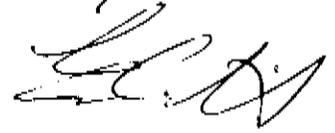


*Este exemplar corresponde a redação final  
da tese defendida pela aluna Maria Valéria Marquezini  
e aprovada pela banca Examinadora. 04/09/90*

MARIA VALÉRIA MARQUEZINI



**“APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA  
FOTOACÚSTICA AO ESTUDO “IN VIVO”  
DA TOXIDADE METÁLICA EM PLANTAS”**

Tese apresentada ao Instituto de Física  
“Gleb Wataghin”, da Universidade Esta-  
dual de Campinas, para a obtenção do título  
de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Edson Corrêa da Silva

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

Campinas – 1990

*“Se não houver frutos,  
valeu a beleza das flores.  
Se não houver flores,  
valeu a sombra das folhas.  
Se não houver folhas,  
valeu a intenção da semente.”*

*Henfil*

**Dedico este trabalho a meus pais, Nelson e Rosa; a meus irmãos, Cris, Ró e César e ao Juca.**

# Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial,

- Ao Prof. Edson Corrêa da Silva, que me orientou com dedicação e amizade.
- Ao Prof. Helion Vargas, que, com sua experiência e sabedoria, teve uma participação fundamental neste trabalho.
- Aos Profs. William José da Silva, Luís Carlos Miranda e Carlos Alberto Lima, pelas importantes discussões e colaboração.
- Ao Prof. William e à técnica Elisabete, pelas amostras de milho.
- Ao Prof. Curt, à Dinah, ao Bento, ao Ossamu, ao Antônio Neto, ao Nani e ao Guilherme, pela atenção, amizade e ajuda no laboratório.
- Ao Norberto, pela colaboração em todas as etapas deste trabalho e, sobretudo, pela amizade.
- Ao Toninho e ao Mauro, com quem aprendi muito no dia a dia em nossa sala.
- À Martha e à Denise, pelo incentivo, apoio e amizade.
- À Conceição, pela edição do texto e ao Silvano, pelos desenhos.
- À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## Resumo

Neste trabalho descreve-se a técnica: Espectroscopia Fotoacústica com a Célula Aberta (OPC). Esta permite estudar diferentes respostas à ação tóxica do alumínio sobre plantas de milho (*Zea Mays L.*) geneticamente distintas. Mostra-se que a configuração experimental adotada permite a obtenção dos espectros de absorção e transmissão a partir de um arranjo experimental simples. Esta técnica permite experiências "in vivo" e medidas de propriedades ópticas e térmicas de folhas de plantas.

## Abstract

An open-cell photoacoustic (OPC) spectroscopic technique is described which can assess genetically rooted differences in the response of live specimens of corn (*Zea Mays* L.) to the toxic action of aluminium. It is shown that this alternative signal-to-noise enhanced photoacoustic configuration allows us to obtain both absorption and transmission spectra with minimal requirements of experimental arrangement and cell machining. This process also permits "in vivo" experiments and the measurement of optical and thermal properties of plant leaves.

# Índice

	Pág.
<b>Apresentação</b> .....	<b>1</b>
<b>Cap.I - Efeito Fotoacústico e Espectroscopia Fotoacústica</b> .....	<b>3</b>
I.1 - Introdução.....	3
I.2 - Efeito Fotoacústico.....	4
I.2.1 - Modelo RG para a produção do Sinal Fotoacústico: Equação Geral .....	7
I.2.2 - Casos Limites .....	12
I.2.3 - Casos Especiais: Absorção por Incidência Traseira e Absorção Superficial .....	15
<b>Cap.II - Espectroscopia Fotoacústica com a Célula Aberta (OPC)</b> .	<b>17</b>
II.1 - Introdução.....	17
II.2 - Teoria .....	20
II.2.1 - Incidência Direta sobre a Membrana do Microfone.....	24
II.2.2 - Caso Limite de Interesse: Amostra Opticamente Transparente e Termicamente Grossa .....	24
II.3 - Obtenção de Parâmetros da OPC: Constante RC, Espessuras da Membrana ( $l_m$ ) e da Câmara Fotoacústica ( $l_g$ ).....	27
<b>Cap.III - Contribuição do Processo de Fotossíntese para o Sinal Fotoacústico no Estudo de Plantas</b> .....	<b>36</b>
III.1 - Morfologia da Folha.....	36
III.2 - Pigmentos.....	39

III.3 - Efeitos Positivo (+) e Negativo (-) .....	42
III.4 - Observação dos Efeitos (+) e (-) em Folhas de Milho .....	45
III.4.1 - Procedimento Experimental .....	45
III.4.2 - Resultados Experimentais .....	49
III.4.3 - Discussão dos Resultados .....	50
<b>Cap.IV - Medidas Fotoacústicas em Folha de Milho com a OPC ...</b>	<b>52</b>
IV.1 - 1º Experimento: Obtenção do Espectro de Absorção Fotoacústico de uma Folha de Milho .....	52
IV.2 - 2º Experimento: Obtenção de Parâmetros Ópticos e Térmicos da Folha de Milho .....	57
IV.3 - Discussão dos Resultados .....	60
<b>Cap.V - Toxicidade do <math>Al^{3+}</math> em Plantas de Milho.....</b>	<b>65</b>
V.1 - Motivos que Despertaram nosso Interesse pelo Presente Estudo ...	65
V.2 - Experimental .....	66
V.2.1 - Amostras .....	66
V.2.2 - Procedimento Experimental.....	66
V.3 - Resultados .....	69
V.4 - Discussão dos Resultados.....	74
<b>Cap.VI - Conclusões e Perspectivas .....</b>	<b>76</b>
<b>Apêndice I - Medidas de <math>\tau</math> e <math>\tau_{\beta}</math> em Folhas de Milho com a Célula Con-</b> <b>vencional: Influência da Desidratação da Amostra sobre</b> <b>estes Parâmetros .....</b>	<b>77</b>
<b>Referências .....</b>	<b>86</b>

## Apresentação

O presente trabalho tem como objetivo a utilização da espectroscopia fotoacústica ao estudo "in vivo" da ação do elemento tóxico  $Al^{3+}$  em plantas de milho. Utilizou-se como detector a denominada célula aberta (OPC).

- No capítulo I apresentamos um resumo da teoria do efeito fotoacústico, em particular, o modelo de Rosencwaig e Gersho para a geração do sinal fotoacústico.

- No capítulo II descrevemos a técnica OPC e apresentamos alguns resultados teóricos de nosso interesse. Os resultados teóricos apresentados foram obtidos a partir da teoria da célula aberta desenvolvida na ref.28. O capítulo contém ainda um trabalho experimental para a determinação de parâmetros do microfone (caracterização do microfone de eletreto). Esta etapa do presente trabalho foi feita em colaboração com o aluno Norberto Cella e será objeto de sua tese de doutoramento.

- No capítulo III, depois de uma breve descrição morfológica das folhas vegetais, investigamos a contribuição para o sinal fotoacústico de processos envolvidos na fotossíntese, a saber, evolução modulada do  $O_2$  e a perda fotoquímica.

- No capítulo IV abordamos dois experimentos com folha de milho "in vivo" usando a técnica fotoacústica OPC: o primeiro deles consiste na obtenção do espectro de absorção da folha e o segundo, na obtenção de parâmetros ópticos, térmicos e do tempo de relaxação não radiativa para a folha em um dado comprimento de onda da luz incidente. Neste capítulo descrevemos o espectrômetro fotoacústico utilizado em nossas medidas.

- No capítulo V desenvolvemos o tema principal da tese, ou seja, o estudo por espectroscopia fotoacústica OPC da ação da toxicidade do  $Al^{3+}$  em plantas de milho. É interessante notar que pela 1ª vez a técnica OPC é usada para monitorar a resposta genotípica das plantas à toxicidade do  $Al^{3+}$ .

- O capítulo VI é dedicado às conclusões finais e às perspectivas para o prosseguimento da pesquisa.

- O apêndice I trata da influência da desidratação da folha vegetal sobre o sinal fotoacústico quando a medida não é feita "in vivo".

# I - Efeito Fotoacústico e Espectroscopia Fotoacústica

## I.1 - Introdução

A espectroscopia fotoacústica é uma técnica que estuda a interação da radiação com a matéria através de um fenômeno conhecido como efeito fotoacústico. Tem sido amplamente utilizada em aplicações não só no campo da Física, como também da Química, Biologia, Medicina e Engenharia. Isto porque esta técnica possui algumas vantagens sobre a espectroscopia óptica convencional (de transmissão, reflexão e espalhamento). Uma destas vantagens é que a espectroscopia fotoacústica é uma medida direta da absorção (mede apenas a radiação absorvida que relaxa na forma de calor), de forma que a luz transmitida, refletida ou espalhada não interferem nas medidas. Assim, a técnica fotoacústica aplica-se ao estudo de materiais opacos, pouco absorvedores, géis, na forma de pó ou amorfos, que são materiais onde a espectroscopia óptica convencional não é adequada. Outra vantagem é que o detector de radiação na espectroscopia fotoacústica é a própria amostra, o que significa que a técnica pode ser usada em qualquer intervalo do espectro eletromagnético. Além disso, a técnica fotoacústica permite estudar não só propriedades ópticas do material como também as propriedades térmicas<sup>(1-7)</sup>; mais que isso, ela tem a capacidade única de permitir analisar o perfil de profundidade<sup>(8-10)</sup> dessas propriedades. Tal capacidade de microscopia de profundidade vem do fato de que o efeito fotoacústico é sensível apenas ao calor gerado dentro de uma certa espessura da amostra, a qual em princípio pode ser controlada, variando-se a frequência de modulação da luz incidente. Outra importante vantagem da espectroscopia fotoacústica consiste no fato de que esta

é uma técnica não destrutiva e que, sobretudo, permite a realização de estudos em materiais biológicos "in vivo". Este é um aspecto que será bastante explorado neste trabalho.

## 1.2 - Efeito Fotoacústico

O efeito fotoacústico em sólidos embora tenha sido descoberto há mais de um século (1880) por Alexandre Graham Bell<sup>(11)</sup>, só veio a ser utilizado a partir de 1973<sup>(12-14)</sup> quando os primeiros modelos teóricos apareceram para explicar o fenômeno. Este efeito consiste na geração de um sinal acústico dentro de uma célula fechada (fig. 1.1) que contém um gás em contato com a amostra, devido à absorção intermitente da luz modulada pela amostra. A energia absorvida periodicamente pela amostra transforma-se (total ou parcialmente) em pulsos de calor que dão origem à flutuação de pressão no gás.

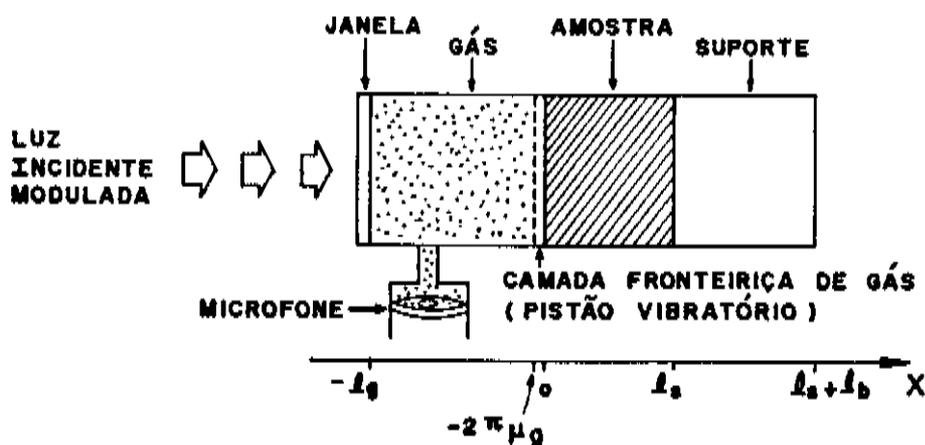


Fig.1.1: Esquema de uma célula fotoacústica convencional.

Os diferentes mecanismos através dos quais os pulsos de calor produzidos na amostra geram ondas acústicas no gás são basicamente três: a difusão de calor da amostra para o gás, a expansão térmica da amostra e a flexão termoelástica da mesma. A ocorrência ou não de um ou outro mecanismo e a predominância de um sobre o outro depende das condições experimentais bem como do material a ser estudado<sup>(16-18)</sup>.

A expansão térmica pode ser entendida da seguinte maneira: o aquecimento periódico da amostra (devido aos pulsos de calor na amostra), faz com que sua temperatura média também oscile. Como consequência, a amostra expande-se e contrai-se periodicamente de forma que sua superfície em contato com o ar passa a funcionar como um pistão vibratório, gerando ondas acústicas no gás.

A flexão termoelástica surge devido à existência de um gradiente de temperatura ao longo da espessura da amostra, pois a absorção decresce à medida que a luz penetra no material. Este gradiente de temperatura faz com que a expansão térmica seja diferente para diferentes planos da amostra (perpendiculares ao gradiente), induzindo uma flexão da mesma na direção do gradiente se suas bordas estiverem presas. Este processo é também periódico (semelhante à vibração da membrana de um tambor), gerando ondas acústicas no gás.

Na difusão térmica o pulso de calor produzido na amostra é transmitido ao gás, que ao expandir-se periodicamente gera a onda acústica.

Os três mecanismos de geração do sinal fotoacústico são ilustrados na fig.I.2. Em todos os casos a detecção do sinal é feita através de um microfone acoplado à célula.

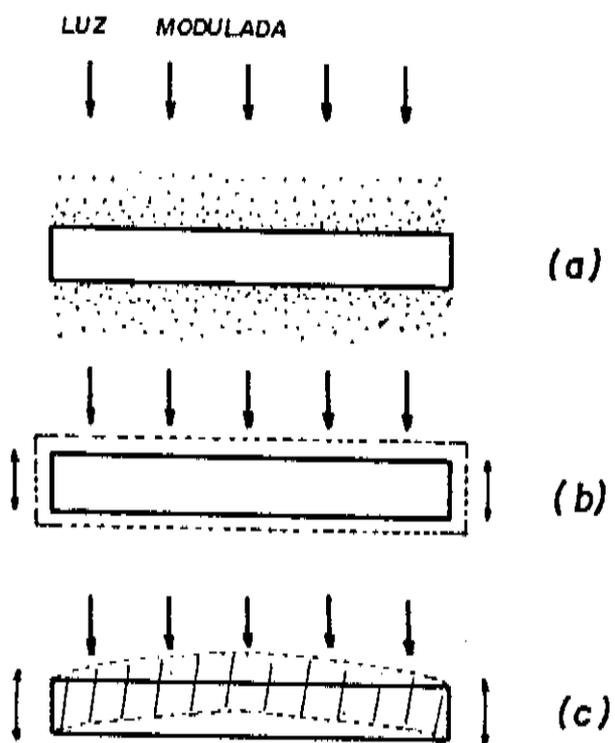


Fig.1.2: Mecanismos de geração do sinal fotoacústico.

- (a) difusão térmica
  - (b) expansão térmica
  - (c) flexão termoelástica
- (extraído da ref. 17)

A contribuição dos mecanismos de expansão térmica e flexão termoelástica para a geração do sinal fotoacústico é, para a maioria dos sólidos (na maioria das condições experimentais), desprezível em relação à contribuição da difusão térmica, pois os sólidos em geral têm coeficientes de dilatação térmica pequenos.

Baseados no mecanismo de difusão térmica, Rosencwaig e Gersho<sup>(12)</sup> desenvolveram um modelo unidimensional (modelo RG), segundo o qual somente uma pequena camada fronteira de gás é capaz de responder termicamente às variações de temperatura da superfície da amostra, atuando como um pistão vibratório para o resto do gás e produzindo, assim, flutuações de pressão no gás (ondas acústicas) que são detectadas por um microfone. Este modelo tem explicado a maioria dos resultados experimentais obtidos.

### **1.2.1 - Modelo RG para a Produção do Sinal Fotoacústico: Equação Geral**

O modelo RG baseia-se no esquema da fig.I.1, onde a luz modulada incide na amostra de espessura  $l_a$ , em contato com uma câmara de gás (geralmente ar) de espessura  $l_g$ , e opostamente em contato com um suporte de espessura  $l_b$ . A câmara de gás é fechada por uma janela de quartzo (transparente à radiação incidente) e acoplado a esta câmara existe um microfone que detecta variações de pressão no gás.

Considera-se que a luz monocromática modulada incidente pode ser descrita por uma equação do tipo:

$$I_0(t) = \frac{1}{2}I_0(1 + e^{j\omega t}) \quad (I.1)$$

onde  $I_0$  é o fluxo de luz monocromática incidente ( $W/cm^2$ ) e  $\omega = 2\pi f$  é a frequência

angular de modulação.

Uma parte dessa luz é absorvida pela amostra de forma que a intensidade do feixe luminoso diminui exponencialmente ao penetrar no material ( $I(x, t) = I_0(t)e^{-\beta x}$ , segundo a lei de Beer), exceto nos casos em que a absorção se dá totalmente na superfície. Uma medida da absorção da amostra é a distância que o feixe percorre até ter sua intensidade reduzida a  $1/e$  do valor inicial. Essa distância, chamada de comprimento de absorção óptica ( $l_\beta$ ), é o inverso do coeficiente de absorção óptica ( $\beta$ ). Microscopicamente, a luz incidente absorvida pela amostra interage com as moléculas do material excitando um estado eletrônico (no caso de luz visível e ultravioleta) ou vibracional (no caso de luz infravermelha). Após a excitação ocorre a desexcitação, ou seja, o retorno ao estado fundamental. Uma série de decaimentos radiativos e não radiativos podem ocorrer na desexcitação. Entre os radiativos citamos a fluorescência, luminescência e reações fotoquímicas. O restante da energia absorvida é convertida em calor por processo de decaimento não radiativo (relaxação térmica); isto corresponde a um aumento de temperatura na amostra. No modelo *RG* considera-se que só há relaxação térmica, ou seja, que toda luz absorvida é convertida em calor. Assim, a densidade de calor produzida em qualquer ponto  $x$  da amostra por unidade de tempo é dada por:

$$s(x, t) = -\frac{dI(x, t)}{dx} = \frac{1}{2}\beta I_0 \exp(-\beta x)(1 + e^{j\omega t}) \quad (I.2)$$

onde  $x$  assume valores positivos, pois a amostra estende-se de  $x = 0$  até  $x = l$ , com a luz incidindo em  $x = 0$  (fig.I.1).

A expressão para a variação de pressão na câmara fotoacústica e, conseqüentemente, a expressão para o sinal fotoacústico, no modelo *RG*, decorre da aplicação da equação de difusão térmica aos três meios representados na fig.I.1,

a saber, a amostra, o gás e o suporte. Mas, antes de escrevermos tais equações vamos definir os símbolos usados neste modelo. Nas definições seguintes, o índice  $i$  representará:  $i = s$  (amostra),  $i = g$  (gás) e  $i = b$  (suporte)

$K_i \rightarrow$  condutividade térmica ( $cal/cm.s.^{\circ}C$ )

$\rho_i \rightarrow$  densidade ( $g/cm^3$ )

$c_i \rightarrow$  calor específico ( $cal/g.^{\circ}C$ )

$\alpha_i = K_i/\rho_i c_i \rightarrow$  difusividade térmica ( $cm^2/s$ )

$a_i = [w/(2\alpha_i)]^{1/2} \rightarrow$  coeficiente de difusão térmica ( $cm^{-1}$ )

$\sigma_i = (1 + j)a_i \rightarrow$  coeficiente complexo de difusão térmica ( $cm^{-1}$ )

$\mu_i = 1/a_i \rightarrow$  comprimento de difusão térmica ( $cm$ )

$\beta_i \rightarrow$  coeficiente de absorção óptica ( $cm^{-1}$ )

$l_{\beta_i} = 1/\beta_i \rightarrow$  comprimento de absorção óptica ( $cm$ )

As equações de difusão nos três meios da célula são dadas por:

$$\frac{\partial^2 T(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial T}{\partial t}(x,t) + f(x,t) = 0 \quad 0 \leq x \leq l_s \quad (\text{amostra}) \quad (1.3)$$

$$\frac{\partial^2 T(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_g} \frac{\partial T}{\partial t}(x,t) = 0 \quad -l_g \leq x \leq 0 \quad (\text{gás}) \quad (1.4)$$

$$\frac{\partial^2 T(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_b} \frac{\partial T}{\partial t}(x,t) = 0 \quad l_s \leq x \leq l_s + l_b \quad (\text{suporte}) \quad (1.5)$$

onde:

$$f(x,t) = \frac{s(x,t)}{K_s} \quad \xrightarrow{\text{eq.(1.2)}} \quad f(x,t) = \frac{\beta I_0}{2K_s} \exp(-\beta x) [1 + e^{j\omega t}]$$

Nas eqs.(I.4) e (I.5) não aparece o termo  $f(x,t)$  porque no modelo *RG* considera-se que não há absorção da radiação incidente pelo gás nem pelo suporte, não havendo conseqüentemente geração de calor nesses meios.

Partindo das equações de difusão acima<sup>(12)</sup> e aplicando as condições de contorno do modelo *RG*— continuidade da temperatura e do fluxo de calor nas interfaces, chegamos a:

$$T_g = \theta(0)e^{-\sigma_g|x|}e^{j\omega t} \quad (I.6)$$

onde  $\theta(0)$  é a temperatura na interface amostra-gás, a qual é dada por:

$$\theta(0) = \frac{\beta I_0}{2K_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \left[ \frac{(r-1)(b+1)e^{l_s\sigma_s} - (r+1)(b-1)e^{-l_s\sigma_s} + 2(b-r)e^{-\beta l_s}}{(g+1)(b+1)e^{l_s\sigma_s} - (g-1)(b-1)e^{-l_s\sigma_s}} \right] \quad (I.7)$$

com

$$r = \frac{\beta}{\sigma_s}, \quad g = \frac{K_g\sigma_g}{K_s\sigma_s}, \quad b = \frac{K_b\sigma_b}{K_s\sigma_s}$$

O decaimento exponencial da eq.(I.6) indica que as flutuações de temperatura no gás tendem a zero para pontos distantes da interface amostra-gás, de forma que a uma distância  $\mu_g = 1/a_g$  a amplitude da oscilação térmica atenua-se a  $1/e$ . Assim, Rosencwaig e Gersho propuseram que somente uma camada gasosa de espessura  $2\pi\mu_g$  adjacente à superfície da amostra é capaz de responder termicamente à flutuação de temperatura na superfície da amostra, expandindo-se periodicamente de forma a exercer o papel de um pistão acústico sobre o resto do

gás. Supondo o gás ideal e que o restante do gás responde adiabaticamente à ação desse pistão, obtém-se<sup>(12)</sup> para a variação física de pressão, a parte real de:

$$\delta P(t) = \frac{\gamma P_0 \theta(0)}{\sqrt{2l_g a_g T_0}} e^{j(\omega t - \pi/4)} \quad (I.8)$$

onde  $\gamma = c_p/c_v$  é a razão entre os calores específicos a pressão ( $c_p$ ) e volume ( $c_v$ ) constantes,  $P_0$  é a pressão ambiente e  $T_0$  é a temperatura média na superfície da amostra.

A oscilação temporal da variação de pressão na célula pode ser representada por um vetor (fasor) girante no plano complexo. Assim:

$$\delta \vec{P}(t) = \vec{S}_F e^{j\omega t} \quad \text{onde} \quad \vec{S}_F = S_F e^{j\phi} \quad (I.9)$$

O sinal fotoacústico é definido como o fasor  $\vec{S}_F$  (conforme fig. I.3), ou seja, é a componente não temporal da variação de pressão na célula.

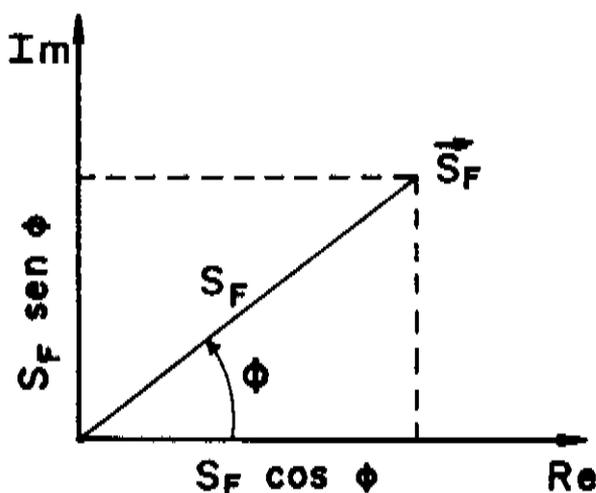


Fig. I.3: Representação fasorial ou vetorial do sinal fotoacústico.

Portanto, a equação geral para o sinal fotoacústico é:

$$\tilde{S}_F = \frac{\gamma P_0 \theta(0)}{\sqrt{2} l_g a_g T_0} e^{-j \frac{\pi}{4}} \quad (1.10)$$

Mas  $\theta(0) = |\theta(0)| e^{j\varphi}$ , então:

$$\tilde{S}_F = \frac{\gamma P_0 |\theta(0)|}{\sqrt{2} l_g a_g T_0} e^{j\phi} ; \quad \phi = \varphi - \frac{\pi}{4} \quad (1.11)$$

### 1.2.2 - Casos Limites

A eq.(1.11) para o sinal fotoacústico é bastante complicada, mas em geral ela não é usada na íntegra. Dependendo das propriedades ópticas e térmicas da amostra, esta é substancialmente simplificada. Então, antes de tratarmos os casos limites da eq.(1.11), é importante classificarmos as amostras segundo suas propriedades ópticas e térmicas.

Classificação óptica – classificam-se as amostras opticamente comparando sua espessura ( $l_s$ ) com o comprimento de absorção óptica ( $l_\beta$ ):

se  $l_\beta \ll l_s \rightarrow$  amostra opticamente opaca

se  $l_\beta \sim l_s \rightarrow$  amostra absorvedora

se  $l_\beta > l_s \rightarrow$  amostra opticamente transparente

Classificação térmica – classificam-se termicamente as amostras através da comparação de sua espessura com o comprimento de difusão térmica ( $\mu_s$ ):

se  $\mu_s > l_s \rightarrow$  amostra termicamente fina

se  $\mu_s < l_s \rightarrow$  amostra termicamente grossa

Com relação à classificação térmica, é importante dizer que o parâmetro  $\mu_s = \sqrt{\frac{\alpha_s}{\pi f}}$  não é uma propriedade intrínseca do material, pois ele depende também da frequência de modulação da luz incidente. Assim, variando-se  $f$ , uma mesma amostra pode passar de termicamente fina para termicamente grossa. Denomina-se frequência de corte ( $f_c$ ) a frequência na qual ocorre essa transição. Obtém-se  $f_c$  fazendo  $\mu_s = l_s$ , assim:

$$\mu_s = l_s \implies f_c = \frac{\alpha_s}{\pi l_s^2}$$

Considerando a classificação acima, mostramos na tab.I.1 a dependência do sinal fotoacústico com as propriedades ópticas e térmicas do material, bem como com a frequência de modulação da luz, conforme previsto pelo modelo RG em alguns casos limites<sup>(19)</sup>.

Nosso principal interesse é pelo caso em que a amostra é transparente e termicamente grossa (2º caso da tab. 1.1), pois é o caso das folhas de milho com as quais trabalhamos. Vemos na tab.I.1 que, neste caso, a dependência do sinal com a frequência é dada por  $f^{-3/2}$ . É também interessante notar que nem toda a luz absorvida pela amostra gera sinal fotoacústico; somente aquela absorvida dentro do comprimento de difusão térmica ( $\mu_s$ ) contribui para o sinal. Assim, uma vez que  $\mu_s$  depende da frequência de modulação, é possível efetuarmos uma microscopia de profundidade.

Casos Limites	Amplitude Aproximada do Sinal Fotoacústico	Representação Esquemática
1º) $\beta l_s \ll 1, l_s \ll \mu_s$	$\frac{\beta l_s (\alpha_p \alpha_b)^{1/2}}{K_b f}$	
2º) $\beta l_s \ll 1, l_s \gg \mu_s$	$\frac{\beta \alpha_s \alpha_p^{1/2}}{K_s f^{3/2}}$	
3º) $\beta l_s \gg 1, l_s \ll \mu_s, \beta \mu_s \gg 1$	$\frac{(\alpha_b \alpha_p)^{1/2}}{K_b f}$	
4º) $\beta l_s \gg 1, l_s > \mu_s, \beta \mu_s > 1$	$\frac{(\alpha_s \alpha_p)^{1/2}}{K_s f}$	
5º) $\beta l_s \gg 1, l_s \gg \mu_s, \beta \mu_s < 1$	$\frac{\beta (\alpha_s \alpha_p)^{1/2}}{K_s f^{3/2}}$	

Tab.I.1: Dependência da amplitude do sinal fotoacústico com as propriedades ópticas e térmicas em alguns casos limites. Os dois primeiros casos referem-se às amostras transparentes ( $\beta l_s \ll 1$ ) e os 3 últimos às amostras opacas ( $\beta l_s \gg 1$ ). Nos casos 3º e 4º dizemos que o sinal fotoacústico é saturado.

### I.2.3 - Casos Especiais: Absorção por Incidência Traseira e Absorção Superficial

No modelo RG consideramos que a luz incide na amostra em  $x = 0$  no esquema da fig. I.1, ou seja, na superfície da amostra em contato com o gás. Chamamos este caso de incidência dianteira. Consideremos agora um outro caso de interesse: incidência traseira. Este se dá quando a luz incide na amostra pela superfície oposta a que está em contato com o gás. Considerando o esquema da célula fotoacústica conforme a fig.I.1, a incidência traseira só é possível quando o suporte é transparente. Neste caso a geração de calor, supondo que a absorção se dá conforme a lei de Beer e considerando que toda a luz absorvida transforma-se em calor, é dada por:

$$f(x) = \frac{\beta}{K_s} I_0 e^{-\beta(l_s - x)} \quad (1.12)$$

e a eq. de RG para a temperatura na interface amostra-gás torna-se<sup>(20)</sup>:

$$\theta(0) = \frac{\beta I_0}{K_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \frac{[(r+1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (r-1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s}]e^{-\beta l_s} - 2(r+b)}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s}} \quad (1.13)$$

Por outro lado, consideremos agora o caso em que a absorção na amostra é superficial. Então, podemos representar uma absorção superficial a uma profundidade  $x_0$  por uma função delta "δ" de maneira que

$$f(x_0) = -\frac{I_0 \beta'}{K_s} \delta(x_0) \quad (1.14)$$

onde  $\beta'$  é o coeficiente de absorção superficial da amostra ( $\beta'$  é adimensional).

Neste caso, a temperatura na interface amostra-gás é<sup>(20)</sup>:

$$\theta(0) = \frac{I_0 \beta'}{K_s \sigma_s} \left[ \frac{(b+1)e^{\sigma_s(l_s - x_0)} - (b-1)e^{-\sigma_s(l_s - x_0)}}{(b+1)e^{\sigma_s l_s} + (b-1)e^{-\sigma_s l_s}} \right] \quad (1.15)$$

As eqs.(1.13) e (1.15) nos dão a temperatura na interface amostra-gás no caso de absorção por incidência traseira e absorção superficial respectivamente. Essas são para nós de grande interesse porque na configuração da célula aberta que passaremos a discutir no capítulo seguinte, há uma fonte de geração de calor conforme eq.(1.12) (amostra) e outra conforme eq.(1.14) (membrana do microfone).

## II - Espectroscopia Fotoacústica com a Célula Aberta (OPC)

### II.1 - Introdução

O termo célula fotoacústica aberta (OPC) foi utilizado primeiro<sup>(21)</sup> na designação de uma técnica fototérmica: técnica OPC. Esta técnica detecta a oscilação de temperatura, devido à irradiação periódica de uma amostra, através de medidas da expansão de uma placa sólida e fina (usualmente uma placa de safira) em contato térmico com a amostra. Uma versão modificada para o sensor OPC foi proposta mais tarde<sup>(22)</sup>, consistindo de um disco de safira sobre um cristal piezoelétrico na forma de anel.

Recentemente uma nova versão para a técnica OPC foi proposta, onde a detecção é feita através de um microfone. Esta técnica consiste em utilizar a câmara de ar frontal de um microfone como a câmara fotoacústica da célula convencional. Nesta nova célula (OPC) a amostra é colocada diretamente sobre um microfone circular de eletreto; neste sentido dizemos que é uma célula aberta, pois a amostra é colocada no topo do sistema de detecção como no caso de detecções piezoelétrica e piroelétrica. Daqui para frente somente empregaremos o termo OPC nesta última versão.

Na fig.II.1 representamos esquematicamente, em secção reta, a célula aberta (OPC). O microfone de eletreto<sup>(23,24)</sup> é um cilindro ( $\sim 5mm$  de raio e  $9mm$  de altura) que tem no centro de sua face superior uma abertura circular de  $3mm$  de diâmetro. Sob essa face há uma camada de ar de aproximadamente  $1mm$  de altura e  $8mm$  de diâmetro. Esta é adjacente a um diafragma de eletreto meta-

lizado (tipicamente  $12\mu\text{m}$  de FEP<sup>1</sup> com uma camada de 500 a  $1000\text{\AA}$  de metal depositado). Entre o diafragma (membrana) e a placa metálica de fundo há uma camada de ar de  $45\mu\text{m}$  aproximadamente. A camada metálica da membrana está ligada à placa de fundo através de um resistor. Quando luz modulada incide sobre a amostra, a flutuação periódica da temperatura faz variar a pressão na câmara de ar do microfone (câmara fotoacústica), provocando deflexões da membrana que resultam numa voltagem  $V$  através do resistor  $R$ . Esta voltagem é realimentada em um pré-amplificador FET que existe dentro da cápsula do microfone.

O uso da detecção OPC como uma técnica fotoacústica alternativa difundiu-se rapidamente nos últimos três anos<sup>(25-29)</sup>. Tem sido particularmente muito utilizada na caracterização térmica de amostras. Isto porque ela possui algumas vantagens sobre a detecção fotoacústica convencional: a célula fotoacústica é o próprio microfone de eletreto, o qual é facilmente encontrado e tem baixo custo; o volume da câmara fotoacústica é o mínimo possível uma vez que é a própria câmara do microfone<sup>(30)</sup>. Mas, o nosso interesse pela técnica OPC é principalmente devido ao fato de que com ela é possível realizarmos medidas em plantas "in vivo".

---

<sup>1</sup>Tetrafluoroethylene/Hexafluoropropylene Copolymers

lizado (tipicamente  $12\mu\text{m}$  de FEP<sup>1</sup> com uma camada de 500 a  $1000\text{\AA}$  de metal depositado). Entre o diafragma (membrana) e a placa metálica de fundo há uma camada de ar de  $45\mu\text{m}$  aproximadamente. A camada metálica da membrana está ligada à placa de fundo através de um resistor. Quando luz modulada incide sobre a amostra, a flutuação periódica da temperatura faz variar a pressão na câmara de ar do microfone (câmara fotoacústica), provocando deflexões da membrana que resultam numa voltagem  $V$  através do resistor  $R$ . Esta voltagem é realimentada em um pré-amplificador FET que existe dentro da cápsula do microfone.

O uso da detecção OPC como uma técnica fotoacústica alternativa difundiu-se rapidamente nos últimos três anos<sup>(25-29)</sup>. Tem sido particularmente muito utilizada na caracterização térmica de amostras. Isto porque ela possui algumas vantagens sobre a detecção fotoacústica convencional: a célula fotoacústica é o próprio microfone de eletreto, o qual é facilmente encontrado e tem baixo custo; o volume da câmara fotoacústica é o mínimo possível uma vez que é a própria câmara do microfone<sup>(30)</sup>. Mas, o nosso interesse pela técnica OPC é principalmente devido ao fato de que com ela é possível realizarmos medidas em plantas "in vivo".

---

<sup>1</sup>Tetrafluoroethylene/Hexafluoropropylene Copolymers

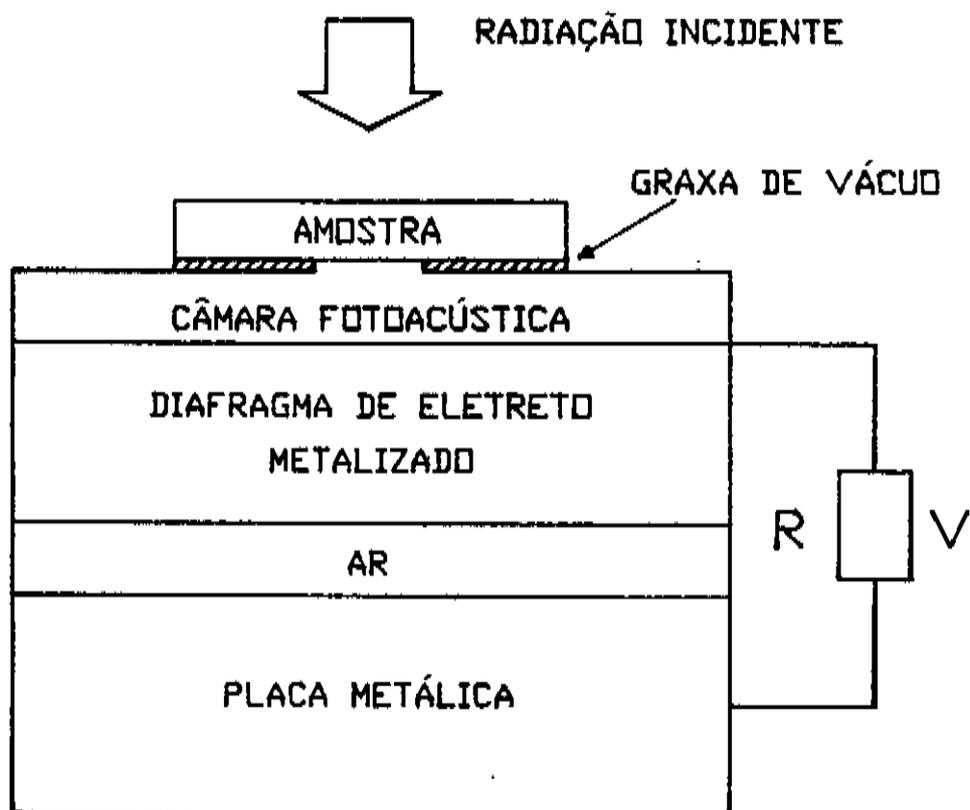


Fig. II.1: Secção reta da célula aberta (microfone de eletreto).

## II.2 - Teoria

Para amostras opticamente opacas, tanto na detecção fotoacústica com a célula aberta como na convencional, só há uma fonte de geração do sinal fotoacústico que é a própria amostra. Já no caso de amostras opticamente transparentes, na detecção com a célula aberta existem duas fontes de geração do sinal fotoacústico, diferentemente da detecção fotoacústica convencional cuja fonte é sempre única, a amostra. Uma delas é devido à absorção da luz modulada pela amostra e a outra é devido à absorção da luz transmitida pela própria membrana do microfone de eletreto. Assim, o aquecimento periódico da amostra e/ou da membrana do microfone fazem variar a pressão na câmara fotoacústica, causando deflexões no diafragma (membrana) e conseqüentemente gerando uma voltagem  $V_{OPC}$  através do resistor  $R$ .

A voltagem de saída do microfone ( $V_{OPC}$ ) relaciona-se com a variação de pressão na câmara fotoacústica ( $\delta P$ ) por<sup>(28,31)</sup>:

$$V_{OPC} = V_0 \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \frac{\delta P}{\gamma P_0} \exp(j\omega t) \quad (II.1)$$

onde:  $\omega = 2\pi f$ ,  $f$  é a frequência de modulação da luz

$C$  é a capacitância do microfone

$P_0$  é a pressão ambiente

$\gamma$  é a razão  $c_p/c_v$  do ar

$V_0$  é uma constante que depende das constantes dielétricas do eletreto ( $\epsilon$ ) e do ar ( $\epsilon_0$ ), da espessura da membrana ( $l_m$ ), da espessura inicial da câmara de ar existente entre a membrana e a placa de fundo ( $l_b$ ) e da densidade superficial de carga do eletreto ( $\sigma_0$ ):  $V_0 = l_b l_m \sigma_0 / (l_b \epsilon + l_m \epsilon_0)$

Segundo o modelo de Rosencwaig e Gersho para a produção do sinal fotoacústico, a flutuação de pressão na câmara fotoacústica ( $\delta P$ ) é somente devida

ao fluxo de calor da amostra e/ou da membrana para o gás. De acordo com este modelo podemos escrever:

$$\delta P = \frac{\gamma P_0}{T_0} \langle T_g \rangle \quad (II.2)$$

onde  $T_0$  é a temperatura ambiente e  $\langle T_g \rangle$  é a média espacial da flutuação de temperatura do ar na câmara fotoacústica.

Substituindo (II.2) em (II.1) chegamos a:

$$V_{OPC} = \frac{V_0}{T_0} \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \langle T_g \rangle \exp(j\omega t) \quad (II.3)$$

Resta agora encontrarmos  $\langle T_g \rangle$ . Consideremos, então, a geometria da OPC representada esquematicamente na fig.II.2 abaixo.

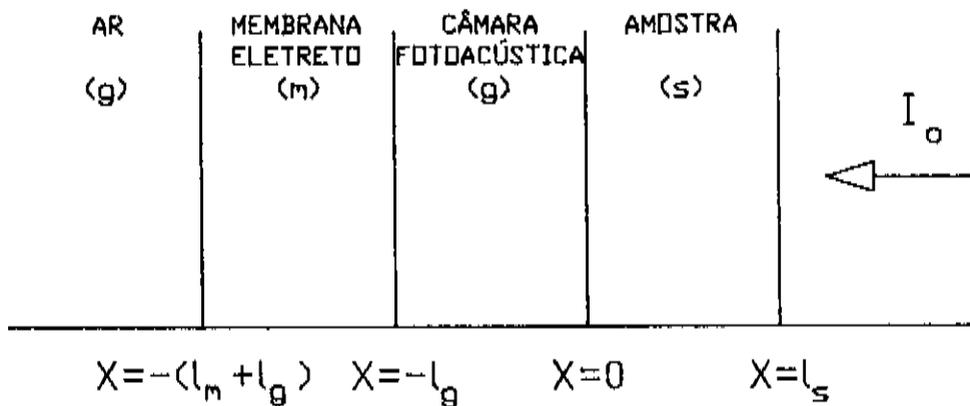


Fig.II.2: Representação esquemática da geometria da OPC.

Considerando que um feixe de luz monocromática, modulado a uma frequência  $\omega = 2\pi f$  incide sobre a amostra com uma intensidade  $I_0 \exp(j\omega t)$  e que esta absorve luz na forma de Lambert-Beer,  $I(x) = I_0 e^{-\beta(l_s-x)}$ , podemos escrever a equação de difusão térmica (componente espacial  $T(x)$ ) para o sistema amostra-câmara fotoacústica-membrana como<sup>(12,28)</sup>:

$$\frac{\partial^2 T_s}{\partial x^2} = \sigma_s^2 T_s - \frac{\beta I_0}{K_s(1+j\omega\tau)} \exp(-\beta(l_s-x)) \quad 0 \leq x \leq l_s \quad (\text{II.4a})$$

$$\frac{\partial^2 T_g}{\partial x^2} = \sigma_g^2 T_g \quad -l_g \leq x \leq 0 \quad (\text{II.4b})$$

$$\frac{\partial^2 T_m}{\partial x^2} = \sigma_m^2 T_m - \frac{\beta' I_0}{K_m} \exp(-\beta l_s) \delta(x+l_g) \quad -(l_m+l_g) \leq x \leq -l_g \quad (\text{II.4c})$$

onde  $\tau$  é o tempo de relaxação não radiativa na amostra e  $\beta'$  é o coeficiente de absorção superficial da membrana (adimensional). Os demais símbolos já foram definidos na pág.9. Os índices  $i = s$ ,  $i = g$  e  $i = m$  referem-se respectivamente à amostra, gás e membrana.

Os segundos termos do lado direito das eqs. (II.4a) e (II.4c) são chamados termos de fonte, pois representam a geração de calor na amostra e membrana respectivamente, conforme eqs. (I.12) e (I.14). Não há fonte de geração de calor no gás, pois no modelo RG considera-se que o gás não absorve a radiação. A fonte de calor na membrana do microfone é considerada como uma fonte superficial, o que é uma boa aproximação para superfícies metálicas.

Resolvendo as eqs.(II.4) e considerando desprezível o fluxo de calor dentro do gás uma vez que sua condutividade térmica é muito menor que a da maioria dos materiais ( $g = b = 0$  no modelo RG), chegamos a:

$$\langle T_g \rangle = \theta_m + \theta_s \quad (\text{II.5})$$

onde

$$\theta_m = \frac{\beta' I_0 e^{-\beta l_s} \cosh(l_m \sigma_m) [\cosh(l_g \sigma_g) - 1]}{l_g \sigma_g K_m \sigma_m \sinh(l_m \sigma_m) \sinh(l_g \sigma_g)} \quad (\text{II.6a})$$

$$\theta_s = \frac{I_0 \tau [\cosh(l_g \sigma_g) - 1] \left\{ 2\tau - e^{-\beta l_s} \left[ (\tau + 1)e^{l_s \sigma_s} + (\tau - 1)e^{-l_s \sigma_s} \right] \right\}}{(1 + j\omega\tau) l_g \sigma_g K_s \sigma_s (\tau^2 - 1) \sinh(l_g \sigma_g) \left[ e^{l_s \sigma_s} - e^{-l_s \sigma_s} \right]} \quad (\text{II.6b})$$

com  $\tau = \beta/\sigma_s$ . As eqs. (II.6a) e (II.6b) representam as contribuições da membrana e da amostra para a flutuação de temperatura na câmara fotoacústica, respectivamente. Usando as eqs.(II.6) e (II.5) em (II.3), a voltagem de saída do microfone pode ser escrita como:

$$V_{OPC} = V_0 \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \frac{\theta_m + \theta_s}{T_0} \exp(j\omega t) \quad (\text{II.7})$$

A expressão (II.7) acima é bastante complicada. Mas, existem alguns importantes casos limites onde ela é simples de se analisar.

### II.2.1 - Incidência Direta sobre a Membrana do Microfone

Se ao invés da amostra, colocarmos uma janela totalmente transparente à radiação incidente ( $\beta=0$ ) para fechar a câmara do microfone de eletreto, só haverá a contribuição da membrana para o sinal fotoacústico. Na prática não existem janelas totalmente transparentes, mas existem janelas com fator de transmissão próximos a 100%, de forma que sua absorção é desprezível. Neste caso, a expressão para a voltagem de saída ( $V_D$ ) é obtida fazendo-se  $\theta_s = 0$  e  $\beta=0$  em (II.7). Assim chegamos a:

$$V_D = \frac{S_0}{1 + j\omega RC} \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} \frac{[\cosh(l_g \sigma_g) - 1]}{\sinh(l_g \sigma_g)} \cdot e^{j\omega t} \quad (\text{II.8})$$

onde

$$S_0 = \frac{\beta' I_0 V_0 RC (\alpha_g \alpha_m)^{1/2}}{T_0 l_g K_m}$$

Vemos na eq.(II.8) que o sinal da OPC, para  $\omega$  fixo, depende da constante RC do microfone, das espessuras da membrana e da câmara fotoacústica.

### II.2.2 - Caso Limite de Interesse: Amostra Opticamente Transparente e Termicamente Grossa

Para amostras transparentes e termicamente grossas ( $l_g \sigma_g \gg 1$ ) podemos escrever:

$$\theta_s = \frac{I_0 e^{-\beta l_s}}{(1 + j\omega\tau) l_g \sigma_g K_s \sigma_s} \frac{r}{(1 - r)} \frac{[\cosh(l_g \sigma_g) - 1]}{\sinh(l_g \sigma_g)} \quad (\text{II.9})$$

A expressão (II.9) foi obtida fazendo-se  $e^{-l_s \sigma_s} = 0$  e  $r^2 = \beta^2 / \sigma_s^2 = 0$  em (II.6b), que são aproximações bastante razoáveis para este caso. Então, usando (II.6a) e (II.9) em (II.7) chegamos a:

$$V_{OPC} = V_0 \chi G \frac{I_0}{T_0 l_g \sigma_g K_s \sigma_s} F_s \exp(j\omega t) \quad (\text{II.10})$$

onde:

$\chi = j\omega RC / (1 + j\omega RC)$  é a função resposta do microfone

$$G = \frac{\cosh(l_g \sigma_g) - 1}{\sinh(l_g \sigma_g)}$$

$$F_s = \left[ \frac{1}{1 + j\omega\tau} \frac{r}{(1 - r)} + \beta' \frac{K_s}{K_m} \left( \frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right)^{1/2} \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} \right] e^{-\beta l_s} \quad (\text{II.11})$$

Segue da eq.(II.11) que no domínio de alta freqüência de modulação onde a amostra é termicamente grossa, a função  $F_s$  torna-se essencialmente dominada pelo segundo termo desta equação. Assim podemos escrever:

$$V_{OPC} \simeq V_0 \chi G \frac{I_0 e^{-\beta l_s}}{T_0 l_g \sigma_g K_s \sigma_s} \frac{\beta' K_s}{K_m} \left[ \frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right]^{1/2} \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} \exp(j\omega t) \quad (\text{II.12})$$

A eq.(II.12) significa que, neste caso, o sinal  $V_{OPC}$  é proporcional à densidade de potência transmitida ( $I_0 e^{-\beta l_s}$ ) e varia com  $f^{-1}$ .

Com relação ao espectro fotoacústico devido apenas à absorção da amostra, este pode ser obtido através de uma normalização apropriada, como segue. Uma outra forma de escrever a eq. (II.8) da seção anterior para o sinal direto é:

$$V_D = V_0 \chi G \frac{I_0}{T_0 l_g \sigma_g K_s \sigma_s} \beta' \frac{K_s}{K_m} \left[ \frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right]^{1/2} \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} \exp(j\omega t) \quad (\text{II.13})$$

Comparando as eqs. (II.12) e (II.13) segue imediatamente que:

$$V_N = \frac{V_D - V_{OPC}}{V_D} = 1 - e^{-\beta l_s} = \alpha \quad (\text{II.14})$$

onde  $V_N$  é igual a absorbância da amostra  $\alpha = 1 - e^{-\beta l_s}$ , que para amostras transparentes se reduz a  $\alpha = \beta l_s$ . Assim, o espectro de absorção da amostra devidamente normalizado é obtido fazendo-se para cada comprimento de onda da radiação incidente ( $\beta = \beta(\lambda)$ ), a diferença entre os sinais direto ( $V_D$ ) e com a amostra ( $V_{OPC}$ ) normalizados em relação a  $V_D$ .

Nosso interesse por esse caso, em particular, é porque as folhas de milho, com as quais realizamos os experimentos que serão descritos nos capítulos seguintes, são opticamente transparentes e termicamente grossas para frequências superiores a  $2Hz$ , ou seja, em todo o intervalo de frequência onde trabalhamos. Pois as espessuras das folhas de milho por nós utilizadas são, em geral, próximas de  $150\mu m$  e sua difusividade térmica próxima de  $0,001cm^2/s$ , então a frequência de corte ( $f_c = \frac{\alpha_t}{\pi l_s^2}$ ) é em torno de  $2Hz$ .

### II.3 - Obtenção de Parâmetros da OPC: Constante RC, Espessuras da Membrana ( $l_m$ ) e da Câmara Fotoacústica ( $l_g$ )

De acordo com os resultados teóricos apresentados na seção II.2.1 para a incidência direta, temos:

$$V_D = S_0 \frac{1}{(1 + j\omega RC)} \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} \frac{[\cosh(l_g \sigma_g) - 1]}{\sinh(l_g \sigma_g)} e^{j\omega t}$$

A eq.(II.8) acima pode ser escrita como:

$$V_D = |V_D| e^{j\theta}$$

onde  $|V_D|$  é a amplitude do sinal e  $\theta$ , a sua fase.

Vamos agora trabalhar com a eq.(II.8) para encontrarmos a expressão para  $|V_D|$  e para  $\theta$ . Assim, podemos reescrever (II.8) como:

$$V_D = \frac{S_0}{[1 + (\omega RC)^2]^{1/2}} \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} \frac{[\cosh(l_g \sigma_g) - 1]}{\sinh(l_g \sigma_g)} e^{j(\omega t - \phi_E)} \quad (\text{II.15})$$

onde  $\phi_E = \arctg(\omega RC)$

Por outro lado temos  $\sigma_i = (1 + j)a_i$ , então:

$$\begin{cases} \cosh(\sigma_i l_i) = \cosh[(1 + j)l_i a_i] = \cosh(l_i a_i) \cos(l_i a_i) + j \sinh(l_i a_i) \sin(l_i a_i) \\ \sinh(\sigma_i l_i) = \sinh[(1 + j)l_i a_i] = \sinh(l_i a_i) \cos(l_i a_i) + j \cosh(l_i a_i) \sin(l_i a_i) \end{cases} \quad (\text{II.16})$$

Escrevemos então:

$$\cosh(\sigma_m l_m) = A + jB$$

$$\sinh(\sigma_m l_m) = C + jD$$

$$\cosh(\sigma_g l_g) = E + jF$$

$$\sinh(\sigma_g l_g) = G + jH$$

onde  $A, B, C, D$  são dados por (II.16) fazendo-se  $i = m$  e  $E, F, G, H$  fazendo-se  $i = g$ .

Substituindo em (II.15) ficamos com:

$$V_D = \frac{S_0}{[1 + (\omega RC)^2]^{1/2}} \left[ \frac{A + jB}{C + jD} \right] \left[ \frac{E + jF - 1}{G + jH} \right] e^{j(\omega t - \Phi_E)}$$

$$V_D = \frac{S_0}{[1 + (\omega RC)^2]^{1/2}} \left[ \frac{(A + jB)(C - jD)}{C^2 + D^2} \right] \left[ \frac{(E + jF - 1)(G - jH)}{G^2 + H^2} \right] e^{j(\omega t - \Phi_E)}$$

$$V_D = \frac{S_0}{[1 + (\omega RC)^2]^{1/2}} \left[ \frac{(AC + BD) + j(BC - AD)}{C^2 + D^2} \right] \left[ \frac{(EG + FH - G) + j(FG - HE + H)}{G^2 + H^2} \right] e^{j(\omega t - \Phi_E)}$$

$$V_D = \frac{S_0}{[1 + (\omega RC)^2]^{1/2}} \left[ \frac{[(AC + BD)^2 + (BC - AD)^2]^{1/2}}{C^2 + D^2} \right] \left[ \frac{[(EG + FH - G)^2 + (FG - HE + H)^2]^{1/2}}{G^2 + H^2} \right] e^{j(\omega t - \Phi_E + \Phi_T + \Phi_G)}$$

onde:

$$\Phi_T = \arctg \left[ \frac{BC - AD}{AC + BD} \right] \quad e \quad \Phi_G = \arctg \left[ \frac{FG - HE + H}{EG + FH - G} \right]$$

Portanto, a amplitude e fase do sinal fotoacústico são dados por:

$$|V_D| = \frac{S_0}{[1 + (\omega RC)^2]^{1/2}} \left[ \frac{[(AC + BD)^2 + (BC - AD)^2]^{1/2}}{C^2 + D^2} \right] \left[ \frac{[(EG + FH - G)^2 + (FG - HE + H)^2]^{1/2}}{G^2 + H^2} \right] \quad (II.17)$$

$$\theta = \omega t - \Phi_E + \Phi_T + \Phi_G \quad (\text{II.18})$$

Uma vez conhecidas as expressões para a amplitude e fase do sinal direto, eqs. II.17 e II.18 respectivamente, fizemos um experimento que consistiu na dependência do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz, quando esta incidia diretamente sobre a membrana do microfone. Utilizamos um laser de He-Ne de  $2,6mW$  como fonte de luz, modulada por um modulador HMS. Uma janela de vidro *Bk - 7* de  $300\mu m$  de espessura foi colocada sobre o microfone de eletreto de forma a fechar a câmara de ar. Utilizamos a janela de *Bk - 7* porque esta tem um fator de transmissão de 92% no comprimento de onda do laser  $\lambda = 632,8nm$  (ver fig.II.6). A fixação da janela de vidro sobre o microfone foi feita utilizando graxa de vácuo. A amplitude e fase do sinal fotoacústico em diferentes frequências foram obtidas através da leitura direta em um amplificador "lock-in". Na fig.II.3 está esquematizada a montagem experimental utilizada neste experimento.

Os dados experimentais obtidos para a amplitude e fase do sinal fotoacústico foram ajustados com as expressões teóricas adequadas, ou seja, eqs.(II.17) e (II.18) respectivamente. Esses ajustes foram feitos com 4 parâmetros livres, a saber:

$$A(1) = l_m \left( \frac{\pi}{\alpha_m} \right)^{1/2}$$

$$A(2) = l_g \left( \frac{\pi}{\alpha_g} \right)^{1/2}$$

$$A(3) = RC$$

$$A(4) = S_0(\theta_0) \text{ no caso da amplitude (fase) do sinal}$$

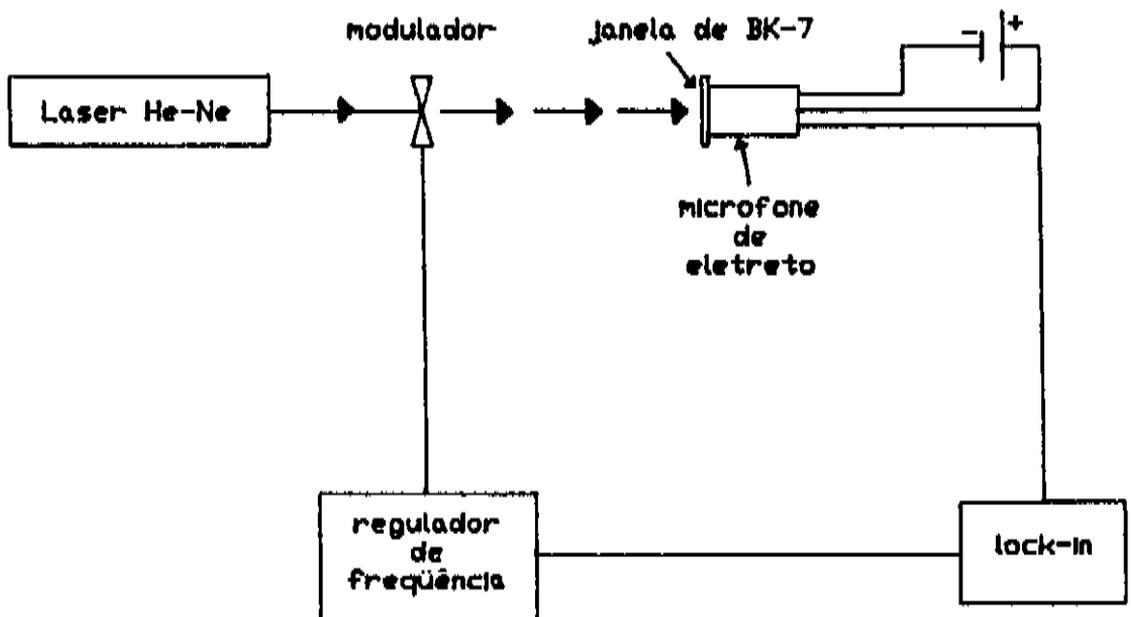


Fig. II.3: Incidência direta sobre a membrana do microfone

Na fig. II.4 mostramos a dependência da fase do sinal fotoacústico com a frequência de modulação, onde a linha sólida representa o melhor ajuste de dados experimentais à expressão teórica eq.(II.18). O desvio quadrático médio dos pontos experimentais em relação à curva teórica foi de 0,6 graus e os valores obtidos para os 4 parâmetros são os seguintes:

$$A(1) = 0,088s^{1/2}$$

$$A(2) = 0,40s^{1/2}$$

$$A(3) = 0,0053s$$

$$A(4) = 291\text{graus}$$

A partir dos valores de  $A(1)$  e  $A(2)$ , juntamente com os valores dados pela literatura para as difusividades térmicas do ar ( $\alpha_g = 0,19\text{cm}^2/\text{s}$ ), e da membrana ( $\alpha_m = 0,0010\text{cm}^2/\text{s}$ )<sup>(32)</sup>, podemos encontrar a espessura da membrana ( $l_m$ ) e a espessura da coluna de gás ( $l_g$ ) correspondente à câmara fotoacústica usando as definições de  $A(1)$  e  $A(2)$ . Assim:

$$l_m = A(1) \left( \frac{\alpha_m}{\pi} \right)^{1/2} \implies l_m \simeq 16\mu\text{m}$$

$$l_g = A(2) \left( \frac{\alpha_g}{\pi} \right)^{1/2} \implies l_g \simeq 0.98\text{mm}$$

Esses valores estão muito próximos das especificações do microfone de eletreto, a saber,  $l_m = 12\mu\text{m}$  e  $l_g = 1\text{mm}$ . O parâmetro  $A(3)$  nos dá diretamente o valor da constante  $RC$  para o qual obtivemos neste ajuste  $5,3\text{ms}$ .

O melhor ajuste dos dados experimentais à expressão teórica eq.(II.17) é mostrado na fig.II.5, onde podemos ver a dependência da amplitude do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz. O erro neste ajuste foi de 1,36% e os valores para os quatro parâmetros ajustados são:

$$A(1) = 0,085\text{s}^{1/2}$$

$$A(2) = 0,47\text{s}^{1/2}$$

$$A(3) = 0,0075\text{s}$$

$$A(4) = 705\mu\text{V}$$

Analogamente ao que fizemos anteriormente, usando as definições de  $A(1)$  e  $A(2)$  encontramos:

$$l_m \simeq 16\mu\text{m}$$

$$l_g \simeq 1,1\text{mm}$$

Estes resultados também estão muito próximos das especificações típicas do microfone de eletreto e concordam com os resultados obtidos antes a partir do ajuste da fase do sinal. Então, no microfone por nós utilizado  $l_m \simeq 16\mu m$  e  $l_g \simeq 1mm$ .

Nas figs. II.4 e II.5 vemos que há uma excelente concordância entre a curva teórica e os dados experimentais, o que indica que o modelo teórico de difusão térmica proposto no cap.II descreve bem o sinal OPC quando a incidência é direta.

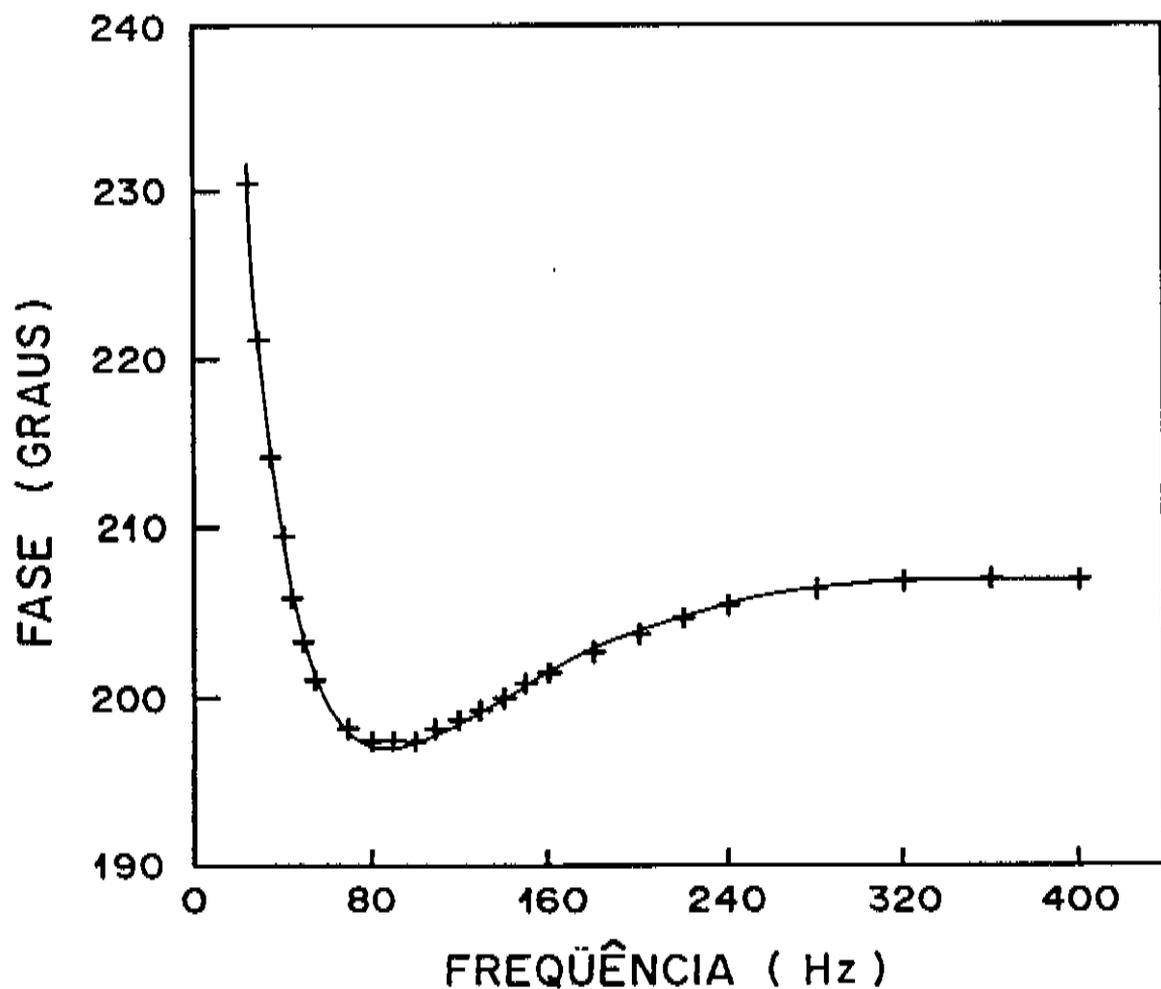


Fig.II.4: Dependência da fase do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz quando esta incide diretamente sobre a membrana do microfone

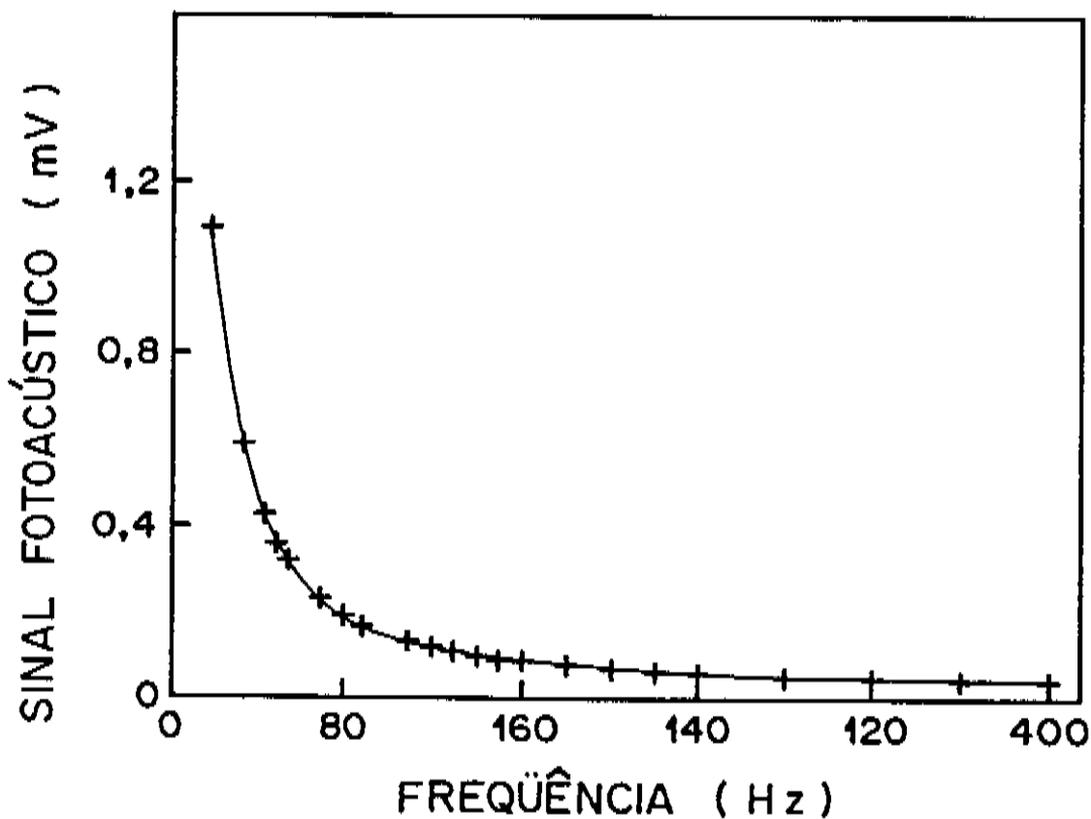


Fig.II.5: Dependência da amplitude do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz

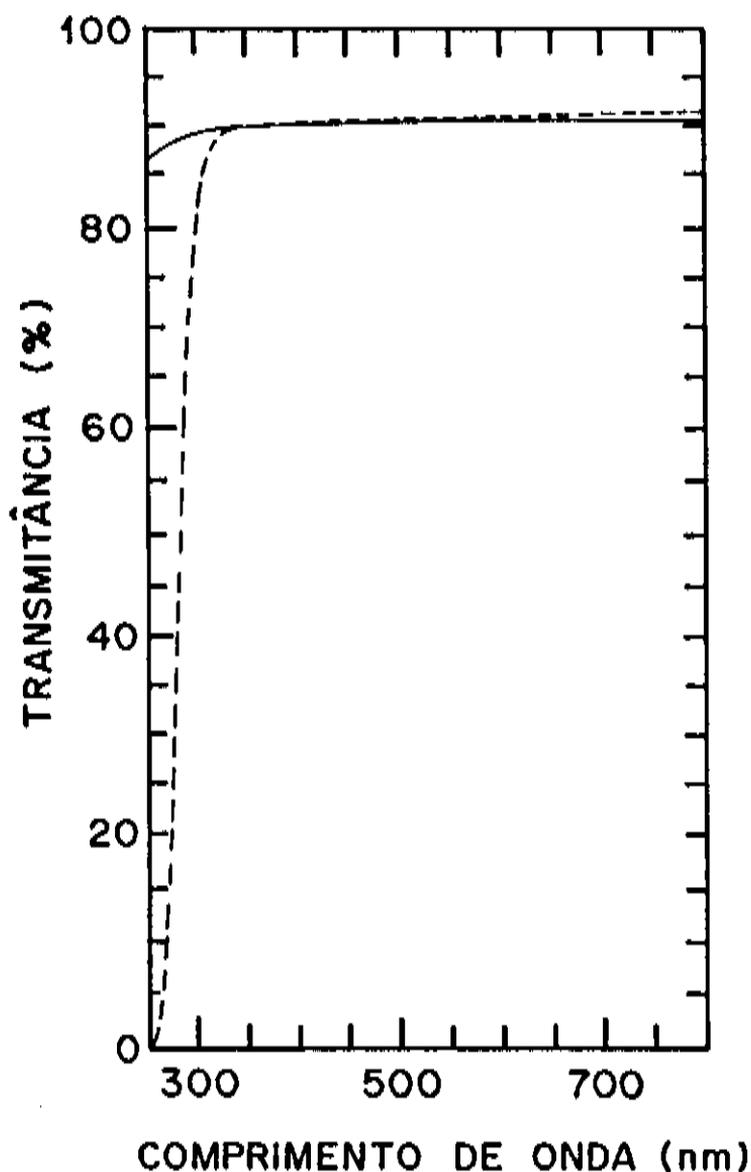


Fig.II.6: Transmitância da janela de *Bk-7* ( $300\mu m$  de espessura) utilizada em nossos experimentos (linha pontilhada). A linha cheia corresponde à transmitância de uma janela de Quartzo de  $500\mu m$  de espessura. Espectrômetro utilizado: PERKIN-ELMER, LAMBDA 9.

### III - Contribuição do Processo de Fotossíntese para o Sinal Fotoacústico no Estudo de Plantas

Todos sabemos que as plantas utilizam a energia radiante para realizar fotossíntese. Na presença da luz do sol elas sintetizam compostos orgânicos tais como açúcares, proteínas e etc, a partir de compostos inorgânicos como água, dióxido de carbono, sais minerais e etc ( $n CO_2 + n H_2O \xrightarrow{h\nu} C_n H_{2n} O_n + n O_2$ : reação geral da fotossíntese). Então, uma parte da energia absorvida pela planta é convertida fotoquimicamente em energia armazenada na forma de compostos orgânicos. O restante da energia absorvida é convertida em calor ou é emitida radiativamente (fluorescência).

Medidas fotoacústicas em folhas nos fornecem informações quantitativas sobre dois aspectos do processo fotossintético, a saber, a energia fotoquímica armazenada e a evolução do  $O_2$ .

Antes de tratarmos esses dois aspectos, é interessante conhecermos um pouco sobre a morfologia das folhas e seus pigmentos.

#### III.1 - Morfologia da Folha

A folha de uma planta é o órgão responsável pela sua principal função – a fotossíntese. Todas as outras funções dependem dela ou contribuem para ela. No interior das folhas encontram-se os cloroplastos onde estão localizados os pigmentos como a clorofila e onde se dá a fotossíntese.

A morfologia das folhas varia de acordo com os diferentes grupos de vegetais superiores, mas a maioria delas apresenta uma estrutura constituída basicamente por 3 camadas:

- 1ª – epiderme superior
- 2ª – mesófilo + sistema vascular
- 3ª – epiderme inferior

Dá-se o nome de mesófilo ao conjunto formado pelo parênquima paliçádico e parênquima esponjoso.

A fig. III.1 mostra a estrutura de uma folha de maçã e a configuração das células nos vários tecidos.

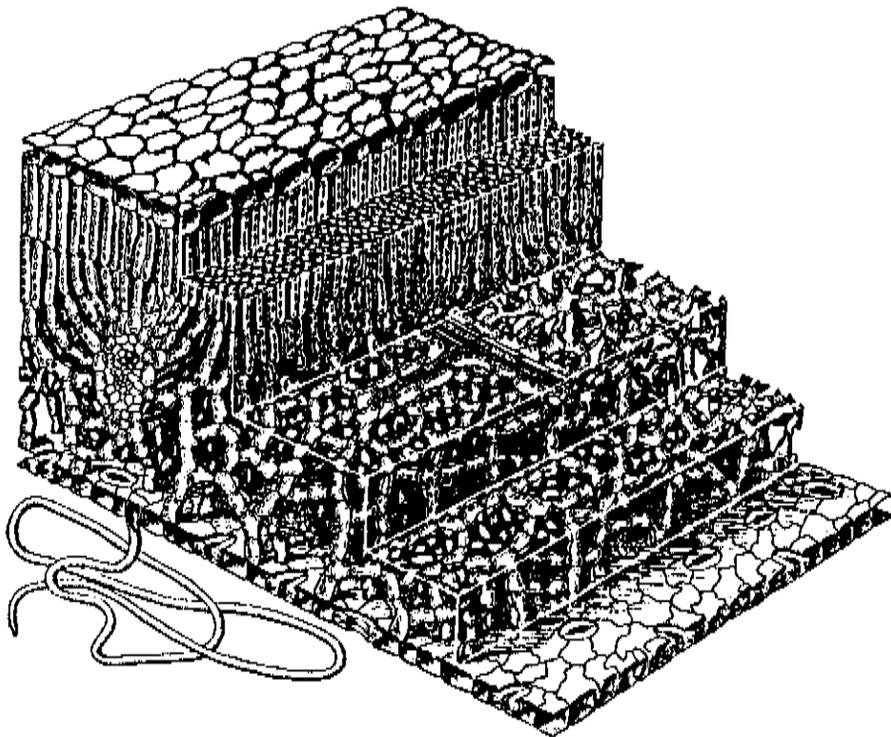


Fig.III.1: Estrutura de uma folha de maçã. Extraída do livro "An Introduction to Plant Anatomy"<sup>(34)</sup>.

No mesófilo encontramos espaços intercelulares com ar saturado de umidade que servem para o intercâmbio gasoso de  $H_2O$ ,  $CO_2$  e  $O_2$ . Encontramos também os cloroplastos que aparecem dispostos ao longo das membranas das células. Estas são, por isso, chamadas de células fotossinteticamente ativas.

Os cloroplastos são organelas com  $5\mu m$  a  $8\mu m$  de diâmetro e cerca de  $1\mu m$  de espessura que possuem no seu interior estruturas menores chamadas grana onde encontram-se as clorofilas. Estão distribuídos, em geral, de forma irregular nas células do mesófilo, sendo mais abundantes no lado superior da folha, ou seja, nas células paliçádicas. Isto explica o fato de que muitas folhas são mais escuras na superfície superior do que na inferior. Os cloroplastos são encontrados também nas células guarda que aparecem com pequena abundância na epiderme.

O sistema vascular (xilema e floema) aparece no mesmo nível do mesófilo, sendo constituído pelas veias ou nervuras da folha. Tem a função de transportar a seiva para todas as partes da folha e retirar para fora dela os produtos lá sintetizados a fim de nutrir o restante da planta.

As epidermes superior e inferior são revestidas por uma fina camada de cêra chamada cutícula. Nelas encontramos alguns poros, estômatos, por onde a folha troca  $O_2$  e  $CO_2$ . O mecanismo de abrir e fechar os estômatos é controlado pelas células guarda adjacentes. A distribuição dos estômatos nas folhas varia de um grupo de vegetais para outro. Existem folhas (a maioria delas) em que a quantidade de estômatos é muito maior na epiderme inferior e outras em que os estômatos estão igualmente distribuídos nas epidermes superior e inferior.

A cutícula ( $3 - 5\mu m$  de espessura em geral) é um revestimento que protege a folha do ultravioleta emitido pelo sol, uma vez que seus constituintes são excelentes absorvedores do UV. Além disso, a cutícula evita a perda de água excessiva pela planta e a protege de agentes externos como fungos, por exemplo.

No presente trabalho, estamos particularmente interessados em folhas de

milho. Por isso, mostramos na fig.III.2 sua estrutura. Notamos que tais folhas não apresentam o parênquima palicádico; o mesófilo é constituído apenas pelo parênquima esponjoso.

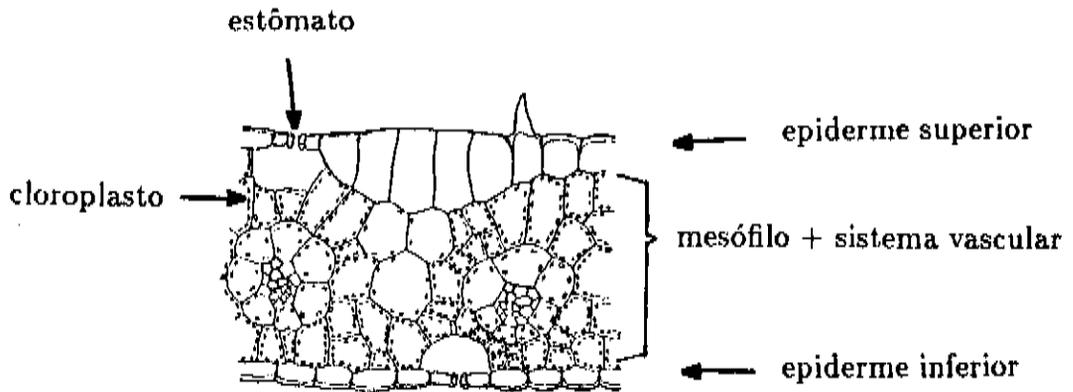


Fig.III.2: Estrutura de uma folha de milho (*Zea mays*), em secção reta. Observa-se que não há diferenciação no mesófilo.

### III.2 - Pigmentos

Os pigmentos geralmente encontrados nos cloroplastos são: clorofilas (65%), carotenos (6%) e xantofilas (29%), embora a distribuição percentual seja altamente variável<sup>(35)</sup>.

Existem cerca de dez tipos de clorofilas identificados, cada uma com um espectro de absorção característico, mas os dois tipos mais importantes são a clorofila-a e a clorofila-b. A clorofila-a é encontrada em todas as plantas fotos-sintetizantes, enquanto que a clorofila-b é encontrada na maioria delas, mas não em todas. Com relação ao grupo dos carotenóides (carotenos + xantofilas), os pigmentos mais importantes são o  $\beta$ -caroteno e a luteína (um tipo de xantofila).

Na fig.III.3 mostramos os espectros de absorção óptica e os correspondentes

fotoacústicos para os principais pigmentos da folha; onde vemos que as clorofilas além de absorverem na região do azul como os carotenóides, absorvem também na região do vermelho. Na tab.III.1 indicamos a posição dos picos de absorção tanto nos espectros de absorção óptica como nos fotoacústicos. Os espectros apresentados na fig.III.3 foram extraídos do trabalho "Identification of Chlorophylls and Carotenoids by Photoacoustic Spectroscopy"<sup>(36)</sup>, onde os pigmentos foram isolados através da técnica de cromatografia (CP). Esta figura indica uma boa concordância entre os espectros de absorção óptica e os fotoacústicos para cada pigmento.

Pigmentos	Picos de absorção fotoacústicos (nm)	Picos de absorção óptica (nm)
clorofila-a	428, 666	428, 660
clorofila-b	469, 653	455, 644
$\beta$ -caroteno	442, 469, 493	427, 449, 475
luteína	432, 451, 471	422, 444, 475

Tab.III.1: Posição dos picos de absorção nos espectros da fig.III.3.

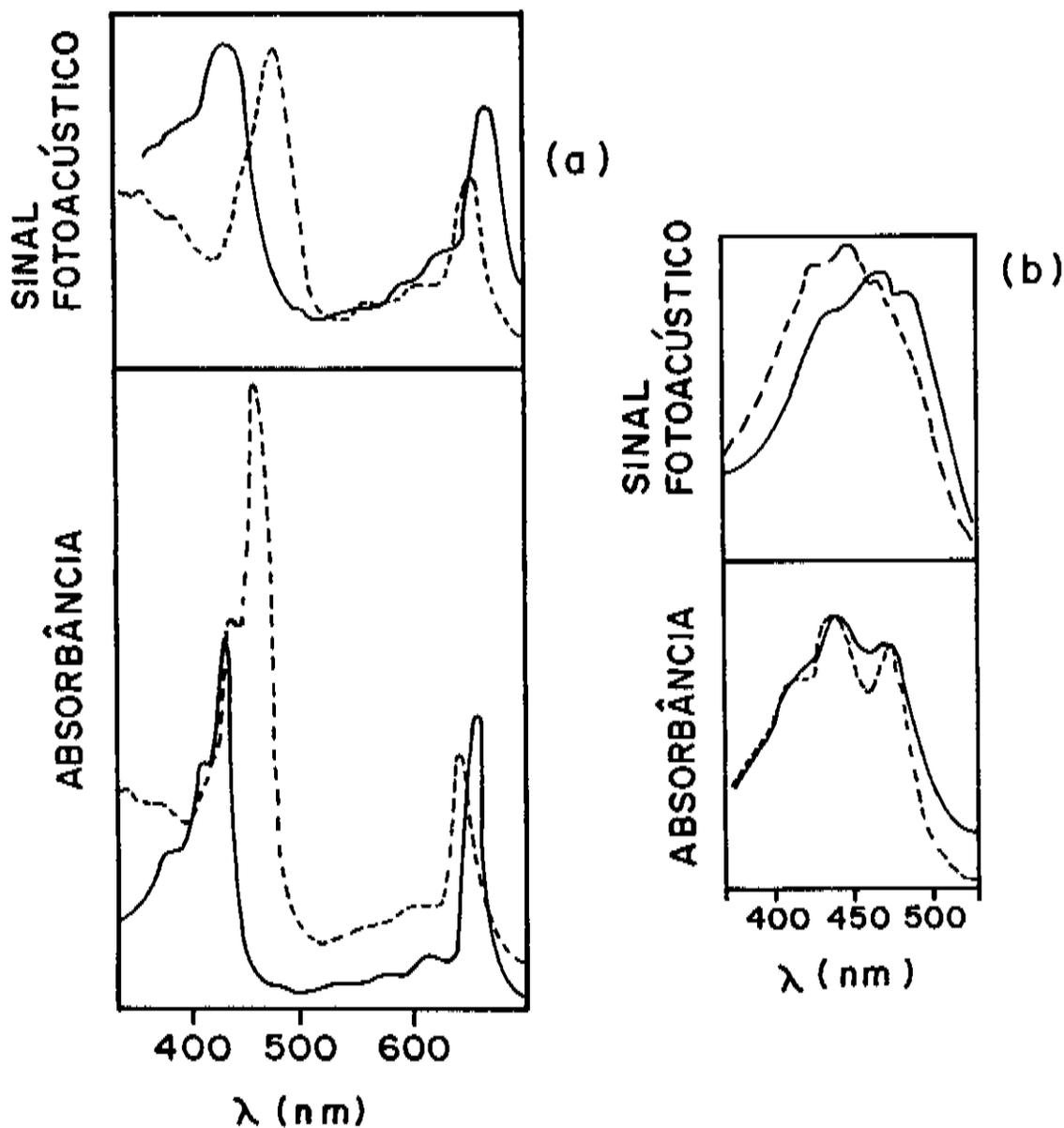


Fig. III.3: a) Espectros fotoacústicos (em cima) e de absorção óptica para as clorofilas-a (linha cheia) e b (linha pontilhada).

b) Espectros fotoacústicos e de absorção óptica para o  $\beta$ -caroteno (linha cheia) e para a luteína (linha pontilhada).

### III.3 - Efeitos Positivo (+) e Negativo (-)

Quando a amostra a ser analisada é uma folha de vegetal, o sinal fotoacústico não representa bem a absorção óptica, pois dois eventos envolvidos na fotossíntese contribuem para o sinal, a saber: a evolução modulada do  $O_2$  e a perda fotoquímica.

1. a evolução modulada do  $O_2$  contribui para aumentar o sinal fotoacústico, pois a planta libera  $O_2$  na mesma frequência de modulação da luz incidente gerando ondas acústicas no ar próximo à superfície das células.
2. a perda fotoquímica (parte da energia absorvida que é gasta nas reações químicas) contribui para diminuir o sinal fotoacústico, pois este é gerado apenas pela luz absorvida que é convertida em calor e, neste caso, uma parte dela transforma-se em energia química.

As duas contribuições acima podem ser eliminadas simultaneamente utilizando-se uma luz branca de fundo, não modulada e bastante intensa, juntamente com a luz modulada<sup>(37-39)</sup>. Essa luz de fundo não interfere no sinal fotoacústico, uma vez que não é modulada. Tem a função de simular o sol e deve ser intensa o suficiente para saturar a atividade fotossintética da planta. Assim, o oxigênio é liberado continuamente pela planta e a primeira contribuição deixa de existir. Também a perda fotoquímica (2ª contribuição) é eliminada, pois a saturação causada pela luz de fundo implica em que toda a energia gasta nas reações químicas seja por ela fornecida, resultando na conversão máxima da luz modulada absorvida em calor.

A 1ª contribuição não aparece quando é usada alta frequência de modulação da luz (superior a  $200\text{Hz}$ ). Esta é uma evidência experimental<sup>(39)</sup> que pode ser

explicada com base na existência de um intervalo de tempo desde a excitação até a formação de  $O_2$  e de um tempo de difusão do  $O_2$  a partir dos cloroplastos, onde é produzido, até a superfície. Para altas frequências de modulação da luz, esse tempo é relativamente longo, de forma que o  $O_2$  deixa de ser modulado e apenas a perda fotoquímica interfere no sinal fotoacústico.

A perda fotoquímica pode ser detectada através de medidas sucessivas do sinal fotoacústico, com frequência de modulação superior a  $200Hz$  (para eliminar a evolução do  $O_2$ ), ora com a luz modulada apenas, ora com a luz modulada mais a luz branca de fundo. Neste caso o sinal é maior com a presença da luz branca de fundo do que sem ela. Isto porque, como já dissemos, quando só há luz modulada parte da energia absorvida é gasta na realização da fotossíntese, não sendo convertida em calor. Ao ser incluída a luz branca de fundo, a intensidade do sinal aumenta e esse efeito é chamado Efeito Positivo (+).

A evolução do  $O_2$  pode ser detectada de maneira análoga, só que no limite de baixas frequências (aproximadamente  $20Hz$ ). Neste caso a intensidade do sinal diminui na presença da luz de fundo, sendo este o Efeito Negativo (-). A diminuição no sinal significa que a contribuição da evolução do  $O_2$ , neste caso, é mais significativa que a contribuição da perda fotoquímica.

Em medidas do sinal fotoacústico em folhas vegetais destacamos a ocorrência de transientes típicos durante os primeiros minutos de iluminação, até que o estado estacionário seja atingido. Estes transientes ocorrem devido à existência de um aumento da atividade fotoquímica neste período (período de adaptação da planta à luz) e também devido ao fato de que a evolução do oxigênio modulado não começa imediatamente após a excitação<sup>(39)</sup>. Na fig.III.4 ilustramos pictoricamente os efeitos positivo (parte a) e negativo (parte b) no estado estacionário.

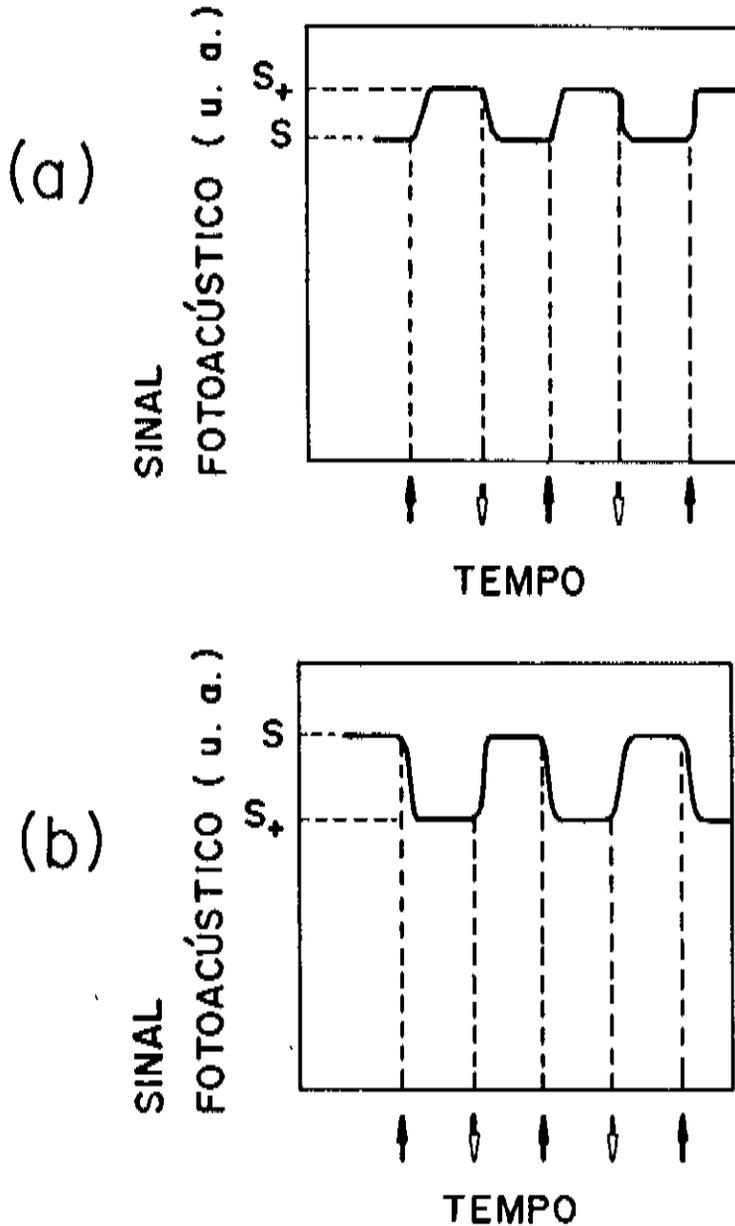


Fig.III.4: Processos envolvidos na fotossíntese: efeitos positivo (a) e negativo (b).

$S \rightarrow$  Sinal fotoacústico só com o laser

$S+ \rightarrow$  Sinal fotoacústico com o laser + luz branca

$\uparrow$  e  $\downarrow$  indicam respectivamente os instantes em que a luz branca incide na amostra e deixa de incidir.

Resumindo, o vetor sinal fotoacústico total tem um componente fotobárico (evolução modulada do  $O_2$ ), além do componente fototérmico. O componente fototérmico resulta da conversão parcial ou total da luz modulada absorvida em calor (inclui-se aqui o efeito de perda fotoquímica).

Devido às origens físicas desses dois componentes serem diferentes, a eliminação de um deles pode mudar a fase do sinal fotoacústico<sup>(38)</sup>. Quando apenas o componente fototérmico está presente, não há mudança no ângulo de fase do vetor sinal quando a luz branca de fundo é aplicada eliminando a perda fotoquímica. Este é o caso de medidas do sinal em altas frequências. Para frequências mais baixas, entretanto, uma considerável mudança na fase pode acompanhar a mudança de amplitude do sinal com a aplicação da luz branca de fundo, ou melhor, a eliminação do componente fotobárico pode resultar em mudanças significativas na fase do sinal, dependendo do ângulo formado por este componente e o componente fototérmico.

### **III.4 - Observação dos Efeitos (+) e (-) em Folhas de Milho**

#### **III.4.1 - Procedimento Experimental**

Observamos os efeitos (+) e (-) em folhas de milho, através de medidas do sinal fotoacústico em altas e baixas frequências de modulação da luz respectivamente. Realizamos medidas sucessivas do sinal ora com apenas a luz modulada incidindo na amostra, ora com a luz modulada mais a luz branca de fundo não modulada incidindo simultaneamente sobre a amostra, conforme o procedimento indicado na seção III.3 para a detecção desses efeitos.

Como fonte de luz modulada e não modulada utilizamos respectivamente

um laser de He-Ne de  $3mW$  e uma lâmpada halógena de  $250W$ , cuja luz ao chegar na amostra tinha uma intensidade de aproximadamente  $100mW/cm^2$ . Isto significa que a luz branca foi suficientemente intensa para saturar a atividade fotossintética<sup>(39)</sup>.

Na fig.III.5 mostramos esquematicamente a montagem experimental por nós utilizada na observação desses efeitos e na fig.III.6 mostramos a célula fotoacústica em maiores detalhes.

As lentes que aparecem na fig.III.5 foram usadas uma para convergir a luz branca e outra para expandir o feixe laser. O filtro IV foi usado para proteger a amostra (folha de milho) da radiação infravermelha produzida pela luz branca. O diafragma foi utilizado com a finalidade de permitir ou impedir que a luz branca chegasse na amostra.

As amostras, colocadas diretamente sobre o microfone de eletreto com o auxílio da graxa de vácuo, tinham um diâmetro aproximadamente igual ao do microfone,  $9mm$ .

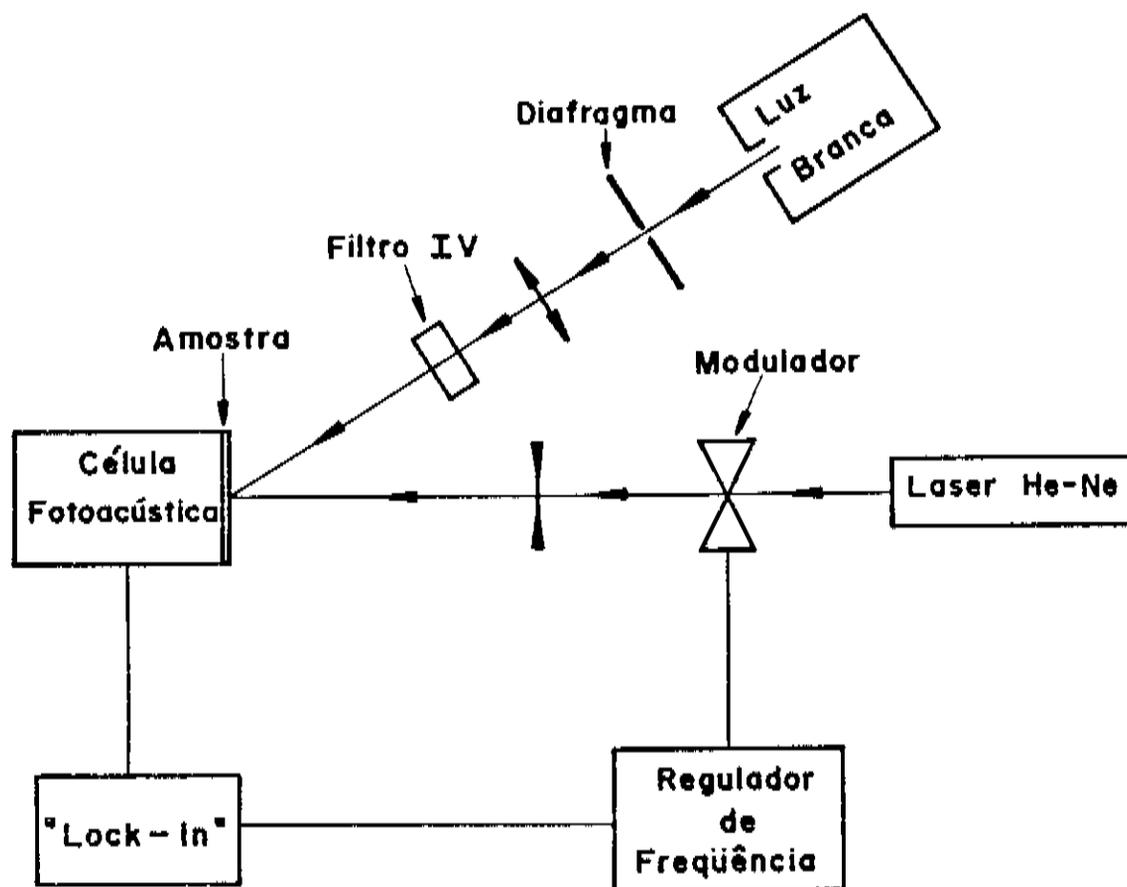


Fig.III.5: Montagem experimental utilizada para detectar os efeitos positivo e negativo.

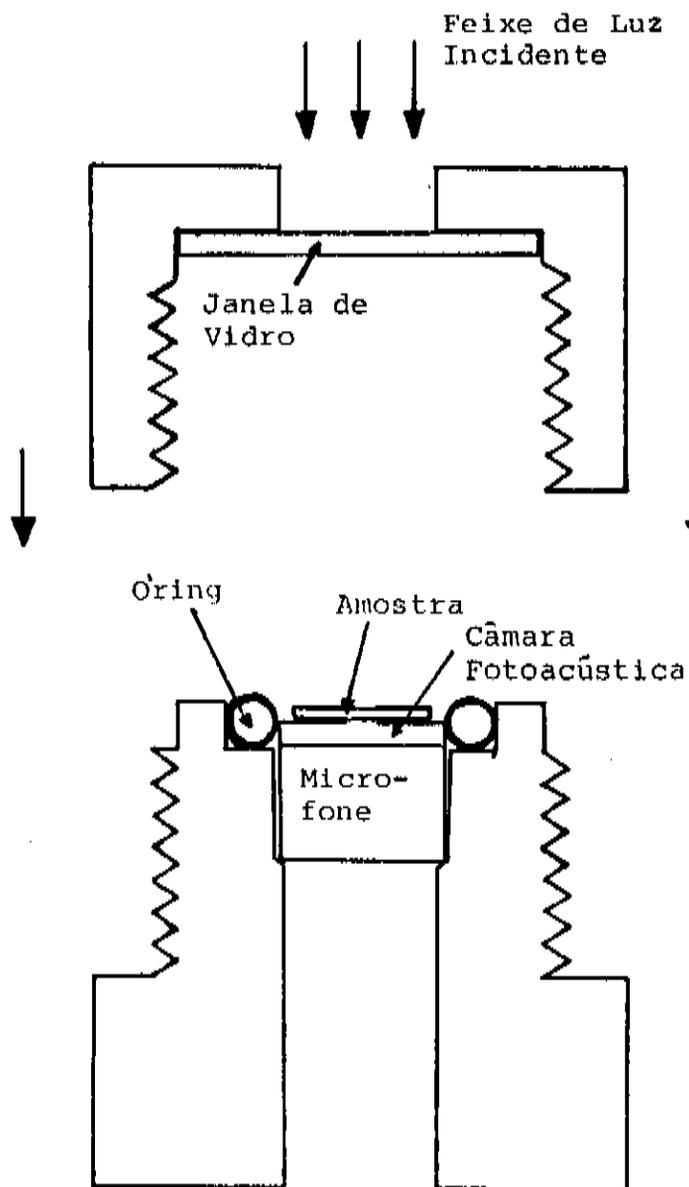


Fig.III.6: Célula Fotoacústica.

### III.4.2 - Resultados Experimentais

Na tab.III.2 abaixo mostramos alguns resultados obtidos para a intensidade do sinal fotoacústico em folhas de milho e os efeitos (+) e (-). As amostras utilizadas pertencem a duas linhagens diferentes de milho, a saber, L1037 (amostras A1 e A3) e L922 (amostras A2). O tempo indicado na tabela refere-se ao intervalo desde a colocação da amostra na célula até a medida. Neste intervalo de tempo a amostra permaneceu iluminada pelo laser.

$f(H_z)$	Amostra	Tempo (min)	$S(\mu V)$	$S_+(\mu V)$	$(S_+ - S)/S_+$
29	A1	10	87	78	-0,12
		20	94	78	-0,21
		30	97	80	-0,21
29	A2	10	138	115	-0,20
		20	140	115	-0,22
		30	140	117	-0,20
31	A3	10	120	101	-0,19
		20	122	102	-0,20
		30	122	102	-0,20
290	A1	30	4,7	4,9	+0,041
		40	4,7	5,1	+0,078
		50	4,8	5,2	+0,077
290	A2	30	4,1	4,4	+0,068
		40	4,2	4,5	+0,067
		50	4,3	4,6	+0,065
310	A3	40	4,2	4,6	+0,087
		50	4,3	4,6	+0,065

Tab.III.2: Efeitos (+) e (-) em folhas de milho

$S$  - sinal fotoacústico só com o laser

$S_+$  - sinal fotoacústico com laser + luz branca

### III.4.3 - Discussão dos Resultados

Antes de discutirmos os resultados da tab.III.2, é importante termos em mente que a observação dos efeitos (+) e (-) com a célula fotoacústica convencional (fig.I.1) tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores<sup>(37-39)</sup>. Verificamos que tais efeitos são bastante significativos quando utilizamos a célula convencional; por isso, nas medidas realizadas com esta célula (Apêndice I), fêz-se necessária a utilização de uma luz branca de fundo não modulada para eliminarmos esses efeitos. A observação desses efeitos através do uso da OPC constitui uma novidade que passamos a discutir.

Inicialmente, antes de realizarmos as medidas da tab.III.2, tentamos observar os efeitos (+) e (-) em folhas de milho "in vivo", ou seja, com a célula aberta (sem a janela de vidro na fig.III.6). Mas, neste caso, não observamos diferenças significativas entre os sinais com e sem luz branca de fundo. Decidimos então, fechar a célula OPC com a janela para melhorarmos a vedação, pois em altas frequências o sinal é muito baixo e o ruído poderia estar mascarando o efeito da perda fotoquímica. Com esta nova configuração foi possível observarmos ambos os efeitos. Vemos na tab.III.2 que a contribuição da evolução modulada do  $O_2$  para o sinal fotoacústico é superior a 20%, enquanto que o efeito da perda fotoquímica representa cerca de 7% do sinal.

O efeito da evolução modulada do  $O_2$  é bastante significativo. Então, como explicar o fato de não o termos observado com a célula aberta? Uma possível explicação é supormos que, neste caso, todo (ou quase todo)  $O_2$  produzido seja liberado através da epiderme superior, ou seja, para o ambiente, uma vez que a folha de milho é porosa (ver fig.III.2). Por outro lado, quando fechamos a célula OPC com uma janela de vidro (fig.III.6), o  $O_2$  modulado é forçado a ser liberado pela epiderme inferior, ou seja, para dentro da câmara fotoacústica, causando

assim um sinal acústico.

Assim, tendo em vista que a evolução modulada do  $O_2$  é desprezível com a célula aberta e que o efeito da perda fotoquímica, para o milho, representa uma pequena contribuição de fundo que não interfere na análise de nossos resultados, não utilizamos nos experimentos descritos nos capítulos seguintes (experimentos "in vivo") a luz branca de fundo não modulada.

## IV - Medidas Fotoacústicas em Folha de Milho com a OPC

Neste capítulo trataremos de 2 experimentos, “in vivo”, feitos com uma folha de milho de aproximadamente 45 dias. O primeiro deles consiste na obtenção do espectro de absorção da folha e o outro consiste na obtenção de parâmetros ópticos e térmicos, bem como do tempo de relaxação não radiativa da amostra, a partir da dependência do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz. A expressão teórica para o sinal  $V_{OPC}$ , neste caso, e a normalização adequada para se obter o espectro de absorção, correspondem, respectivamente, às eqs.(II.10) e (II.14) que foram apresentadas no capítulo II, pois a folha de milho é transparente e termicamente grossa para todo o intervalo de frequência onde trabalhamos ( $f_c \cong 2Hz$ ).

### IV.1 - 1º Experimento: Obtenção do Espectro de Absorção Fotoacústico de uma Folha de Milho

O espectro de absorção fotoacústico da folha de milho foi obtido utilizando o espectrômetro fotoacústico construído em nosso laboratório (fig.IV.1). Este é constituído basicamente por uma lâmpada de arco de Xenônio de 1000 *Watts* da Oriel, um modulador de luz da PAR, um monocromador modelo Ebert da Jarrel - Ash (10nm de resolução da luz monocromática), dois amplificadores “lock-in” da PAR sintonizados (um em fase e outro em quadratura), uma célula fotoacústica, um registrador XY e um microcomputador. Este, através de uma interface, possibilita o armazenamento e processamento de dados. A célula fotoacústica utilizada foi a OPC, com o microfone polarizado em 2,7V (2 pilhas de 1,5V cada). Os detalhes desta célula são mostrados na fig.IV.2.

A luz branca gerada pela lâmpada de Xe passa pelo modulador e em seguida entra no monocromador onde é difratada por uma grade de difração, de forma que um certo comprimento de onda ( $\lambda$ ) é selecionado. Como essa grade gira, os diversos comprimentos de onda vão sendo selecionados, desde o ultravioleta até o infravermelho próximo. Para comprimentos de onda superiores a  $580nm$  usamos um filtro na saída do monocromador para cortar os picos de 2ª ordem de difração. O feixe de luz monocromática ao sair do monocromador é refletido por um espelho, passa depois por uma lente convergente de forma a chegar na amostra perpendicularmente a ela. O sinal do microfone é levado aos amplificadores sintonizados, de onde vai para a interface, sendo então armazenado num microcomputador. A fase do sinal fotoacústico é estabelecida em relação a um sinal de referência da modulação, originado por uma fotocélula no modulador e transmitido aos amplificadores.

A amostra foi fixada sobre o microfone de eletreto com graxa de vácuo e pressionada contra ele por uma lâmina de acrílico vazada por um orifício de aproximadamente  $5mm$  de diâmetro, ou seja, maior que o diâmetro do orifício do microfone, de forma que a luz chega diretamente na amostra (conforme fig. IV.2). O feixe de luz atinge a amostra na posição que corresponde ao centro da face do microfone, com um diâmetro ( $\simeq 5mm$ ) um pouco maior que o orifício do microfone.

O espectro de absorção da folha de milho foi obtido subtraindo, para cada  $\lambda$ , o sinal  $V_{OPC}$  da amostra do sinal  $V_D$  (incidência direta sobre a membrana), segundo a normalização apropriada (eq.II.14). O sinal  $V_D$  foi obtido usando a janela de vidro  $Bk - 7$  de  $300\mu m$  de espessura (conforme seção II.3) em lugar da amostra. Notamos na fig.II.6 que na região espectral de nosso experimento ( $400 - 800nm$ ), a janela de  $Bk - 7$  tem um fator de transmissão de aproximadamente 91% em todo o intervalo. Na fig.IV.3 mostramos o espectro de absorção desta folha de milho ( $\simeq 150\mu m$  de espessura), obtido a uma frequência de modulação de  $24Hz$ .

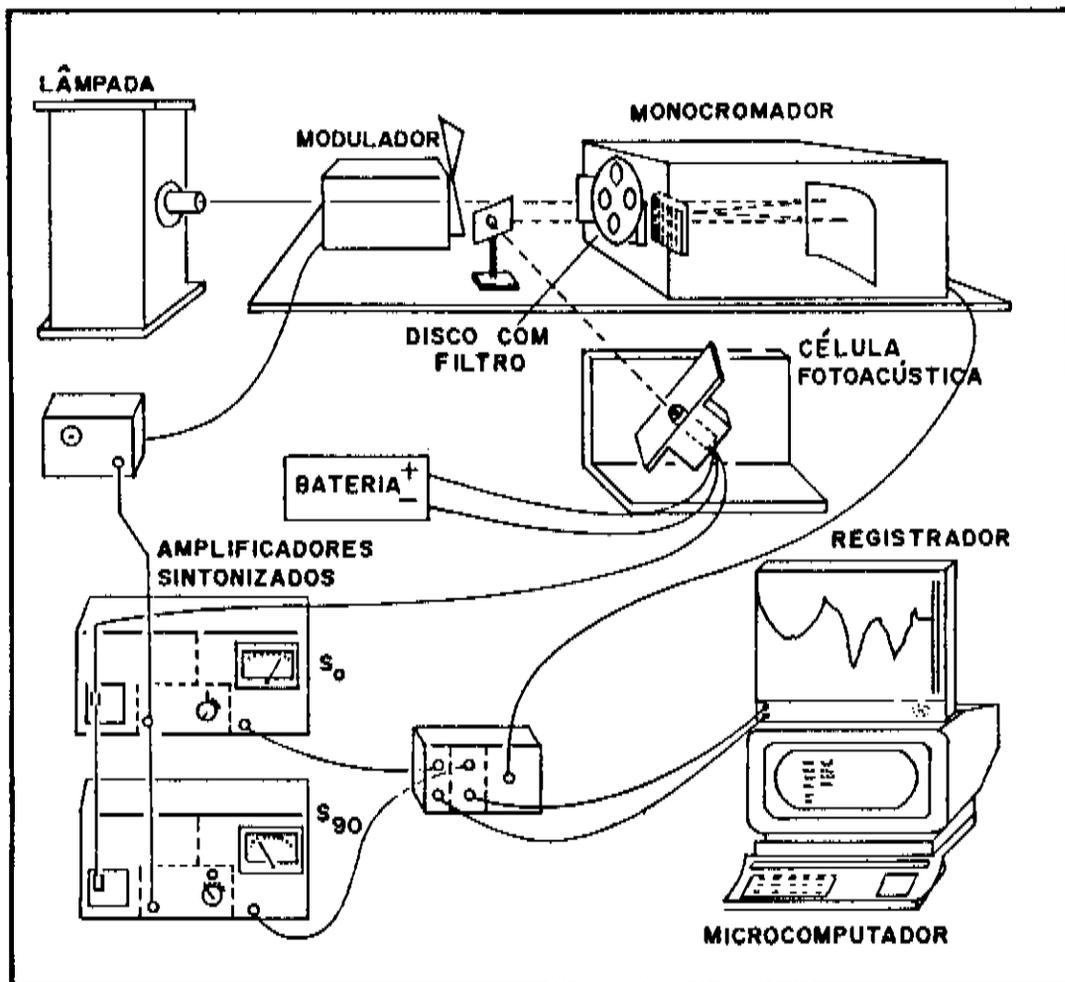
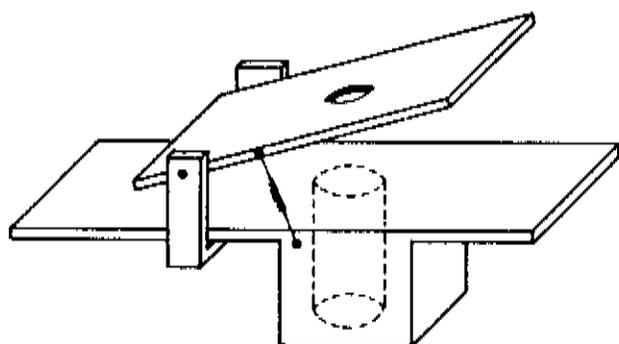


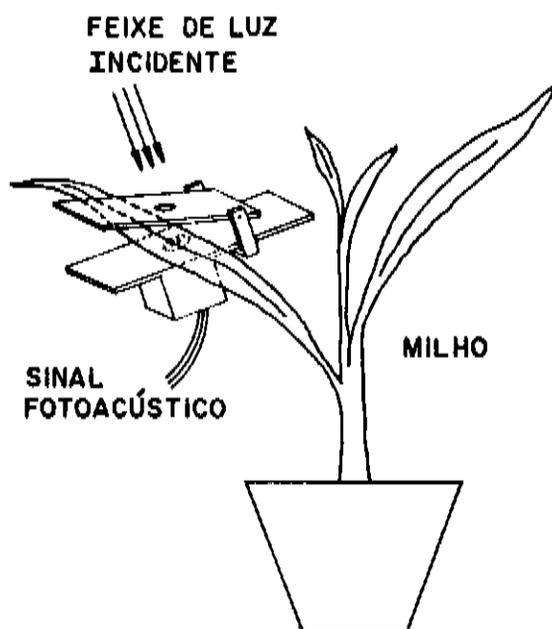
Fig. IV.1: Espectrômetro fotoacústico



(a)



(b)



(c)

Fig. IV.2: Célula aberta

- (a) suporte para o microfone
- (b) microfone de eletreto
- (c) medida "in vivo"

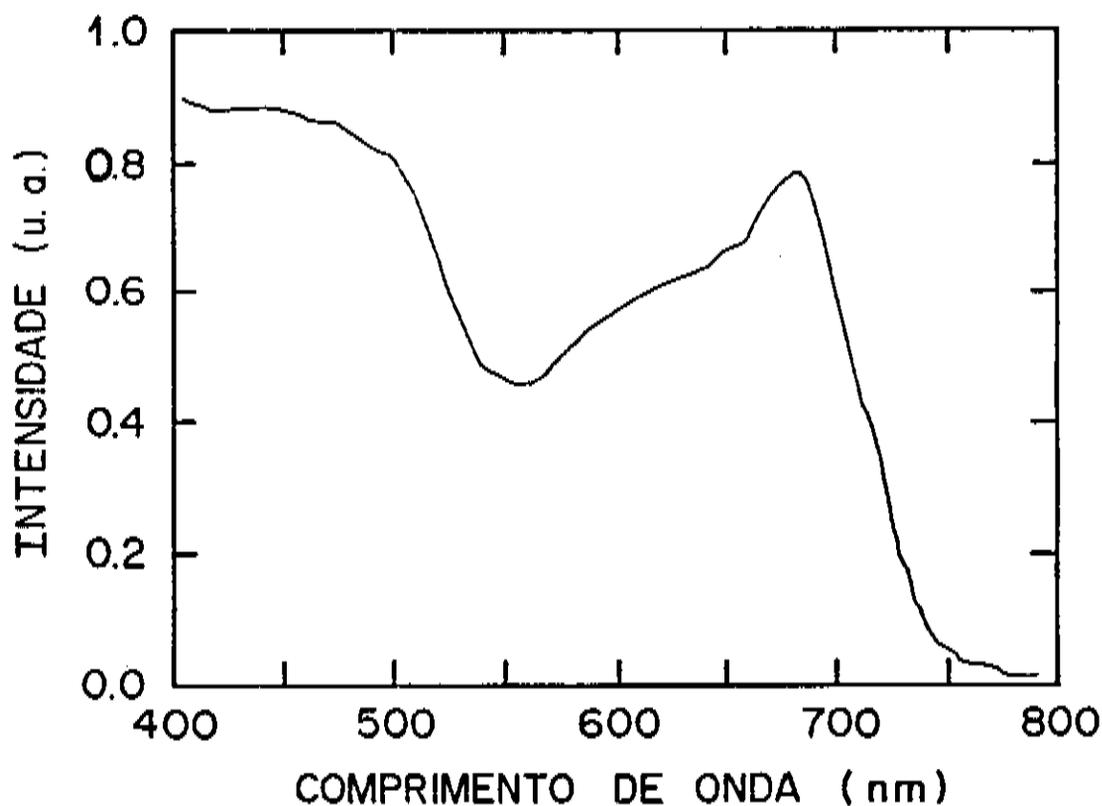


Fig. IV.3: Espectro de absorção fotoacústico de uma folha de milho de aproximadamente  $150\mu\text{m}$  de espessura, obtido com a célula aberta e "in vivo".

Vemos no espectro da folha de milho (fig.IV.3) que na região espectral correspondente ao vermelho existem picos de absorção em 680 e 650 nm, os quais identificamos como picos de absorção das clorofilas-a e b respectivamente (conforme fig.III.3 para os pigmentos isolados). Este espectro nos mostra que a razão entre as intensidades de absorção em 680 e 650 nm é:

$$\frac{I(680)}{I(650)} = 1,17 \implies \frac{\beta(680)}{\beta(650)} = 1,17$$

## IV.2 - 2º Experimento: Obtenção de Parâmetros Ópticos e Térmicos da Folha de Milho

Este experimento consistiu na dependência do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz em 680 e 650nm que correspondem aos picos das clorofilas-a e b respectivamente. Tanto a montagem experimental como a amostra foram as mesmas do 1º experimento. Fixamos o comprimento de onda no monocromador e variamos a frequência de modulação da luz.

Os dados obtidos para o sinal  $V_{OPC}$  em função da frequência de modulação foram armazenados em disquete e em seguida transferidos para o VAX onde temos um programa de ajuste de curvas. Ajustamos os dados para a intensidade do sinal com a expressão teórica adequada, obtida a partir das eqs.(II.10) e (II.11), pois estas nos dão o sinal  $V_{OPC}$  para amostras opticamente transparentes e termicamente grossas que é o caso das folhas de milho. Neste ajuste existem 7 parâmetros ajustáveis que são:

$$A(1) = l_m \left( \frac{\pi}{\alpha_m} \right)^{1/2}$$

$$A(2) = l_g \left( \frac{\pi}{\alpha_g} \right)^{1/2}$$

$$A(3) = RC$$

$$A(4) = \tau$$

$$A(5) = \tau_{\beta} = \frac{1}{\beta^2 \alpha_s}$$

$$A(6) = \beta' \frac{K_s}{K_m} \left( \frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right)^{1/2}$$

$$A(7) = \text{constante}$$

Mas, como podemos ver no cap.II, os três primeiros parâmetros podem também ser obtidos fazendo-se uma dependência do sinal direto (janela Bk-7) com a frequência de modulação e depois ajustando os dados com a expressão teórica para o sinal direto (eq.II.8). Esses parâmetros são característicos do microfone utilizado, portanto não devem mudar sensivelmente de uma medida para outra.

Procedemos então da seguinte maneira: primeiramente fizemos uma varredura de frequência com a janela de Bk-7 (sinal direto) e depois substituímos esta janela pela folha de milho, mantendo as mesmas condições experimentais e o mesmo microfone. Fizemos o ajuste do sinal direto com a eq.(II.8) e extraímos daí os valores para os 3 primeiros parâmetros. Uma vez conhecidos esses parâmetros, eles puderam ser fixados no ajuste do sinal obtido com a folha, restando apenas 4 parâmetros a serem ajustados.

Na fig.IV.4 mostramos o ajuste para a fase do sinal direto (conforme seção II.3) e os parâmetros ajustados. O desvio quadrático médio dos pontos experimentais em relação à curva teórica foi de 0,26 graus. Notamos que os valores ajustados para os parâmetros variam de um microfone para outro e se compararmos tais va-

lores com aqueles obtidos para o microfone utilizado na seção II.3, vemos que são diferentes. O valor da constante RC do microfone utilizado neste experimento foi medido também através da leitura direta em um osciloscópio e concorda com o valor obtido através do ajuste, ou seja,  $35ms$ .

Nas figs.IV.5 e IV.6 mostramos o ajuste para a intensidade do sinal com a folha de milho em 680 e 650 nm respectivamente, bem como os valores obtidos para os outros parâmetros. Os valores ajustados para os parâmetros  $\tau$  e  $\tau_\beta$  são apresentados na tab.IV.1.

Comp. de onda (nm)	$\tau$ (ms)	$\tau_\beta$ (ms)
650	0,6	23
680	2,1	15

Tab.IV.1: Valores obtidos para  $\tau$  e  $\tau_\beta$  a partir da dependência da amplitude do sinal fotoacústico com a frequência de modulação em 650 e 680nm.

A difusividade térmica da folha de milho foi medida independentemente usando a célula de 2 feixes como descrito nas refs. 01 e 02. O valor encontrado foi:  $\alpha_s = 0,0012cm^2/s$ .

Usando o valor acima para a difusividade e os parâmetros ajustados para  $\tau_\beta$  (ver tab.IV.1) chegamos aos coeficientes de absorção óptica ( $\beta$ ), pois  $\tau_\beta = 1/\beta^2\alpha_s$ . Os valores assim obtidos para  $\beta$  são mostrados na tab.IV.2 abaixo:

comp. de onda (nm)	$\beta$ ( $cm^{-1}$ )
650	190
680	236

Tab.IV.2: Valores encontrados para os coeficientes de absorção óptica em 650 e 680nm, considerando  $\alpha_s = 0,0012cm^2/s$

Em particular, notamos a partir da tab.IV.2 acima que  $\frac{\beta(680)}{\beta(650)} = 1,24$ , o que está muito próximo do valor obtido no 1º experimento para a razão das intensidades na fig.IV.3  $\left( \frac{\beta(680)}{\beta(650)} = 1,17 \right)$ .

A condutividade térmica ( $k_s$ ) da folha de milho pode ser obtida a partir de A(6), conhecendo-se  $\beta'$ ,  $K_m$ ,  $\alpha_m$  e  $\alpha_s$ . Tendo em mente que  $\beta'$  é igual a um menos a refletividade do diafragma metalizado e que esta vale cerca de 90% para o Al, podemos fazer  $\beta' = 0,1$ . Com relação à condutividade e difusividade térmicas da membrana, encontramos na literatura os seguintes valores:  $K_m = 2,5mW/cmK$  e  $\alpha_m = 0,0010cm^2/s$  (tabelados para o FEP)<sup>(32,33)</sup>. Considerando tais valores e o valor acima indicado para a difusividade térmica da folha de milho ( $\alpha_s = 0,0012cm^2/s$ ) chegamos a  $K_s$ . Em 680nm, por exemplo,  $A(6) = 0,15$  e  $K_s = 4,1mW/cmK$ .

### IV.3 - Discussão dos Resultados

Com estes dois experimentos, mostramos a capacidade de realização de estudos espectroscópicos com a OPC, bem como a determinação de parâmetros ópticos e térmicos em folhas de milho "in vivo". A possibilidade de determinarmos parâmetros como  $\tau_\beta$  "in vivo", representa uma grande conquista porque a determinação deste parâmetro com a célula convencional enfrenta uma dificuldade que é a influência da desidratação da amostra sobre ele (Apêndice I).

Com relação aos valores obtidos para os parâmetros a partir dos ajustes; temos, por exemplo, que os valores obtidos para  $\tau$  são da mesma ordem de grandeza de valores já obtidos na literatura<sup>(40)</sup>. Temos também que os valores obtidos para a condutividade térmica ( $K_s$ ) em 680 e 650nm são bastante razoáveis, pois são próximos da condutividade térmica do constituinte da folha mais abundante que é a água ( $\sim 6mW/cmK$ )<sup>(32)</sup>.

A boa concordância entre os dados experimentais e as curvas teóricas nas figs.IV.4, IV.5 e IV.6 significam que o modelo de difusão para a OPC proposto no cap.II é adequado; não só no caso de incidência direta como também no caso em que a amostra é transparente e termicamente grossa.

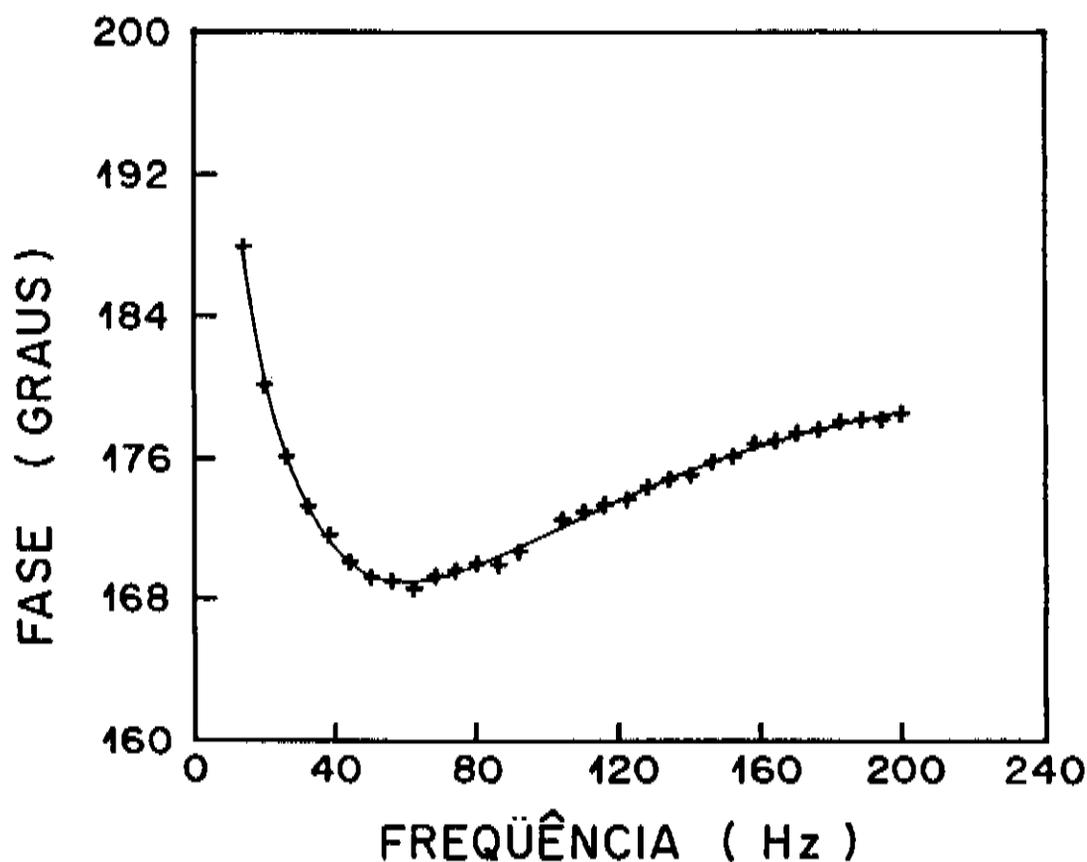


Fig.IV.4: Dependência da fase do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz quando esta incide diretamente sobre a membrana do microfone. O comprimento de onda da radiação incidente é  $680nm$  e os parâmetros ajustados são:

$$A(1) = 0,12 \text{ s}^{1/2}$$

$$A(2) = 0,33 \text{ s}^{1/2}$$

$$A(3) = 35 \text{ ms}$$

$$A(4) = 268 \text{ graus}$$

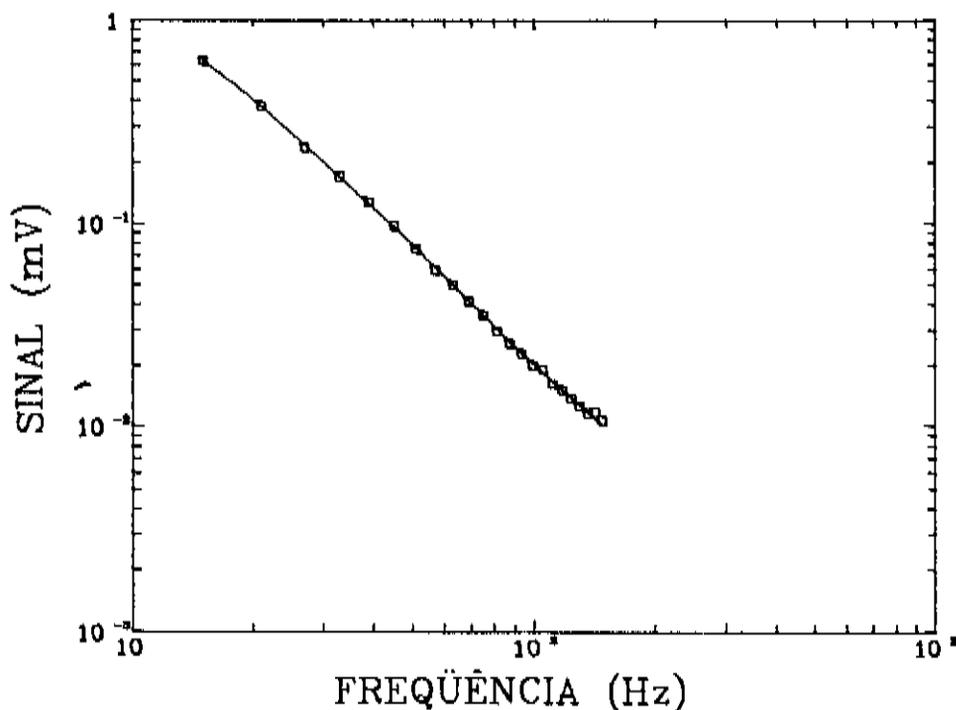


Fig. IV.5: Dependência da amplitude do sinal fotoacústico com a frequência de modulação em  $650nm$ . A linha cheia representa o melhor ajuste dos dados experimentais à expressão teórica adequada (erro no ajuste = 2,43%). Os valores dos parâmetros ajustados são:

$$A(4) = 0,60ms$$

$$A(5) = 23ms$$

$$A(6) = 0,11$$

$$A(7) = 2,4mV$$

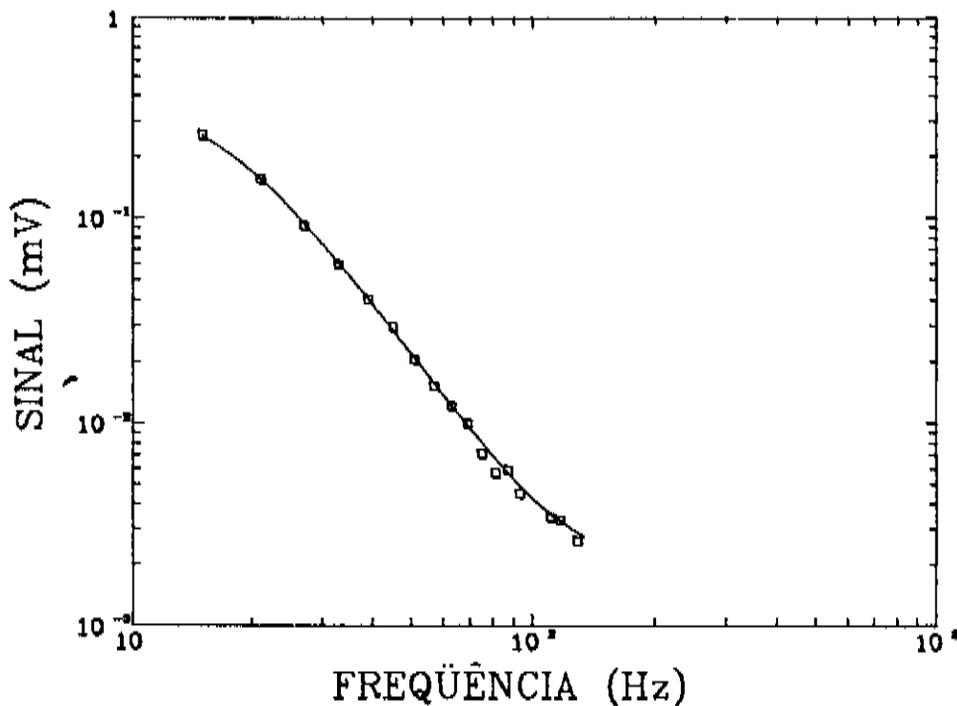


Fig. IV.6: Dependência da amplitude do sinal fotoacústico com a frequência de modulação em  $680nm$ . O erro neste ajuste foi de 3,18% e os valores obtidos para os parâmetros ajustados são:

$$A(4) = 2,1 \text{ ms}$$

$$A(5) = 15 \text{ ms}$$

$$A(6) = 0,15$$

$$A(7) = 0,61mV$$

## V - Toxicidade do $Al^{3+}$ em Plantas de Milho

O tema central deste capítulo consiste de medidas da intensidade do sinal fotoacústico em folhas de milho "in vivo" em função do tempo de exposição das mesmas ao  $Al^{3+}$ . Desenvolvemos aqui um estudo por espectroscopia fotoacústica da ação da toxicidade do  $Al^{3+}$  em plantas de milho<sup>(41)</sup>.

### V.1 - Motivos que Despertaram nosso Interesse pelo Presente Estudo

O cerrado brasileiro corresponde a aproximadamente 1,8 milhões de  $Km^2$  e seus solos são geralmente ácidos com altas concentrações de  $Al^{3+}$ . E, como sabemos, o  $Al^{3+}$  é um fator limitante para a agricultura em solos ácidos<sup>(42)</sup>. Seu principal efeito sobre as plantas é inibir a divisão celular das raízes, o que provoca uma redução no sistema radicular e conseqüentemente uma diminuição da capacidade da planta extrair nutrientes do solo e uma alta susceptibilidade à seca<sup>(43)</sup>.

Em milho particularmente ocorrem variabilidades genéticas, sendo algumas linhagens susceptíveis e outras tolerantes ao  $Al^{3+}$ <sup>(44-46)</sup>.

A paralização da divisão celular nas raízes reduz seu crescimento e as tornam mais grossas. Então, o procedimento utilizado até hoje para verificar-se a susceptibilidade ou não do milho ao  $Al^{3+}$ , é a comparação dos comprimentos das raízes das plantas de uma certa linhagem submetidas ao  $Al^{3+}$  com aquelas da mesma linhagem, mas que não foram submetidas ao  $Al^{3+}$ . Entretanto, embora seja possível chegar-se a uma conclusão sobre a susceptibilidade da planta dessa maneira, o tempo necessário para isso é muito longo (superior a 96 horas após a exposição da planta ao  $Al^{3+}$ ).

Pensando nisso, achamos interessante utilizar a espectroscopia fotoacústica como um procedimento alternativo, mais rápido e não destrutivo para estudarmos

o efeito do  $Al^{3+}$  sobre as plantas, particularmente o milho.

## V.2 - Experimental

### V.2.1 - Amostras

As amostras por nós utilizadas correspondem a duas linhagens diferentes de milho (*Zea mays* L.). Uma delas sendo susceptível ao  $Al^{3+}$  (L 1037) e a outra, tolerante ao  $Al^{3+}$  (L922).

Nosso objetivo foi comparar o comportamento espectroscópico dessas duas linhagens quando continuamente expostas por 80 horas a 2 níveis de toxicidade do  $Al^{3+}$ , a saber, 0 e 9ppm.

A linhagem L 1037 deriva da raça Tuxpeño enquanto que a linhagem L922, da raça Cateto. Ambas as linhagens são puras, o que significa que dentro de uma mesma linhagem as plantas são geneticamente idênticas.

As sementes de ambas as linhagens foram colocadas para germinar envoltas por "papel toalha" em água destilada por 72 horas. No final desse tempo, as sementes tornaram-se plântulas com radículas de aproximadamente 3cm de comprimento, que posteriormente foram tratadas a zero e a  $9 \times 10^{-6}g$  de  $Al^{3+}$  por ml de solução nutriente. O ambiente no qual as plântulas cresceram continha iluminação fluorescente com fotoperíodo de 12 horas e temperatura controlada em  $(27 \pm 1)^{\circ}C$ .

Acompanhamos e participamos da preparação dessas amostras feita pelo grupo do professor William José da Silva do Instituto de Biologia da UNICAMP.

### V.2.2 - Procedimento Experimental

Medidas da intensidade do sinal fotoacústico foram realizadas para as duas linhagens (L1037 - susceptível e L922 - tolerante) quando submetidas a 0 e a 9ppm

de  $Al^{3+}$ .

A metodologia por nós adotada neste experimento foi a seguinte: primeiramente realizamos uma série de medidas com as plantas susceptíveis - L1037 e depois uma outra série de medidas análogas com as plantas tolerantes - L922.

Na primeira série de medidas colocou-se para germinar sementes da linhagem L1037, as quais depois de germinarem foram colocadas em dois recipientes iguais (fig.V.1), contendo soluções nutrientes idênticas, inclusive o pH e exatamente nas mesmas condições. Passados seis dias desde que as sementes foram postas para germinar, colocou-se em apenas um desses recipientes o  $Al^{3+}$  numa concentração de  $9ppm$ . Iniciamos as medidas dezoito horas após a colocação do  $Al^{3+}$ . Retiramos, então, uma planta de cada recipiente, as quais foram colocadas em dois "vazinhos" que continham a mesma solução de seus recipientes de origem. Então, com as plantas nos "vazinhos" tiramos o espectro da segunda folha de cada uma delas. Em seguida são retiradas novamente uma planta de cada recipiente, resultando em mais dois espectros. Ficamos então com um total de quatro espectros (dois de cada recipiente). E, esse processo repetiu-se a cada 12 horas até aproximadamente 80 horas após a aplicação do  $Al^{3+}$ .

As plantas retiradas do recipiente que continha  $9ppm$  de  $Al^{3+}$  foram chamadas por nós de amostras-experimento e aquelas do recipiente que não continha  $Al^{3+}$  foram chamadas amostras-controle. Então, a cada 12 horas obtivemos dois pares de espectros experimento-controle.

A segunda série de medidas, com plantas tolerantes ao  $Al^{3+}$  da linhagem L922, foi inteiramente análoga à primeira série.

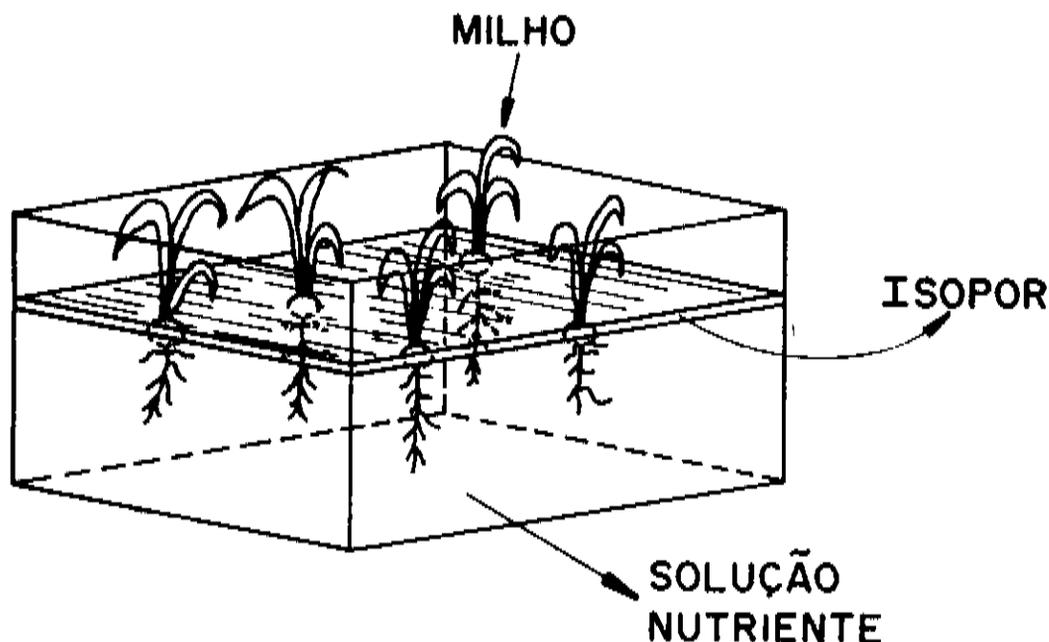


Fig. V.1: Recipiente típico onde cresceram as plantas de milho.

Os espectros de absorção fotoacústicos das folhas de milho foram obtidos utilizando o espectrômetro descrito no cap.IV (fig.IV.1) e normalizados conforme o procedimento indicado na seção 11.2.2. Todas as medidas foram realizadas “in vivo” e a fixação das folhas à célula aberta ocorreu da mesma forma que no cap.IV (fig.IV.2). Tomamos o cuidado de colocar o microfone sempre na mesma posição das folhas ( $\pm$  na metade de seu comprimento) e sem danificá-las.

Vale também notar que cada par experimento-controle foi escolhido de tal forma que os comprimentos das raízes e folhas fossem aproximadamente iguais para as duas plântulas.

### V.3 - Resultados

Para ilustrar nossos resultados tomamos dois dos pares de espectros experimento-controle obtidos em cada uma das duas séries de medidas.

A fig.V.2 mostra dois pares de espectros típicos experimento-controle obtidos na primeira série de medidas, ou seja, com plantas susceptíveis (L1037). Na parte a temos o par experimento-controle obtido 33 horas após a aplicação do  $Al^{3+}$  e na parte b, o par obtido 57 horas após sua aplicação.

Analogamente para a segunda série de medidas (plantas tolerantes - L922) mostramos, na fig.V.3, os pares experimento-controle obtidos 33 (parte a) e 57 horas (parte b) após a aplicação do  $Al^{3+}$ .

As linhas finas (1) que aparecem nas figs.V.2 e V.3 correspondem aos espectros das amostras experimento, ou seja, aquelas crescidas em solução nutriente com 9ppm de  $Al^{3+}$  e as linhas mais grossas (2) são os espectros das amostras controle, ou seja, aquelas que cresceram na ausência de  $Al^{3+}$ .

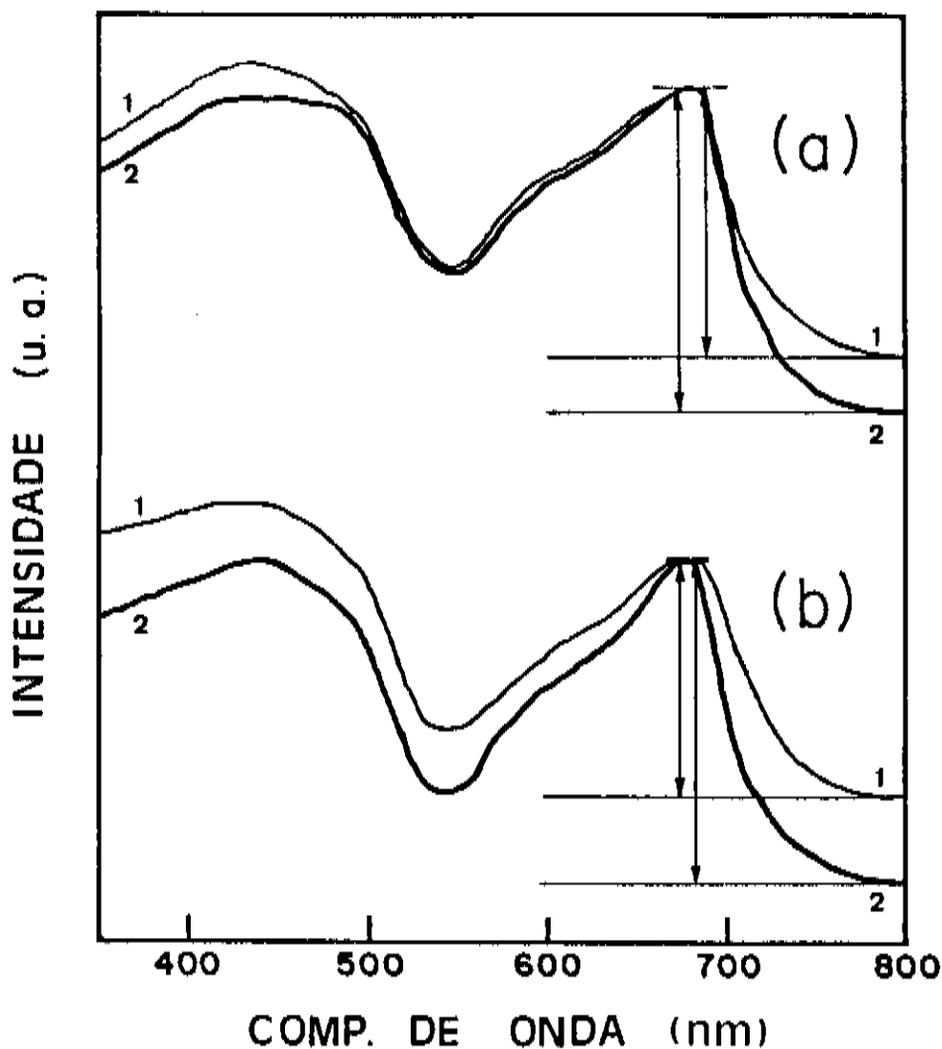


Fig.V.2: Espectros de absorção fotoacústicos de amostras susceptíveis ao  $Al^{3+}$  (L1037) obtidos 33 horas (parte a) e 57 horas (parte b) após a aplicação do  $Al^{3+}$ . As curvas (1) referem-se às amostras experimento e as curvas (2), às amostras controle.

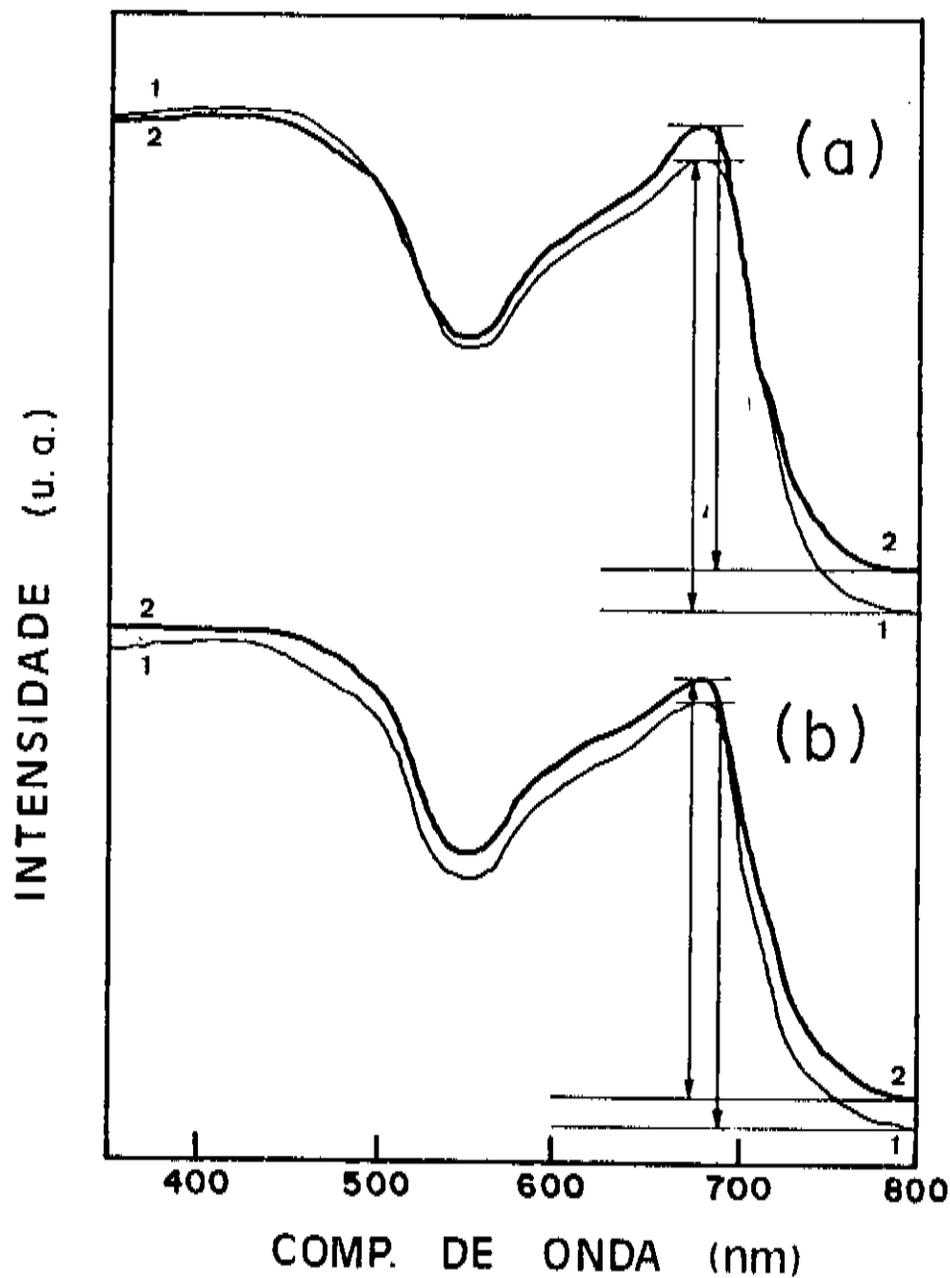


Fig.V.3: Espectros de absorção fotoacústicos de amostras tolerantes ao  $Al^{3+}$  obtidos 33 horas (parte a) e 57 horas (parte b) após a aplicação do  $Al^{3+}$ .

Observando todos os espectros por nós obtidos, não notamos diferenças espectrais significativas entre as amostras experimento e controle da linhagem L922 (tolerante). Já no caso da linhagem L1037 (susceptível) notamos diferenças marcantes entre as amostras do par experimento-controle, sendo que a maioria delas ocorre na região espectral que corresponde à banda da clorofila (cerca de 680nm). Então, vamos investigar as diferenças da intensidade do sinal fotoacústico nesta região.

As duas flechas que aparecem em cada par experimento-controle representam as intensidades do sinal fotoacústico desse par em 680nm devido à absorção da folha, em relação às linhas de base espectral correspondentes (também indicadas nas figuras).

Chamaremos  $r(t)$  à seguinte razão:

$$r(t) = \frac{S_{\text{experimento}}}{S_{\text{controle}}}$$

onde  $S_i$  é a intensidade do sinal fotoacústico em 680nm devido à absorção da folha, para a amostra  $i$  em relação à linha de base espectral correspondente.

Nas figs.V.4 e V.5 graficamos a razão  $r(t)$  em função do tempo de exposição das amostras ao  $Al^{3+}$ , respectivamente para a primeira série de medidas (plantas susceptíveis) e para a segunda série (tolerantes).

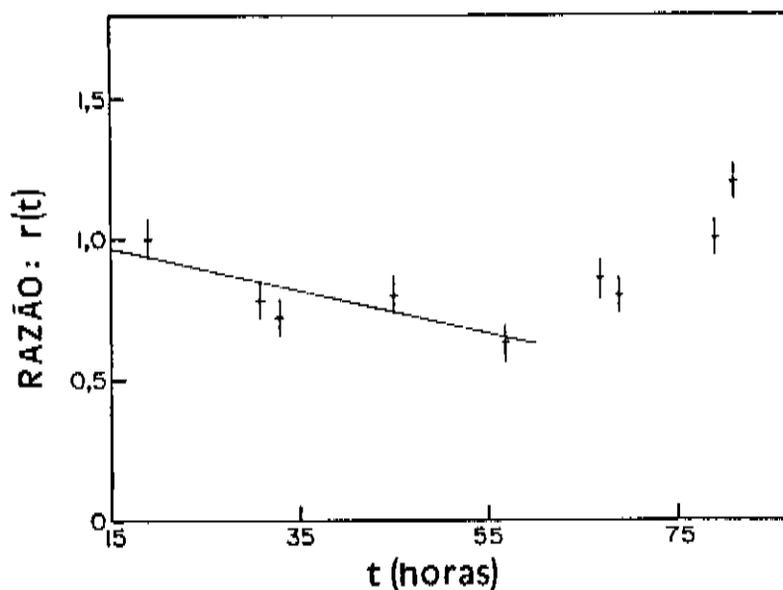


Fig.V.4: Razão  $r(t)$  para amostras susceptíveis em função do tempo de exposição das mesmas ao  $Al^{3+}$ .

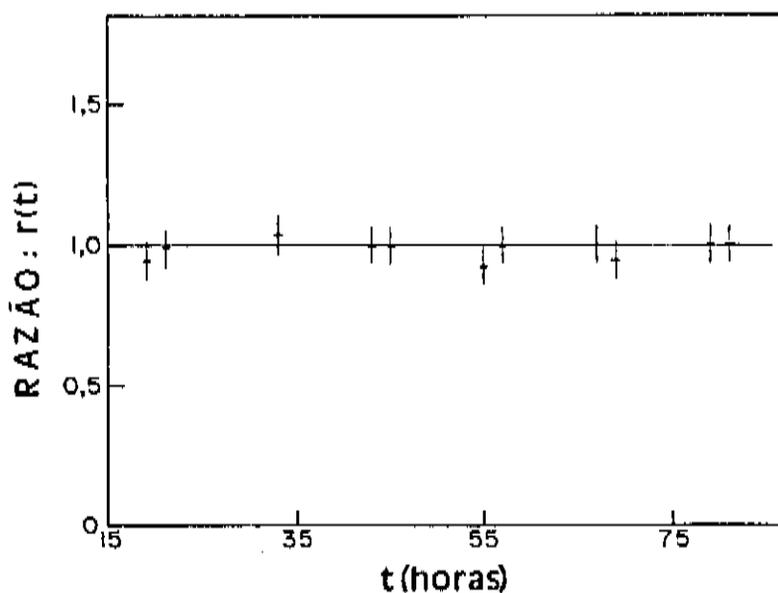


Fig.V.5: Razão  $r(t)$  para amostras tolerantes em função do tempo de exposição das mesmas ao  $Al^{3+}$ .

## V.4 - Discussão dos Resultados

Com relação às medidas feitas com plantas tolerantes L 922, não observamos diferenças espectrais entre experimento e controle para nenhum valor de  $t$ . Podemos ver na fig.V.5 que a razão  $r(t)$  mostra completa insensibilidade dessa linhagem ao  $Al^{3+}$  para todos os valores de  $t$ , pois  $r(t)$  manteve-se com um valor experimental constante e igual a 1.

Com relação às medidas com plantas susceptíveis L 1037, observamos diferenças espectrais marcantes entre os membros do par experimento-controle. Como podemos ver na fig.V.2, essa diferença já é bastante acentuada 33 horas após a aplicação do  $Al^{3+}$  e fica maior ainda 57 horas após. Ocorre um decréscimo de aproximadamente 30% na intensidade do pico da clorofila 57 horas após a aplicação do  $Al^{3+}$ . Podemos ver na fig.V.4 que a razão  $r(t)$  depende fortemente do tempo, com um decréscimo aparentemente linear a uma razão percentual de cerca de  $-0,5h^{-1}$  para valores de  $t$  menores que 60 horas. A partir daí ocorre uma subida no gráfico que deverá ser explicada.

Então, por alguma razão ainda a ser discutida, a exposição das plantas a 9ppm de  $Al^{3+}$  na solução nutriente alterou significativamente a resposta óptica das folhas das amostras L1037, mas não das amostras L922.

Uma possível explicação para o decréscimo em  $r(t)$  na fig.V.4, durante as primeiras 60 horas, é a ocorrência de uma diminuição da taxa de produção de clorofila nas plantas L1037 sujeitas ao  $Al^{3+}$ , causada por alguma alteração fisiológica<sup>(47)</sup>.

Tal fato acarreta, conseqüentemente, uma redução na concentração de clorofila nas folhas dessas plantas, pois menos clorofila é produzida do que o necessário para manter sua concentração constante durante o desenvolvimento das plantas. Então, o declínio em  $r(t)$  para a linhagem L1037 pode ser explicado pela deficiência de clorofila nas amostras experimento em relação às controle.

Com relação à subida que ocorre no gráfico de  $r(t)$  fig.V.4 a partir de 60 horas, não temos ainda nenhuma explicação clara. Uma possível explicação seria uma aparente resposta de adaptação da planta após 60 horas de exposição ao  $Al^{3+}$ . De fato, observamos que as raízes laterais das amostras experimento(L1037) começaram a ser ativadas após esse período.

## VI - Conclusões e Perspectivas

De uma forma geral, mostramos neste trabalho a capacidade da realização de estudos espectroscópicos em folhas vegetais usando a técnica OPC, bem como a utilização desta técnica na caracterização óptica e térmica das folhas<sup>(49)</sup>. Trata-se de uma ferramenta muito útil no estudo de materiais biológicos como folhas vegetais, principalmente porque possibilita o estudo "in vivo" desses materiais. Esta é uma importante vantagem da técnica fotoacústica OPC sobre a convencional. A realização de medidas "in vivo" em folhas elimina o problema da desidratação da amostra.

Mostramos ainda, neste trabalho, a possibilidade de monitoramento da resposta genotípica de plantas de milho à toxicidade do  $Al^{3+}$  através da utilização da espectroscopia fotoacústica OPC. O estudo da toxicidade revelou completa insensibilidade ao  $Al^{3+}$  das plantas tolerantes (linhagem L922), enquanto que os efeitos nocivos do  $Al^{3+}$  nas plantas susceptíveis a ele (linhagem L1037) mostraram-se acentuados 30 horas após a aplicação do  $Al^{3+}$ . Assim, a espectroscopia fotoacústica possibilitou-nos detectar em pouco tempo, comparado com o método tradicional, a susceptibilidade da planta ao  $Al^{3+}$ .

A utilização da célula aberta no estudo de plantas abre muitas perspectivas. Uma delas é o monitoramento de efeitos de herbicidas em folhas "in vivo". O estudo da ação de herbicidas em plantas com a espectroscopia fotoacústica convencional tem sido objeto de vários trabalhos<sup>(20,48)</sup>, mas esse estudo "in vivo" constitui uma novidade que poderá fornecer-nos informações adicionais.

## Apêndice I

### Medidas de $\tau$ e $\tau_\beta$ em Folhas de Milho com a Célula Convencional: Influência da Desidratação da Amostra sobre estes Parâmetros

A realização de medidas fotoacústicas em folhas de milho com a célula convencional (fig.I.1) impossibilita o estudo "in vivo". Conseqüentemente uma dificuldade se faz presente: a desidratação da amostra com o tempo.

A fim de investigarmos a influência da desidratação da amostra para o sinal (intensidade e fase) fotoacústico, cortamos dois pedaços do mesmo tamanho (0,5cm de diâmetro) de uma folha de milho, e colocamos um deles numa balança e o outro na célula fotoacústica na presença da luz monocromática ( $\lambda = 680nm$ ) modulada e da luz branca de fundo não modulada. Fizemos um acompanhamento da perda de água da amostra que ficou na balança durante cerca de 4 horas. O resultado obtido é mostrado na fig.A.1. Embora as condições ambientais da amostra que ficou na célula não sejam as mesmas daquela que ficou na balança, ela também desidrata e como conseqüência a intensidade do sinal fotoacústico aumenta com o tempo. Acompanhamos esse processo por mais de uma hora através da leitura direta em um "lock-in". Os resultados obtidos para a intensidade e fase do sinal fotoacústico são apresentados na tab.A1 e fig.A2.

Tempo (min.)	Intensidade do Sinal (mV)	Fase (graus)
10	13,5	-
15	14,0	-
23	15,0	105,2
30	15,5	107,8
37	16,0	108,7
45	16,5	109,7
57	17,0	110,7
70	17,5	111,8
81	17,8	112,4
93	18,2	113,1

Tab.A1: Intensidade e fase do sinal fotoacústico em função do tempo. No instante  $t = 0$  a amostra foi cortada. A frequência de modulação da luz monocromática utilizada foi  $18Hz$ .

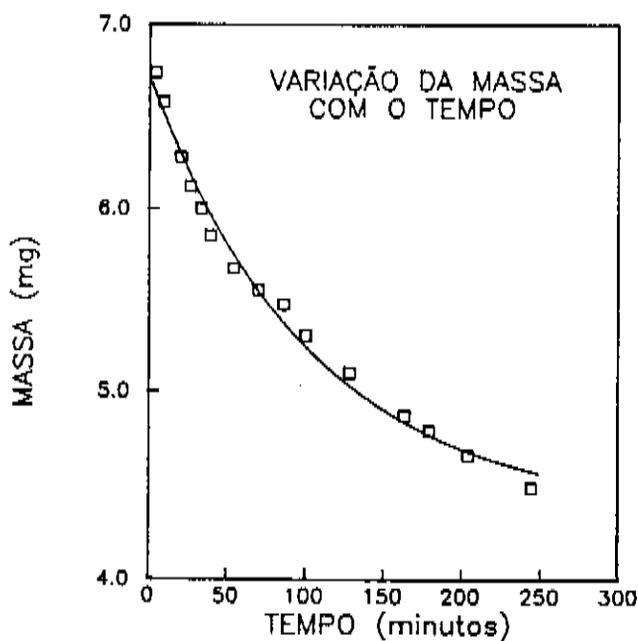


Fig. A1: Variação da massa de um pedaço de folha de milho com o tempo. No instante  $t = 0$  a folha foi cortada.

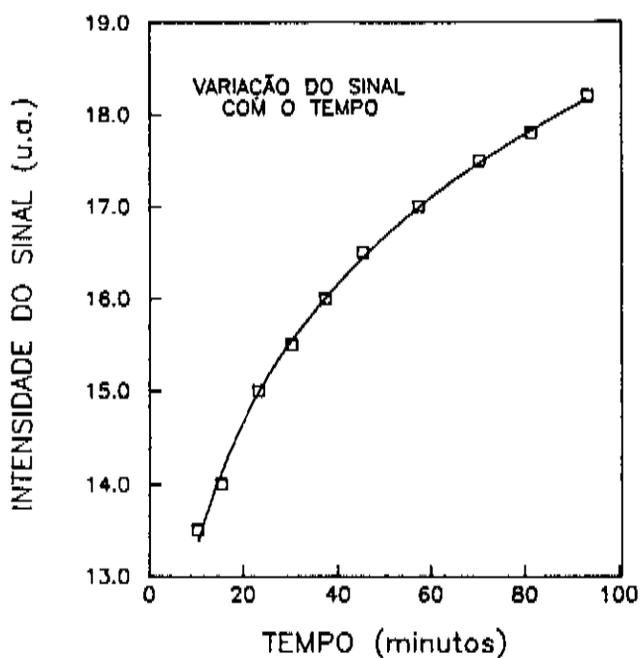


Fig. A2: Variação da intensidade do sinal com o tempo.

Feito esse estudo preliminar da variação do sinal fotoacústico com o tempo, passamos a determinar os parâmetros  $\tau$  e  $\tau_\beta$  para a folha de milho em cima do pico da clorofila-a ( $\lambda = 680nm$ ). Para isso realizamos um conjunto de 8 medidas sucessivas da dependência do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz. Em cada uma dessas medidas fizemos uma varredura de frequência de 20 a 200Hz. Neste experimento utilizamos o espectrômetro fotoacústico de nosso laboratório já descrito no capítulo IV e ilustrado na fig.IV.1 com algumas alterações, a saber, a substituição da célula aberta pela convencional e a inclusão de uma luz branca de fundo não modulada incidindo sobre a amostra para eliminarmos a contribuição da evolução do  $O_2$ . Como fonte para essa luz branca utilizamos uma lâmpada de retroprojeter. A amostra analisada neste experimento consiste de um pedaço de uma folha de milho (0,5cm de diâmetro) que havia sido plantado no solo há cerca de 30 dias.

Na tab.A2 mostramos o intervalo de tempo entre uma medida e outra, o tempo de duração de uma medida e a dependência da intensidade do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz em cada medida. Vale notar que a amostra é a mesma nas 8 medidas e que ela permaneceu na célula durante todo o tempo, inclusive nos intervalos entre uma medida e outra, pois estamos interessados em saber a variação dos parâmetros  $\tau$  e  $\tau_\beta$  com o tempo desde que a folha foi cortada.

Medidas	Aquisição de Dados		Dependência do Sinal com a Frequência
	início(min)	final(min)	
1ª	2	7	$f^{-1,4}$
2ª	13	19	$f^{-1,4}$
3ª	25	31	$f^{-1,4}$
4ª	37	42	$f^{-1,4}$
5ª	48	55	$f^{-1,4}$
6ª	70	76	$f^{-1,3}$
7ª	86	93	$f^{-1,3}$
8ª	103	111	$f^{-1,3}$

Tab.A2: Dependência da intensidade do sinal fotoacústico com a frequência de modulação da luz para a folha de milho em 680nm. No instante  $t = 0$  cortamos a folha.

A dependência da intensidade do sinal com a frequência em cada medida foi obtida fazendo-se um gráfico  $\log \times \log$  da intensidade pela frequência. A fig.A3 mostra o gráfico para a 1ª medida e a inclinação da reta nos dá diretamente a dependência. É importante conhecermos essa dependência a fim de identificarmos qual é o mecanismo predominante na geração do sinal fotoacústico. Sabemos, por exemplo, que para uma amostra transparente e termicamente grossa, como é o caso das folhas, se essa dependência for  $f^{-1,5}$  o mecanismo predominante é a difusão térmica (2º caso da tab.I.1) e se for  $f^{-1,0}$  predomina o efeito termoelástico<sup>(18)</sup>. Como nossos resultados estão mais próximos do primeiro caso ( $f^{-1,5}$ ), entendemos que o mecanismo predominante é a difusão térmica, então ajustamos os dados experimentais obtidos para a fase do sinal em cada medida com a expressão abaixo<sup>(14)</sup>:

$$\theta = \frac{-3\pi}{4} - tg^{-1}(\omega\tau) + tg^{-1}\left[\frac{1}{\sqrt{2\omega\tau\beta} + 1}\right] \quad (A-1)$$

onde:  $\tau$  é o tempo de relaxação não radiativa e  $\tau_{\beta} = 1/\beta^2\alpha$ , é o tempo de difusão térmica dentro do comprimento de absorção óptica,  $\beta^{-1}$ .

Os ajustes foram feitos com três parâmetros livres, a saber,  $A(1) = \tau$ ,  $A(2) = \tau_{\beta}$  e  $A(3) = \theta_0$ . Os parâmetros ajustados nas 8 medidas são apresentados na tab.A3 abaixo.

Medida	$\tau(ms)$	$\tau_{\beta}(ms)$	$\theta_0(graus)$
1ª	6,4	14,0	370
2ª	5,6	8,8	364
3ª	5,5	7,3	362
4ª	5,0	6,1	356
5ª	5,2	6,4	358
6ª	5,2	1,2	354
7ª	5,8	1,9	359
8ª	6,2	1,5	360

Tab. A3: Valores obtidos para  $\tau$  e  $\tau_{\beta}$ .

Na fig.A4 partes (a) e (b) mostramos os dados experimentais obtidos para a fase respectivamente na 1ª e 8ª medidas. A linha cheia corresponde ao melhor ajuste dos dados à expressão teórica para a fase do sinal fotoacústico (eq.A1). O desvio quadrático médio dos pontos experimentais em relação à curva teórica na 1ª medida foi de  $2^0$  e na 8ª medida foi de  $1,4^0$ .

Concluindo: A desidratação da amostra provoca um aumento da intensidade do sinal fotoacústico com o tempo e também provoca mudanças na fase do sinal. As mudanças na fase estão associadas às mudanças nos parâmetros  $\tau$  e  $\tau_\beta$  uma vez que a fase depende deles. Os resultados para  $\tau$  e  $\tau_\beta$  apresentados na tab.A3 mostram que o tempo de relaxação não radiativa ( $\tau$ ) não varia significativamente com o tempo enquanto que  $\tau_\beta$  diminui sensivelmente. Atribuímos essa diminuição em  $\tau_\beta$  ao aumento da difusividade térmica ( $\alpha_s$ ) na amostra devido à perda de água, pois  $\tau_\beta$  varia com o inverso da difusividade térmica. Os valores obtidos para o tempo de relaxação não radiativa ( $\tau$ ), neste experimento, são da mesma ordem de grandeza daquele obtido com a célula aberta em  $680nm$  ( $2,1ms$ ). As diferenças existentes entre os valores aqui obtidos ( $5,0$  a  $6,4ms$ ) e aquele obtido com a célula aberta devem-se provavelmente a diferenças experimentais. Primeiro, as amostras são diferentes: em um caso a folha foi cortada e no outro, o experimento foi realizado "in vivo". Segundo, as condições experimentais são diferentes: em um caso há a presença da luz branca de fundo e no outro não há. Tais diferenças possivelmente alteram o processo de relaxação térmica.

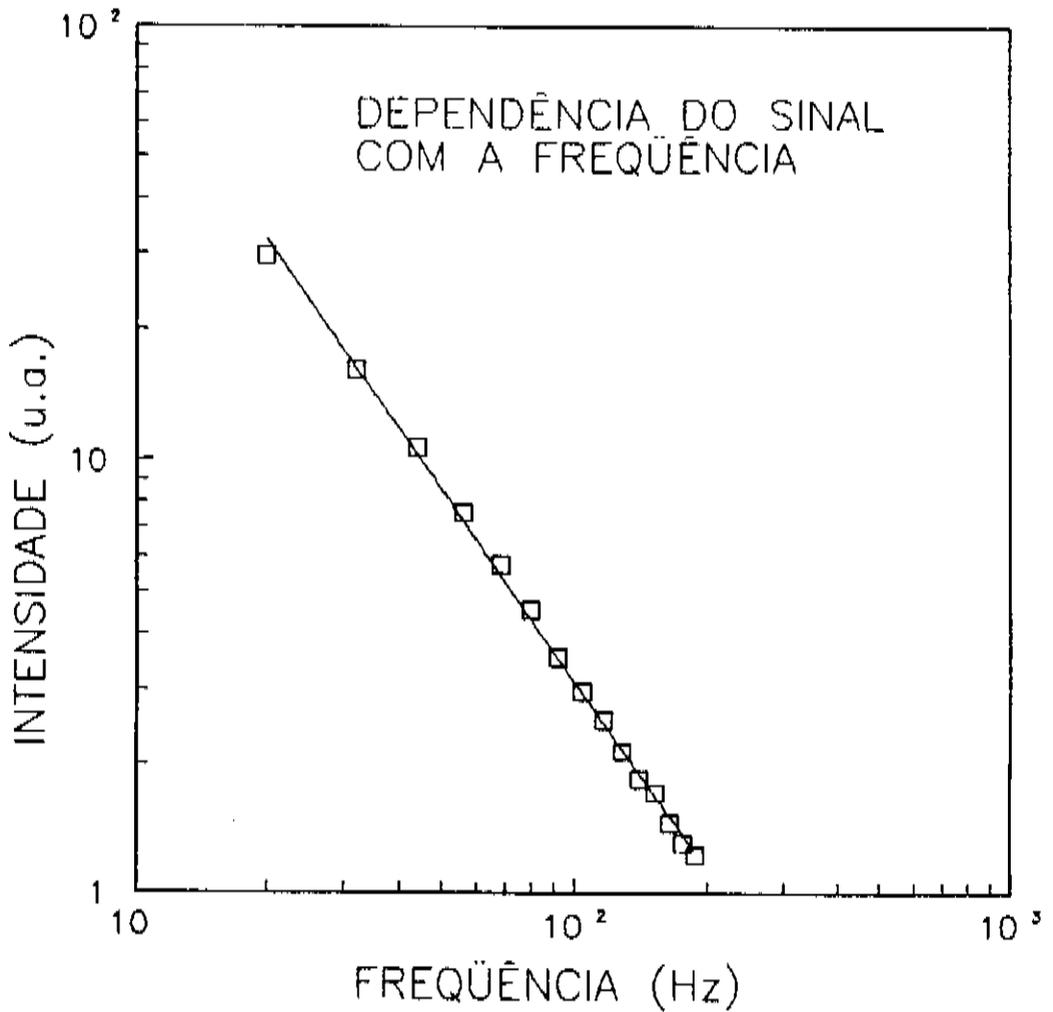


Fig.A3: Resultados obtidos na primeira medida para a intensidade do sinal em função da frequência de modulação da luz.

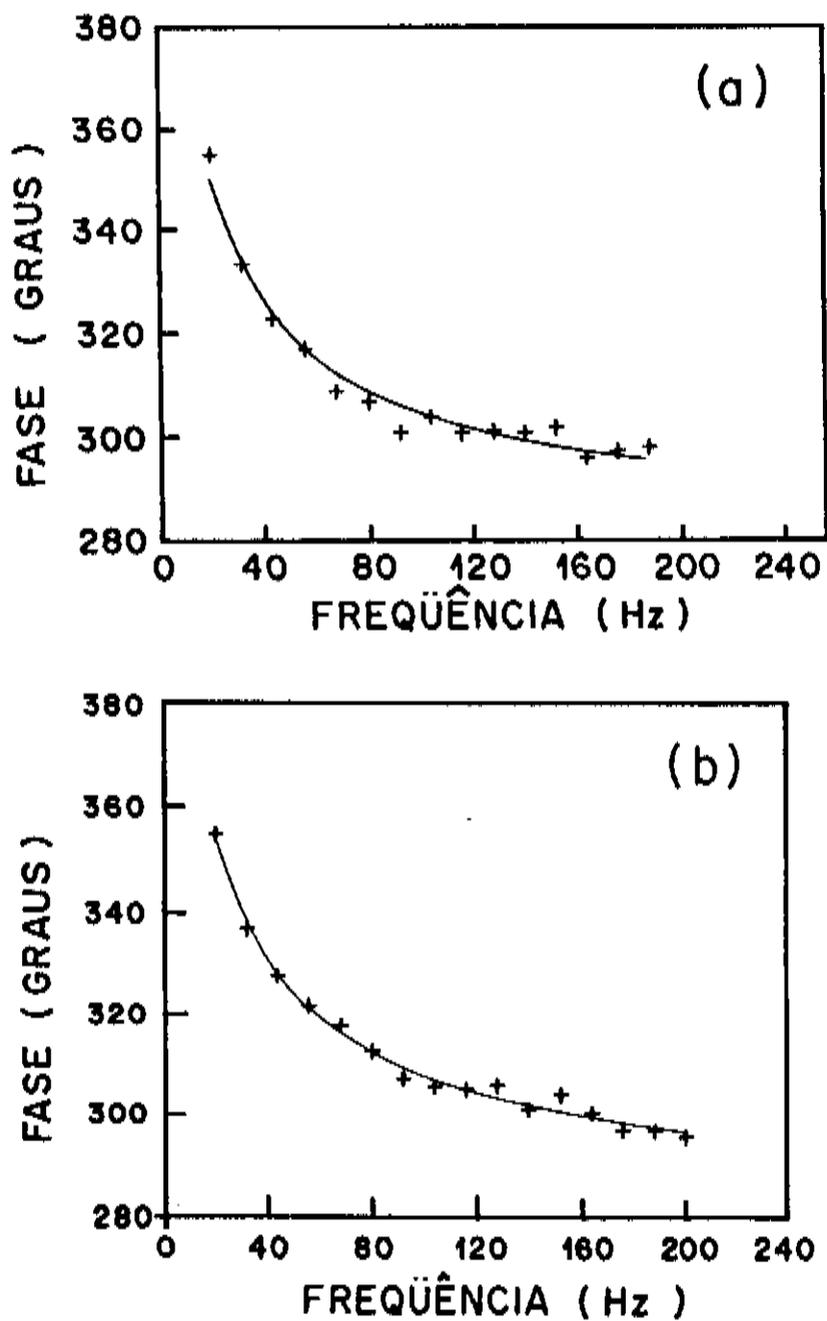


Fig.A4: Ajuste dos dados experimentais obtidos para a fase do sinal fotoacústico na 1ª medida (parte a) e 8ª medida (parte b).

## Referências

1. Pessoa Jr., O.; Cesar, C.L.; Patel, N.A.; Vargas, H.; Ghizoni, C.C.; Miranda, L.C.M., *J. Appl. Phys.*, *59*, 1316, 1986.
2. Leite, N.F.; Cella, N.; Vargas, H., Miranda, L.C.M., *J. Appl. Phys.*, *61*, 3023, 1987.
3. Cesar, C.L.; Vargas, H.; Mendes Filho, J.; Miranda, L.C.M., *Appl. Phys. Lett.*, *43*, 555, 1983.
4. Bento, A.C.; Vargas, H.; Aguiar, M.M.F.; Miranda, L.C.M., *Phys. Chem. of Glasses*, *28*, 127, 1987.
5. Mansanares, A.M.; Baesso, M.L.; da Silva, E.C.; Gandra, F.C.G.; Vargas, H., *Phys. Rev. B*, *40*, 7912, 1989.
6. Cesar, C.L.; Lima, C.A.S.; Leite, N.F.; Vargas, H.; Rubira, A.F.; Galembeck, F., *J. Appl. Phys.*, *57*, 4431, 1985.
7. Swimm, R.T., *Appl. Phys. Lett*, *42*, 955, 1983.
8. Nery, J.W.; Pessoa Jr., O.; Vargas, H.; Reis, F.A.M.; Gabrielli, A.C.; Miranda, L.C.M.; Vinha, C.A., *Analyst*, *112*, 1487, 1987.
9. Cesar, C.L.; Vargas, H.; Pelzl J.; Miranda, L.C.M., *J. Appl. Phys*, *55*, 3460, 1984.
10. Netzelmann, U.; Pelzl, J.; Vargas, H.; Cesar, C.L.; Miranda, L.C.M., *MAG*, *20*, 1252, 1984.
11. Bell, A.G., *Am. J. Sci.*, *120*, 305, 1880.

12. Rosencwaig, A.; Gersho, A., J. Appl. Phys., *47*, 64, 1976.
13. Cesar, C.L.; Vargas, H.; Meyer, J.A.; Miranda, L.C.M., Phys. Rev. Lett., *42*, 1570, 1979.
14. Rosencwaig, A.: "*Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*", J. Wiley & Sons, New York, 1980.
15. Rousset, G.; Lepoutre, F.; Bertrand, L., J. Appl. Phys., *54*, 2383, 1983.
16. Baesso, M.L.; Mansanares, A.M.; da Silva, E.C.; Vargas, H.; Miranda, L.C.M., Phys. Rev. B, *40*, 1880, 1989.
17. Cella, N.: Tese de Mestrado apresentada no IFGW - UNICAMP em 1987.
18. Abritta, T.; Cella, N.; Vargas, H., Chem. Phys. Letts., *161*, 12, 1989.
19. Vargas, H.; Miranda, L.C.M., Phys. Reports, *161*, 43, 1988.
20. Pessoa Jr., O.: Tese de Mestrado apresentada no IFGW - UNICAMP em 1985.
21. Helander, P., J. Photoacoust., *1*, 103, 1982.
22. Mc Queen, D.H., J. Phys. E, *16*, 738, 1983.
23. Sessler, G.M.; West, J.E.: "*Electrets*", Springer, Berlin, editado por G.M. Sessler Springer Series em "*Topics in Applied Physics*", vol.33, pág. 347, 1980.
24. Sessler, G.M., J. Acoust. Soc. Am., *35*, 1354, 1963.
25. Bento, A.C.; Aguiar, M.M.F.; Vargas, H.; da Silva, M.D.; Bandeira, I.N.; Miranda, L.C.M., Appl. Phys. B, *48*, 269, 1989.

26. Torres-Filho, A.; Leite, N.F.; Miranda, L.C.M.; Cella, N.; Vargas, H.; J. Appl. Phys., *66*, 97, 1989.
27. Ferreira, S.O.; An, C.Y.; Bandeira, I.N.; Miranda, L.C.M.; Vargas, H., Phys. Rev. B, *39*, 7967, 1989.
28. Leite, N.F.; Miranda, L.C.M.; Cella, N.; Vargas, H., J. Appl. Phys. (submetido à publicação).
29. Mansanares, A.M.; Bento, A.C.; Vargas, H.; Leite, N.F.; Miranda, L.C.M., Phys. Rev. B (aceito para publicação).
30. Perondi, L.F.; Miranda, L.C.M., J. Appl. Phys., *62*, 2955, 1987.
31. Morse, P.M.: *"Vibrations and Sound"*, Mc Graw-Hill, New York, pág. 193, 1948.
32. Touloukian, L.R.; Powell, R.W.; Ho, C.Y.; Nicolasu, M.C.: *"Thermophysical Properties of Matter"*, IFI/Plenum, New York, 1970-1973.
33. Roff, W.J.; Scott, J.R.: *"Handbook of Common Polymers"*, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1971.
34. Eames, A.J.; Mac Daniels, L.H.: *"An Introduction to Plant Anatomy"*, Mc Graw-Hill, New York and London, 1947.
35. Gates, D.M.; Keegan, H.J.; Schleter, J.C.; Weidner, V.R., Appl. Opt., *4*, 11, 1965.
36. Guiwen, Z.; Huara, C.; Siquan, L.; Qingde, S., Summary for the Sixth International Meeting on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, pág. 164, 1989.

37. Kanstad, S.O.; Cahen, D.; Malkin, S., *Biochimica et Biophysica Acta*, **722**, 182, 1983.
38. Poulet, P.; Cahen, D.; Malkin, S., *Biochimica et Biophysica Acta*, **724**, 433, 1983.
39. Bultz, G.; Horwitz, B.A.; Malkin, S.; Cahen, D.; *Biochimica et Biophysica Acta*, **679**, 452, 1982.
40. Kato, K.; Ishino, S.; Sugitani, Y., *Chem. Lett.*, 783, 1980.
41. Marquezini, M.V.; Cella, N.; da Silva, E.C.; Serra, D.B.; Lima, C.A.S.; Vargas, H.; Prioli, A.J.; da Silva, W.J., *Analyst*, **115**, 341, 1990.
42. Silva, A.R., *Ciência e Cultura*, **28**, 147, 1976.
43. Foy, C.D.: "*Effects of Aluminum on Plant Growth*" em "*The Plant Root and Its Environment*"; Carson, E.W, Editor, University Press, Charlottesville, Virgínia, U.S.A., pág. 601, 1974.
44. Garcia, O., da Silva, W.J., *Ciência e Cultura*, **31**, 585, 1979.
45. Magnavaca, R., Ph.D. Thesis, University of Nebraska, U.S.A., 1982.
46. Prioli, A.J., Tese de Doutorado apresentada no IB – UNICAMP em 1987.
47. Santoro, L.G.; Soares, T.E.; Magalhães, A.C., *Oiton*, **44**, 75, 1984.
48. Vinha, C.A.: Tese de Doutorado apresentada no IFGW – UNICAMP em 1988.
49. Marquezini, M.V.; Cella, N.; Mansanares, A.M.; Vargas, H.; Miranda, L.C.M., *Physica Status Solidi* (submetido à publicação).