trabalho de Ling *et al.* (2018) alcançou excelentes resultados a partir das bandas do uso de canais espectrais de emissão de fluorescência em 550 nm e 700 nm para estimar clorofila-*a* e distinguir os grupos de algas. O estudo de Garrido *et al.* (2019) também o obteve excelentes resultados, porém trabalhou com outras bandas fluorimétricas (370, 450, 525, 570, 590 e 610 nm) para alcançá-los.

Vários são os benefícios desse método (Fluorescência- *in vivo*), dentre eles, destacam-se a facilidade de uso, a aquisição instantânea da concentração dos elementos de forma não destrutiva do organismo, a capacidade de obtenção de dados em grandes quantidades, a precisão e a acurácia (Roesler *et al.*, 2017). Apesar dessas vantagens, há relatos em estudos que demonstram preocupações diante dos dados adquiridos, como observado no estudo de Catherine *et al.* (2012), em que foram identificados valores superestimados de clorofila-*a*, quando correlacionados com medidas laboratoriais tradicionais.

Outros trabalhos com abordagens distintas também avaliaram a efetividade da fluorescência *in vivo* (Leboulanger *et al.*, 2002; Gregor e Maršálek 2004; Richardson *et al.*, 2010; Houliez *et al.*, 2012; Kring *et al.*, 2014; Escoffier *et al.*, 2014; Ling *et al.*, 2018; Harmann *et al.*, 2019). Entretanto, muitos desenvolvidos em ambientes controlados, regiões temperadas ou de altas concentrações de clorofila-*a*, o que pode ser diferente da realidade de reservatórios tropicais.

O que remete a busca por estudos em água interiores em regiões tropicais, no Brasil, há relatos de pesquisas que usaram método *in vivo* (fluorômetro) como método complementar para quantificar a concentração de clorofila-*a*, em virtude da baixa amostragem laboratorial que compromete a avaliação e/ ou calibração dos fluorômetros (Silva *et al.*, 2016; Cicerelli *et al.*, 2017, Ferreira *et al.*, 2012). Esses estudos apontam uma lacuna na literatura sobre a acurácia dos dados fluorimétricos advindos de formato absoluto e relativo para os ambientes aquáticos tropicais. Distante do exposto, o presente estudo tem, como objetivo, analisar e avaliar os métodos de estimativas dos dados absolutos e estabelecer um modelo alternativo de quantificação de clorofila-*a* partir das

combinações de bandas fluorimétricas relativas com intuito de mostrar a sua acuracidade na detecção dos pigmentos fotossintetizantes em diversos ambientes aquáticos tropicais.

1.1-Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa é avaliar o desempenho da fluorescência na quantificação de clorofila-a em corpos d'água do DF.

1.2-Objetivo específico:

- a) Analisar o desempenho dos valores absolutos obtidos pelos métodos de estimativas;
- b) Avaliar a correlação dos resultados entre as medidas de estimativa tradicional como dados absolutos;
- c) Identificar e avaliar a combinação de bandas fluorimétricas mais eficientes na quantificação de concentração de clorofila-a;
- d) Propor técnicas de calibração a partir da realização de medidas relativas.

1.3- Organização do volume

A presente dissertação “FLUORESCÊNCIA NA ESTIMATIVA DE CLOROFILA-A EM MANANCIAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO NO CERRADO, BRASIL” é subdividida em capítulos. O primeiro tópico é a introdução, que apresenta o tema, enfatiza a problemática da pesquisa, os objetivos e a estrutura do trabalho.

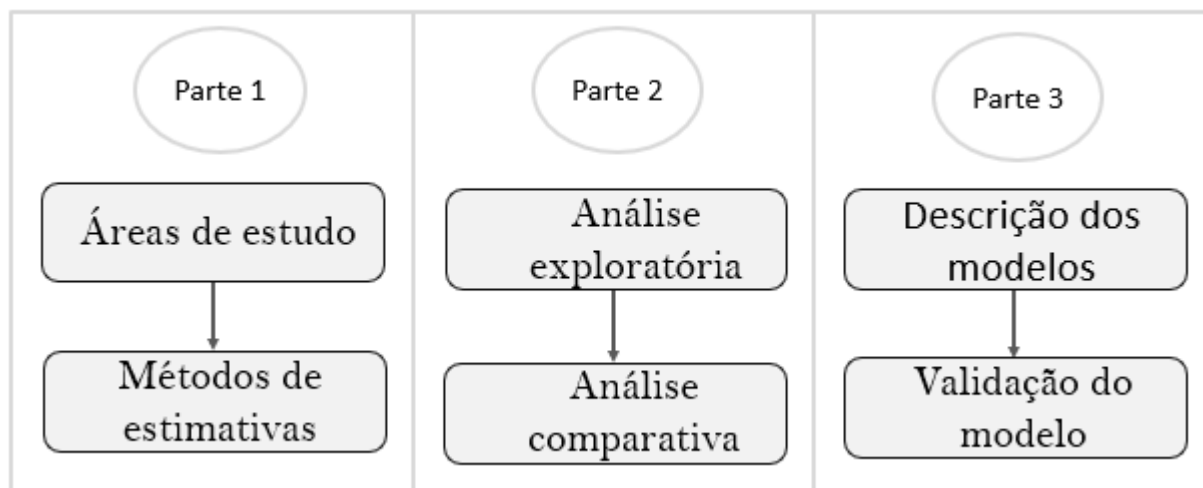
O segundo capítulo realiza uma breve fundamentação teórica sobre o tema, abordando a importância do monitoramento aquático, as características do fitoplâncton, os principais pigmentos fotossintetizantes e seus fatores controladores e limitações. Também define os conceitos básicos sobre fluorescência e o comportamento fluorescente dos pigmentos, especialmente a clorofila-a. Em seguida, evidencia os métodos de estimativa mais relevante da biomassa algal, percorrendo as técnicas mais convencionais até as mais atuais.

O desenvolvimento metodológico da pesquisa é apresentado no terceiro capítulo, no qual se fez uma breve caracterização da região de estudo, o que é evidenciado no mapa de localização. Posteriormente, os materiais utilizados foram detalhados e os métodos propostos e utilizados para obtenção da estimativa de clorofila-a foram descritos. Também é apresentada toda a abordagem estatística metodológica usada na dissertação, na qual se explicam os procedimentos adotados para cada etapa do trabalho.

O quarto capítulo traz as análises preliminares dos dados, em que se exhibe a análise exploratória dos dados, após a remodelagem amostral, apresentando as características limnológicas e meteorológicas dos ambientes estudados.

O quinto capítulo apresenta os resultados e discussões após todas as filtrações amostrais necessárias. Ele está estruturado em formato de artigo, em que mostra os objetivos alcançados, análises realizadas e, principalmente, apresenta a técnica de calibração a partir da realização das medidas relativas.

Figura 1: Fluxograma metodológico do artigo



A figura 01 apresenta o fluxograma metodológico deste artigo. Resumidamente, a pesquisa começou com a seleção das áreas de estudo, em que se optou por fazer os levantamentos nos três mananciais de abastecimento do DF, foram eles: Lago Descoberto, Santa Maria e Paranoá. As campanhas de campo foram realizadas em parceria com CAESB, sendo que as coletas de dados foram realizadas nos pontos de monitoramento das variáveis limnológicas definidos pela companhia. Os dados foram obtidos por meio de três métodos: O primeiro foi tradicional método laboratorial *in vitro* realizado pela CAESB e os demais métodos *in vivo* foram por meio de sondas fluorimétricas (BBE e Exo II) adquiridas junto ao instituto de Geociência da UNB. Os dados obtidos pelos métodos *in vivo* apresentaram os resultados em dados relativos e absolutos. Com a obtenção dos dados absolutos, foram realizadas uma análise exploratória e comparativa com os dados convencionais (laboratorial) por meio das variáveis estatísticas. Para os dados relativos, foi gerado um modelo de quantificação de clorofila-*a* a partir das combinações de bandas fluorimétricas e avaliado tanto pelos indicativos estatísticos e quanto pelos dois métodos de validação (Jackknife e validação de campo).

No sexto capítulo, são apresentadas as considerações finais, recomendações e indicações para futuros trabalhos usando as medidas fluorimétricas. O sétimo capítulo apresenta as referências bibliográficas usadas nesta dissertação. Por fim, os apêndices I, II e anexo mostram as tabelas e figuras complementares desta pesquisa.

CAPÍTULO 02 - FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

2.1- A importância do monitoramento aquático.

Todos os ambientes aquáticos são ecossistemas complexos, que envolvem uma série de processos físicos, químicos e biológicos, com interações permanentes e dinâmicas. Esses processos são peculiares a cada sistema aquático (oxigênio dissolvido, temperatura, transparência, viscosidade, entre outros) e dependem do conjunto de situações resultantes da posição geográfica e da origem do sistema (Tundisi & Tundisi, 2008). Assim, entender essas variáveis limnológicas torna-se fundamental para um perfil das condições ecológicas do corpo d'água, a compreensão do ecossistema, enriquecimento do conhecimento limnológico e entendimento da dinâmica das comunidades aquáticas.

A preservação e conservação dos recursos d'água é essencial para manutenção do ecossistema e para o desenvolvimento das atividades socioeconômicas. O desafio é a conscientização do uso sustentável desses recursos hídricos, diante das atividades humanas (atividades agrícolas, a industrialização, a mineração e outros), que, muitas vezes, ocasionam impactos ambientais. Geralmente, essas alterações das condições naturais dos ambientes estão ligadas aos poluentes de origem difusa e pontuais, comumente originadas de ações antrópicas (Cicerelli & Galo 2015).

Uma das consequências dessa contaminação é o enriquecimento artificial de nutrientes que estimulam a proliferação de fitoplâncton, potencialmente produtoras de toxinas, para níveis prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (Saha *et al.*, 2021). Para evitar esse cenário, é evidente a importância do monitoramento das variáveis limnológicas (fósforo, nitrogênio, oxigênio dissolvido e clorofila-*a*, bem como os valores de pH, turbidez e densidade de coliformes fecais e totais) para avaliar o índice do estado trófico da qualidade da água, promover um programa de conservação, proteção e recuperação do sistema (Tundisi & Tundisi, 2008).

No Brasil, para o monitoramento e manutenção dos sistemas aquáticos, a Resolução CONAMA n° 357/2005 do Ministério do Meio Ambiente prioriza a saúde, o bem-estar humano e o equilíbrio ecológico, que não devem ser afetados pela degradação da qualidade da água. A referida Resolução dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões máximos de lançamento de efluentes para as classes de uso (tabela1). Apesar da resolução estipular normas, não define a frequência a ser adotada para avaliar esses parâmetros.

Tabela 1- Classificação dos corpos d'água e padrões para água doce para concentração de clorofila-*a*.

Classes	(uso destinados)	Clorofila-<i>a</i> (µg/L)
1	Abastecimento após tratamento simplificado, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças consumidas cruas;	10
2	Abastecimento após tratamento convencional, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e frutíferas, aquicultura e pesca;	30
3	Abastecimento após tratamento convencional ou avançado, recreação de contato secundário, dessedentação de animais;	60

Fonte: Resolução CONAMA nº357/2005

2.2- Fitoplâncton: pigmentos fotossintetizantes.

Em 1897, o termo fitoplâncton foi utilizado pela primeira vez para descrever um grupo heterogêneo formado por algas fotossintetizantes presentes em diversos ambientes aquáticos, como: oceanos, lagos, reservatórios, estuários, rios e mananciais (Tundisi & Tundisi, 2008). Esses organismos fitoplanctônicos são a base da cadeia alimentar e estão presentes em várias formas, tamanhos e elevada variedade, tanto intra quanto interespecífica em sua morfologia (Reynolds, 2006). Atualmente, são classificados em vários grupos taxonômicos, tais como *Chlorophyceae* (algas verdes), *Rhodophyceae* (algas vermelhas), *Phaeophyceae* (algas marrons), *Cyanophyceae* (cianobactérias), *Xanthophyceae* (algas verde-amarelas), *Bacillariophyceae* (diatomáceas) e *Dinophyceae* (Pangestuti *et al.*, 2011; Suganya *et al.*, 2016).

É importante mencionar que, pelo fato de serem facilmente dispersos na coluna d'água, sofrem influência de vários fatores, tais como variação da temperatura, acúmulo de nutrientes, intensidade de luz, turbidez, oxigênio dissolvido, sedimentação e herbivoria (Beisner *et al.*, 2006; Marques & Américo, 2017; TIAN *et al.*, 2018). Essa sensibilidade desses organismos tem contribuído para o monitoramento do corpo hídrico, já que sua composição e distribuição espacial podem ser usadas como indicador da qualidade da água. Em outros termos, funcionam como um “biosensor” das mudanças em ambientes aquáticos, pois respondem rapidamente a essas mudanças ambientais, tornando-os de suma importância na avaliação de ecossistemas aquáticos (Goulart, 2019).

Os pigmentos fotossintetizantes presentes nos fitoplânctons são os componentes utilizados para essa avaliação do nível trófico dos corpos hídricos. Há, na literatura, diversas pesquisas (Lorenzen, 1966; Watras and Baker, 1988; Leboulanger *et al.*, 2002; Gregor e Maršálek 2004; Izydorczyk *et al.*, 2005; Seppala *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2010; Zamyadi *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2014; Kring *et al.*, 2014; Escoffier *et al.*, 2014; Chai *et al.*, 2016; Hodges *et al.*, 2018; Ling *et al.*, 2018;

Harmann *et al.*, 2019; Damar *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021), que, ao longo de décadas, têm trabalhado na identificação e quantificação desses pigmentos fotossintetizantes e até na diferenciação dos tipos de grupos fitoplanctônicos, pois cada grupo algal apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta, o que torna possível distingui-las (Abalde *et al.*, 1995).

Cerca de 100 pigmentos algais já foram identificados e são divididos em três principais categorias encontradas nos organismos fotossintetizantes, são eles: clorofilas, carotenóides e ficobilinas (ficobiliproteínas) (Kirk, 1993; Richardson, 1996). A principal função desses pigmentos é absorver luz visível utilizada no processo fotossintético. Além disso, também apresentam outras funções, como os pigmentos carotenóides que têm a função preventiva, a destruição da clorofila pelo oxigênio na luz (Rowan, 1989). As ficobilinas (ficobiliproteínas) são consideradas antenas de pigmentos coletores de luz que ainda são subdivididas em três principais pigmentos: ficoeritrina (vermelho) presentes nas algas vermelhas, ficocianina (azul brilhante) e aloficocianina (verde-azul), que influenciam na cor e nas propriedades de absorbância e estão presentes nas cianobactérias (Richardson, 1996). Na tabela 02, está resumidamente a distribuição desses pigmentos por grupos de algas.

Tabela 2: Distribuição de pigmentos e grupos de organismos

Grupo de algas	Clorofilas	Carotenóides	Ficobilinas	Cor predominante
Cyanophyta	a	Flavicina, Zeaxantina, Oxtilaxantina, Myxoxantofil a	aloficocianina, ficocianina, ficoeritrina	verde-azul
Cryptophyceae	a,c	α -caroteno, e- caroteno	ficocianina e ficoeritrina	-
Prochlorophyta	a, b	-	-	verde
Rhodophyta	a, d	α -caroteno	Aloficocianina, ficocianina, ficoeritrina	vermelha
Fucophyceae	a, c	Luteína	-	marrom
Bacillariophyceae	a, c	Fucoxantina	-	dourada
Dinophyta	a, c	Peridinina	-	marrom
Chlorophyta	a, b	Luteína, Sifonoxantina	-	verde
Euglenophyta	a, b	Sifonoxantina	-	verde
Plantas terrestres	a, b	-	-	verde

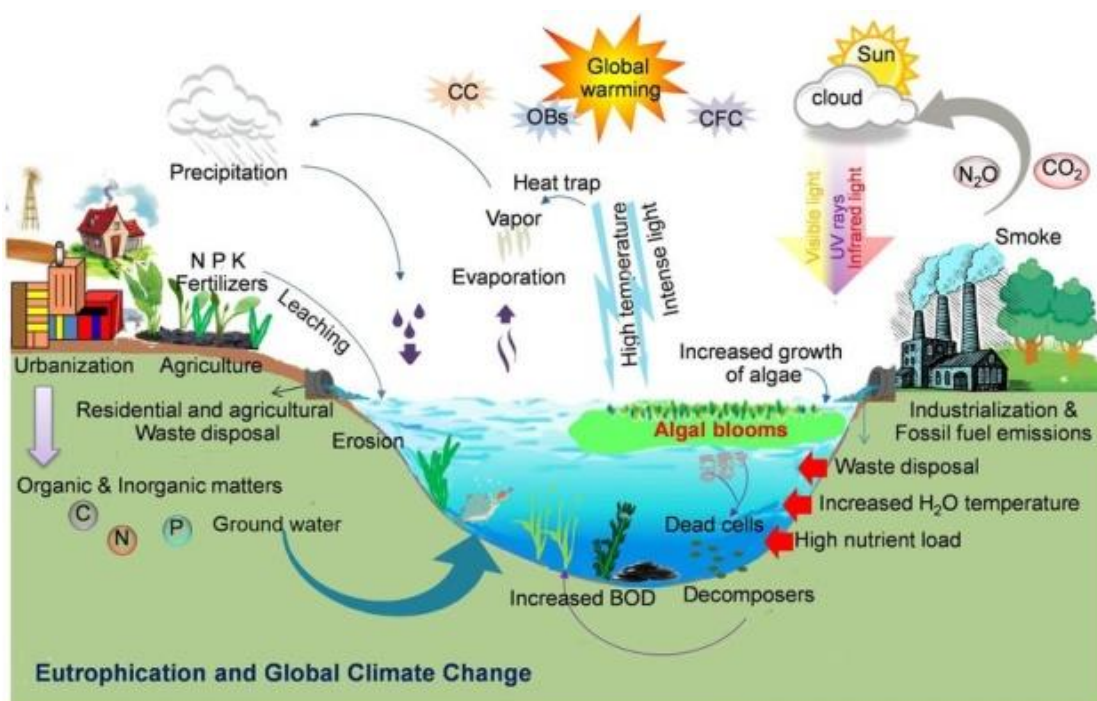
Fonte: Adaptado de Richardson, 1996; Londe, 2008; Wetzel, 2001.

Dentre esses pigmentos fotossintetizantes presentes no fitoplâncton, destacam-se as clorofilas, que estão presentes em todas as espécies de algas (tabela 01). Os pigmentos clorofilados são divididos em grupos, denominados clorofilas *a*, *b*, *c*, *d*, e *e*, sendo que a clorofila *c* é dividida em várias subespécies (Wetzel, 2001). Entretanto, a clorofila-*a* funciona como centro de reação fotossintética, um coletor e um armazenador de radiação eletromagnética. Além disso, destaca-se por estar presente em todos os organismos fotossintetizantes e ser um dos principais responsáveis pela fotossíntese, bem como ser o mais usualmente usado estimativo da biomassa do fitoplâncton e, conseqüentemente, para avaliar a deterioração da qualidade da água (Tundisi & Tundisi, 2008; Pan *et al.*, 2013; Roesler *et al.*, 2019; Kuha *et al.*, 2020).

2.2- Influência dos fatores controladores e limitantes

Vários são os fatores que influenciam a produtividade primária dos fitoplanctônicos. Dentre os principais, pode-se destacar: a disponibilidade de nutrientes, a intensidade de luz, a temperatura, a precipitação, o vento, a temperatura do ar, entre outros (Wetzel, 2001; Tundisi & Tundisi, 2008; MARAÑÓN *et al.*, 2018; Biudes, & Camargo 2008; Silva *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2020; Wiegand *et al.*, 2020). A ilustração (figura 01) desenvolvida por Rastogi (2015) é uma boa representação esquemática desses principais fatores controladores e limitantes.

Figura 1: Fatores que influenciam no desenvolvimento na produtividade algal, eutrofização antropogênica, mudança climática global, fatores bióticos e abióticos.



Fonte: Rastogi (2015)

Quando ocorrem variações extremas desses fatores, provenientes normalmente das atividades antrópicas ou de oscilações climáticas, elas podem alterar as condições naturais do ambiente e provocar uma proliferação ou a extinção dos organismos fotossintetizantes, pois são organismos altamente sensíveis a mudanças do ambiente aquático.

Um dos principais fatores que influenciam essa alteração é a carga de nutrientes, visto que, quando a concentração de nutrientes é baixa, a biomassa fotossintética para de crescer. Entretanto, quando ocorre um enriquecimento de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, originados de efluentes domésticos e / ou industriais pode ocorrer o processo chamado de eutrofização artificial (Calijuri *et al.*, 2006; Ayele & Atlabachew 2020; Saha *et al.*, 2021). Como resultado da eutrofização, ocorrem os eventos de floração de algas, que é um aumento excessivo da biomassa dos fitoplâncton, que contamina o corpo hídrico e impacta na saúde humana. Para avaliar essa produtividade primária dentro do corpo água, os estudos de qualidade da água utilizam o parâmetro limnológico clorofila-a como indicador (Marques & Américo, 2017; Li *et al.*, 2018; Zolfaghari *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021).

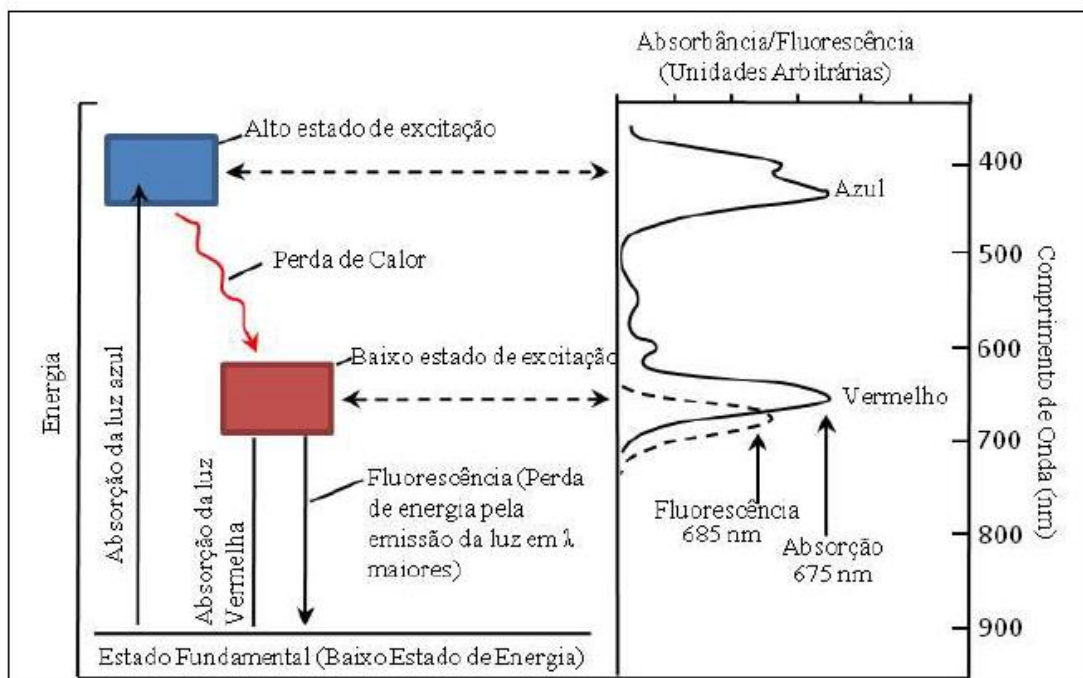
Além da carga de nutrientes, outros fatores também influenciam no desenvolvimento e na distribuição espacial das comunidades fitoplanctônicas. A intensidade de luz é um desses outros fatores determinantes, pois a variação da radiação pode interferir na fisiologia, no crescimento e na reprodução dos organismos fitoplanctônicos. A alta intensidade de luz pode prejudicar as algas e causar danos aos pigmentos ou membranas, principalmente em condições com alta transparência e com alta radiação solar (Wetzel, 2001; Tundisi & Tundisi, 2008). Normalmente, a limitação da luz pode ocorrer devido à turbidez causada pelos sedimentos suspensos e partículas de argila inorgânica, comumente corrente nos reservatórios, rios e lagos das regiões tropicais e subtropicais (Biudes, & Camargo 2008; Utsumi, 2012). A temperatura é outra variável relacionada com radiação solar, que pode ocasionar um aumento ou diminuição das concentrações de fitoplâncton na coluna d'água.

A interação dos fatores mencionados anteriormente com as condições climáticas (vento, temperatura do ar e precipitação) limita também o crescimento do fitoplâncton nos corpos d'água. Quando há um elevado aumento da temperatura, associada a condições de baixa precipitação, pode ocorrer a proliferação de crescimento do fitoplâncton. O efeito inverso também pode surgir, altas ocorrências de chuva intensas e longas podem aumentar o escoamento superficial, provocando ocorrência de florações (Reichwaldt & Ghadouani ,2012).

2.3- Comportamento fluorescente do pigmento fotossintetizante – Clorofila-*a*.

Os principais pigmentos fotossintetizantes encontrados nos fitoplânctons são altamente fluorescentes, o que tem tornado a fluorescência uma ferramenta excepcional para o monitoramento desses organismos e, conseqüentemente, para a avaliação do ambiente aquático. O fenômeno fluorescência é quando um pigmento absorve um quantum de luz, um elétron é elevado de seu estado fundamental (S_0) para altos níveis (S_1, S_2, \dots) e, ao retornar ao estado fundamental, ou seja, de S_1 para S_0 , ocorre a emissão de fluorescência, bem como outros processos, como: perda de calor e transferência de energia para uma molécula adjacente (Nakaema & Sanches, 1999; Seppala, 2009). Na figura 2, apresenta-se resumidamente esse princípio básico do fenômeno fluorescência, mais especificamente para o caso do pigmento clorofila-*a*, em que se evidencia o comportamento de absorção e fluorescência das moléculas no corpo d'água. De acordo com a figura, a absorção da luz pela molécula ocorre na região do azul, em que o elétron passa pelo estado de excitação (S_2), posteriormente, ocorre a perda de calor, reduzindo-o para um baixo estado de excitação (S_1). Ao retornar para o estado fundamental, ocorrem dois processos: Absorção da luz vermelha em 675nm e emissão por fluorescência em 685nm.

Figura 2: Princípios básicos do fenômeno de excitação e emissão e as diferenças entre a excitação espectral (absorção) e emissão espectral (fluorescência) da luz absorvida por moléculas de pigmentos da clorofila-*a*.

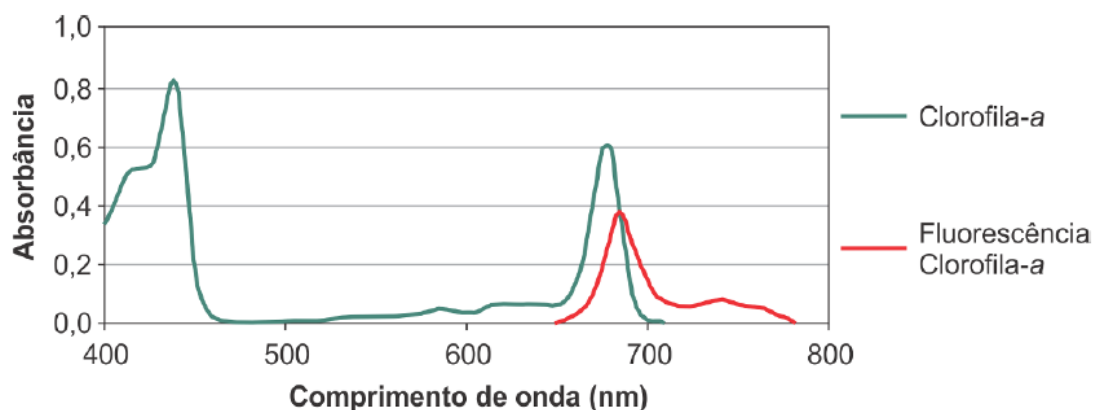


Fonte: Adaptada de Papagiourgiou e Govindjee (2004) e Suggett et al. (2010)

Além dos pigmentos fotossintetizantes, outras substâncias também apresentam comportamento fluorescente, como muitos dos compostos encontrados na matéria orgânica (Mobley *et al.*, 2005). Contudo, o elemento mais estudado ao longo de décadas por meio da fluorescência é o pigmento de clorofila *a* (Yentsch & Menzel, 1963; Lorenzen, 1966; Falkowski & Kiefer 1985; Davis *et al.*, 1997; Leboulanger *et al.*, 2002; Gregor & Maršálek 2004; Richardson *et al.*, 2010; Boss *et al.*, 2013; Roesler & Barnard 2013; Kring *et al.*, 2014; Escoffier *et al.*, 2014; Loisa *et al.*, 2015; Cremella *et al.*, 2018; Ling *et al.*, 2018; Harmann *et al.*, 2019; Panchenko *et al.*, 2020), frequentemente, utilizado com proxy para a biomassa fitoplanctônica e quantificado por meio de distintos métodos fluorimétricos.

Esses métodos de análise por fluorescência fundamentam-se no princípio de que cada pigmento possui faixas espectrais específicas de excitação e emissão, sendo que, no caso da clorofila-*a*, a energia é intensamente absorvida em comprimentos de onda menores que 675 nm (453-440, 620-635 e 672-675 nm) enquanto que a reemissão ocorre por volta de 685 nm (Shin *et al.*, 2020; Choo *et al.*, 2018; Suggett *et al.*, 2010; Seppala 2007; Lohrenz *et al.*, 2003), conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3: Espectro de absorção e fluorescência da clorofila-*a*.



Fonte: Adaptada de Papagiourgiou e Govindjee (2004).

Em outras palavras, irradia-se uma amostra em um comprimento de onda de absorção fixo e mede-se a intensidade da luz reemitida, numa faixa espectral definida. Baseadas nesse princípio, diversas tecnologias de monitoramento por fluorescência têm trabalhado com diferentes faixas espectrais ou até múltiplas bandas, para obter resultados mais precisos e acurados na quantificação de clorofila. Há, na literatura, estudos (Suggett *et al.*, 2010; Seppala 2007; Lohrenz *et al.*, 2003) que usaram distintas faixas espectrais para estimular seletivamente a excitação da clorofila-*a*, 453-440 nm, 620-635 nm e 672-675 nm, respectivamente. Um estudo mais recente, Ling *et al.*, (2018) optaram por usar canais espectrais de emissão de fluorescência em 550 nm e 700 nm, para estimar clorofila-*a* e distinguir os grupos de algas. Já a pesquisa de Garrido *et al.*, (2019) optou por usar

múltiplas faixas de excitação (370, 450, 525, 570, 590 e 610 nm) para estimular essas moléculas de clorofila-*a*. Portanto, compreender e analisar o comportamento dessas faixas (bandas fluorimétricas) é extremamente importante para obter melhores resultados.

Outro ponto pertinente é que, ao analisar dos dados, deve-se levar em consideração as interferências que podem afetar a quantificação de clorofila por fluorescência, como: sobreposição nos espectros que pode proporcionar uma super ou subestimação do pigmento, a variabilidade das espécies, o estado fisiológico, a presença de poluentes e a disponibilidade nutricional (Babin *et al.* 1996; Mobley *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2019). Além disso, outros fatores como a temperatura, a turbidez e o material orgânico dissolvido na água também podem influenciar essa quantificação. (Zamyadi *et al.*, 2016; Choo *et al.*, 2018; Kuha *et al.*, 2019).

2.4-Técnicas de estimativa da biomassa fitoplanctônica (clorofila-*a*) por fluorescência.

Existe, atualmente, uma vasta variedade de métodos de estimativa de clorofila-*a* baseados no princípio da fluorescência, por meio de distintas abordagens, que variam das mais convencionais até as mais sofisticadas.

Inicialmente, a técnica de análise por fluorescência da clorofila teve seu início na década de 30 e foi aprimorada ainda mais no final da década de 40, com avanços no desenvolvimento dos tubos fotomultiplicadores que permitiram ampliar as técnicas por fluorescência (Kautsky & Hirsch, 1931; Kautsky & Franck 1943, 1948). Nas décadas posteriores 50 e 60, surgiram várias propostas metodológicas de quantificação de clorofila-*a*, aplicadas *in vitro* (Yentsch & Menzel, 1963; Holm-Hansen *et al.*, 1965; Lorenzen, 1967) ou *in vivo* (Lorenzen, 1966; Yentsch & Yentsch, 1979; Yentsch & Phinney, 1985).

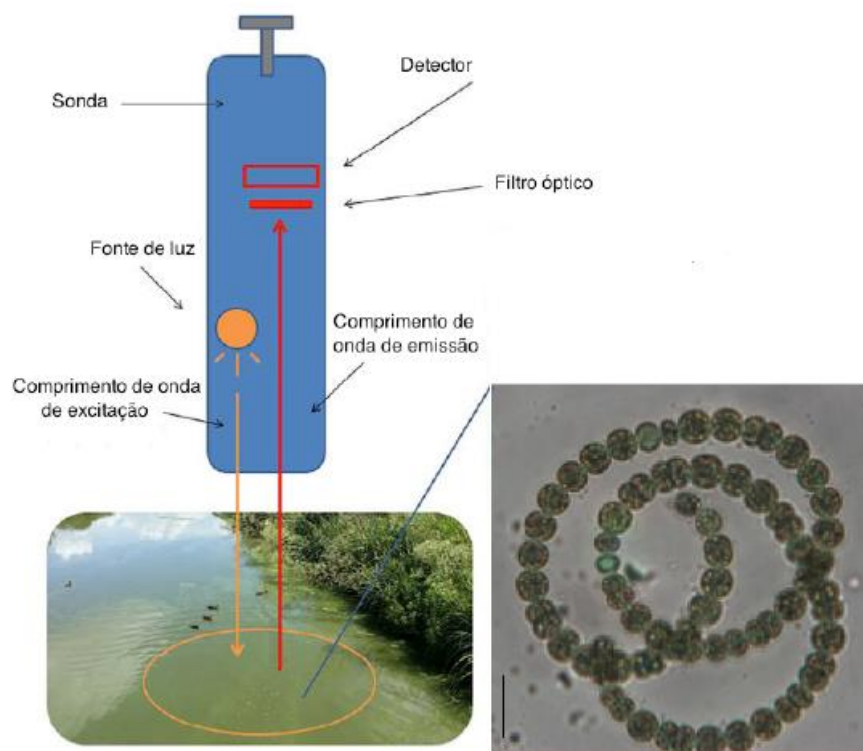
Dos vários métodos de fluorescência convencionais medida *in vitro*, vale destacar o método aprimorado por Lorenzen em 1967, que propôs uma estimativa mais eficiente para obtenção das concentrações de clorofila-*a* por meio das leituras espectrofotométricas antes e após acidificação da amostra, com intuito de diminuir as interferências dos feopigmentos derivados das clorofilas *b* e *c*. Assim sendo, tornou-se uma técnica aceitável e aconselhável pela comunidade científica (Carmouze, 1994; Jeffrey *et al.*, 1997).

É um método laboratorial tradicional (*in vitro*) usualmente utilizado até hoje em diversas pesquisas (Ferreira *et al.*, 2012; Utsumi *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Cicerelli *et al.*, 2017; Marino 2017; Batista & Fonseca 2018). Vale lembrar que é um método que envolve uma série de procedimentos, como: coleta, armazenamento adequado, transporte, filtração, extração por

solventes orgânicos (acetona ou etanol ou metanol) e leitura no espectrofotômetro. O processo analítico laboratorial requer tempo, o que pode ser inviável para um monitoramento mais grandioso, principalmente em regiões mais remotas (Ferreira *et al.*, 2012; Escoffier *et al.*, 2014). Para suprir essa lacuna espaço-temporal, outras técnicas inovadoras têm surgido, como: sensoriamento remoto, sensores ópticos, citometria de fluxo e cromatografia líquida de alto desempenho.

Dentre essas novas tecnologias, vale destacar os métodos fluorimétricos (sensores ópticos) medidos *in situ e in vivo* que quantificam substâncias (pigmentos) capazes de emitir fluorescência, diretamente no campo (*in situ*) de forma não destrutiva (*in vivo*). Além disso, obtêm os dados em grandes quantidades, com uma rápida detecção, precisão e acurácia (Seppala, 2009; Zamyadi *et al.*, 2012; Roesler *et al.*, 2017). De forma geral, as tecnologias construídas nesses princípios apresentam alguns componentes principais (Figura 4), como: fonte de luz, lentes, filtros ópticos e detectores de fluorescência (Lee *et al.*, 2016).

Figura 4: Ilustração da função tecnológica de medição de fluorescência *in situ*.



Fonte: Adaptado de (Awwa, 2010; Cagnard *et al.*, 2006; Gregor; Marsalek, 2004; Gregor; Marsalek; Sipkova, 2007).

Existe uma variedade de métodos e tecnologias construídas nesses moldes (*in situ e in vivo*) para quantificar fluorescência da biomassa fitoplânctônica. As tecnologias comercialmente disponíveis utilizam comprimento de onda de excitação e emissão distintas, que são capazes de fornecer

estimativa dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila-*a* e outros pigmentos acessórios) e até mesmo diferenciar os grupos algais. Essas tecnologias podem fornecer os dados em formato absoluto (estimativa de clorofila-*a* em µg/L) e relativo (intensidade relativa da fluorescência). Na tabela em anexo, desenvolvida por Zeng & Li (2015), pode-se observar os principais métodos tecnológicos de medição de fluorescência de clorofila, em distintas faixas de excitação e emissão, medidas *in situ*, e algumas limitações.

Embora essas tecnologias sejam promissoras na detecção da biomassa fitoplanctônica, pode-se observar algumas limitações e interferências de detecção que são discutidas em várias pesquisas (Leboulanger *et al.*, 2002; Gregor & Maršálek 2004; Catherine *et al.*, 2012; Escoffier *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016; Ling *et al.*, 2018; Garrido *et al.*, 2019; Harmann *et al.*, 2019; Panchenko *et al.*, 2020). O desafio para as técnicas de medição por fluorescência da clorofila é buscar avanços em tecnologias para melhorar e aperfeiçoar essas limitações, pois a ideia é alcançar maior precisão, confiabilidade e estabilidade na medição da fluorescência (Zeng & Li 2015). Segundo o mesmo autor, os principais avanços são nas fontes de luz, detectores, procedimentos de calibração, dimensão do fluorômetro e até mesmo no preço de equipamento. Essas melhorias podem auxiliar em um monitoramento ainda mais rápido e preciso, principalmente, em ambientes aquáticos, em que as concentrações de biomassa fitoplanctônica (clorofila-*a*) são extremamente baixas.

Como mencionado anteriormente, outras técnicas também são altamente eficientes, como a análise por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), que é um método de quantificação de pigmentos fotossintéticos, incluídos a clorofila-*a* e os pigmentos acessórios. É uma técnica precisa, confiável e amplamente utilizada em várias pesquisas de monitoramento ambiental (Mackey *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2019).

Portanto, a escolha do método de estimativa de clorofila-*a* a ser usado varia de acordo com alguns fatores, como: custo de aquisição e manutenção (preço), custo logístico, tempo de aquisição, benefícios a longo e curto prazo, precisão, acurácia das técnicas, entre outros. De forma geral, todas as técnicas apresentam vantagens, desvantagens e limitações, cabendo analisar e balancear as melhores condições.

CAPÍTULO 3- MATERIAIS E MÉTODOS

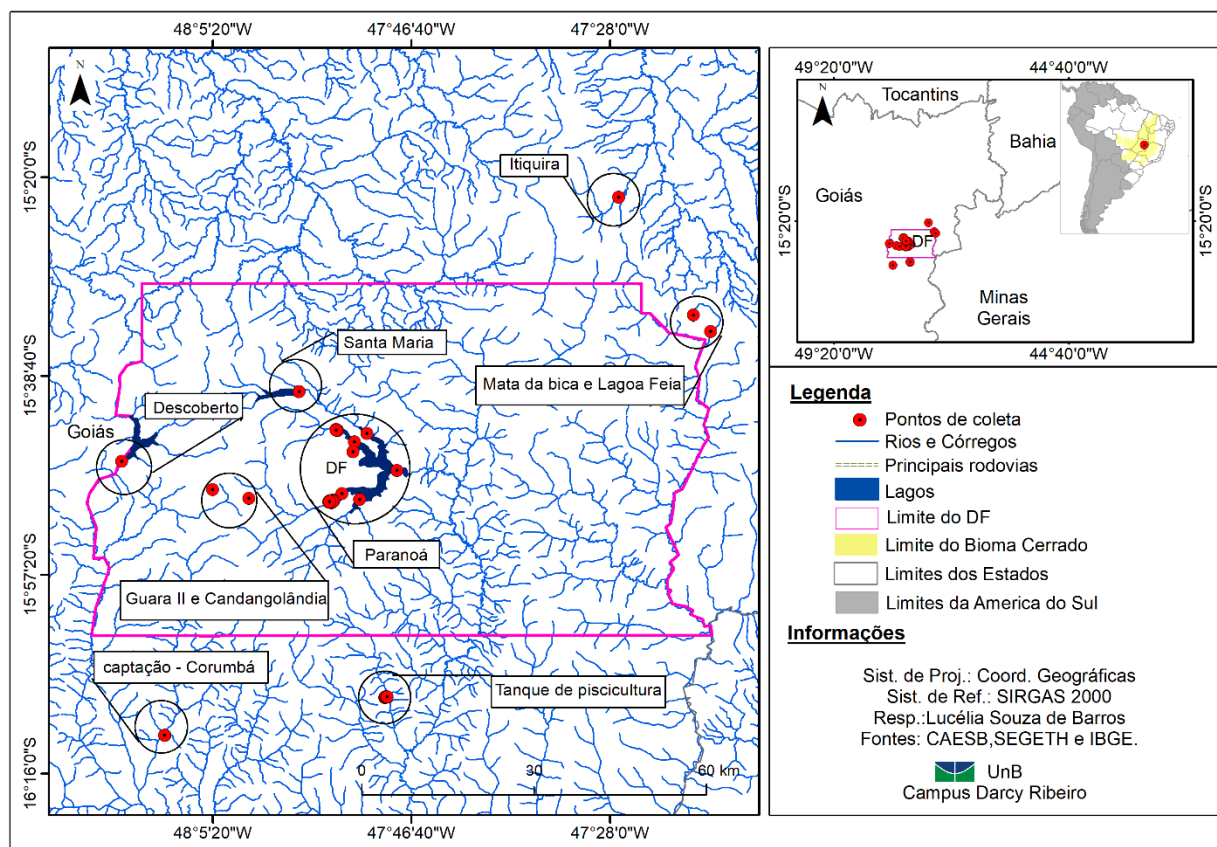
3.1-Áreas de estudo

O presente estudo está localizado integralmente no bioma Cerrado, que é o segundo maior bioma brasileiro em extensão, ocupando cerca de 21% do território nacional, localizado na porção central do país e faz contato com quatro outros biomas, que são: Floresta Atlântica, Caatinga, Pantanal e Floresta Amazônica. O bioma Cerrado apresenta uma vegetação constituída de savanas, matas, campos e matas de galeria (Oliveira filho *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2008).

É uma região conhecida por abrigar boa parte das bacias hidrográficas do país e por ser considerada a “caixa d’água do Brasil” (Lima, 2011). O clima da região é estacional, o qual apresenta um período chuvoso, que dura de outubro a março, e, posteriormente, um período seco, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.500mm e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, entre 22°C e 27°C em média (Pereira *et al.*, 2011).

Para desenvolvimento desta pesquisa, foram necessárias várias coletas em diversos ambientes aquáticos tropicais, localizados no bioma Cerrado, mais especificamente no DF e em GOIÁS, para obtenção das concentrações distintas de biomassa fitoplanctônica, em locais como: rios, lagos, reservatórios, mananciais e tanques de pisciculturas (Figura 1).

Figura 1:Mapa de Localização dos locais de coleta.



3.2-Aquisição de dados

Vários levantamentos de campo foram realizados para obtenção dos dados de clorofila-*a*, em diversos ambientes aquáticos, no DF e no entorno, locais como: braço de rios, reservatórios, lagos e tanques de piscicultura. Esses campos foram vinculados pelo Instituto de Geociências - UnB e pelos campos conveniados a CAESB. Na tabela 1, mostra-se a lista dos locais de coleta, as datas de aquisição e o número de amostras coletas por cada método utilizado. Observa-se também que algumas amostras não foram adquiridas por alguns métodos, devido aos contratempos instrumentais ocorridos ou as altas variabilidades pelo método laboratorial. Por isso, alguns dados foram descartados para análise comparativa.

Tabela 1 – Aquisição de dados

Campos	Datas	Localização	Amostras EXO	Amostras BBE	Amostras LAB
Diogo	31/05/2019	Tanque de piscicultura	11	11	11
CAESB	19/06/2019	Lago Paranoá	7	4	6
Ricardo	24/06/2019	Parque Itiquira/ Mata da bica/ Lagoa Feia	3	3	3
Cinthyia	01/07/2019	Braço do Lago Paranoá	10	8	10
CAESB	10/07/2019	Lago do Descoberto	1	1	1
CAESB	23/07/2019	Lago Paranoá	6	2	6
CAESB	08/08/2019	Lago Corumbá	2	2	2
CAESB	13/08/2019	Lago Paranoá	6	6	6
CAESB	15/08/2019	Lago Santa Maria	1	1	1
CAESB	13/09/2019	Lago Santa Maria	1	1	0
CAESB	17/09/2019	Lago Paranoá	0	6	6
Cinthyia	23/09/2019	Braço do Lago Paranoá	6	6	6
Vitória	24/09/2019	Guará II e candangolândia	2	2	2
Vitória	10/10/2019	Guará II e candangolândia	2	0	2
CAESB	21/10/2019	Lago do Descoberto	3	3	3
CAESB	22/10/2019	Lago Paranoá	6	6	6
CAESB	19/11/2019	Lago Paranoá	6	6	6
Cinthyia	06/12/2019	Braço do Lago Paranoá	10	10	10
CAESB	11/12/2019	Lago Paranoá	6	6	6
CAESB	11/02/2020	Lago Paranoá	6	6	6
CAESB	10/03/2020	Lago do Descoberto	0	1	1
CAESB/UnB	17/08/2020	Lago Paranoá - Validação	0	5	5
Total - Dados coletados			96	97	106
Total - Utilizado no Resultados Gerais			82	82	82
Total - Utilizado no Artigo			40	45	45

Além dos dados de estimativa de clorofila-*a*, outros parâmetros limnológicos (Condutividade, temperatura, pH, turbidez e oxigênio dissolvido) e climatológicos (precipitação média (mm), temperatura média (°C), umidade relativa média (%) e velocidade do vento (m/s)) foram adquiridos. Os dados limnológicos foram coletados por meio da sonda multiparamétrica EXO2 e os dados climatológicos foram adquiridos juntos ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), nas estações meteorológicas mais próximas dos pontos de coleta. Esses dados complementares foram usados somente nas análises preliminares dos dados, para caracterização das condições dos ambientes.

3.3-Técnicas de estimativa

- ✓ Método espectrofotométrico tradicional *in vitro* (referência).

A estimativa tradicional de clorofila-*a* foi realizada no Laboratório de Geoquímica do Instituto de Geociências da Universidade de Brasília e pela CAESB, ambas utilizaram a técnica de referência 10.200H do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2012). Primeiramente, as amostras de água foram coletadas em um volume de aproximadamente 1000 ml de água em um frasco escuro para evitar degradação do pigmento. Após a coleta, os frascos foram identificados e armazenados em um recipiente térmico (Isopor ou Coleman) com gelo para preservar as amostras até a chegada ao laboratório.

Na fase laboratorial, as amostras foram submetidas em três etapas: Filtragem, extração e leitura no espectrofotômetro. Na etapa filtragem, usou-se um conjunto de filtração e bomba de vácuo para filtrar a amostra e anotar o volume filtrado. O filtro utilizado foi Whatman GF/F (0.7 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro), posteriormente, cada filtro foi dobrado ao meio, acondicionado em um papel alumínio, identificado e armazenado no freezer. Para extração do pigmento, retirou-se o filtro do papel alumínio com auxílio de pinça e colocou-se para macerar o filtro cuidadosamente até o ponto pastoso, em seguida, foi adicionado no tubo de ensaio, acrescentando acetona 90% e realizado o processo de centrifugação. Vale destacar que o processo de extração (maceração) foi modificado pela CAESB e aplicado a validação, os resultados das validações estão presentes em “relatórios de validação” disponibilizados pela companhia.

Após a centrifugação, as amostras passaram para a etapa leitura no espectrofotômetro, em que foi adicionada 3 ml da amostra em uma cubeta e realizada a leitura em comprimento de onda de 664 e 750nm, em seguida, foram colocadas duas gotas de ácido clorídrico (0.1 mL 0.1N HCL) para acidificar a clorofila com tempo de espera de 90s e, novamente, feita leitura da absorbância em 750 nm e 665 nm. Anotado o volume e obtida a absorbância dos comprimentos de onda antes e após acidificação, foi obtida a concentração de clorofila-*a* a partir da equação, abaixo:

$$\text{Clorofila } a) \mu\text{g/L} = 26,73 \times (D_{664} - D_{665}) \times \left[\frac{v}{V \times L} \right]$$

Onde:

V= Volume, em litros, da amostra filtrada

v = Volume, em mL, de acetona 90% usada para extração

L= Caminho óptico, em cm, da cubeta espectrofotométrica usada

D664c= Densidade óptica a 664 nm, corrigida

D665c= Densidade óptica a 665 nm, corrigida

É importante mencionar que todo o processo laboratorial foi realizado no escuro para evitar a degradação do pigmento.

✓ Método espectrofluorímetro *in vivo* (Sondas portáteis).

A presente pesquisa também usou a técnica espectrofluorímetro *in vivo* (fluorescência-IVF) que é a detecção da clorofila-*a*, sem a degradação e contato direto com o fitoplâncton. O laboratório do IG/UnB disponibilizou dois modelos, a Sonda multiparamétrica da YSI - EXO 2 e o fluorômetro FluoroProbe - BBE Moldaenke – Version 2.6 E2. De acordo com o manual da EXO2 (2020), o dispositivo apresenta cinco sensores para realização de coleta de dados, os parâmetros limnológicos disponibilizados são:

- Algas Totais (canal duplo para clorofila e algas azuis/verdes);
- Condutividade e Temperatura;
- PH ou pH/ORP (dados de oxirredução);
- Oxigênio Dissolvido (ótico);
- Turbidez.

Especificamente para concentração de clorofila-*a*, o dispositivo YSI - EXO 2 apresenta o sensor de algas totais, que funciona da seguinte maneira: o sensor emite feixes de luz (*light-emitting diode* - LED) em comprimento de onda em 470 nm para a clorofila-*a*, 590 nm para o pigmento acessório de ficocianina (PC) encontradas em algas azul esverdeadas(cianobactérias) e de 525 nm para a ficoeritrina (PE), e as reemissões ocorrem em 685 nm (Choo *et al.*, 2018). Segundo o manual EXO2 (2020), essas faixas espectrais definidas foram baseadas em monoculturas de espécies específicas de algas reproduzidas em laboratórios.

O segundo equipamento utilizado foi o fluorômetro FluoroProbe - BBE, que detecta a fluorescência da clorofila-*a* e diferencia os principais grupos algais, conforme o manual

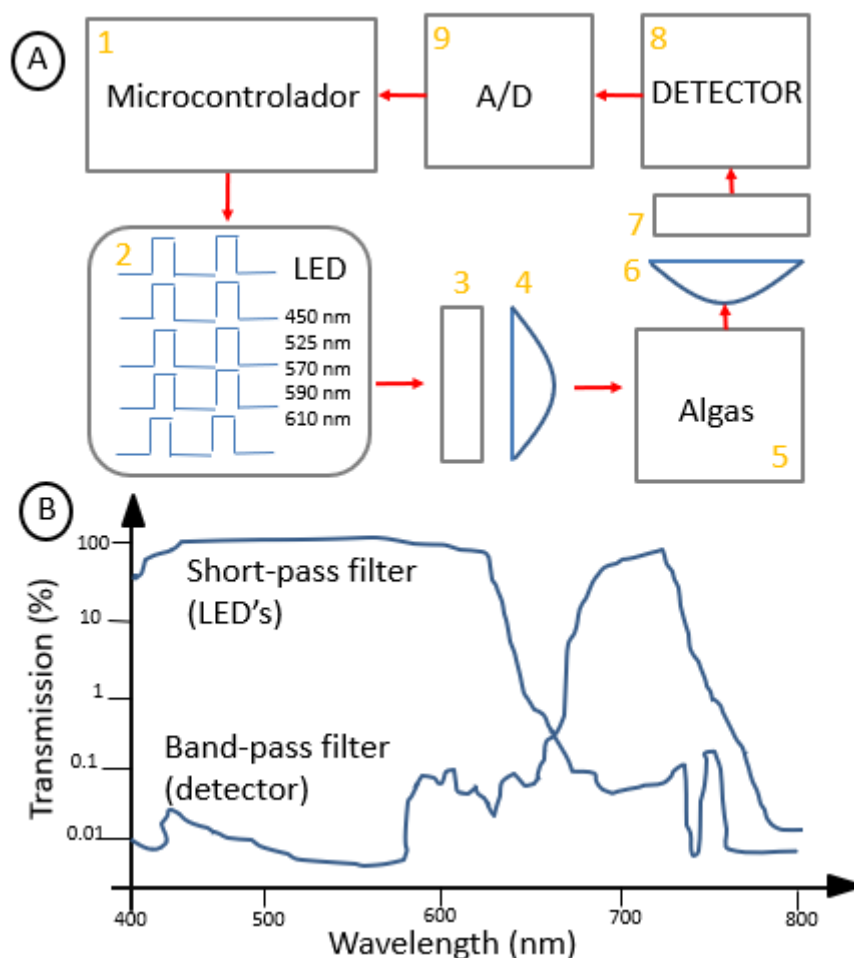
Moldaenke- BBE (2017). De acordo com Beutler *et al.* (2002), o princípio de funcionamento do fluorômetro FluoroProbe é medir a fluorescência emitida pelo núcleo do fotossistemas II e as antenas periféricas, localizadas nas membranas dos tilacóides dos fitoplâncton. Esse conjunto de antenas do núcleo central e periféricos dos Fotossistemas II, quando provocados por uma sequência de excitação de radiação, fornecem estimativas totais de clorofila-a em amostras de fitoplâncton. Para excitar essas antenas ou pigmentos é necessário variar o comprimento de onda de excitação, enquanto o comprimento de onda de observação (ou emissão) é mantido constante (Cicerelli, 2013).

No caso do FluoroProbe - BBE, o equipamento opera sob seis diodos emissores de luz (LEDs) emitidos em 370,470, 525, 570, 590 e 610 nm, sendo que o LED 470 nm é a faixa utilizada para detectar o pigmento de clorofila-a, os resultados das medidas fluorescentes são comparados com a de espectros para quatro grupos de algas, denominadas “impressões digitais”, conforme a descrição feita por Beutler *et al.*, (2002). Esse armazenamento chamado| “impressões digitais” foi baseado nas medidas dos grupos algais realizados em laboratório. Conforme o manual Moldaenke- BBE (2017), as algas são classificadas da seguinte maneira:

- O grupo das algas verde (clorofíceas), a antena periférica contém clorofila-*a* e -*b*, mostra um máximo de fluorescência no LED de 470nm.
- As cianofíceas (algas verde-azuladas) têm seu máximo em 610nm devido à presença de ficocianina no pigmento da antena fotossintética.
- As algas (“marrom”) para as bacillariophyceae origina-se da xantofila fucoxantina e para a dinofíceas da peridina mostra o pico elevado na região de 525nm.
- No nosso último grupo, cryptophyceae, um máximo significativo pode ser encontrado em 570nm, que se origina da ficoeritrina (algas “vermelhas ou mistas”).

De forma resumida, a figura 2 apresenta os principais componentes do dispositivo BBE: o microprocessador, a fonte de luz (LEDS), o filtro, a lente de foco, o fotomultiplicador e o conversor digital AD.

Figura 2. Componentes e funcionamento do fluorômetro - BBE



Fluorômetro: (A) componentes e (B) transmissão espectros de filtro óptico. Em A: (1) microcontrolador; (2) díodos emissores de luz; (3) filtro de passagem curta para bloquear as emissões vermelha e infravermelha (ver B), (4), lente de focagem; (5) volume de amostra de algas; (6) lentes de focagem; (7) filtro passa-banda (ver B); (8) fotomultiplicador integrado; (9) conversor AD). (B) Espectros de transmissão do filtro passa-curto e do filtro passa-banda.

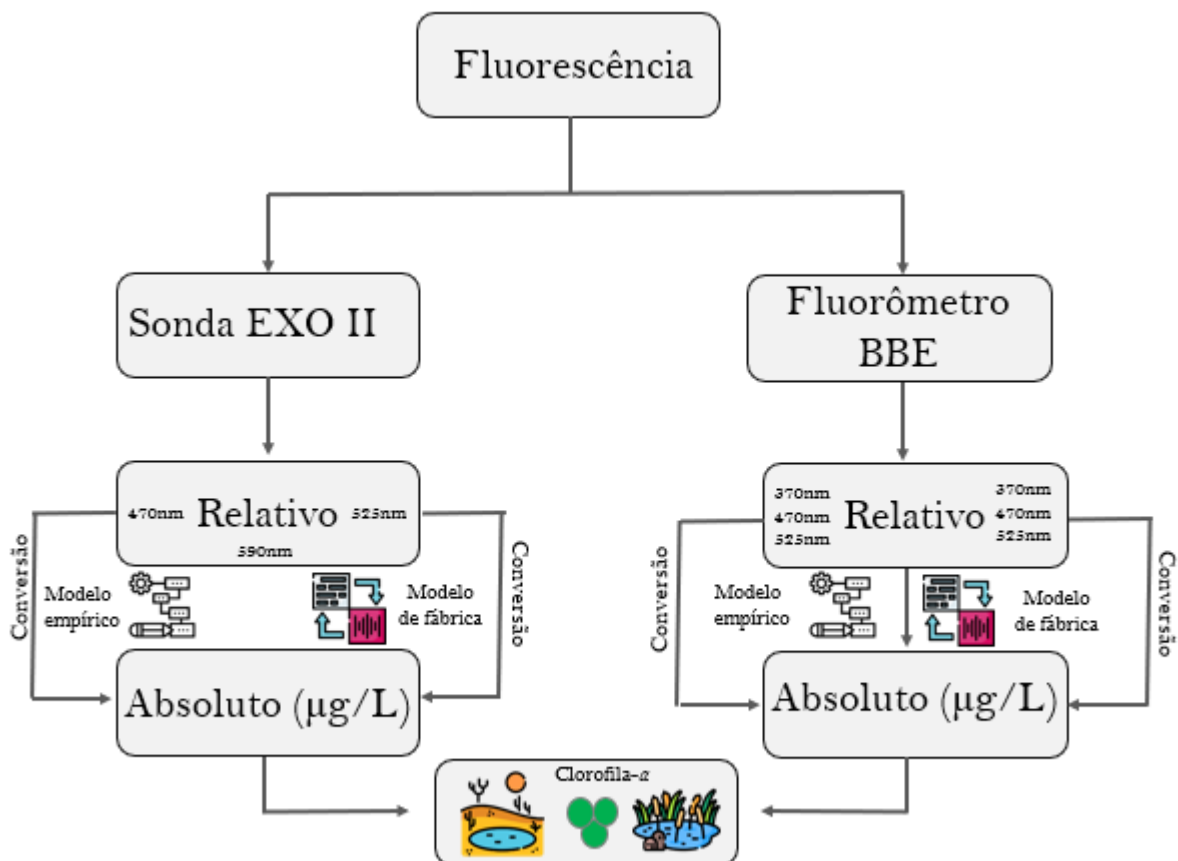
Fonte: Adaptado de Beutler *et al.*, (2002).

3.4-Disponibilização de dado absoluto e relativo

Os sensores ópticos (sondas portáteis) usados neste estudo disponibilizaram os dados em dois formatos: relativo e absoluto. O relativo é o chamado dado bruto, resultado direto do processo de fluorescência da clorofila, ou seja, os dispositivos emitem feixes de luz (LED) em um ou vários comprimentos de ondas e, em seguida, mede-se a energia de comprimento de onda mais alta emitida como resultado, chamada de intensidade relativa de fluorescência – digits ou dados brutos. A sonda EXO II opera com três comprimentos de onda 470 nm, 525 nm e 590 nm. O fluorômetro FluoroProbe - BBE Moldaenke, que, de acordo com o manual da BBE (2017), funciona em seis comprimentos de onda de excitação em 370nm, 470nm, 525nm, 570nm, 590nm e 610nm.

A partir dos dados relativos, as novas sondas portáteis convertem os dados para formato absoluto, que é a obtenção da concentração de clorofila-*a* em ($\mu\text{g/L}$). Essa conversão é feita por meio de modelos matemáticos que tentam obter somente o resultado real da clorofila, diminuindo as possíveis interferências, como matéria orgânica, turbidez e outros. Vale lembrar que são modelos gerais, ou seja, que não levam em consideração as características específicas de cada ambiente aquático. O presente estudo utilizou os dois formatos disponibilizados para avaliar o desempenho. A Figura 3 apresenta o fluxograma dos dados absolutos e relativos.

Figura 3-Fluxograma da disponibilização dos dados.



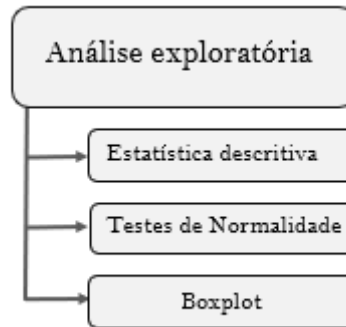
3.5-Análise exploratória dos dados absolutos

Várias análises exploratórias foram realizadas a partir dos dados absolutos adquiridos pelos sensores ópticos e pelo método tradicional (Referência). Iniciou-se com a estatística descritiva básica, para auxiliar na descrição dos dados observados, em que foram calculados a média, a mediana, os valores mínimos e máximos, o desvio padrão, o coeficiente de variação, a curtose, a assimetria e o coeficiente de variação.

A segunda fase exploratória foi a verificação da distribuição normal dos dados, por meio da construção dos testes de normalidade Shapiro-Wilk e de Kolmogorov-Smirnov. Como não houve normalidade dos dados, decidiu-se avaliar, identificar e investigar, por meio da ferramenta Boxplot, se a fonte da anormalidade foi devido à existência de valores discrepantes (outliers), observações

ruidosas ou o comportamento anormal do sistema (Díaz Muñoz *et al.*, 2012; Gradilla-Hernández *et al.*, 2020). Essa verificação é extremamente importante para definir a melhor estratégia de refinamento de dados (Gradilla-Hernández *et al.*, 2020). Essas análises exploratórias dos dados foram aplicadas em resultados preliminares e nos dados do artigo.

Figura 4-Fluxograma da fase inicial da pesquisa.

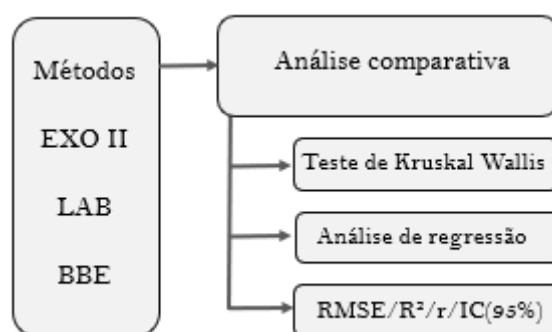


3.6-Análise comparativa dos dados absolutos

Para avaliação do desempenho dos dados absolutos ($\mu\text{g/L}$) das sondas com o método tradicional (Referência), foram realizadas análises comparativas. Inicialmente, como os três métodos avaliados não apresentaram distribuição normal, procedeu-se ao uso de algumas estatísticas não paramétricas para a realização dessas análises. Trata-se de uma abordagem habitualmente aplicada em outros estudos que também não encontraram o pressuposto da normalidade (Hartmann *et al.*, 2019; Garrido *et al.*, 2019). Neste estudo, usou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e a comparação de pares chamado *post hoc* de Dunn (ou Dunn-Bonferroni) para testar a hipótese se as três populações analisadas apresentaram diferença significativa.

Para as análises posteriores, optou-se por usar estatística tradicionalmente paramétrica, pois, como os valores discrepantes (outliers), foram ocasionados por eventos normais do ambiente, decidiu-se manter a estatística comumente usada na literatura (Silva *et al.*, 2016; Hartmann *et al.*, 2019; Garrido *et al.*, 2019). As análises complementares foram: análise de regressão, grau de confiabilidade de 95%, análise de correlação Pearson, coeficiente de determinação (R^2) e raiz do erro quadrático médio (RMSE). Essa avaliação teve, como intuito, avaliar o comportamento, a acurácia e a dispersão dos dados absolutos quando comparados com os dados de referência (Laboratório).

Figura 5-Fluxograma da análise comparativa entre os três métodos avaliados.



3.7-Descrição do modelo – Dados relativos

O presente estudo usou as bandas individuais e operações com razão de bandas fluorimétricas para desenvolver um modelo empírico para obter a estimativa da concentração de clorofila-*a* a partir dos dados de fluorescência relativa (Tabela 2). Nessa fase da pesquisa, utilizou-se apenas as bandas fluorimétricas relativas da BBE para geração do modelo. As seis bandas (370nm, 470nm, 525nm, 570nm, 590nm e 610nm) foram testadas separadamente e por operações, como razão, proporções e outras combinações para obter um modelo satisfatório, conforme as fórmulas abaixo.

Tabela 2: Combinação de bandas de fluorescência de emissão.

(x)	(1)
$\log_{10}(x)$	(2)
$(x) - (y)$	(3)
$(x)/(y)$	(4)
$\log_{10}(x) / \log_{10}(y)$	(5)
$[(x) - (y)] / [(x)/(y)]$	(6)
$[(x) - (y)] / [(y)/(x)]$	(7)
$[(x) + (y)] / [(x)/(y)]$	(8)
$[(x) + (y)] / [(y)/(x)]$	(9)
$[(x) - (y)] / [(x) + (y)]$	(10)

* as bandas 370nm, 470nm, 525nm, 570nm, 590nm e 610nm foram testadas para x e y.

Os indicativos estatísticos correlação Pearson (r) e o coeficiente de determinação (R^2) foram usados para escolher o melhor modelo a partir dos índices mais altos. Posteriormente, a análise de regressão foi empregada para gerar modelos de estimativa de clorofila-*a* a partir da relação entre os dados obtidos pelo método espectrofotômetro laboratorial com o modelo obtido pela combinação das bandas dos espectros de emissão de fluorescência relativa. A geração do modelo de estimativa de clorofila-*a* considerou a dispersão dos pontos em relação à função de regressão, bem como intervalo de confiança de 95% e p-valor de 0.05.

3.8-Validação do modelo

A primeira avaliação de desempenho e a precisão do modelo foi a partir de cinco indicadores estatísticos, comumente usados em pesquisas de variáveis limnológicas (Ling et al. 2018; Kuha et al. 2020). Foram eles: correlação Pearson (r), coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro quadrático médio (RMSE), erro percentual médio absoluto (MAPE) e erro sistemático (BIAS), que pode ser calculado da seguinte forma:

$$[R^2] \cong \frac{\hat{\beta}_1^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{\hat{\beta}_1^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 + \sigma^2} \quad (1)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - y'_i)^2} \quad (2)$$

$$MAPE = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{|p_i - t_i|}{|t_i|}}{N} \quad (3)$$

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - y'_i) \quad (4)$$

Posteriormente, foram aplicadas duas outras formas de validação. A primeira, a partir de um outro conjunto de dados coletados no campo do dia 17/08/2020 (5 pontos-Tabela 1), em que um novo valor de concentração de clorofila-*a* foi obtido por meio do modelo e comparado com o valor obtido pela técnica espectrofotométrica tradicional. Apesar do tamanho da amostra ter baixa significância estatística, manteve-se essa análise. Para preencher a lacuna do primeiro modo de validação, usou-se uma segunda forma de validação, denominado *jackknife*, popularmente conhecido como validação cruzada, aplicado para estudos que envolvem menor quantidade de elementos amostrais abaixo de 50 (Neophytou et al., 2000, p.20). A técnica consiste na remoção de uma amostra do conjunto total observado (n amostras) e o estimador do modelo é recalculado com base no restante de elementos amostrais da amostra ($n-1$) e, em seguida, a amostra removida é estimada, utilizando a nova equação do modelo. Esse procedimento é repetido para todas as amostras, de forma que todas as observações sejam estimadas nos demais valores restantes. Para geração dos cálculos, utilizou-se o programa de linguagem R e o software livre BioEstat, versão 5.0.

CAPÍTULO 4 – ANÁLISE PRELIMINAR DOS DADOS

4.1-Análise limnológica e meteorológica

Neste tópico, evidenciam-se os resultados obtidos pelas variáveis meteorológicas e limnológicas, que são elementos que influenciam no crescimento e na resposta do fitoplâncton.

Os levantamentos de campo ocorreram em condições meteorológicas favoráveis para a realização de amostragem de dados fitoplancônicos. Conforme a tabela 01 e as observações realizadas no dia de cada campo, não houve ocorrência de chuvas, poucas nuvens e a velocidade do vento foi leve. Essas características são extremamente importantes, pois a associação de chuva, temperatura e vento pode causar aumento ou diminuição da biomassa fitoplancônica. Além disso, essas interações podem provocar uma maior heterogeneidade da distribuição vertical e horizontal do fitoplâncton das concentrações de fitoplâncton na coluna d'água (Esteves, 1998; Reichwaldt & Ghadouani ,2012).

Tabela 01 – Condições meteorológicas gerais dos campos.

Estação: BRASÍLIA-83377- DF	
Temperatura média: 22°C	Velocidade do vento: 1.1 m/s
Umidade: 55%	Precipitação média dos meses coletados: 105 mm

Fonte: <https://portal.inmet.gov.br/>

Para uma análise geral do comportamento sazonal das variáveis limnológicas, apresenta-se, na Tabela 2, um resumo estatístico obtido para as variáveis em todas as áreas pesquisadas. De modo resumido, os dados limnológicos apresentaram valores homogêneos para todos os locais de estudo. A temperatura média da água foi de 26.2°C. A turbidez foi considerada baixa, variável que depende de vários fatores para sua alteração, como concentração de material dissolvido e do material em suspensão. O pH, entre 5.2 e 6.3, está dentro do padrão estabelecido como referência. Por fim, as taxas de oxigênio dissolvido variaram de 8 a 15, o que pode ser decorrente de interferências da matéria orgânica.

Tabela 2: Variáveis limnológicas medidas nos campos

Variáveis Limnológicas	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
Condutividade	122.8	170.8	145.5	10.2	7.02%
temperatura	22	29.1	26.2	0.45	2.02%
pH	5.2	7.6	6.78	0.3	5%
turbidez	1.8	5.24	6.9	0.3	4.74%
oxigênio dissolvido(mg.)	8	15	3.1	0.84	25%

4.2-Análise estatística dos dados absolutos

Com a obtenção dos dados coletados referentes aos três métodos, observou-se que alguns dados não poderiam ser usados para análise comparativa, o que foi ocasionado por problemas logísticos e instrumentais no momento da coleta, sendo assim, foi necessário descartar alguns dados, totalizando 82 pontos amostrais. Na tabela 03, apresentam-se os resultados da estatística descritiva dos três métodos de estimativa de clorofila-*a*, após o descarte dos dados.

Tabela 3 - Estatística descritiva das concentrações de clorofila-*a*.

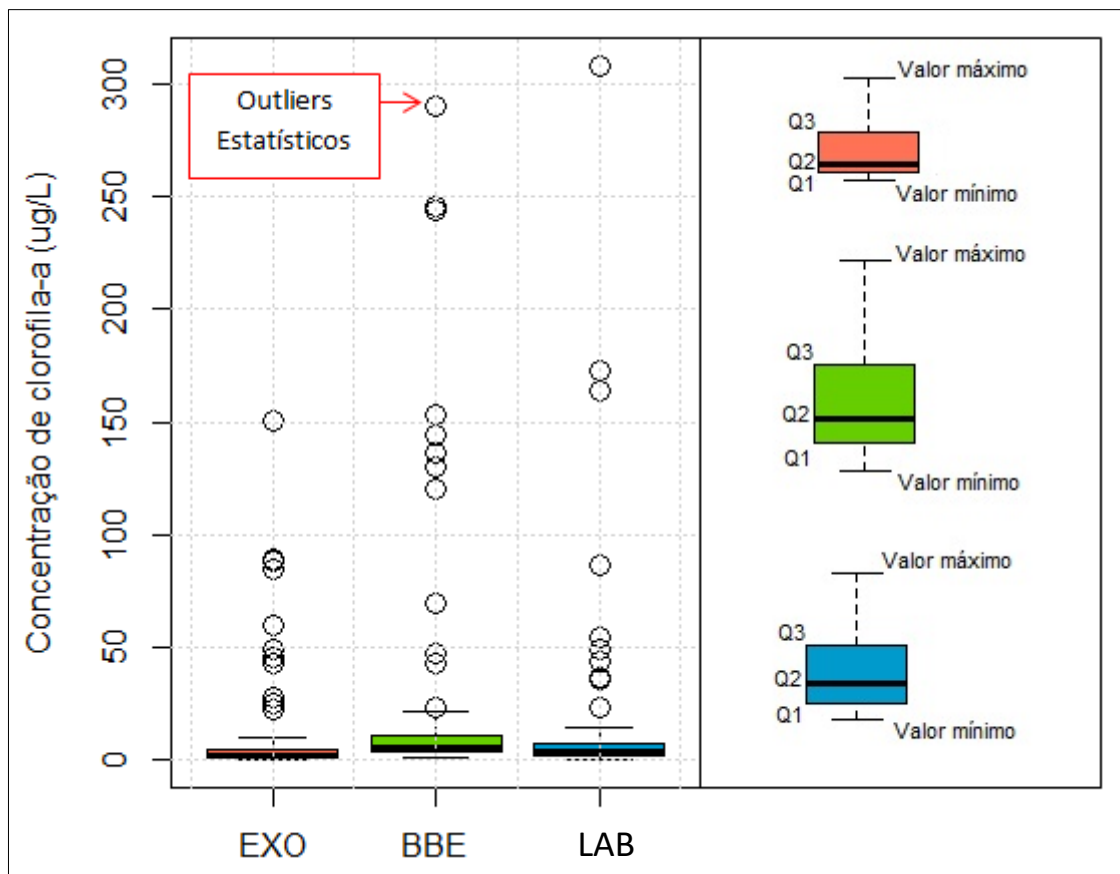
Estatística descritiva			
Variáveis	EXO	BBE	LAB
Tamanho da amostra	82	82	82
Mínimo	0.27	0.72	0
Máximo	150.6	290.74	308.26
Amplitude Total	150.55	290.32	308.26
Mediana	1.55	5.46	3.60
Média Aritmética	10.15	24.95	15.02
Variância	602.02	3171.39	1859.86
Desvio Padrão	24.54	56.32	43.13
Erro Padrão	2.69	6.18	4.73
Coefficiente de Variação	241.74%	225.73%	287.04%
Assimetria (g1)	3.70	3.28	5.11
Curtose (g2)	15.24	10.61	29.27
Shapiro-Wilk	*	*	*
Kolmogorov-Smirnov	**	**	**

EXO – instrumento usado para coleta de pigmento de clorofila-*a* em µg/L; BBE – instrumento usado para coleta de pigmento de clorofila-*a* em µg/L; LAB – método laboratorial utilizado para leitura pigmento de clorofila-*a* em µg/L; *: distribuição não normal pelo teste de Shapiro-Wilk's a 5 %; **: distribuição não normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a 5 %.

Os resultados da tabela 03, os valores dos métodos avaliados para os 82 pontos mostram que as medidas de tendência central dos dados, como: média aritmética (10.15, 24.95, e 15.02) e mediana (1.55, 5.46, e 3.60) apresentaram valores altamente distintos, evidenciando que os dados tendem a não apresentar uma distribuição normal. Essa afirmação pode ser observada também nos valores de assimetria e curtose, no caso da assimetria: os dados foram caracterizados como distribuição assimétrica positiva $g > 0$, ou seja, maior que zero e apresentam uma distribuição mais para a direita da curva, não se enquadrando uma distribuição simétrica. O coeficiente de curtose caracterizou-se como uma curva mais fechada que o normal, esse tipo de curva de achatamento é conhecido como leptocúretica.

Para analisar a variável coeficiente de variação, usou-se uma classificação muito utilizada ainda em diversas áreas de pesquisa, a proposta feita por Gomes (1991), que classifica os valores como: baixos (menores que 10%), médios (entre 10 e 20%), representando pouca variabilidade para essas variáveis, entre 20 e 30% considerado alto, e acima de 30% tido como muito alto, representando alta variabilidade. Na Tabela 3, os coeficientes de variação para os três (EXO, BBE e LAB) métodos analisados foram acima de 30%, ou seja, uma elevada dispersão. Essa constatação é devida aos experimentos terem sido feitos em diferentes ambientes e com variação bastante significativa. Além disso, outras variáveis, como: variância, desvio padrão, erro padrão, amplitude total, mínimo e máximo, também confirmam essa variabilidade. Diante do observado na análise preliminar da estatística descritiva e confirmada pelos testes de normalidade Shapiro-Wilk e de Kolmogorov-Smirnov, os métodos não apresentaram normalidade (Tabela 3). Uma forma de visualizar essa variabilidade dos dados e investigar a fonte da anormalidade, usou-se o gráfico de caixa (Boxplot), que permitiu identificar a existência de outliers, como pode ser observado na Figura 01.

Figura 01: Boxplot dos dados de clorofila-a para os três métodos coletados



Q3- Terceiro quartil; Q2-Segundo Quartil ou mediana; Q1-Primeiro quartil; EXO – instrumento usado para coleta de pigmento de clorofila-a em $\mu\text{g/L}$; BBE – instrumento usado para coleta de pigmento de clorofila-a em $\mu\text{g/L}$; LAB – método laboratorial utilizado para leitura pigmento de clorofila-a em $\mu\text{g/L}$.

Na figura 01, observa-se a presença dos pontos que apresentaram discrepância (outliers estatísticos) para cada método avaliado (EXO, BBE e LAB), a quantidade de outliers foram 11,12 e 10, respectivamente. Esses valores discordantes são referentes aos pontos de altas concentrações que foram coletados em ambientes artificiais, lênticos e lóticos, são eles: o tanque de piscicultura, que é um ambiente aquático monitorado, o lago do parque Asa Sul e o braço do rio do Riacho Fundo I, vistos na Figura 1 (Mapa de Localização dos locais de coleta) que apresentam atividades antrópicas ao entorno, o que provavelmente pode ocasionar um aumento de atividades fitoplanctônicas.

Ainda na figura 1 (Boxplot) é notório a alta variabilidade entre os três métodos coletados, apesar das coletas terem sido coletadas simultaneamente nos mesmos pontos. O método espectrofluorímetro EXO (*in vivo*), apresentou as menos concentrações quando comparadas com os outros métodos. O método BBE alcançou resultados mais próximo ao de referente (LAB) evidenciados nas variáveis média, mediana e amplitude máxima (tabela 1).

Outra constatação é que a técnica espectrofotométrica tradicional (LAB) - *in vitro*, apresentou maiores valores, com amplitude máxima 308.26, já os métodos portáteis EXO e BBE apresentaram 150.6 e 290.74, respectivamente. Esses valores encontrados são referentes aos pontos de coleta realizados nos tanques de piscicultura. É importante mencionar que outros pontos também apresentam alta variabilidade, pelo fato de serve de ambientes de alta concentração ou devido as superestimativas dos métodos portáteis.

No intuito de compreender o comportamento da estimativa de clorofila-a pelas técnicas foram realizados testes preliminares para comparação da estimativa absoluta obtida com a sonda EXO e BBE com a concentração de clorofila-a obtida em laboratório (figura 2).

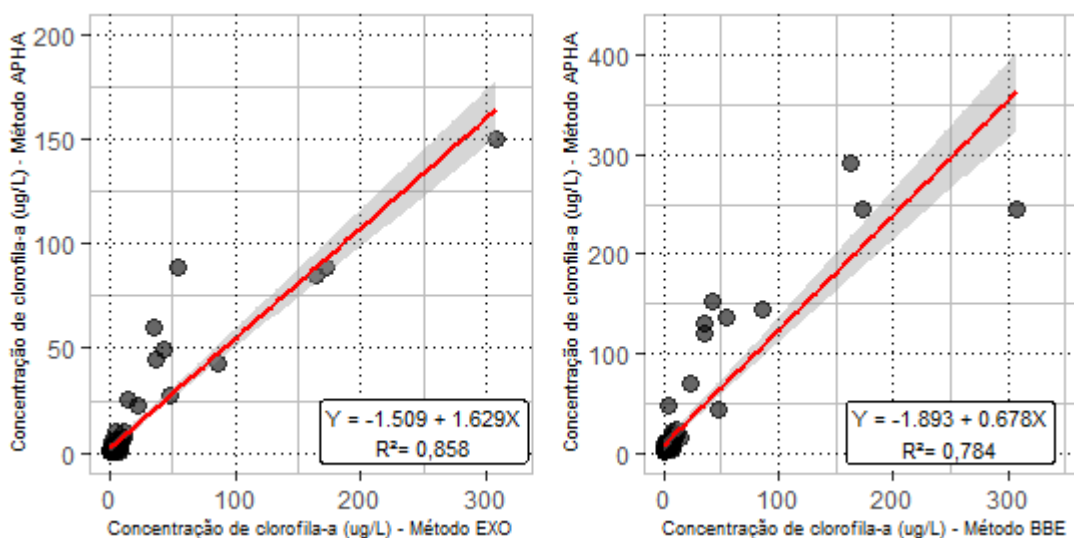


Figura 02: Equações de regressão linear entre os métodos avaliados.

Percebe-se na figura 2, uma aglomeração dos pontos para baixas concentrações e uma dispersão para altas concentrações, o que evidencia que o modelo gerado ficou inadequado para o universo amostral. Apesar dos coeficientes de determinação terem sido altos, vale ressaltar que a existência de alguns valores espúrios ou outliers, que podem influenciar no resultado.

Ainda nessa análise preliminar ficou evidente uma certa variabilidade no comportamento de clorofila-a obtida pela técnica de laboratório, principalmente para pontos com maiores concentrações, como observado na figura 2. Ficou constatado a não normalidade dos dados, alta dispersão dos dados (coeficiente de variação) e, principalmente, a diferenças entre as réplicas e trélicas pelo método laboratorial realizado no laboratório do IG/UnB. Após uma análise cuidadosa nos dados, observou que os resultados de estimativa laboratorial por espectrofotometria obtidos pela CAESB apresentaram comportamento normal com alto controle de qualidade. Atualmente a CAESB apresenta laboratório, ferramentais e protocolos consolidados para a estimativa na concentração de clorofila-a, o que garante a qualidade na estimativa. A Tabela 4 apresenta um experimento realizado pela Caesb com a quantificação de clorofila para diferentes pontos no Lago Paranoá, além da réplica e tréplica.

Os resultados mostram que a variabilidade entre as amostras para o mesmo ponto não ultrapassou um desvio padrão de 0,5 µg/L, sendo muito abaixo do desvio padrão obtidos em outros laboratórios. Dessa forma, os dados obtidos em outros laboratórios foram extraídos da amostra para as análises posteriores, mantendo-se apenas as análises laboratoriais realizadas pela CAESB. Entende-se que o fato de a Caesb ter estabelecido um protocolo bem definido, com equipamentos, logística e espaço físico adequados, garante que as estimativas tenham qualidade suficiente para serem utilizadas para validação dos dados de fluorescência.

Naturalmente, o universo amostral para as próximas etapas foi reduzido para 45 amostras.

Tabela 4: Pontos de validação – Amostras triplicadas

Data	Locais	Chla µg/L	Média	Desvio Padrão
17/08/2020	Paranoá - A5 - 01 m Próx. Trem do Lago/Posto	2.1	2.03	0,404
17/08/2020	Paranoá - A5 - 01 m - Próx. Trem do Lago/Posto	1.6		
17/08/2020	Paranoá - A5 - 01 m - Próx. Trem do Lago/Posto	2.4		
17/08/2020	Paranoá - B - 01 m - Parque QL 14 (ultra-leve)	0.5	0.87	0,404
17/08/2020	Paranoá - B - 01 m - Parque QL 14 (ultra-leve)	1.3		
17/08/2020	Paranoá - B - 01 m - Parque QL 14 (ultra-leve)	0.8		
17/08/2020	Paranoá - C - 01 m - Área central	1.9	1.7	0,173
17/08/2020	Paranoá - C - 01 m - Área central	1.6		
17/08/2020	Paranoá - C - 01 m - Área central	1.6		
17/08/2020	Paranoá - D - 01 m - Ent. Ribeirão do Torto	1.9	1.8	0,173
17/08/2020	Paranoá - D - 01 m - Ent. Ribeirão do Torto	1.6		
17/08/2020	Paranoá - D - 01 m - Ent. Ribeirão do Torto	1.9		
17/08/2020	Paranoá - E - 01 m - Minas Brasília Tênis Clube	4	3.37	0,850
17/08/2020	Paranoá - E - 01 m - Minas Brasília Tênis Clube	2.4		
17/08/2020	Paranoá - E - 01 m - Minas Brasília Tênis Clube	3.7		

CAPÍTULO 5 – FLUORESCÊNCIA NA ESTIMATIVA DE CLOROFILA-A EM MANANCIAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO NO CERRADO, BRASIL

RESUMO: Uma das consequências do processo de eutrofização artificial é a proliferação de fitoplâncton para níveis que afetam o meio ambiente e a saúde humana, principalmente em mananciais de abastecimento público. A estratégia habitual para monitoramento desses eventos é o uso de métodos limnológicos tradicionais de quantificação de biomassa fitoplanctônica. Esses procedimentos envolvem análises laboratoriais onerosas e morosas, normalmente com metodologias *in vitro*, que ainda podem apresentar limitações quanto à sensibilidade e confiabilidade, se mal administradas. Naturalmente, o processo resulta na redução do tempo de previsão do risco de desastres ambientais, o que provoca atrasos nas ações de resposta. Logo, estabelecer técnicas para monitorar os ambientes aquáticos de forma rápida, acurada e precisa é um grande desafio. Os fitoplânctons contam com a capacidade dos principais pigmentos fotossintetizantes serem altamente fluorescentes, fornecendo informações quali/quantitativas de algas. Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi analisar e avaliar métodos de estimativa de clorofila-*a* por meio da fluorescência em mananciais de abastecimento público no cerrado brasileiro. Os dados absolutos e laboratoriais foram submetidos a uma análise exploratória estatística, na qual se observou baixas concentrações de clorofila-*a* e uma forte correlação entre métodos (Dados 1 - $r=0.79$, $R^2=0.63$; Dados 2 - $r=0.78$, $R^2=0.63$). Posteriormente, foram gerados modelos empíricos que permitissem a conversão de medidas de fluorescência relativas em estimativas de concentração de clorofila a partir da combinação de bandas. O modelo gerado apresentou correlação significativa forte ($r=0.88$; $R^2=0.78$), principalmente, quando comparado com dados absolutos. A eficiência do modelo pode ser confirmada pelos indicadores estatísticos (RMSE= 1.27, MAPE=26.72 e BIAS= -6.32) e pelos dois métodos validação usados, em que se concluiu que a estimativa de clorofila-*a* por meio de dados relativos foi melhor que utilizando dados absolutos. Observou-se que o uso das medidas fluorimétricas é ótima como alternativa para quantificação em concentração de clorofila, portanto, uma excelente ferramenta no controle e no monitoramento de ambientes tropicais.

Palavras-chave: Fluorescência. Estimativa de Clorofila-*a*. Ambientes Aquáticos Tropicais.

ABSTRACT: One of the consequences of the artificial eutrophication process is the proliferation of phytoplankton to levels that affect the environment and human health, especially in public water sources. The usual strategy for monitoring these events is the use of traditional limnological methods for quantifying phytoplankton biomass. These procedures involve costly and time-consuming laboratory analyses, usually with *in-vitro* methodologies, which can still have limitations in terms of sensitivity and reliability, if poorly managed. Naturally, the process results in a reduction in the time for forecasting the risk of environmental disasters, which causes delays in response actions. Therefore, establishing techniques to monitor aquatic environments quickly, accurately and precisely is a great challenge. Phytoplankton have on the ability of major photosynthetic pigments to be highly fluorescent providing qualitative/quantitative algal information. Given the above, the objective of this research was analyzed and evaluated the estimate of chlorophyll-*a* through fluorescence in public water sources in the Brazilian cerrado. Absolute and laboratory data were subjected to an exploratory statistical analysis, which observed low concentrations of chlorophyll-*a* and a strong correlation between methods (Data 1 - $r=0.79$, $R^2=0.63$; Data 2 - $r=0.78$, $R^2=0.63$). Subsequently, empirical models were generated that allowed the conversion of relative fluorescence measurements into chlorophyll concentration estimates from the combination of bands. The model generated showed a strong significant correlation ($r=0.88$; $R^2=0.78$), especially when compared to absolute data. The efficiency of the model can be confirmed by the statistical indicators (RMSE= 1.27, MAPE=26.72 and BIAS= -6.32) and also by the two validation methods used, in which it concluded that the estimate of chlorophyll-*a* through relative data was better than using absolute data. The generated model explained, confirmed by the validation parameters, concluding that the estimate of chlorophyll-*a* through relative data was better than using absolute data. It was observed that the use of fluorimetric measurements is an excellent alternative for quantifying chlorophyll concentration, therefore, an excellent tool in the control and monitoring of tropical environments.

Keywords: Fluorometer. Fluorimetric Reflectance. Aquatic Environments.

1- Introdução

Proteger os mananciais de água é essencial para a manutenção da vida dos ecossistemas terrestres. Além das chuvas, o volume de água que abastece as zonas urbanas e rurais advém dessas fontes. Logo, é um dever de toda a sociedade o uso consciente da água, monitoramento e preservação desses mananciais (Mustafa *et al.*, 2020). No Brasil, tem se observado esse agravamento nos ambientes aquáticos, causados pelas poluições originadas de fontes pontual e difusa, que ocasiona assoreamento e estimula o processo de eutrofização, o que induz a proliferação de fitoplâncton para níveis críticos.

Esses processos são ainda mais dinâmicos em ambientes tropicais, nos quais as alternâncias de estações quentes e úmidas no verão, e frias e secas no inverno, provocam uma maior capacidade de assimilação de nutrientes e conseqüente rápido crescimento de algas e plantas aquáticas (Lewis 2000; Hennemann *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2020). Como consequência, o reservatório pode deixar de cumprir seus usos múltiplos, em razão da presença de variáveis limnológicas com valores acima do limite permitido. Trata-se de um cenário comum em grandes centros urbanos, portanto, torna-se um desafio definir estratégias de monitoramento que garantam o entendimento da dinâmica do ambiente aquático. A clorofila-*a*, encontrada na biomassa do fitoplâncton, é um elemento com esse potencial, pois é considerado um indicador dos níveis de eutrofização, portanto, um alvo importante para o controle (Lorenzen 1967; Hartmann *et al.*, 2019; Panchenko *et al.*, 2020).

Atualmente, existe uma variedade de abordagens que são usadas para mensurar e quantificar esse pigmento. Técnicas tradicionalmente utilizadas (Marino 2017; Batista e Fonseca 2018; Garrido *et al.*, 2019) são os métodos espectrofotométricos ou de cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography*-HPLC). Tratam-se de métodos destrutivos (*in vitro*) que utilizam vários protocolos de laboratório com elevado consumo de reagentes químicos. A quantificação é extremamente confiável e aceitável, apesar de ainda ter muito debate sobre a abordagem *in vitro*, pois envolve uma série de etapas laboratoriais (processos químicos e maceração) que podem deteriorar as algas no momento da extração (Lorenzen 1967; Heukelem *et al.*, 2001; Marino. 2017; Graban *et al.*, 2020). Além disso, as análises consomem tempo, requerem grandes volumes de amostra e envolvem alta logística e altos custos analíticos (Ferreira *et al.*, 2012; Kuha *et al.*, 2020). Esse processo retarda a caracterização do ambiente, o que atrasa o potencial de resposta dos órgãos responsáveis para ações de prevenção, controle e fiscalização.

Para suprir essa lacuna espaço-temporal, novas tecnologias são propostas com capacidade de captura de dados em tempo real (Loisa *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2018; Cremella *et al.*, 2018; Garrido *et al.*, 2019; Panchenko *et al.*, 2020; Silva e Garcia 2021). Dentre as diversas tecnologias, destacam-

se os sensores ópticos, que se baseiam no princípio da fluorescência. Roesler *et al.* (2017) apresentam benefícios no uso da fluorescência *in vivo*, dentre eles, destacam-se a facilidade de uso, a aquisição instantânea da concentração dos elementos de forma não destrutiva do organismo, a capacidade de obtenção de dados em grandes quantidades, a precisão e a acurácia.

A técnica fundamenta-se no princípio de que cada pigmento possui faixas espectrais de excitação e emissão, que, no caso da clorofila-*a*, é absorvida em comprimentos de onda menores que 675 nm (453-440, 620-635 e 672-675 nm) e reemitida por volta de 685 nm (Shin *et al.* 2020; choo *et al.* 2018; Suggett *et al.*, 2010; Seppala 2007; Lohrenz *et al.*, 2003). Essas faixas (bandas fluorimétricas) têm um papel importantíssimo na obtenção de um resultado confiável na detecção dos pigmentos e até mesmo identificação dos grupos de algas. Tal constatação foi confirmada na pesquisa de Ling *et al.* (2018) que obtiveram ótimos resultados a partir do uso de canais espectrais de emissão de fluorescência em 550 nm e 700 nm para estimar clorofila-*a* e distinguir os grupos de algas. O estudo de Garrido *et al.* (2019) também obteve excelentes resultados, porém trabalhou com outras bandas fluorimétricas (370, 450, 525, 570, 590 e 610 nm) para alcançá-los. Apesar dessas vantagens, há relato em estudos que demonstram preocupações diante dos dados adquiridos, como observado no estudo de Catherine *et al.* (2012), que identificaram valores superestimados de clorofila-*a*, quando correlacionados com medidas laboratoriais tradicionais.

Vários outros trabalhos com abordagens distintas (Leboulanger *et al.*, 2002; Gregor e Maršálek 2004; Richardson *et al.*, 2010; Houliez *et al.*, 2012; Kring *et al.*, 2014; Escoffier *et al.*, 2014; Ling *et al.*, 2018; Hartmann *et al.*, 2019) também avaliaram a efetividade da fluorescência *in vivo*. Entretanto, muitos desenvolvidos em ambientes controlados, regiões temperadas ou de altas concentrações de clorofila-*a*, o que pode ser diferente da realidade de reservatórios tropicais.

No Brasil, pesquisas que usaram método *in vivo* (fluorômetro) para quantificar concentração de clorofila-*a* possuem baixa amostragem laboratorial, o que compromete a avaliação e/ ou calibração dos fluorômetros (Silva *et al.*, 2016; Cicerelli *et al.*, 2017, Ferreira *et al.*, 2012). Essas pesquisas apontam uma lacuna na literatura sobre a acurácia dos dados fluorimétricos advindos de formato absoluto e relativo em ambientes altamente heterogêneos, tais como ambientes tropicais e mananciais de abastecimento público.

Distante do exposto, o presente estudo tem, como objetivo, analisar e avaliar métodos de estimativa de clorofila-*a* por meio da fluorescência em ambientes tropicais no Cerrado. Para tanto, foram testadas diferentes composições de dados fluorimétricos (regiões de emissão e excitação) absolutos e relativos para a avaliação de sua acuracidade na detecção de clorofila-*a*. Entende-se que os dados fluorimétricos relativos podem ser adaptados por meio do uso de modelos empíricos,

melhorando, assim, o potencial na estimativa de clorofila-*a*, ou seja, acredita-se que o modelo físico oferecido pela empresa para estimativa de clorofila-*a* (valor absoluto) pode ser aprimorado ou apropriado para realidades de regiões tropicais, como as do Cerrado brasileiro.

2- Materiais e Métodos

2.1- Localização

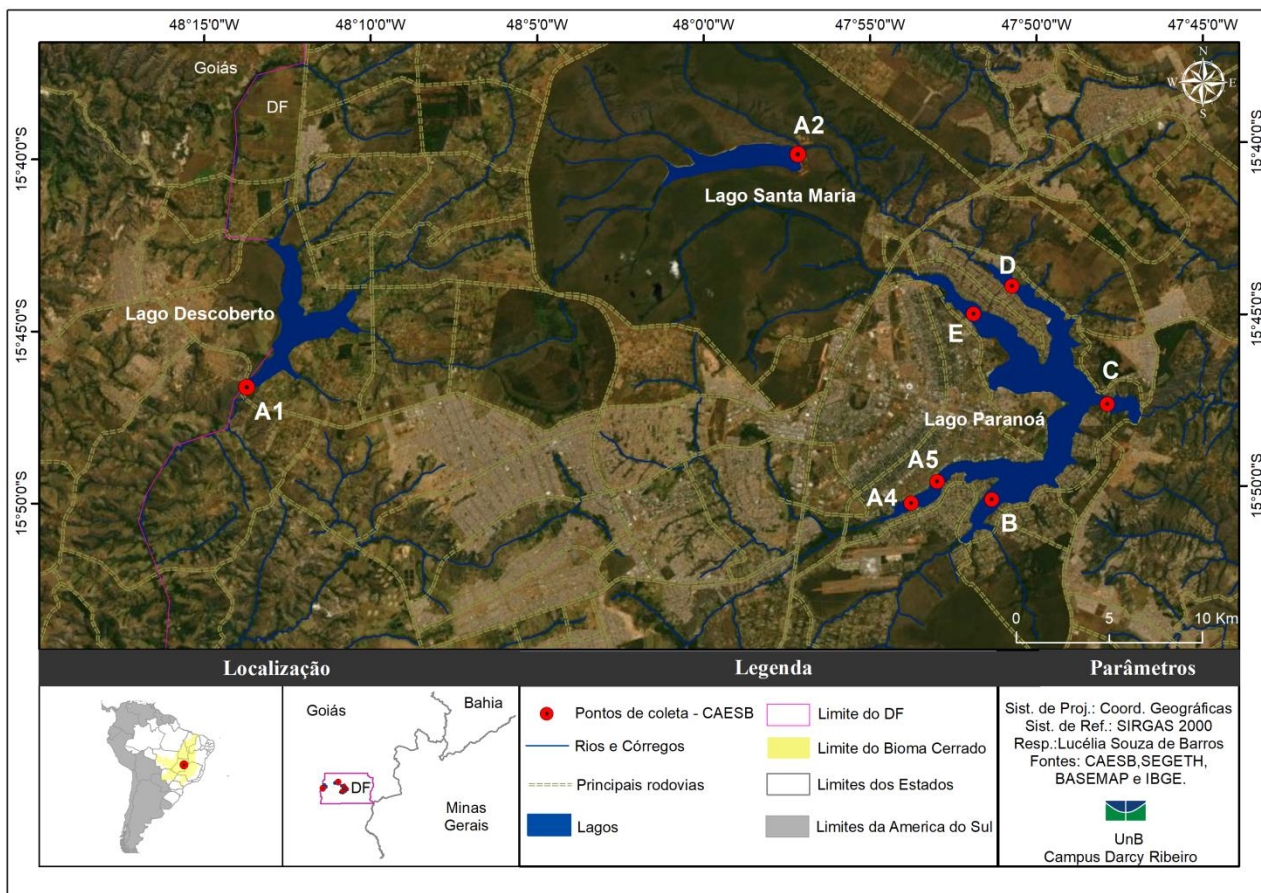
A região do estudo está inserida integralmente no bioma Cerrado, uma região conhecida por ser “caixa d'água do Brasil”, pois abriga boa parte das bacias hidrográficas do país, fundamentais no processo do escoamento das águas para outras regiões (Lima, 2011). Esse bioma apresenta uma vegetação predominante constituída de savanas, matas, campos e matas de galeria (Oliveira filho *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2008). O clima é estacional, sendo que apresenta uma estação seca e outra, que é chuvosa, precipitação média anual na faixa de 800- 1.800 mm e temperaturas variam entre 20°C e 27°C em média (Pereira *et al.*, 2011).

O presente estudo foi realizado em três mananciais de abastecimento público do Distrito Federal (DF): Lago Descoberto, Santa Maria e Paranoá (Figura 1). Esses reservatórios atendem uma população de aproximadamente três milhões de habitantes (IBGE, 2017). O primeiro lago, Descoberto, é responsável pelo abastecimento de água de cerca 60% da população do DF, está localizado na porção oeste do Distrito Federal (a 40 km do centro do plano piloto de Brasília). Possui uma área alagada de aproximadamente 12 km² e volume útil de 86 hm³(GDF, 2017). É um reservatório que tem apresentado, ao longo dos anos, uma expansão de atividade agrícola e ocupações inadequadas em seu entorno, contribuindo, assim, para a poluição do reservatório. O segundo reservatório de estudo foi o de Santa Maria, situado numa área de preservação, o Parque Nacional de Brasília, ocupa uma área de 6,1 km² e apresenta cobertura vegetal no entorno de campo limpo/cerrado. De acordo com o Plano Integrado de Enfrentamento da Crise Hídrica (GDF, 2017), os reservatórios Lago Descoberto e Santa Maria têm sofrido, nos últimos anos, com os baixos índices de precipitação (estiagem), o que tem interferido no nível de captação dos reservatórios, situação que obrigou a Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (CAESB) a interromper o abastecimento de água e prover um sistema de rodízio nas cidades do DF nos anos de 2016 e 2017.

Como resultado dessa crise hídrica, tornou-se necessário o uso do Lago Paranoá como uma fonte de captação emergencial de água para abastecimento público. Especificamente, em 2016, junto com a crise hídrica, o Lago Paranoá registrou altas concentrações de nutrientes que resultou no processo de proliferação de eutrofização e, conseqüentemente, no surgimento de cianobactérias, que são prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. (Barbosa *et al.*, 2019). O lago Paranoá é a terceira área de estudo, é um reservatório de múltiplos usos, localizado na região central do Distrito Federal,

numa área de aproximadamente 1034 km², correspondendo a cerca de 18% do DF. É um reservatório que sofre com atividades antropogênicas em virtude da sua proximidade da área urbana. Além de receber os efluentes de estações de tratamento de esgoto.

Figura 1: Mapa de Localização dos Lagos em estudo.



2.2- Delineamento amostral e métodos de estimativa

No DF, o monitoramento das variáveis limnológicas é realizado pela CAESB, de forma sistemática, por meio de técnicas convencionais. Neste estudo, em conjunto com a coleta de dados tradicional realizada pela CAESB, foram coletados dados *in vivo* (fluorômetro) nos campos, nos períodos e locais e listados na Tabela 1 e na Figura 1. Ressalta-se que a pesquisa procurou observar dados mensalmente em diferentes estações ao longo de aproximadamente um ano.

Datas	Pontos	Local	Profundidades	Nº de amostras
10/07/2019	A1	Descoberto	30 cm(superfície)	1
21/10/2019			30 cm, 1 m e 5m	3
15/08/2019	A2	Santa Maria	30 cm(superfície)	1
19/06/2019	C, D e E	Paranoá	1 metros	3
23/07/2019	D e E			2
13/08/2019	A4, A5, B, C, D e E			6
22/10/2019				6
19/11/2019				6
11/12/2019				6
11/02/2020				6
17/08/2020	A5, B, C, D e E			30 cm
Total				45

Tabela 1: Data da aquisição dos dados

Para obtenção de concentrações de clorofila-*a*, utilizou-se duas técnicas de estimativa: espectrofotométrica tradicional *in vitro* (referência) e o espectrofluorímetro *in vivo* (fluorescência-IVF) por sondas portáteis. O método de estimativa tradicional, utilizado para validação, foi realizado pela CAESB, pela técnica de referência 10.200H do *Standard Methods for the Examination os Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2012). Cada amostra de água coletada em campo foi mantida sobre refrigeração até a chegada ao laboratório, tendo sido protegida da luz. Posteriormente, as amostras coletadas foram filtradas por meio de um filtro Whatman GF/F (0.7 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro), congelada e analisada em ambiente escuro, para evitar degradação, em seguida, feita a extração dos pigmentos com acetona a 90%. Posteriormente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro em comprimentos de onda em 664 e 750 nm antes e, após, 665 e 750 nm a acidificação com HCl 0.1 N. Essa metodologia é frequentemente utilizada em pesquisas brasileiras para ambientes aquáticos interiores, como os estudos de Ferreira *et al.* (2012); Utsumi *et al.* (2015); Silva *et al.* (2016); Cicerelli *et al.* (2017); Marino (2017); Batista & Fonseca (2018).

A técnica testada para a detecção da clorofila-*a*, sem a degradação e contato direto com o fitoplâncton, foi por espectrofluorímetro *in vivo* (fluorescência-IVF). Esses instrumentos induzem a clorofila-*a* a ficar fluorescente ao direcionar um feixe de luz (*light-emitting diode* - LED) em um comprimento de onda e, em seguida, mede-se a energia de comprimento de onda mais alta emitida como resultado do processo de fluorescência (YSI, 2009). A presente pesquisa utilizou dois modelos de fluorômetro disponíveis no laboratório do IG/UnB, a sonda multiparâmetro da YSI modelo EXO2 e o fluorômetro FluoroProbe - BBE Moldaenke – Version 2.6 E2. De acordo com o manual da EXO2 (2020), o comprimento de onda de excitação ocorre em 470 nm ± 15 nm, enquanto de emissão em 685 nm ± 20 nm para a estimativa de clorofila-*a*. Além desse comprimento de onda de excitação, o fluorômetro também é capaz de excitar nos comprimentos de onda de 590 ±

15 nm e 525 ± 15 nm para a estimativa de ficocianina e ficoeritrina, respectivamente, com emissão em $685 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ (Choo *et al.*, 2018).

O fluorômetro FluoroProbe - BBE Moldaenke apresenta seis comprimentos de onda de excitação em 370nm, 470nm, 525nm, 570nm, 590nm e 610nm, com a leitura da emissão ocorrendo em 685-700 nm. Por intermédio dos LEDs, são medidas as fluorescências, que são comparadas com a biblioteca de espectros para quatro grupos de algas, denominadas “impressões digitais”, conforme a descrição feita por Beutler *et al.* (2002). Esses fluorômetros fornecem os resultados em valores absolutos ($\mu\text{g/L}$) e em valores relativos (Intensidade relativa de fluorescência - digits).

Em cada ponto analisado, os fluorômetros foram posicionados na mesma localização de coleta de água para estimativa de clorofila pelo método tradicional (referência). O intervalo médio de espera para coleta de dados foi de quatro minutos com registro a cada dois segundos. Para cada ponto coletado pelas sondas, obteve-se valores estimados a partir da média das medidas. No caso da sonda EXO, apenas a estimativa absoluta foi utilizada na pesquisa para fins de comparação com os valores de referência.

2.3- Análises Estatísticas e modelagem

A partir da obtenção dos dados absolutos adquiridos pelos fluorômetros ($\mu\text{g/L}$) e os dados tradicionais laboratoriais (*in vitro*), foram realizadas algumas análises exploratórias dos dados. Primeiramente, foi feita uma análise estatística descritiva básica dos dados, em seguida, aplicados testes de normalidade e identificado que os dados avaliados não atenderam à suposição da distribuição normal (testes de Shapiro–Wilk e de Kolmogorov – Smirnov). A ferramenta estatística Boxplot foi usada para investigar a fonte da anormalidade, devido à existência de valores discrepantes (outliers), observações ruidosas ou o comportamento anormal do sistema (Díaz Muñoz *et al.*, 2012; Gradilla-Hernández *et al.* 2020). Normalmente, um conjunto de dados brutos pode conter dados com comportamento atípico (*outliers*), portanto, é importante categorizar o tipo de *outliers* para adotar a melhor estratégia de refinamento de dados (Gradilla-Hernández *et al.*, 2020). Concluiu-se que muito dos *outliers* observados foram devido a fenômenos comuns nos ambientes aquáticos. Portanto, devido a esses valores discrepantes terem ocorridos por eventos normais, optou-se por manter essas observações para análises.

Vale lembrar que estudos anteriores também não encontraram normalidade e usaram algumas estatísticas não paramétricas para realizar análises comparativas, tais como correlação de *spearman* (Hartmann *et al.*, 2019) e o teste Kruskal-Wallis (Garrido *et al.*, 2019), que foi replicado neste estudo. O teste de Kruskal-Wallis e o método comparativo de pares chamado *post hoc* de Dunn (ou Dunn-Bonferroni) foram utilizados para analisar e comparar as diferenças significativas entre os

métodos avaliados. Ademais, as análises foram complementadas por análise de regressão linear, grau de confiabilidade de 95%, probabilidade de significância (p-valor), análise de correlação, coeficiente de determinação (R^2) e raiz do erro quadrático médio (RMSE), com o objetivo de avaliar o comportamento, a acurácia, a dispersão e a tendência dos valores fluorimétricos absolutos comparados com os dados de referência.

A estratégia adotada para os dados de fluorescência relativa foi realizar combinações de bandas dos espectros de emissão de fluorescência para desenvolver modelos empíricos a fim de estimar a concentração de clorofila-*a* a partir das medidas fluorimétricas, técnica similar aplicada pelo estudo de Ling *et al.* (2018). No estudo de Ling *et al.* (2018), além do exposto, também foi aplicado um método para estimar as espécies dominantes em águas marinhas com base nas combinações de bandas dos espectros de emissão de fluorescência.

Na pesquisa, foram utilizadas oito combinações, que incluem a análise das bandas individuais (Tabela 02 - 1) e operações com razão de bandas (Tabela 02 - 2 a 10). Cada combinação, considerou o espectro de emissão de fluorescência dos equipamentos. Foram usadas as 40 amostras coletadas para elaboração do modelo. A correlação Pearson (r), o coeficiente de determinação (R^2) e a análise de dispersão foram utilizados para determinar o melhor modelo. Posteriormente, a análise de regressão também foi empregada para gerar modelos de estimativa de clorofila-*a* a partir da relação entre os dados obtidos por espectrofotometria de laboratório com a combinação de dados de fluorescência relativa. Os modelos foram analisados considerando a dispersão dos pontos em relação à função de regressão, bem como intervalo de confiança de 95% e p-valor de 0.05. Estatisticamente, o melhor modelo foi empregado para a estimativa de concentração de clorofila-*a*.

Tabela 2: Combinação de bandas de fluorescência de emissão.

(x)	(1)
$\log_{10}(x)$	(2)
$(x) - (y)$	(3)
$(x)/(y)$	(4)
$\log_{10}(x) / \log_{10}(y)$	(5)
$[(x) - (y)] / [(x)/(y)]$	(6)
$[(x) - (y)] / [(y)/(x)]$	(7)
$[(x) + (y)] / [(x)/(y)]$	(8)
$[(x) + (y)] / [(y)/(x)]$	(9)
$[(x) - (y)] / [(x) + (y)]$	(10)

* as bandas 370nm, 470nm, 525nm, 570nm, 590nm e 610nm foram testadas para x e y.

2.4- Validação dos dados

Análises estatísticas foram feitas para avaliar o desempenho e a precisão do modelo, este estudo utilizou cinco indicadores estatísticos, comumente usados em pesquisas de variáveis limnológicas (Ling *et al.*, 2018; Kuha *et al.*, 2020). Foram eles: correlação Pearson (r), coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro quadrático médio (RMSE), erro percentual médio absoluto (MAPE) e erro sistemático (BIAS), que pode ser calculado da seguinte forma:

$$[R^2] \cong \frac{\hat{\beta}_1^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{\hat{\beta}_1^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 + \sigma^2} \quad (1)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - y'_i)^2} \quad (2)$$

$$MAPE = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{|p_i - t_i|}{|t_i|}}{N} \quad (3)$$

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - y'_i) \quad (4)$$

Para avaliar o potencial do modelo desenvolvido, foram aplicadas duas formas de validação. A primeira, *in situ*, foi a verificação a partir de um outro conjunto de dados coletado no campo do dia 17/08/2020 (5 pontos-Tabela 1), em que um novo valor de concentração de clorofila-*a* foi obtido por meio do modelo e comparado com o valor obtido pela técnica espectrofotométrica tradicional. Apesar do tamanho da amostra ter baixa significância estatística, manteve-se essa forma de validação. O segundo método de validação, denominado *jackknife*, popularmente conhecido como validação cruzada, que é aplicado para estudos que envolvem menor quantidade de elementos amostrais (Neophytou *et al.*, 2000, p.20). Essa técnica consiste na remoção de uma amostra do conjunto total observado (40 amostras) e o estimador do modelo é recalculado com base no restante de elementos amostrais amostra (n-1) e, em seguida, a amostra removida e é estimada utilizando a nova equação do modelo. Esse procedimento é repetido para todas as amostras, de forma que todas as observações sejam estimadas nos demais valores restantes.

Por fim, foi realizada uma proposta de adaptação do modelo absoluto obtido pela sonda BBE para reservatórios de abastecimento público do cerrado. Para geração dos cálculos, utilizou-se o programa de linguagem R e o software livre BioEstat, versão 5.0.

3- Resultados e Discussão

3.1- Análise dos valores Absolutos

Os trabalhos de campos foram realizados em condições meteorológicas favoráveis com ausência de chuva, temperatura (média de 22°C), vento (média de 1.1 m/s) e umidade do ar (55%). A análise estatística obtida a partir dos valores absolutos extraídos diretamente dos fluorômetros de concentração de clorofila-*a* segue na Tabela 03. Os valores de clorofila-*a* permaneceram abaixo de 30 µg/L para todo o período, sendo considerado dentro do limite estabelecido pela resolução CONAMA n°357/2005, para águas de classe 2. Embora as concentrações de clorofila-*a* tenham sido baixas para os reservatórios avaliados, observou-se ainda, pelo desvio padrão, uma certa variabilidade nos dados. O coeficiente de variação alcançado pelas técnicas foi de 118% pelo fluorômetro da EXO2 e de 86% e pelo fluorômetro BBE Moldaenke. Os resultados com menor variabilidade (66%) foram alcançados pela técnica laboratorial (LAB).

Tabela 3: Estatística descritiva das concentrações de clorofila-*a* (µg/L), para os métodos coletados.

Estatística descritiva			
Variáveis	EXO	BBE	LAB
Tamanho da amostra	40	40	40
Mínimo	0.28	1.60	0.80
Máximo	10.01	20.88	11.8
Amplitude Total	9.73	19.28	11
Mediana	0.88	3.92	3.60
Média Aritmética	1.89	5.63	4.09
Variância	5.02	23.56	7.50
Desvio Padrão	2.24	4.85	2.74
Erro Padrão	0.35	0.77	0.43
Coeficiente de Variação	118.73%	86.15%	66.91%

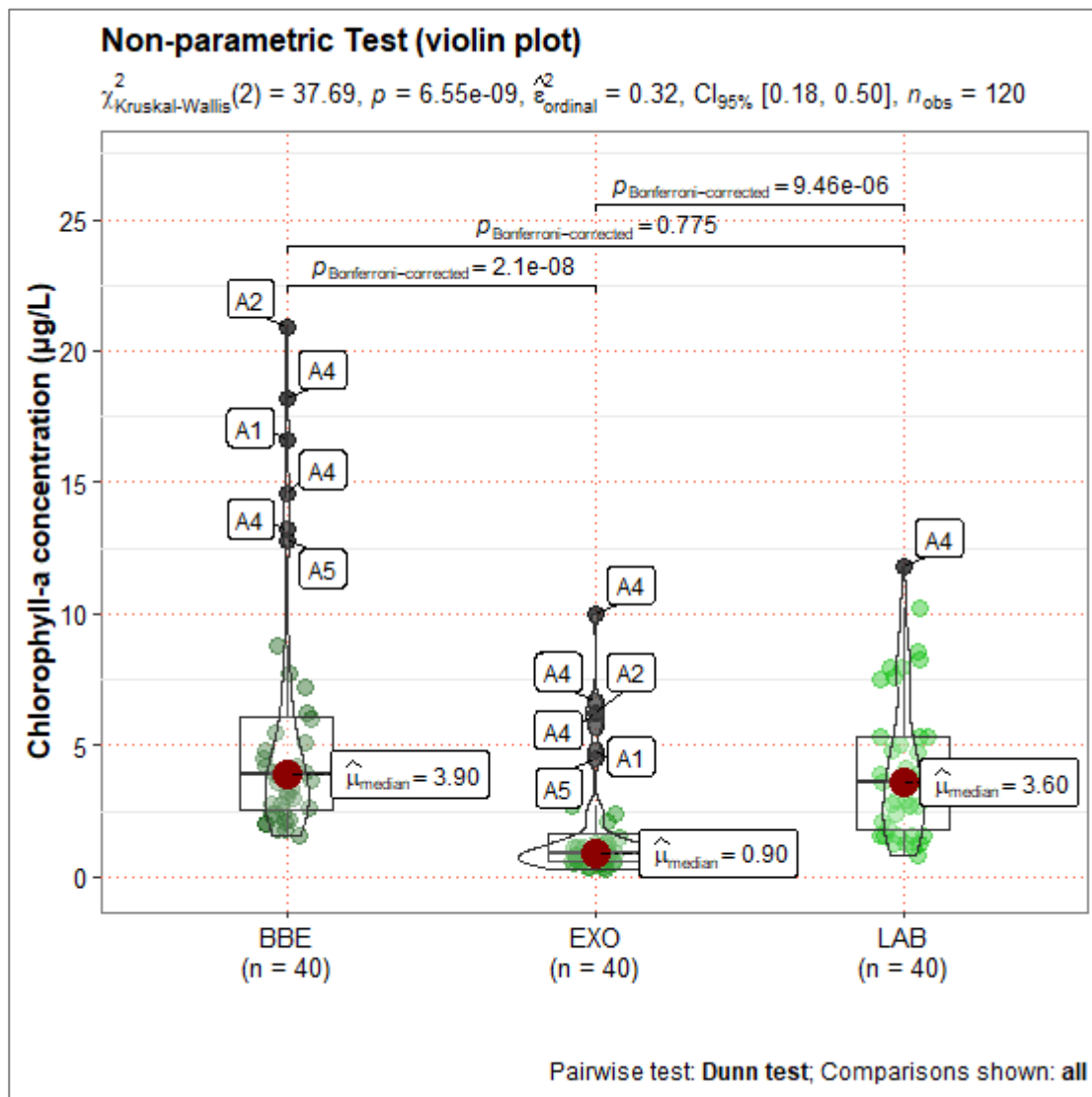
De acordo com a Tabela 3, a média de concentração de clorofila-*a* alcançada por todos os métodos não ultrapassou 6 µg/L. Foi observado, nos trabalhos de Gregor *et al.* (2005), Catherine *et al.* (2012) e Garrido *et al.* (2019), que os valores alcançam 90 µg/L, 265 µg/L e 42 µg/L, respectivamente. Tal constatação não condiz com o encontrado neste estudo, com características de ambientes tropicais, que apresentam naturalmente alta variabilidade e prioritariamente baixas concentrações.

Além disso, os valores absolutos apresentaram, pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, diferença significativa ($p < 0.05$) entre os três métodos coletados, entretanto, quando comparado por pares, por meio do método Dunn, não houve diferença significativa entre a medição por LAB e medição por BBE (p -ajustado > 0.05), com exceção da comparação das medidas entre LAB e EXO (p -ajustado < 0.05), sendo que, neste caso, houve diferença significativa. Esses resultados são

comprovados graficamente (figura 2), em que é visível a identificação dos *outliers*. Na figura 2, evidenciou-se a presença dos pontos que apresentaram discrepância (*outliers* estatísticos) para cada método avaliado (EXO, BBE e LAB), a quantidade de *outliers* foram 7,6 e 1 medições, respectivamente. Esses valores são referentes às mesmas datas de campo e pontos, são eles: Pontos A4 e A5, do lago Paranoá e as coletas de superfície do lago de Santa Maria e do Descoberto. Para valores dos pontos A4 e A5 do lago Paranoá que possuem concentrações elevadas de clorofila-*a*, infere-se que tal fato pode ser ocasionado pelas suas localizações próximas a estações de tratamento de esgoto que lançam seus rejeitos tratados no Lago Paranoá, além de receber contribuição da bacia do Riacho Fundo (Batista & Fonseca, 2018; Barbosa *et al.*, 2019; Roriz *et al.*, 2019). Para os pontos (A2 e A1) de coletas da superfície dos lagos de Santa Maria e do Descoberto, sugere-se que as épocas de aumento de temperatura e baixas precipitações ocasionaram maiores concentrações de clorofila-*a* (Esteves, 1998; Odebrecht *et al.*, 2003). Assim, conclui-se que os efeitos de *outliers* foram resultantes de fenômenos comuns nos ambientes aquáticos.

Ainda na Figura 2, no gráfico de violino com a distribuição estatística dos dados para todos os métodos, pode-se notar que os valores excedentes foram maiores pelos fluorímetros portáteis que os obtidos pela técnica espectrofotométrica tradicional. Essa superestimação pode ser causada por vários motivos, como, por exemplo, o aumento da emissão de fluorescência pelas cianobactérias diante da limitação de nutrientes (MacIntyre *et al.*, 2010), a fase de estágios do fitoplâncton e suas variações de teor de pigmento das células (Beutler *et al.*, 2002), os diferentes níveis de eficiência durante a extração de clorofila pelo método espectrofotométrico a partir de solventes orgânicos (Nusch, 1980), além de outros fatores, tais como variação de luz, presença de bolhas, Matéria orgânica dissolvida, turbidez, temperatura (Zamyadi *et al.*, 2016; Choo *et al.*, 2018). É importante mencionar que o método por fluorescência prevê que a estimativa para um ponto seja feita a partir de um conjunto de dados coletados por um intervalo de tempo em função da variação de tipos e tamanhos de algas naturalmente observadas no ambiente.

Figura 2: Distribuição dos dados de clorofila-a, para os métodos coletados.



Para Meyns *et al.* (1994), essa superestimação é provavelmente devido ao fato da calibração do Fluorômetro-BBE ser feita por HPLC, o que pode provocar uma superestimação, vista que o HPLC fornece valores mais baixos de concentração de clorofila-a do que por espectrofotometria. Na tabela 4, evidencia-se um índice que permite o cálculo da razão média entre as medidas do espectrofluorímetro *in vivo* (fluorescência-IVF) pelas medidas espectrofotométricas tradicional *in vitro*, conhecido como “fator de superestimação” (Silva *et al.*, 2016). Silva *et al.*, (2016) apresentaram um fator de superestimação de aproximadamente 0,36 ($\pm 0,20$). Outros estudos também foram comparados, mas o trabalho de Le Boulanger *et al.* (2002) destaca-se pelo fato de apresentar um fator de superestimação de 1.03 em um ambiente com concentração máxima de 20 µg/L, resultado aproximado a este estudo.

Tabela 4: Fatores de superestimação do FluoroProbe relatados na literatura científica.

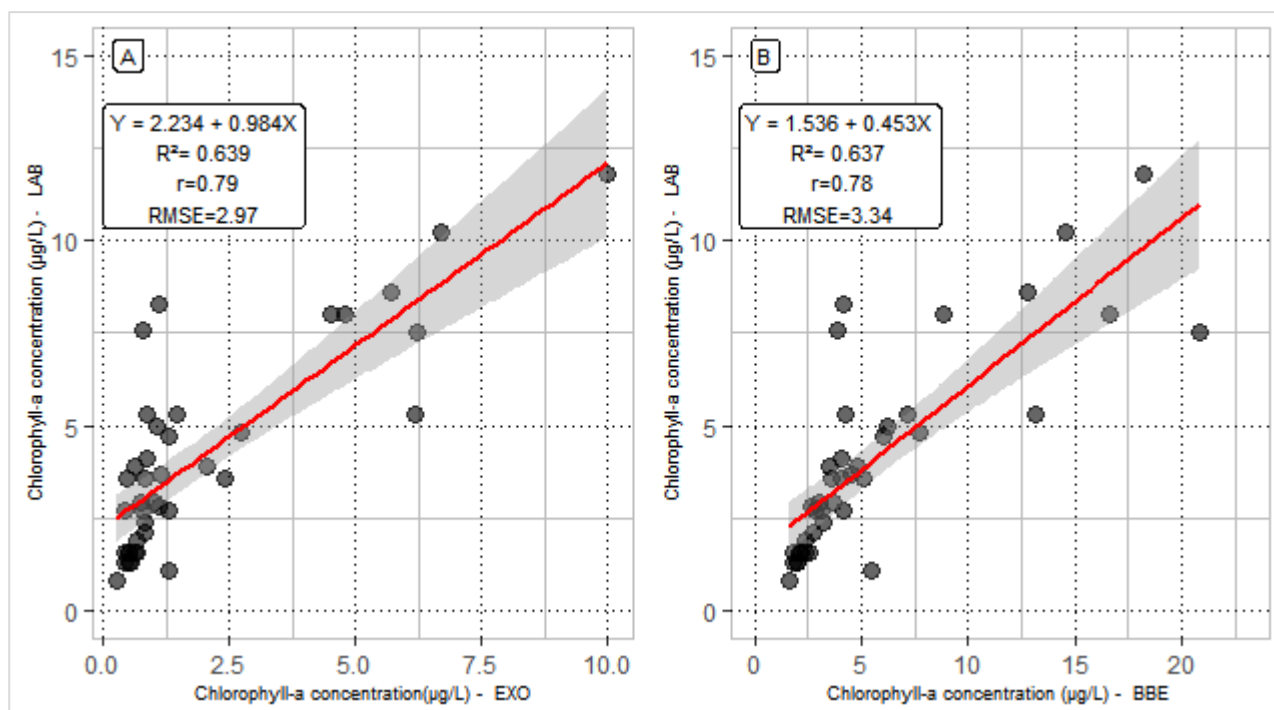
Solvente de extração	Faixa de concentração de clorofila-a	Número de locais monitorados	Fator de superestimação	Referência
Acetona	0–20 µg/L	1	^a 1.03	Leboulanger <i>et al.</i> (2002)
Etanol	0–50 µg/L	6	^a 0.83	Gregor and Maršálek (2004)
Etanol	0–90 µg/L	5	^a 0.74	Gregor et al. (2005)
Metanol	0–265 µg/L	50	^b 0.56	Catherine <i>et al.</i> (2012)
Etanol	42–626 µg/L	1	^a 0.36 e ^b 0.27	Silva <i>et al.</i> , (2016)
Acetona	0 - 20.8 µg/L	3	^b 1.37	Presente pesquisa

^a Fatores de superestimação foram calculados por meio de regressão linear $y = ax$, onde y é a concentração de clorofila- a fornecida pelo espectrofluorímetro, x é a concentração espectrofotométrica (LAB) de clorofila- a e a é o fator de subestimação.

^b O fator de superestimação é uma razão média entre as medidas do espectrofluorímetro e a espectrofotometria tradicional (LAB)

A Figura 3 apresenta a dispersão linear entre a estimativa tradicional (LAB) e as estimativas pelos métodos (EXO e BBE). Os resultados pelo LAB e medição pela EXO foram fortemente correlacionados ($r=0.79$, $R^2=0.63$, $p<0.0001$, $n=40$) e um RMSE relativamente baixo, entorno de 2.97, evidenciando uma moderada qualidade do modelo. Quanto à medida pela BBE, apresentou também uma correlação forte ($r=0.78$, $R^2=0.63$, $p<0.0001$, $n=40$), entretanto, um RMSE de 3.34. Uma possível justificativa deve-se à interferência dos valores discrepantes, como observado no gráfico de dispersão linear na Figura 3 –B, em que as concentrações acima de 5 µg/L não se ajustaram muito bem ao modelo de regressão linear, situados fora da área em cinza, que corresponde os intervalos de confiança (95%), diferentemente do presenciado na Figura 3 - A, em que os valores ajustaram-se relativamente melhor, provavelmente devido às medições pela EXO e LAB terem apresentado, na sua maioria, concentrações abaixo de 10 µg/L de clorofila- a .

Figura 3: Equações de regressão linear entre os métodos avaliados.



Vale destacar que trabalhos anteriores, como Silva *et al.* (2016), encontraram forte correlação, quando comparada com a estimativa tradicional, que apresentou, em seu estudo, uma correlação altamente significativa abaixo de 100 $\mu\text{g/L}$ ($r = 0.84$, $p < 0.001$, $n = 25$) e insignificante acima de 100 $\mu\text{g/L}$ ($r = 0.17$, $p = 0.63$, $n = 10$). Outras pesquisas, como as de Gregor *et al.* (2005) e Catherine *et al.* (2012), mostraram também correlações significativamente mais altas, com concentrações que alcançaram valores máximos de 90 $\mu\text{g/L}$ ($r = 0.95$, $n = 96$) e 264 $\mu\text{g/L}$ ($r = 0.97$, $n = 50$), respectivamente. Esses resultados descritos na literatura apresentaram correlações maiores quando comparados com o obtido neste estudo. Entretanto, o estudo de Leboulanger *et al.* (2002) apresentou uma correlação significativa em um ambiente que atingiu concentração máxima de 20 $\mu\text{g/L}$ ($r = 0.77$, $n = 55$), o que é similar a este estudo. Logo, esses resultados evidenciam que amostras de baixa biomassa geralmente apresentam coeficientes de correlação mais baixos. De forma geral, embora esses estudos tenham encontrado boas correlações, alguns fatores, como mencionado anteriormente (matéria orgânica, material total em suspensão, condição de floração e outros), podem causar limitações em suas precisões (Chang *et al.*, 2012; Kring *et al.*, 2014; Zamyadi *et al.*, 2016).

3.2- Análise dos valores relativos

Os resultados das combinações são apresentado na tabela 05, em que se observa, pelos indicativos estatísticos (r e R^2), as bandas que apresentaram melhor resultado na quantificação de clorofila-*a*, sendo que, dentre as diversas combinações (Tabela 5), a equação 09 com a combinação

das bandas 525nm e 570nm, apresentou ser o modelo com melhor resultado $(525+570)/(570/525)$. Nos trabalhos de Suggett *et al.* (2010), Seppala (2007) e Lohrenz *et al.* (2003), as bandas fluorimétricas 453-440 nm, 620-635 nm e 672-675 nm foram as faixas espectrais utilizadas para estimular seletivamente a excitação da clorofila-*a*, diferentemente do obtido neste estudo. No estudo de Blockstein *et al.* (2014), o comprimento de onda selecionado foi em 465 nm para estimar clorofila-*a*, no qual o autor fabricou um fluorômetro portátil, sendo capaz de indicar os melhores comprimentos de onda. Além disso, o mesmo autor relatou que, em 405 nm, é o comprimento de onda ideal para a estimativa de matéria orgânica dissolvida (CDOM). Tal resultado foi distinto do utilizado por Gosset *et al.* (2018), que trabalharam com o pico de 470 nm como fonte de excitação. Tal estudo foi em concordância com o fluorômetro BBE Moldaenke, cujo pico máximo para o grupo de algas verdes e clorofila-*a* é de 470 nm para valores absolutos.

Tabela 5: Os resultados dos melhores índices.

Combinações	Correlação Pearson (r)	Coefficiente de Determinação (R ²)	Combinações	Correlação Pearson (r)	Coefficiente de Determinação (R ²)
F1- (525)	0.85	0.72	F7- (525-570)/(570/525)	0.85	0.73
F1- (610)	0.83	0.69	F7- (570-590)/(590/570)	0.83	0.69
F1- (370)	0.83	0.69	F8- (525+590)/(525/590)	0.78	0.61
F1- (590)	0.86	0.73	F8- (570+590)/(570/590)	0.78	0.61
F1- (470)	0.79	0.62	F8- (610+370)/(610/370)	0.79	0.62
F2- (Log ₁₀ 470)	0.79	0.63	F8- (610+590)/(610/590)	0.86	0.74
F2- (Log ₁₀ 525)	0.83	0.69	F8- (370+470)/(370/470)	0.77	0.60
F2- (Log ₁₀ 610)	0.83	0.70	F9- (525+570)/(570/525)	0.88	0.78
F2- (Log ₁₀ 370)	0.84	0.71	F9- (525+590)/(590/525)	0.82	0.67
F2- (Log₁₀ 590)	0.85	0.73	F9- (610+590)/(590/610)	0.81	0.65
F3- (525-570)	0.87	0.76	F9- (370+590)/(590/370)	0.77	0.60
F3- (590-570)	0.81	0.66	F9- (525+610)/(610/525)	0.78	0.61
F6- (525-570)/(525/570)	0.81	0.65	F9- (370+470)/(470/370)	0.86	0.73

F1 ;F2 ;F3;F6 F7;F8 e F9 – Fórmulas usadas na tabela 02

É importante mencionar ainda que a melhor combinação obtida nesta pesquisa, ou seja, com as bandas espectrais de 525nm e de 570 nm, geralmente mostra o pico de fluorescência para os grupos de algas marrom (*Bacillariophyceae* e *Dinophyceae*) e misto (*Cryptophyceae*), que apresentam, na sua estrutura, pigmentos de clorofila-*a* e outros pigmentos acessórios (Clorofila-*c* e ficobiliproteínas) (BBE, 2017). De acordo com Batista (2018), os grupos predominantes do Lago Paranoá foram Bacillariophyceae, Chlorophyceae e Cryptophyceae. Já a pesquisa feita por Roriz *et al.* (2019), realizada em agosto de 2016 a agosto de 2017 no Lago Paranoá, identificou a presença do grupo *Dinophyceae*, em registrando a primeira espécie invasora *Ceratium furcoides* (Levander) Langhans 1925.

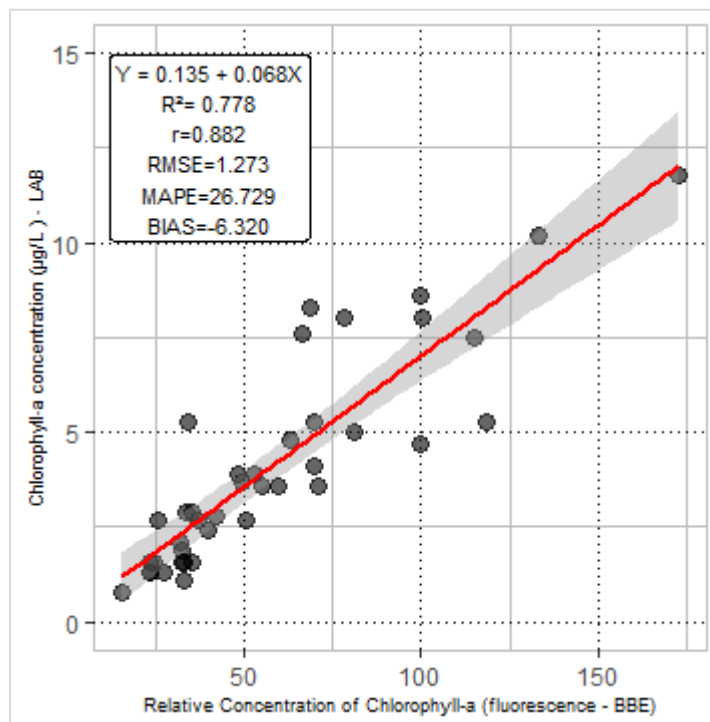
Estudos recentes confirmam essa flexibilidade dos canais de fluorescência, conforme observado na pesquisa de Ling *et al.*, (2018), que apresentou ótimo resultado usando dois canais espectrais de emissão de fluorescência em 550 nm e 700 nm para distinguir os grupos de algas em águas marinhas, evidenciando que o uso dos canais espectrais específicos de emissão de fluorescência é promissor na quantificação e na distinção das comunidades de fitoplâncton. Neste estudo, a combinação dessas duas bandas 525nm e 570nm mostrou-se eficiente na quantificação do pigmento da clorofila-*a*, indicada pelos valores de correlação Pearson ($r = 88$), coeficiente de determinação ($R^2 = 0.77$).

Na Figura 4, é possível visualizar a reta de regressão entre valores modelo (combinações das medidas fluorimétricas) e a concentração de clorofila-*a* obtidos pelo método de extração em laboratório. O resultado apresentou alta correlação entre os valores analisados ($r = 0,88$) e um bom ajuste do modelo pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0.77$). Esse resultado mostra que a correlação obtida ficou acima do relatado na pesquisa de Leboulanger *et al.* (2002), que obtiveram uma correlação de 0.77 para concentrações que atingiram valores máximos de 20 $\mu\text{g/L}$ de clorofila-*a*, entretanto, ligeiramente abaixo do encontrado em outros estudos ($r = 0.95$, $n = 96$ em Gregor *et al.*, 2005; $r = 0,97$, $n = 50$ em Catherine *et al.*, 2012). Notou-se também que o resultado com valores relativos foi capaz de melhorar a capacidade de estimativa, quando comparados com os valores absolutos (BBE- $R^2 = 0.63$, $r = 0.78$).

Percebe-se ainda que, apesar dos bons resultados, o modelo ainda apresenta uma dispersão para concentrações acima de 5 $\mu\text{g/L}$ (Figura 4), contudo tal constatação só pode ser confirmada com a densificação de pontos ao modelo, principalmente, para períodos de maiores concentrações.

Outros indicadores estatísticos, como o erro quadrático médio (RMSE), erro percentual médio absoluto (MAPE) e o erro sistemático (BIAS), confirmaram o desempenho dessa técnica para estimativa na concentração de clorofila-*a* a partir do modelo e do uso da equação da reta obtida, os valores estatísticos foram: RMSE: 1.27, MAPE: 26.72 e BIAS: -6.32 respectivamente (Figura 4). Portanto, o erro quadrático médio (RMSE) do modelo pela fluorescência absoluta apresentou ser mais abaixo do que o obtido pelos valores relativos (BBE - RMSE=3.34), o que aponta que a fluorescência dos espectros de emissão das duas bandas combinadas (525nm e 570nm) foi capaz de permitir resultados eficazes na estimativa de clorofila-*a*. Pesquisas anteriores como Ferreira *et al.* (2012) e Ling *et al.* (2018) também apontaram a eficácia dessas medidas relativas fluorimétricas na quantificação e identificação de fitoplâncton. Ambos também garantiram aprimoramento no modelo de estimativa, com destaque para Ferreira *et al.* (2012), que trabalharam em ambientes tropicais, com concentrações que variaram de 2.67 a 30.84 $\mu\text{g/L}$ clorofila-*a*.

Figura 4: Retas de regressão de calibração para a estimativa de clorofila-*a*.



Vale lembrar que os desvios encontrados em relação aos dados espectrofotométricos podem surgir por diversos motivos e, conseqüentemente, influenciar os fatores de correção, quando convertido para dados relativos de clorofila-*a*. Estudos anteriores indicaram que intensidade de luz, temperatura, composição da biomassa e efeito *quenching* (Catherine *et al.*, 2012 ;Chang *et al.*, 2012 ; Kring *et al.*, 2014; Cicerelli *et al.*, 2017) podem afetar as respostas de fluorescência, resultando em variações na fluorescência (Garrido *et al.*, 2019), contribuindo, assim, para a imprecisão da medição (Chang *et al.*, 2012).

Para validar o modelo e confirmar seu desempenho, na tabela 05, observa-se o resultado do primeiro método de validação, em que os valores estimados por meio do modelo foram significativamente próximos quando comparados com valores obtidos pelo método de extração em laboratório, o que indicou uma ótima acurácia e precisão do modelo de estimativa de clorofila-*a* com um erro significativamente baixo RMSE de 0.48 e um coeficiente de correlação (r) de 0.80. Esses resultados de correlação forte com erro baixo mostram uma boa confiança e um grande potencial da calibração do modelo.

Tabela 6: Métodos de validação

Equação de regressão do modelo gerado $Y= 0,135+0,068X$			
Pontos	Estimado pelo modelo	LAB ($\mu\text{g/L}$)	BBE - Absoluto ($\mu\text{g/L}$)
A5	2.65	2.03	4.49
B	1.18	0.87	1.41
C	1.44	1.70	2.33
D	1.55	1.80	1.87
E	2.62	3.37	3.88
Validação Cruzada - <i>Jackknife</i>			
Amostral	Min-máx.	Min-máx.	Min-máx.
40 modelos	1.20 – 12.14	0.80 – 11.8	1.60 – 20.87

Para o segundo método de validação, conforme a tabela 5, optou-se por realizar uma validação cruzada (técnica *jackknife*) na tentativa de compreender a participação de cada ponto na construção do modelo e observar se o modelo é capaz de prever toda a variabilidade da concentração de clorofila-*a*. Os modelos das validações geradas pela técnica *jackknife* alcançaram um intervalo de coeficiente linear que variou de (-0.022 a 0.210), em que se apresenta uma variação significativa no ponto inicial, ou seja, cada modelo corta o eixo Y do plano cartesiano em lugares distintos. Já o coeficiente angular mostra um comportamento estável, pois houve pouca variação (0,068 - 0,073), o que indica uma menor variação da inclinação da reta, reforçando a robustez do modelo.

A pesquisa de Escoffier *et al.* (2014) também confirmou a necessidade da aplicação de calibrações fluorimétricas específicas de acordo com as espécies presentes no meio aquático, pois, segundo o autor, as calibrações específicas melhoram as estimativas. Contudo, trata-se de uma atividade complexa feita diretamente na empresa fabricante do equipamento. A alternativa apresentada nesse trabalho, juntamente com os de Ferreira *et al.* (2019), Ling *et al.* (2018), mostraram ser uma excelente ferramenta de quantificação em concentração de clorofila-*a*, para ambientes aquáticos por meio de calibração com dados de campo, podendo ser um instrumento simples aplicado pelas companhias e de abastecimento e pesquisas acadêmicas. Porém, ressalta-se a importância do entendimento dos efeitos de outros elementos na quantificação total de clorofila-*a*, pois essas interferências podem variar conforme as espécies ou os grupos de algas encontradas nos ambientes aquáticos, ou seja, os grupos em altas concentrações corrompem a determinação de um

grupo com baixa concentração. Além disso, o modelo é adaptado para características específicas do ambiente, ou seja, o modelo não será capaz de se ajustar para fenômenos extremos, como ocorrência de altas concentrações de clorofila-*a* ou até mesmo mistura de outros elementos não previstos na construção do modelo de regressão.

4- Conclusão

Conclui-se que os resultados das medidas fluorimétricas (dados relativos) comprovam a eficiência do modelo, em que se constatou uma correlação forte ($r=0.88$; $R^2=0.78$), confirmada ainda pelos parâmetros de validação (RMSE= 1.27, MAPE=26.72 e BIAS= -6.32). Essas medidas fluorimétricas alcançaram uma boa estimativa para concentração de clorofila-*a* com precisão e acurácia necessária para ambientes tropicais com baixas concentrações para reservatórios de abastecimento público no Cerrado. O modelo absoluto, fornecido pelas empresas fabricantes, mostra limitações na estimativa. Tais limitações foram minimizadas com o uso de modelos relativos.

O procedimento de combinação de bandas a partir dos dados de fluorescência e o processo de conversão indicam ser uma ótima alternativa para quantificação em concentração de clorofila-*a*, no qual se destacam os comprimentos de onda 525 nm e 570 nm, relacionados à presença de algas marrom e mistas. Assim, os dados fluorimétricos relativos podem ser adaptados por meio do uso de modelos empíricos, melhorando, assim, o potencial na estimativa de clorofila-*a*. Expresso em outros termos, o modelo físico oferecido pela empresa para estimativa de clorofila-*a* (valor absoluto) deve ser aprimorado ou adaptado para realidades de regiões tropicais, como as do Cerrado brasileiro. Tal adaptação, em princípio, é dependente dos grupos de fitoplânctons predominantes no ambiente.

Essa nova opção possibilita quantificar a concentração de clorofila-*a* de forma rápida e precisa. Além disso, há um ganho na redução nos custos operacionais que vão desde levantamentos de campo e a redução do número de amostras a serem analisadas em laboratório, fator relevante para monitoramento da qualidade de água nos reservatórios.

5- Agradecimentos

Os autores deste trabalho agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro através da concessão de bolsas de Mestrado. Agradecemos também ao suporte e auxílio na condução do trabalho pelos projetos “uso do VANT para o monitoramento de recursos hídricos no âmbito CT-HIDRO 01/2013 – AQUAVANT” vinculado ao FINEP 01.14.0114.00 e ao projeto da Fundação de Apoio à Pesquisa – FAP-DF denominado Monitoramento da Qualidade da Água nos reservatórios do Distrito Federal utilizando imagens obtidas por VANT e por plataformas orbitais, da Fundação de Apoio à Pesquisa-Edital n° 04/2017, protocolo n° 17457.78.36995.26042017.

6- Referências

- ANDRADE, E. M., FERREIRA, K. C. D., LOPES, F. B., ARAÚJO, I. C. S., SILVA, A. G. R. (2020). Balance of nitrogen and phosphorus in a reservoir in the tropical semi-arid region. *Revista Ciência Agronômica*, 51 (1) [online]. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200020>.
- APHA; AWWA; WEF (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater* 22th edition. Washington DC: APHA.
- BATISTA, B. FONSECA, B. (2018). Fitoplâncton da região central do Lago Paranoá (DF): uma abordagem ecológica e sanitária. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*. 23. 229-241. 10.1590/s1413-41522018169124.
- BARBOSA, J. BELLOTTO, V. SILVA, D. LIMA, T. (2019). Nitrogen and Phosphorus Budget for a Deep Tropical Reservoir of the Brazilian Savannah. *Water*. 11. 1205. 10.3390/w11061205.
- BBE MOLDAENKE (2017) BBE User Manual Version 2.6 E2, October 2017 - Acessado no dia 20/02/2019 <https://www.bbe-moldaenke.de/en/products/chlorophyll/details/fluoroprobe.html>
- BEUTLER, M., WILTSHIRE, K. H., MEYER, B. et al. (2002) A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynth. Res.*, 72, 39–53.
- BLOCKSTEIN L. O. YADID-PECHT, "Lensless miniature portable fluorometer for measurement of chlorophyll and CDOM in water using fluorescence contact imaging," *IEEE Photonics Journal*, vol. 6, no. 3, 6600716 (16pp), 2014.
- CATHERINE, A., ESCOFFIER, N., BELHOCINE, A., NASRI, A.B., HAMLAOUI, S., YÉPRÉMIAN, C., BERNARD, C., TROUSSELLIER, M., 2012. On the use of the FluoroProbe®, a phytoplankton quantification method based on fluorescence excitation spectra for large-scale surveys of lakes and reservoirs. *Water Res.* 46 (6), 1771–1784.
- CHOO, F. ZAMYADI, A. NEWTON, K. NEWCOMBE, G. BOWLING, L. STUETZ, R. HENDERSON, R. (2018). Performance evaluation of in situ fluorometers for real-time cyanobacterial monitoring. *H2Open Journal*. 1. 10.2166/h2oj.2018.009.
- CHANG, D.-W. HOBSON, P. BURCH, M. LIN, T.-F.. (2012). Measurement of cyanobacteria using in-vivo fluoroscopy - Effect of cyanobacterial species, pigments, and colonies. *Water research*. 46. 5037-48. 10.1016/j.watres.2012.06.050.
- CICERELLI, R. E.; TRINDADE, G, M. de L. B.; ROIG, H. LLACER. Multisource data for seasonal variability analysis of cyanobacteria in a tropical inland aquatic environment. *Marine And Freshwater Research*. Clayton: Csiro Publishing, v. 68, n. 12, p. 2344-2354, 2017.
- CREMELLA, B., HUOT, Y., BONILLA, S.: Interpretation of total phytoplankton and cyanobacteria fluorescence from cross-calibrated fluorometers, including sensitivity to turbidity and colored dissolved organic matter. In: *Association for the Sciences of Limnology and Oceanography, Limnology and oceanography: Methods* (2018). <https://doi.org/10.1002/lom3.10290>

- DÍAZ MUÑIZ, C., GARCÍA N, P. J., ALONSO FERNÁNDEZ, J. R., MARTÍNEZ TORRES, J., TABOADA, J. (2012). Detection of outliers in water quality monitoring samples using functional data analysis in San Esteban estuary (Northern Spain). *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.083>
- ESCOFFIER, N. BERNARD, C. HAMLAOUI, S. GROLEAU, A. CATHERINE, A.. (2014). Quantifying phytoplankton communities using spectral fluorescence: the effects of species composition and physiological state. *Journal of Plankton Research*. 1-15. 10.1093/plankt/fbu085
- ESTEVEES, F. A. *Fundamentos de limnologia*. Rio de Janeiro: Finep. 2.ed. 575p. 1998.
- FERREIRA, R. D.; BARBOSA, C. C. F.; NOVO, E. M. L.M; 2012. Assessment of in vivo fluorescence method for chlorophyll-a estimation in optically complex waters (Curuai floodplain, Pará - Brazil). *Acta Limnol. Bras., Rio Claro*, v. 24, n. 4, p. 373386. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2013005000011>.
- GARRIDO, M., CECCHI, P., MALET, N. et al. *Environ Monit Assess* (2019) 191: 204. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7349-8>.
- GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL (GDF). Plano Integrado de Enfrentamento à Crise Hídrica. Brasília: GDF, 2017. 91p. Disponível em: < <http://www.ibram.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/03/Plano-27%C2%AA-ciea.pdf>>. Acesso em: 08 abril. 2021.
- GOSSET, C,A. DURRIEU, L. RENAUD, A.-L. DEMAN, P. BARBE, R. BAYARD, J.-F. CHATEAUX, "Xurography-based microfluidic algal biosensor and dedicated portable measurement station for online monitoring of urban polluted samples," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 117, pp. 669-677, 2018.
- GRABAN, S. DALL'OLMO, G. GOULT, S. SAUZÈDE, R. (2020). Accurate deep-learning estimation of chlorophyll-a concentration from the spectral particulate beam-attenuation coefficient. *Optics Express*. 28. 10.1364/OE.397863.
- GRADILLA-HERNÁNDEZ, M.S., de ANDA, J., GARCIA-GONZALEZ, A. et al. Multivariate water quality analysis of Lake Cajititlán, Mexico. *Environ Monit Assess* 192, 5 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7972-4>
- Gregor.J, Maršálek.B.; Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods, *Water Research*, Volume 38, Issue 3, 2004,Pages 517-522, ISSN 0043-1354, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.033>
- GREGOR, J., GERI'S, R., MARŠÁLEK, B., HETEŠA, J., MARVAN, P., 2005. In situ quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer. *Hydrobiologia* 548, 141–151.
- HARTMANN, A., HORN, H., RÖSKE, I., & RÖSKE, K. (2019). Comparison of fluorometric and microscopical quantification of phytoplankton in a drinking water reservoir by a one-season monitoring program. *Aquatic Sciences*, 81(1). doi:10.1007/s00027-018-0608-
- HEUKELEM, L. THOMAS, C. (2001). Computer-assisted high performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of

phytoplankton pigments. *Journal of chromatography. A.* 910. 31-49. 10.1016/S0378-4347(00)00603-4.

HENNEMANN, M.C. PETRUCIO, M. M. Resposta do fitoplâncton sazonal ao aumento da temperatura e aportes de fósforo em uma lagoa costeira de água doce, Sul do Brasil: um bioensaio em microcosmo. *Acta Limnologica Brasiliensia* [online]. 2010, v. 22, n. 3 [Acessado em 9 de junho de 2021], pp. 295-305. <https://doi.org/10.4322/actalb.02203006>.

HOULIEZ, E., LIZON, F., THYSSEN, M., ARTIGAS, L.F., SCHMITT, F.G. 2012. Spectral fluorometric characterization of Haptophyte dynamics using the FluoroProbe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *J. Plankton Res.* 34: 136–151. doi:10.1093/plankt/fbr091.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico. Brasília, 2017.

KUHA, J., JÄRVINEN, M., SALMI, P. et al. Calibration of in situ chlorophyll fluorometers for organic matter. *Hydrobiologia* 847, 4377–4387 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04086-z>

KRING, S. FIGARY, S. BOYER, G. WATSON, S. TWISS, M. (2014). Rapid in situ measures of phytoplankton communities using the bbe FluoroProbe: Evaluation of spectral calibration, instrument intercompatibility, and performance range. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 71. 1087-1095. 10.1139/cjfas-2013-0599.

LEBOULANGER, C. DORIGO, U. JACQUET, S. BERRE, B. PAOLINI, G. HUMBERT, J.F. (2002). Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: A case study. *Aquatic Microbial Ecology - AQUAT MICROB ECOL.* 30. 83-89. 10.3354/ame030083.

LEWIS, W. M., 2000. Basis for the protection and management of tropical lakes. *Lakes and Reservoirs Research and Management* 5: 35–48.

LIMA, J.E. F. W. Situação e perspectivas sobre as águas do cerrado. *Cienc. Cult., São Paulo* , v. 63, n. 3, p. 27-29, July 2011.

LING. Z., DEYONG S, SHENGQIANG W, ZHONGFENG. Q, YU H, ZHIHUA, M. YIJUN H, "Retrievals of phytoplankton community structure from in situ fluorescence medições by HS-6P," *Opt. Express* 26 , 30556-30575 (2018).

LOISA, O. KAARIA, J. LAAKSONLAITA, J. NIEMI, J. SARVALA, J. SAARIO, J.. (2015). From phycocyanin fluorescence to absolute cyanobacteria biomass: An application using in-situ fluorometer probes in the monitoring of potentially harmful cyanobacteria blooms. *Water Practice and Technology.* 10. 695-698. 10.2166/wpt.2015.083.

LORENZEN, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12: 343–346. doi:10.4319/lo.1967.12.2.0343

LOHRENZ SE, WEIDEMANN AD, TUEL M (2003) Phytoplankton spectral absorption as influenced by community size structure and pigment composition. *J Plankton Res* 25: 35-61

MACINTYRE, H.L., LAWRENZ, E., RICHARDSON, T.L., 2010. Taxonomic discrimination of phytoplankton by spectral fluorescence. In: Suggett, D.J. et al. (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence*

in Aquatic Sciences: Methods and Applications. *Developments in Applied Phycology*, 4, p. 129–169.

MARINO, L. (2017). Relação entre clorofila-a e cianobactérias no estado de São Paulo. *Revista DAE*. 65. 32-43. 10.4322/dae.2016.026.

MEYNS, S., ILLI, R., RIBI, B., 1994. Comparison of chlorophyll-a analysis by HPLC and spectrophotometry: Where do the differences come from? *Archives für Hydrobiologie* 132, 129–139.

MUSTAFA, S.; BAHAR, A.; AZIZ, A. Z.; DARWISH, M. Solute transport modelling to manage groundwater pollution from surface water resources. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 233, 2020.

NEOPHYTOU, E.; CHARITOU, A.; CHARALAMBOUS, C. Predicting corporate failure: empirical evidence for the UK. University of Southampton, Sep. 2000, Working Paper.

NUSCH, E.A., 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 14, 14–36.

OLIVEIRA-FILHO, A. RATTER, J.A.. (2002). Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado Biome. *The cerrados of Brazil*. 121-140.

ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C.; FUGITA, C.C. BERGESCH, M. 2003. The impact of mud deposition on the long Term variability of the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis* (Castracane) Round at Cassino Beach, Brazil. *Journal of Coastal Research* 35: 486-491.

PANCHENKO, M. DOMYSHEVA, V. PESTUNOV, D. SAKIRKO, M. SHAMRIN, A. ZAVORUEV, V. SHMARGUNOV, V. (2020). Reconstruction of the diurnal behavior of the concentration of chlorophyll in the surface and bottom water of the coastal zone of Lake Baikal on the basis of empirical calibration of fluorescence characteristics. *Limnology and Freshwater Biology*. 622-623. 10.31951/2658-3518-2020-A-4-622.

PEREIRA, B. A. SILVA, V., F. CARVALHO, F. A.. Florestas estacionais no cerrado: uma visão geral. *Pesquisa Agropecuária Tropical* [online]. 2011, v. 41, n. 3 [Acessado 6 Julho 2021] , pp. 446-455. ISSN 1983-4063. <https://doi.org/10.5216/pat.v41i3.12666>.

RICHARDSON, T. L., LAWRENZ, E., PINCKNEY, J. L., GUAJARDO, R. C., WALKER, E. A., PAERL, H. W., & MACINTYRE, H. L. (2010). Spectral fluorometric characterization of phytoplankton community composition using the Algae Online Analyser®. *Water Research*, 44(8), 2461–2472. doi:10.1016/j.watres.2010.01.012

Roesler, C., Uitz, J., Claustre, H., Boss, E., Xing, X., Organelli, E., ... Barbieux, M. (2017). Recommendations for obtaining unbiased chlorophyll estimates from in situ chlorophyll fluorometers: A global analysis of WET Labs ECO sensors. *Limnology and Oceanography: Methods*, 15(6), 572–585. doi:10.1002/lom3.10185

Roriz, P., Batista, B., & Fonseca, B. (2019). Primeiro registro da espécie invasora *ceratium furcoides* (levander) langhans 1925 (dinophyceae) no lago Paranoá, Distrito Federal. *Oecologia Australis*, 23(3). doi:<https://doi.org/10.4257/oeco.2019.2303.18>

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de; RIBEIRO, J. F. 2008. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008.

SEPPÄLÄ, J. YLÖSTALO, P. KAITALA, S. HÄLLFORS, S. RAATEOJA, M. MAUNULA, P.. (2007). Ship-of-opportunity based phycocyanin fluorescence monitoring of the filamentous cyanobacteria bloom dynamics in the Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 73. 489-500. 10.1016/j.ecss.2007.02.015.

SILVA, T., GIANI, A., FIGUEREDO, C., VIANA, P., KHAC, V. T., LEMAIRE, B. J., ... VINÇON-L. B. (2016). Comparison of cyanobacteria monitoring methods in a tropical reservoir by in vivo and in situ spectrofluorometry. *Ecological Engineering*, 97, 79–87. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.06.037

SILVA, G. S. M; GARCIA, C.A. E. Evaluation of ocean chlorophyll-a remote sensing algorithms using in situ fluorescence data in Southern Brazilian Coastal Waters. *Ocean and Coastal Research*, v. 69, 2021.

SHIN, Young-Ho & Gutierrez-Wing, M. Teresa & Choi, Jin-Woo. (2020). Review— Recent Progress in Portable Fluorescence Sensors. *Journal of the Electrochemical Society*. 168. 10.1149/1945-7111/abd494.

SHIN, Y.H. BARNETT, J. GUTIERREZ, W., M. T. RUSCH, K. CHOI, J.W. (2018). A hand-held fluorescent sensor platform for selectively estimating green algae and cyanobacteria biomass. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 262. 10.1016/j.snb.2018.02.045.

SUGGETT, D. J. et al. Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications. Dordrecht: Springer, 2010. 323 p. SEPPALA, J. Fluorescence properties of Baltic Sea phytoplankton. 2009. 83 f. Monographs of the boreal environment research. Edita Prima Ltd. Helsinki.

UTSUMI, A. G.; GALO, M. de LBT; TACHIBANA, V. M .. Mapeamento de informações sobre a fluorescência da ficologia e da análise geoestatística. *Rev. bras. eng. agrícola. ambiente*. Campina Grande, v. 19, n. 3, p. 273-279, março de 2015.

YSI 6-Series Environmental Monitoring Systems Operations Manual. Revision A. March, 2009. YSI Inc. 260p. Acessado no dia 13/07/2021 https://www.uvm.edu/bwrl/lab_docs/manuals/YSI_multi-sonde.pdf

YSI (2020) EXO User Manual- Advanced Water Quality Monitoring Platform Acessado no dia 14/01/2019 <https://www.ysi.com/file%20library/documents/manuals/exo-user-manual-web.pdf>

ZAMYADI, Arash & Choo, Florence & Newcombe, Gayle & Stuetz, Richard & Henderson, Rita. (2016). A review of monitoring technologies for real-time management of cyanobacteria: Recent advances and future direction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 85. 10.1016/j.trac.2016.06.023.

CAPÍTULO 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados da pesquisa evidenciam que é possível obter uma boa estimativa de quantificação de clorofila-*a* em reservatórios do cerrado a partir dos dados relativos e absolutos. Ressalta-se que os reservatórios em análise apresentaram baixas concentrações, com média aproximada de 5µg/L, ou seja, mesmo próximo do limite inferior de detecção o método mostra-se viável para fins de monitoramento e controle de reservatórios, principalmente para fins de abastecimento público.

É importante deixar claro que, embora o resultado seja satisfatório, a ideia original da dissertação foi monitorar os reservatórios com um ano completo para garantir a percepção da variação sazonal da variável, além de continuar as análises simultâneas para calibrar e validar o modelo. Contudo, devido à pandemia, houve uma redução nas coletas.

Quanto ao desempenho dados relativos e absolutos ficou claro que o método absoluto teve menor desempenho em virtude de utilizar um modelo universal, o que não garante diagnosticar toda a realidade local, no caso dos reservatórios analisados no cerrado.

Para os dados relativos, verificou-se que as bandas fluorimétricas são uma boa alternativa para quantificar pigmentos de clorofila-*a* em ambientes aquáticos tropicais. Vale salientar que interferências das características do ambiente aquático, a escolha do método e o modo de manuseio podem reduzir a qualidade na detecção e interferir na qualidade da estimativa do pigmento.

A escolha do método de levantamento de campo a ser adotado para área de estudo é fundamental, visto que cada método apresenta suas peculiaridades que podem facilitar e/ou influenciar negativamente na estimativa. O levantamento pelo modo tradicional utilizado pela CAESB é considerado confiável e eficiente, mas requer um tempo e um cuidado em todo o processo, desde coleta das amostragens até aos processos de análises laboratoriais para diminuir a degradação dos pigmentos, o que pode muitas vezes não ser adequado para um rápido diagnóstico das condições da qualidade da água. Utilizar os métodos por meio de sondas que detectam os pigmentos em tempo real é uma ótima alternativa para complementar dados das companhias de saneamento, pois podem reduzir custos laboratoriais.

Apesar das inúmeras vantagens obtidas pelos métodos *in vivo* (sondas), deve-se configurar e ajustar adequadamente esses instrumentos para região em estudo. A presente pesquisa reforça a importância de avaliar e analisar os canais espectrais usados pelas fluorômetros para obter melhor estimativa, pois existe, no mercado, uma variedade de sondas que trabalham com distintas faixas espectrais. Deve-se explorar os canais espectrais disponíveis por esses dispositivos e correlacionar características do ambiente aquático.

O presente estudo buscou desenvolver um modelo fácil para quantificar a biomassa fitoplanctônica (clorofila-*a*) de forma rápida e precisa, usando os dados brutos (bandas

fluorimétricas), para obter melhor resultado na estimativa. Os comprimentos de onda de 525 nm e 570 nm mostraram essa eficiência na quantificação para os reservatórios do DF, bandas que podem estar diretamente ligadas à presença das algas marrom e mistas, comum nesses ambientes aquáticos em estudo. Logo, deve-se adaptar os dados fluorimétricos aos modelos empíricos e correlacionar com as características dos corpos hídricos e com os grupos fitoplanctônicos presentes no ambiente aquático.

Esse método relativo foi sugerido para minimizar e diminuir estimativas discrepantes, disponibilizadas por meio das medidas absolutas, sendo que se observou, neste estudo, uma variabilidade significativa diante de todos os métodos avaliados a partir dos dados absolutos, o que mostra que os dados fluorimétricos relativos são uma ótima alternativa. Vale ressaltar que a influência das características no ambiente, como presença de matéria orgânica, variação de iluminação, TSS entre outros, podem alterar a na qualidade da detecção, ou seja, apesar do modelo relativo ser ótimo, ainda não consegue analisar a parcela da influência desses elementos.

Por fim, este trabalho recomenda para trabalhos futuros uma maior densidade de pontos de amostras, aplicadas em distintos ambientes aquáticos com alta e baixa concentração de clorofila-*a* para obter uma melhor curva de calibração de estimativa. Além disso, vale ampliar a ideia do uso das bandas fluorimétricas para quantificar outros pigmentos fotossintetizantes e correlacionar aos dados das comunidades fitoplanctônicas. Também se observa grande potencial na relação entre as estimativas de clorofila-*a* obtidas pelas bandas fluorimétricas com dados de sensoriamento remoto, que podem ser utilizadas para calibração de modelos de quantificação.

CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABALDE, J. et al. *Microalgas: cultivo e aplicaciones*. España: Universidade da Coruña, 1995. 210p. (Monografías n.26).
- ANDRADE, E. M., FERREIRA, K. C. D., LOPES, F. B., ARAÚJO, I. C. S., SILVA, A. G. R. (2020). Balance of nitrogen and phosphorus in a reservoir in the tropical semi-arid region. *Revista Ciência Agronômica*, 51 (1) [online]. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20200020>.
- APHA; AWWA; WEF (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater 22th edition*. Washington DC: APHA.
- AYELE, HS, ATLABACHEW, M. Revisão da caracterização, fatores, impactos e soluções da eutrofização do lago: lição para o lago Tana, Etiópia. *Environ Sci Pollut Res* 28, 14233–14252 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12081-4>
- BBE Moldaenke (2017) BBE User Manual Version 2.6 E2, October 2017 - Acessado no dia 20/02/2019 <https://www.bbe-moldaenke.de/en/products/chlorophyll/details/fluoroprobe.html>
- BATISTA, B. FONSECA, B. (2018). Fitoplâncton da região central do Lago Paranoá (DF): uma abordagem ecológica e sanitária. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*. 23. 229-241. 10.1590/s1413-41522018169124se
- BABIN, M.; MOREL, A.; GENTILI, B. (1996). “Remote sensing of sea surface sun-induced chlorophyll fluorescence: consequences of natural variations in the optical characteristics of phytoplankton and the quantum yield of chlorophyll a fluorescence”. *International Journal of Remote Sensing* 17 (12), pp. 2417-2448.
- BEISNER, B.E., PERES-NETO, P.R., LINDSTROM, E.S., BARNETT, A., LONGHI, M.L. (2006). “The role of environmental and spatial processes in structuring lake communities from bacteria to fish.” *Ecology*, 87, 2985-2991
- BEUTLER, M., Wiltshire, K. H., Meyer, B. et al. (2002) A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynth. Res.*, 72, 39–53.
- BIUDES, J. CAMARGO, A. (2008). Estudo dos fatores limitantes à produção primária por macrófitas aquáticas no Brasil. *Oecologia Brasiliensis*, ISSN 1981-9366, Vol. 12, Nº. 1, 2008 (Ejemplar dedicado a: Ciclo do carbono em ambientes aquáticos continentais brasileiros). 12. 10.4257/oeco.2008.1201.01.
- BOSS, E., M. PICHERAL, T. LEEUW, A. CHASE, E. KARSENTI, G. GORSKY, L. TAYLOR, W. SLADE, J. RAS, H. CLAUSTRE. 2013. The characteristics of particulate absorption, scattering and attenuation coefficients in the surface ocean; Contribution of the Tara Oceans expedition. *Methods Oceanogr.* 7: 52– 62. doi:10.1016/j.mio.2013.11.002
- BRASIL. Resolução nº 357, de março de 2005. Conselho nacional do meio ambiente – CONAMA. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

- CALIJURI, M.C; ALVES, M.S.A.; SANTOS, A.C.A. 2006. Cianobacterias e cianotoxinas em águas continentais. São Carlos: Rima, 106p.
- CAGNARD, O. et al. Assessment of emerging optic sensors (fluoroprobes) for algae on-line monitoring. Water Quality Technology Conference and Exposition 2006: Taking Water Quality to New Heights, n. November, p. 322–331, 2006.
- CARMOUZE, J. P. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Edgard Blücher/FAPESP, 1994.
- CATHERINE, A., ESCOFFIER, N., BELHOCINE, A., NASRI, A.B., HAMLAOUI, S., YÉPRÉMIAN, C., BERNARD, C., TROUSSELLIER, M., 2012. On the use of the FluoroProbe®, a phytoplankton quantification method based on fluorescence excitation spectra for large-scale surveys of lakes and reservoirs. *Water Res.* 46 (6), 1771–1784.
- CHANG, W, HOBSON, P, BURCH, M. & LIN, T.-F. (2012). Measurement of cyanobacteria using in-vivo fluoroscopy - Effect of cyanobacterial species, pigments, and colonies. *Water research.* 46. 5037-48. 10.1016/j.watres.2012.06.050.
- CHAI, C, JIANG, T, CEN, J, GE, W, LU, S; Phytoplankton pigments and functional community structure in relation to environmental factors in the Pearl River Estuary, *Oceanologia*, Volume 58, Issue 3, 2016, Pages 201-211, ISSN 0078-3234, <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2016.03.001>.
- CHOO, F, ZAMYADI, A, NEWTON, K., NEWCOMBE, G, BOWLING, L, STUETZ, R, HENDERSON, R. (2018). Performance evaluation of in situ fluorometers for real-time cyanobacterial monitoring. *H2Open Journal.* 1. 10.2166/h2oj.2018.009.
- CICERELLI, E.; R. Estudo da ocorrência de cianobactérias no reservatório de Nova Avanhandava-SP por meio da inferência do pigmento ficocianina. 2013.
- Cicerelli, R. E., & Galo, M. D. L. (2015). Sensoriamento remoto multifonte aplicado na detecção do fitoplâncton em águas interiores. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19, 259-265.
- CICERELLI, R. E; TRINDADE, G. M. L. B.; ROIG, H. L. Multisource data for seasonal variability analysis of cyanobacteria in a tropical inland aquatic environment. *Marine And Freshwater Research*. Clayton: Csiro Publishing, v. 68, n. 12, p. 2344-2354, 2017. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/163527>>.
- CREMELLA, B., HUOT, Y., BONILLA, S.: Interpretation of total phytoplankton and cyanobacteria fluorescence from cross-calibrated fluorometers, including sensitivity to turbidity and colored dissolved organic matter. In: *Association for the Sciences of Limnology and Oceanography, Limnology and oceanography: Methods* (2018). <https://doi.org/10.1002/lom3.10290>
- DAMAR, A.; COLIJN, F.; HESSE, K.-J.; KURNIAWAN, F. Coastal Phytoplankton Pigments Composition in Three Tropical Estuaries of Indonesia. *J. Mar. Sci. Eng.* 2020, 8, 311. <https://doi.org/10.3390/jmse8050311>

- DAVIS, R. F., C. C. MOORE, J. R. V. ZANEVEL, NAPP, J. M.. 1997. Reducing the effects of fouling on chlorophyll estimates derived from long-term deployments of optical instruments. *J. Geophys. Res.* 102: 5. doi:10.1029/96JC02430
- DÍAZ MUÑIZ, C.; GARCÍA, N.P.J.; ALONSO, F. J.R., MARTÍNEZ, T. J. & TABOADA, J. (2012). Detection of outliers in water quality monitoring samples using functional data analysis in San Esteban estuary (Northern Spain). *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.083>
- ESCOFFIER, N.; BERNARD, C; HAMLAOUI, S. & GROLEAU, A. ;CATHERINE, A.. (2014). Quantifying phytoplankton communities using spectral fluorescence: the effects of species composition and physiological state. *Journal of Plankton Research*. 1-15. 10.1093/plankt/fbu085.
- FALKOWSKI, P; KIEFER. D. A. 1985. Chlorophyll a fluorescence in phytoplankton: Relationship to photosynthesis and biomass. *J. Plankton Res.* 7: 715–731. doi:10.1093/ plankt/7.5.715
- FERREIRA, R. D; BARBOSA FARIA C. C.; NOVO, M. L. d M. E; 2012. Assessment of in vivo fluorescence method for chlorophyll-a estimation in optically complex waters (Curuai floodplain, Pará - Brazil). *Acta Limnol. Bras., Rio Claro* , v. 24, n. 4, p. 373386. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2013005000011>.
- GARRIDO, M., CECCHI, P., MALET, N. et al. *Environ Monit Assess* (2019) 191: 204. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7349-8>
- GRABAN, S. DALL'OLMO, G. GOULT S. SAUZÈDE, R. (2020). Accurate deep-learning estimation of chlorophyll-a concentration from the spectral particulate beam-attenuation coefficient. *Optics Express*. 28. 10.1364/OE.397863
- GREGOR, J.; MARSÁLEK, B.; SIPKOVA, H. Detection and estimation of potentially toxic cyanobacteria in raw water at the drinking water treatment plant by in vivo fluorescence method. *Water Research*, v. 41, p. 228–234, 2007.
- GREGOR, J., MARŠÁLEK, B.; Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods, *Water Research*, Volume 38, Issue 3, 2004, Pages 517-522, ISSN 0043-1354, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.033>
- GOULART., N., M.; Avaliação metodológica por sonda fluorimétrica para análise de biomassa de cianobactérias; dissertação (mestrado em meio ambiente e recursos hídricos) - universidade federal de itajubá.2019
- GOMES, F.P. O índice de variação, um substituto vantajoso do coeficiente de variação. Piracicaba: IPEF, 1991. 4p. (Circular técnica, 178).
- HARTMANN, A., HORN, H., RÖSKE, I., & RÖSKE, K. (2019). Comparison of fluorometric and microscopical quantification of phytoplankton in a drinking water reservoir by a one-season monitoring program. *Aquatic Sciences*, 81(1). doi:10.1007/s00027-018-0608-
- Heukelem, Laurie & Thomas, Crystal. (2001). Computer-assisted high performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of

phytoplankton pigments. *Journal of chromatography. A.* 910. 31-49. 10.1016/S0378-4347(00)00603-4.

HENNEMANN, M. C.; PETRUCIO, M. M. Resposta do fitoplâncton sazonal ao aumento da temperatura e aportes de fósforo em uma lagoa costeira de água doce, Sul do Brasil: um bioensaio em microcosmo. *Acta Limnologica Brasiliensia* [online]. 2010, v. 22, n. 3 [Acessado em 9 de junho de 2021], pp. 295-305. Disponível em: <<https://doi.org/10.4322/actalb.02203006>>. Epub 11 de abril de 2011. ISSN 2179-975X. <https://doi.org/10.4322/actalb.02203006>.

HODGES, C. M. et al. Sensor manufacturer, temperature, and cyanobacteria morphology affect phycocyanin fluorescence measurements. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 2, p. 1079–1088, 27 jan. 2018.

HOLM-H, O., LORENZEN, C. J., HOLMES, R. W. et al. (1965) Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Int. Explor. Mer*,30, 3–15.

HOULIEZ, E., LIZON, F., THYSSEN, M., ARTIGAS, L.F., SCHMITT, F.G. 2012. Spectral fluorometric characterization of Haptophyte dynamics using the FluoroProbe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *J. Plankton Res.* 34: 136–151. doi:10.1093/plankt/fbr091.

IZYDORCZYK, K. et al. Measurement of phycocyanin fluorescence as an online early warning system for cyanobacteria in reservoir intake water. *Environmental Toxicology*, v. 20, n. 4, p. 425–430, 2005.

JEFFREY, S.W., MANTOURA, R.F.C., Wright, S.W. (Eds.), 1997. Unesco, Paris, 661 p.

KAUTSKY, H., HIRSCH, A. Neue Versuche Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* 19, 964 (1931). <https://doi.org/10.1007/BF01516164>.

KAUTSKY H, FRANCK U (1943) Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. IX. Mitteilung. Apparatur zur Messung rascher Lumineszenzänderungen geringer Intensität. *Biochem Z* 315:139–155

KAUTSKY H, FRANCK U (1948) Fluoreszenzanalyse des Lichtenergiewechsels der grünen Pflanze. *Naturwissenschaften* 35:43–80

KIM, H. G., HONG, S., CHON, T. S., & JOO, G. J. (2021). Spatial patterning of chlorophyll a and water-quality measurements for determining environmental thresholds for local eutrophication in the Nakdong River basin. *Environmental Pollution*, 268, 115701.

KIRK, J.T.O. *Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, London, Cambridge University Press, 1994, v. 2, p. 507.

KONG, Y. et al. Using an online phycocyanin fluorescence probe for rapid monitoring of cyanobacteria in Macau freshwater reservoir. *Hydrobiologia*, v. 741, n. 1, p. 33–49, 2014.

KRING, S. FIGARY, S. & BOYER, G. WATSON, S. TWISS, M. (2014). Rapid in situ measures of phytoplankton communities using the bbe FluoroProbe: Evaluation of spectral calibration,

instrument intercompatibility, and performance range. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 71. 1087-1095. 10.1139/cjfas-2013-0599.

KUHA, J., JÄRVINEN, M., SALMI, P. et al. Calibration of in situ chlorophyll fluorometers for organic matter. *Hydrobiologia* 847, 4377–4387 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04086-z>

LEBOULANGER, C.; DORIGO, U.; JACQUET, S.; LE B. B.; PAOLINI, G.; HUMBERT, J. F. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study, *Aquat. Microb. Ecol.*, 2002, 30, 83–89.

LEE, S. H. et al. Design of Optical Biological Sensor for Phycocyanin Parameters Measurement using Fluorescence Technique. *International Journal of Advanced Smart Convergence*, v. 5, n. 2, p. 73–79, 2016.

LEWIS, W. M., 2000. Basis for the protection and management of tropical lakes. *Lakes and Reservoirs Research and Management* 5: 35–48.

LI, Z.; MA, J.; GUO, J.; PAERL, H. W.; BROOKES, J.D.; XIAO, Y.; FANG, F.; OUYANG, W.; LUNHUI, L.; (2018) Water quality trends in the Three Gorges Reservoir region before and after impoundment (1992–2016), *Ecohydrology & Hydrobiology* DOI: 10.1016/J.ECOHYD.2018.08.005

LI, N., WANG, J., YIN, W., JIA, H., XU, J., HAO, R., ... & Shi, Z. (2021). Linking water environmental factors and the local watershed landscape to the chlorophyll a concentration in reservoir bays. *Science of the Total Environment*, 758, 143617.

LIMA, J. E. F. W. Situação e perspectivas sobre as águas do cerrado. *Cienc. Cult.*, São Paulo , v. 63, n. 3, p. 27-29, July 2011 . <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252011000300011>.

LING. Z, DEYONG. S, SHENGQIANG. W, ZHONGFENG. Q, YU. H, ZHIHUA. M, YIJUN. H, "Retrievals of phytoplankton community structure from in situ fluorescence medições by HS-6P," *Opt. Express* 26 , 30556-30575 (2018).

LIHUA. Z., DAOLIANG. L, "Development of In Situ Sensors for Chlorophyll Concentration Measurement", *Journal of Sensors*, vol. 2015, Article ID 903509, 16 pages, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/903509>

LIU, X., HUANG, B., LIU, Z. et al. (2012) High-resolution phytoplankton diel variations in the summer stratified central Yellow Sea. *J. Oceanogr.*, 68, 913–927.

LOISA. O, KAARIA, J. LAAKSONLAITA, J. NIEMI, J. SARVALA, J. SAARIO, J.. (2015). From phycocyanin fluorescence to absolute cyanobacteria biomass: An application using in-situ fluorometer probes in the monitoring of potentially harmful cyanobacteria blooms. *Water Practice and Technology*. 10. 695-698. 10.2166/wpt.2015.083.

LOHRENZ SE, WEIDEMANN AD, Tuel M (2003) Phytoplankton spectral absorption as influenced by community size structure and pigment composition. *J Plankton Res* 25: 35-61

LORENZEN, C. J. (1966) A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.*, 13, 223–227.

- LORENZEN C. J. Determination of chlorophyll in pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, Baltimore, v. 12, p. 990-992, 1967.
- LONDE, L. R. Comportamento espectral do fitoplâncton de um reservatório brasileiro eutrofizado – Ibitinga (SP). 2008. 138 f. Tese (Doutorado em Sensoriamento Remoto) INPE, São José dos Campos.
- MARQUES, Sâmia Momesso; AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana Heloisa Pinê. Algas como bioindicadores da qualidade da água. *Revista Científica ANAP Brasil*, [S.l.], v. 10, n. 19, dez. 2017. ISSN 1984-3240.
- MARAÑÓN, E. et al. Nutrient limitation suppresses the temperature dependence of phytoplankton metabolic rates. *ISME*. v.12, p.1836-1845, 2018.
- MARINO, L.. (2017). Relação entre clorofila-a e cianobactérias no estado de São Paulo. *Revista DAE*. 65. 32-43. 10.4322/dae.2016.026.
- MACKEY, M., MACKEY, D., HIGGINS, H. et al. (1996) CHEMTAX—a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 144, 265–283.
- MOBLEY C. D, et al. Interpretation of hyperspectral remote-sensing imagery via spectrum matching and look-up tables. *Applied Optics*, v.44, n.17, p.3576-3592, 2005.
- MUSTAFA, S.; BAHAR, A.; AZIZ, A. Z.; DARWISH, M. Solute transport modelling to manage groundwater pollution from surface water resources. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 233, 2020.
- NAKAEMA, M. K. K.; SANCHES, R. Fluorometria no domínio da frequência. São Carlos: Química nova, 1999.
- OLIVEIRA-FILHO, A. & RATTER, J.A. (2002). Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado Biome. *The cerrados of Brazil*. 121-140.
- PANGESTUTI, R.; KIM, S.-K. Efeitos neuroprotetores das algas marinhas. *Mar. Drugs* 2011 , 9 , 803–818.
- PAN, X. et al. Remote sensing of picophytoplankton distribution in the northern South China. *Sea Remote Sensing of Environment*, v. 128, p. 162– 175, 2013.
- PANCHENKO, M.; DOMYSHEVA, V.; NPESTUNOV, D. ;SAKIRKO, M.; SHAMRIN, A.; ZAVORUEV, V.; SHMARGUNOV, V.. (2020). Reconstruction of the diurnal behavior of the concentration of chlorophyll in the surface and bottom water of the coastal zone of Lake Baikal on the basis of empirical calibration of fluorescence characteristics. *Limnology and Freshwater Biology*. 622-623. 10.31951/2658-3518-2020-A-4-622.
- PAPAGEORGIU, G. C.; GOVINDJEE. (2004). Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Springer Dordrecht, 820 p.

- PEREIRA, B. A. S.; VENTUROLI, F. e CARVALHO, F. A.; Florestas estacionais no cerrado: uma visão geral. *Pesquisa Agropecuária Tropical* [online]. 2011, v. 41, n. 3 [Acessado 6 Julho 2021] , pp. 446-455. Disponível em: <<https://doi.org/10.5216/pat.v41i3.12666>>. Epub 08 Fev 2012. ISSN 1983-4063. <https://doi.org/10.5216/pat.v41i3.12666>.
- RASTOGI RP, MADAMWAR D. INCHAROENSAKDI A (2015) Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Front. Microbiol.* 6:1254. doi: 10.3389/fmicb.2015.01254
- REYNOLDS, C. S. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press 2006. 535 p.
- REICHWALDT, E. S., GHADOUANI, A. Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: Between simplistic scenarios and complex dynamics. *Water Research*. vol. 46, p. 1372-1393, 2012.
- RICHARDSON, L.L.; Remote Sensing of algal bloom dynamics; New research fuses remote sensing of aquatic ecosystems with algal accessory pigment analysis. *BioScience*, v. 46, n. 7, p. 492-501, 1996.
- RICHARDSON, T. L., LAWRENZ, E., PINCKNEY, J. L. et al. (2010) Spectral fluorometric characterization of phytoplankton community composition using the Algae Online Analyser. *Water Res.*, 44, 2461–2472.
- ROWAN, K.S. *Photosynthetic Pigments of Algae*. Cambridge: Cambridge University Press. 1989.
- ROESLER, C. S., BARNARD. A. H. 2013. Optical proxy for phytoplankton biomass in the absence of photophysiology: Rethinking the absorption line height. *Methods Oceanogr.* 7: 79–94. doi:10.1016/j.mio.2013.12.003
- ROESLER, C.; UITZ, J.; CLAUSTRE, H.; BOSS, E.; XING, X.; ORGANELLI, E.; BARBIEUX, M. (2017). Recommendations for obtaining unbiased chlorophyll estimates from in situ chlorophyll fluorometers: A global analysis of WET Labs ECO sensors. *Limnology and Oceanography: Methods*, 15(6), 572–585. doi:10.1002/lom3.10185
- SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de; RIBEIRO, J. F. 2008. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008.
- SAHA, A., JESNA, PK, RAMYA, VL, MOL, SS, PANIKKAR, P., VIJAYKUMAR, ME, BK (2021). Frações de fósforo no sedimento de um reservatório tropical, Índia: Implicações para a identificação de fontes de poluição e eutrofização. *Geoquímica Ambiental e Saúde* , 1-21.
- SEPPALA, J., YLOSTALO, P., KAITALA, S. et al. (2007) Ship-of-opportunity based phycocyanin fluorescence monitoring of the filamentous cyanobacteria bloom dynamics in the Baltic Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 73, 489–500.
- SEPPALA, J. *Fluorescence properties of Baltic Sea phytoplankton*. 2009. 83 f. Monographs of the boreal environment research. Edita Prima Ltd. Helsinki.

- SUGANYA, T. ; VARMAN, M. ; MASJUKI, HH; RENGANATHAN, S. Macroalgae e microalgae como uma fonte potencial para aplicações comerciais junto com a produção de biocombustíveis: Uma abordagem de biorefinaria. *Renovar. Sustentar. Energy Rev.* 2016 , 55 , 909–941.
- SUGGETT, D. J. et al. *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications.* Dordrecht: Springer, 2010. 323 p.
- SHIN, Y.H. BARNETT, J. GUTIERREZ-W, M. T. RUSCH, K. CHOI, J.W. (2018). A hand-held fluorescent sensor platform for selectively estimating green algae and cyanobacteria biomass. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 262. 10.1016/j.snb.2018.02.045.
- SHIN, Y.-H. GUTIERREZ ,W., M. T. CHOI, J. W. (2020). Review - Recent Progress in Portable Fluorescence Sensors. *Journal of the Electrochemical Society.* 168. 10.1149/1945-7111/abd494.
- SILVA, L. S.P. et al.2019. avaliação da produtividade primária autóctone do córrego lanoso (apa do rio uberaba), minas gerais, brasil. **revista uningá review**, [S.l.], v. 34, n. 2, p. 16-27, jun. 2019. ISSN 2178-2571.
- SILVA, G. S.de M.; GARCIA, C. A. E.. Evaluation of ocean chlorophyll-a remote sensing algorithms using in situ fluorescence data in Southern Brazilian Coastal Waters. *Ocean and Coastal Research*, v. 69, 2021.
- SILVA, T., GIANI, A., Figueredo, C., VIANA, P., KHAC, V. T., LEMAIRE, B. J., ... Vinçon-Leite, B. (2016). Comparison of cyanobacteria monitoring methods in a tropical reservoir by in vivo and in situ spectrofluorometry. *Ecological Engineering*, 97, 79–87. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.06.037
- SOUSA, E. B., dos SANTOS P, S. L., GOMES, A. L., CUNHA Silva, C. J., Tavares, C. V. B., PINHEIRO, S. C. C. (2020). Composição, riqueza e índices ecológicos do fitoplâncton do lago Bolonha (Belém, Pará). *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 3(4), 3263-3275.
- TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. *Limnologia*, São Paulo: Oficina de Textos, 2008. p. 631.
- TIAN, C. et al. Phytoplankton Functional Groups Variation and Influencing Factors in a Shallow Temperate Lake. *Water Environment Research*, v. 90, p.510-519, 2018.
- UTSUMI, A.G.; GALO, M. LBT; TACHIBANA, VILMA M .. Mapeamento de informações sobre a fluorescência da ficologia e da análise geoestatística. *Rev. bras. eng. agrícola. ambiente. Campina Grande*, v. 19, n. 3, p. 273-279, março de 2015.
- WWA. *Algae: Source to Treatment: manual of water supply practices - M57*, first edition, 2010.
- WATRAS, CJ, BAKER, AL Detection of planktonic cyanobacteria by tandem in vivo fluorometry. *Hydrobiologia* 169, 77-84(1988).<https://doi.org/10.1007/BF00007935>
- WETZEL, R. G. *Limnology*. Academic press, v. 3, 2001, p. 1006
- WIEGAND, M., NASCIMENTO, AT, COSTA, A., NETO, IE (2020). avaliação do nutriente limitante da produção de algal em reservatórios do semiárido brasileiro. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)* , 55 (4), 456 - 478. <https://doi.org/10.5327/Z2176-947820200681>

- YENTSCH, C. S. MENZEL, D. W. (1963) A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, 10, 221–231.
- YENTSCH, C. S. YENTSCH, C. M. (1979) Fluorescence spectral signatures-characterization of phytoplankton populations by the use of excitation and emission spectra. *J. Mar. Res.*, 37, 471–483.
- YENTSCH, C. S. PHINNEY, D. A. (1985) Spectral fluorescence—an ataxonomic tool for studying the structure of phytoplankton populations. *J. Plankton Res.*, 7, 617–632.
- YU, X., YANG, JR, CHEN, J. et al. Sobre o uso da quimiotaxonomia, um método de identificação e quantificação do fitoplâncton baseado em pigmentos para levantamentos rápidos de reservatórios subtropicais. *Environ Sci Pollut Res* 28, 3544–3555 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10704-4>.
- YSI (2020) EXO User Manual- Advanced Water Quality Monitoring Platform Acessado no dia 14/01/2019 <https://www.ysi.com/file%20library/documents/manuals/exo-user-manual-web.pdf>
- ZAMYADI, A., CHOO, F. NEWCOMBE, G. STUETZ, R. HENDERSON, R. (2016). A review of monitoring technologies for real-time management of cyanobacteria: Recent advances and future direction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 85. 10.1016/j.trac.2016.06.023.
- ZAMYADI, A., MCQUAID, N., DORNER, S. et al. (2012) Cyanobacterial detection using in vivo fluorescence probes: managing interferences for improved decision making. *JAWWA*, 104, 466–4
- ZOLFAGHARI, K., WILKES, G., BIRD, S., ELLIS, D., PINTAR, K. D. M., GOTTSCHALL, N., LAPEN, D. R. (2020). Chlorophyll-a, dissolved organic carbon, turbidity and other variables of ecological importance in river basins in southern Ontario and British Columbia, Canada. *Environmental monitoring and assessment*, 192(1), 1-16.

APÊNDICE I- Método de validação (*Jackknife*)

Elemento amostral excluído	Modelos de validação	Estimado pelo modelo	LAB	BBE - relativo
1	$Y = 0,166 + 0,068X$	1,206	0,800	1,600
2	$Y = 0,179 + 0,068X$	2,373	1,600	2,201
3	$Y = 0,166 + 0,068X$	1,759	1,300	1,813
4	$Y = 0,135 + 0,068X$	5,430	8,000	16,644
5	$Y = 0,182 + 0,068X$	2,053	1,300	1,958
6	$Y = 0,158 + 0,069X$	2,882	2,400	3,223
7	$Y = 0,097 + 0,070X$	12,145	11,800	18,232
8	$Y = 0,129 + 0,069X$	4,450	4,800	7,686
9	$Y = 0,149 + 0,069X$	1,756	1,600	1,776
10	$Y = 0,149 + 0,069X$	1,804	1,600	2,112
11	$Y = 0,165 + 0,068X$	1,735	1,300	1,975
12	$Y = 0,116 + 0,069X$	2,530	2,900	2,990
13	$Y = 0,108 + 0,070X$	8,120	7,500	20,875
14	$Y = 0,083 + 0,069X$	1,862	2,700	3,143
15	$Y = 0,210 + 0,068X$	2,463	1,100	5,457
16	$Y = -0,022 + 0,070X$	2,353	5,300	7,178
17	$Y = 0,205 + 0,067X$	9,135	10,200	14,551
18	$Y = 0,179 + 0,067X$	6,905	8,600	12,759
19	$Y = 0,130 + 0,069X$	3,531	3,700	4,543
20	$Y = 0,145 + 0,069X$	3,931	3,600	4,019
21	$Y = 0,119 + 0,069X$	3,448	3,900	3,449
22	$Y = 0,134 + 0,069X$	5,722	5,000	6,234
23	$Y = -0,025 + 0,073X$	8,640	5,300	13,191
24	$Y = 0,163 + 0,068X$	6,963	8,000	8,830
25	$Y = 0,093 + 0,068X$	4,741	8,300	4,194
26	$Y = 0,132 + 0,069X$	4,931	5,300	4,200
27	$Y = 0,093 + 0,068X$	4,619	7,600	3,830
28	$Y = 0,073 + 0,071X$	7,146	4,700	6,029

29	$Y = 0,131 + 0,069X$	3,749	3,900	4,761
30	$Y = 0,150 + 0,069X$	4,240	3,600	5,067
31	$Y = 0,146 + 0,069X$	3,039	2,800	2,600
32	$Y = 0,167 + 0,069X$	3,618	2,700	2,793
33	$Y = 0,149 + 0,069X$	5,038	3,600	3,568
34	$Y = 0,145 + 0,069X$	4,935	4,100	4,020
35	$Y = 0,134 + 0,069X$	2,659	2,700	4,128
36	$Y = 0,109 + 0,069X$	2,409	2,900	3,705
37	$Y = 0,148 + 0,069X$	2,311	2,100	2,777
38	$Y = 0,162 + 0,069X$	2,372	1,900	2,352
39	$Y = 0,187 + 0,068X$	2,587	1,600	2,411
40	$Y = 0,180 + 0,068X$	2,415	1,600	2,525

APÊNDICE II-Script dos gráficos- (Linguagem R)

```
#####BOXPLOT/KRUSKAL-WALLIS#####  
install.packages("ggstatsplot")  
library(ggstatsplot)  
install.packages("palmerpenguins")  
library(palmerpenguins)  
install.packages("tidyverse")  
library(tidyverse)  
library("tidyverse", "ggstatsplot")  
FINAL<-boxplot(VALORES~METODOS,data=dados)  
ggbetweenstats(data = dados,  
  x = METODOS,  
  y = VALORES,  
  type = "np",  
  conf.level = 0.95,  
  package = "colorBlindness", # package from which color palette is to be taken  
  palette = "Green2Magenta16Steps", # choosing a different color palette  
  title = "Non-parametric Test (violin plot)",  
  p.adjust.method= "bonferroni",  
  pairwise.display= "all",  
  outlier.tagging = TRUE,  
  outlier.label = PONTOS)+  
  labs(x="",y=("Chlorophyll-a concentration (µg/L)"),parse = F,  
  colour = "black", size = 12,family="Times New Roman")+  
  theme(  
    axis.text = element_text(color="black",family="Times New Roman",size=10),  
    panel.background = element_rect(fill = "white", colour="grey50"),  
    panel.grid.major = element_line(colour = "tomato1", linetype = "dotted")  
  )+  
  scale_y_continuous(  
    limits = c(0,27 ),  
    breaks = seq(from = 0, to = 27, by = 5))  
ggsave("BOXPLOT_FINAL.png",dpi=600)
```

```
#####GRÁFICO-DE-REGRESSÃO#####
D2<-ggplot(data=dados, aes(x=exo, y=lab)) +
  geom_point(color="black",shape=21,fill="black",alpha=0.6,size=3) +
  theme(plot.background = element_rect(fill = "white"),
    panel.background = element_rect(fill = "white", colour="gray"),
    panel.grid.major = element_line(colour = "black", linetype = "dotted"),
    panel.grid.minor = element_line(colour = "gray", size = 0.5),
    axis.title = element_text( color="black", size=7, face=1))+
  geom_smooth(method=lm , color="red",size=0.8, se=TRUE) +
  ylim(0,15)+
  xlab("Concentração de clorofila-a(µg/L) - EXO")+
  ylab("Concentração de clorofila-a (µg/L) - LAB")+
  geom_label(label="Y = 2.234 + 0.984X
R²= 0.639
r=0.79
RMSE=2.97",x=2,y=12,label.padding =unit(0.19,"lines"),
  size = 2.8,
  color = "black",
  fill="white")+
  geom_label(label="A",x=0.5,y=15,label.padding =unit(0.19,"lines"),
  size = 2.8,
  color = "Black",
  fill="white")
```

```
D3<-ggplot(data=dados, aes(x=bbe, y=lab)) +
  geom_point(color="black",shape=21,fill="black",alpha=0.6,size=3) +
  theme(plot.background = element_rect(fill = "white"),
    panel.background = element_rect(fill = "white", colour="gray"),
    panel.grid.major = element_line(colour = "black", linetype = "dotted"),
    panel.grid.minor = element_line(colour = "gray", size = 0.5),
    axis.title = element_text( color="black", size=7, face=1))+
  geom_smooth(method=lm , color="red",size=0.8,se=TRUE)+
  xlim(0,23)+
  ylim(0,15)+
```

```

xlab("Concentração de clorofila-a (µg/L) - BBE")+
ylab("Concentração de clorofila-a (µg/L) - LAB")+
geom_label(label="Y = 1.536 + 0.453X
R²= 0.637
r=0.78
RMSE=3.34",x=4,y=12,label.padding =unit(0.19,"lines"),
  size = 2.8,
  color = "black",
  fill="white")+
geom_label(label="B",x=0.5,y=15,label.padding =unit(0.19,"lines"),
  size = 2.8,
  color = "Black",
  fill="white")
D1<-grid.arrange(D2, D3, ncol=2)
ggsave("fig13.png",D1,dpi=600)

```

ANEXO- Summary of fluorometers of in situ chlorophyll measurement

Name	Light source	λ_{ex} (nm)	Excitation method	Detectors	Parameters	Measurement mode	Range ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	Strengths	Weakness
AOA	LED	450, 525, 570($\times 2$), 590, and 610	5 kHz	PMT	Chl a, Chl c, PC et al.	Benchtop, submersible probe	0–80	0.02	Spectral groups measurement	More spectral fingerprinting will be better
BenthoFluor	LED	370, 470, 525, 570, 590, and 610	5 kHz	PMT	Microphytobenthos	In situ	0–7 $\mu\text{g cm}^{-2}$		Sediments groups measurement	More spectral fingerprinting will be better
-	Flash xenon lamp	Two-filter 435	Flash 10–15 us	PD	Chl a	Underwatertowed bodies and moored or buoyed	0–100 or 0–1000		Remote operation	Need a platform for operation
ALF	Lasers	405 532	200 us PDP	PMT	Chl a, PC, and CDOM	Laboratory or flow-through	0.003–50		Spectral deconvolution	Need a platform for operation
ALF-T	Laser	510 375, 405, and 510	PDP	Small PMT spectrometer	Chl a, PBP Fv/F m CDOM	Flow-through small-volume sample		0.01	“T” optical scheme	Need a platform for operation
Multiexciter	LED	375, 400, 420, 435, 470, 505, 525, 570, and 590		Si-PD, 680 nm	Phytoplankton	In situ		0.1	Nine LEDs for distinction phytoplankton groups	Not enough information to assessment
Phase fluorometer	LED	blue	Sinusoidal 80 MHz modulation	PD	Chl a			466.7	Fluorescence lifetime measurement	A worse LOD
-	LED	470	Pseudorandom sequence modulation	PD	Chl	In situ	0–25	0.0103	Pseudorandom sequence modulation, highly sensitive	Need more information of assessment
FRRf	LED	470	FRR	PMT	Chl	In situ	0–50	0.01	Profiling buoy system	Big and complex

Tabela 2: Summary of fluorometers of in situ chlorophyll measurement

Tabela 2: Continued

Name	Light source	λ_{ex} (nm)	Excitation method	Detectors	Parameters	Measurement mode	Range ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	Strengths	Weakness
MFF	4 xenon strobe lamps	455	10 kHz strobe flash	Two PMTs 676 nm	Chl a	In situ	0–50 and 0–200	0.1 and 0.5	Eight sensors simultaneous measurement, long term	Accuracy
ECO BBFL2	LED	370, 540, and 660	Modulated 1 k	460, 570, and 660 nm PD	Chl a, CDOM phycoerythrin	In situ	0–125	0.025	Three-channel excitation, high accuracy	Expensive
ECO 3X1M	LED	435, 470, and 532	Modulated 1 k	PD 695 nm	Chl	In situ	0.01–125	0.095	High accuracy	Expensive
Trios MicroFlu	LED	470	Modulated	PD	Chl	In situ	0–10 0– 100	0.1	Two ranges and accuracy	Cannot simultaneously measure chlorophyll and phycocyanin
TurboMAP-L	Diode laser	410		PD CMOS	Chl a and turbidity	In situ	0–100	0.5	Consider the aerodynamic design	Composition analysis
-	Blue LED	425	Modulation	PD	Chl a	Pumpable			Low cost	A little rough
	Lamp	420, 270/530	Flash	PMT	Chl	Submersible			Two probing heads, Raman scattering calibration	Cannot find the LOD
PLIF	Diode laser	532		CCD	Chl	In situ			Microscale fluorescence imaging	Accuracy
Lensless Miniature Portable Fluorometer	LED	405, 465		CMOS image sensor array	Chl, CDOM	Portable	0.625– 893	0.625	Low cost, lensless, and low power	Accuracy and LOD

Fonte: Zeng & Li (2015)