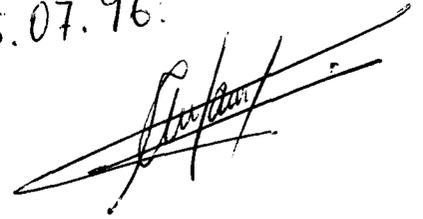


Este exemplar corresponde à versão final  
da tese de Mestrado defendida pelo  
Sr. Paulo Roxo Barja e aprovada pela  
banca examinadora. 05.07.96:



**ESTUDO DA  
INDUÇÃO FOTOSSINTÉTICA  
ATRAVÉS DA  
TÉCNICA FOTOACÚSTICA:  
EFEITOS DE  
SATURAÇÃO E FOTOINIBIÇÃO**

**Paulo Roxo Barja**

**Orientador: Antonio Manoel Mansanares**

Tese apresentada  
no Instituto de Física Gleb Wataghin - UNICAMP  
para obtenção do título de mestre em Física

**PARECER DE APROVAÇÃO**  
**DEFESA DE TESE DE MESTRADO**  
**PAULO ROXO BARJA**

DATA: 29.01.96

BANCA EXAMINADORA:

  
- Prof. Dr. ANTONIO MANOEL MANSANARES (Orientador)

  
- Prof. Dr. NORBERTO CELLA

  
- Prof. Dr. ARTÊMIO SCALABRIN

*Este trabalho é dedicado à memória de*

*Dulce Fonseca Dias Pinto,*

*pela música,*

*e*

*Roldão Mendes Rosa,*

*pela poesia*

*“ Luz do Sol  
Que a folha traga e traduz  
Em verde novo,  
Em folha, em graça, em vida, em força :  
Em luz ”*

*(Caetano Veloso)*

## Resumo

Neste trabalho mostra-se a fotoacústica como técnica adequada ao estudo de sistemas vegetais, particularmente na caracterização de mecanismos da fotossíntese. É apresentado um modelo que descreve os processos físicos analisados. Utilizando a célula fotoacústica aberta, analisa-se medidas *in vivo* e *in situ* referentes a parâmetros fotossintéticos como a evolução de oxigênio e o armazenamento de energia em amostras. Medições realizadas em plantas de eucalipto permitiram construir curvas da atividade fotossintética em função da intensidade luminosa, mostrando a ocorrência de saturação fotossintética. A incidência de luz saturante de diversas intensidades também permitiu o estudo da fotoinibição em eucalipto. Esta resposta das plantas à incidência de luz forte pode demonstrar estresse, o que é discutido no trabalho.

## Abstract

This work shows photoacoustics as an adequate technique for studying vegetable systems, specially in the characterization of mechanisms related to photosynthesis. We present a model that describes the physical processes studied. Using the open photoacoustic cell (OPC), we measure and analyze photosynthetic parameters as oxygen evolution and energy storage for *in vivo* and *in situ* samples. From measurements performed in three different species of *Eucalyptus* plants, it was possible to obtain curves of the photosynthetic activity as a function of the light intensity. These curves show the occurrence of photosynthetic saturation. The incidence of background saturating light of various intensities also allowed the study of photoinhibition in *Eucalyptus* plants. The response of the plants to strong continuous light incidence connotes a kind of stress, as we discuss here.

# Agradecimentos

- ao Antonio, pela orientação dedicada e constante;
- à família e, em particular, aos meus pais, Antônio e Ila, pelo amor, apoio e confiança;
- ao professor Edson Corrêa da Silva, chefe e amigo de todas as horas;
- a Annette Gorenstein, porque “a primeira orientadora a gente nunca esquece”;
- ao pessoal do laboratório de Fototérmica e do laboratório de Metais e Ligas: Alexandre, André, Dinah, prof. Flávio Gandra, Gustavo, Jerias, Larissa, Laura, Lobato, Luis Carlos, Maurício, Medina, Romarli, por tudo;
- aos professores Antônio Magalhães (IB - Unicamp) e Pedro Alves (Unesp - Jaboticabal), pela colaboração no trabalho, pelas amostras e, sobretudo, pelas valiosas discussões;
- aos professores Artêmio Scalabrin e Carlos Lima, pelo interesse demonstrado e pelas sugestões;
- aos professores Antônio Carlos Pereira, Norberto Cella e Helion Vargas, que muito me ensinaram e com quem muito ainda tenho a aprender;
- a Carmen Gorvenia, pelas medidas produtivas e perguntas pertinentes;
- aos amigos, pelo apoio pessoal imprescindível: Silvia e Zé, Luiz Carlos e Paula, André Victor, Fá, amigos músicos em geral (e tantos outros);
- aos colegas da pós-graduação, pela convivência, especialmente ao Pascoal, companheiro desde o primeiro dia da graduação;
- ao CNPq, pelo apoio financeiro.

# ÍNDICE

<b>Apresentação</b>	viii
<b>I - FUNDAMENTAÇÃO</b>	1
<u>I.1 - Histórico</u>	1
I.1.a - Fotoacústica	1
I.1.b - Fotossíntese	2
I.1.c - Aplicações da fotoacústica na biologia	3
<u>I.2 - Teoria</u>	5
I.2.a - Mecanismos de geração do sinal fotoacústico	6
I.2.b - A equação de difusão	9
I.2.c - Absorção de Beer e absorção superficial	12
I.2.d - Componentes do sinal fotoacústico	14
1.2.d.α - Componente térmica	15
1.2.d.β - Componente bária	16
<b>II - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	20
II.1 - Montagem experimental	20
II.2 - Célula fotoacústica	22
II.3 - Célula fotoacústica aberta	22
II.4 - As amostras vegetais	25
<b>III - ESTUDO DE PARÂMETROS FÍSICOS DA FOTOSSÍNTESE ATRAVÉS DA FOTOACÚSTICA</b>	26
III.1 - A fotossíntese	26
III.2 - Modelo: fotoacústica e fotossíntese	32
III.3 - Saturação fotossintética	36
III.4 - Efeitos negativo e positivo: evolução de O <sub>2</sub> e energia armazenada	37
III.5 - Perda fotoquímica	40
III.6 - Indução fotossintética	42

<b>IV - RESULTADOS EXPERIMENTAIS</b>	
<b>EM PLANTAS DE EUCALIPTO</b>	<b>44</b>
IV.1 - Informações gerais sobre o eucalipto	44
IV.1.a - Introdução	44
IV.1.b - Fotoinibição	45
IV.1.c - Materiais e métodos	45
IV.1.d - Objetivos	46
IV.2 - Indução fotossintética	47
IV.3 - Fotoinibição em plantas de eucalipto	54
IV.4 - Curvas de saturação	59
<b>V - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>65</b>
<b>APÊNDICE I - O Efeito Emerson</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>70</b>

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho se divide em cinco partes principais. Na **Fundamentação**, buscou-se localizar a pesquisa num contexto histórico, apresentando os antecedentes do encontro entre fotoacústica e fotossíntese e as razões que motivaram o estudo efetuado. Além disso, apresenta-se a base teórica que sustenta o trabalho. Em **Materiais e métodos**, detalha-se a configuração experimental necessária para o estudo da fotossíntese através da fotoacústica. O terceiro capítulo, **Estudo de parâmetros físicos da fotossíntese através da fotoacústica**, fala dos diversos efeitos que podem ser observados no estudo fotoacústico das plantas, explicando quais as informações que podem ser extraídas de cada medida efetuada. A seguir, mostra-se os **Resultados experimentais em plantas de eucalipto**. Uma análise global da pesquisa é feita no último capítulo, **Conclusões e perspectivas**, onde também se procura apontar possíveis direções a serem seguidas no estudo, de agora em diante.

# CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO

## I.1 - Histórico

### I.1.a - Fotoacústica

Alexander Graham Bell descobriu o efeito fotoacústico em 1880 [1]. Trabalhando em seu fonofone, Bell percebeu que a incidência de luz solar modulada (a 1000 Hz) num sólido em forma de diafragma conectado a um tubo produzia um som. Posteriormente, Bell estudou o efeito fotoacústico em líquidos e gases e mostrou a influência da absorção de luz por um material na intensidade do sinal acústico observado.

No século XIX, sabia-se que o aquecimento de um gás (através da absorção de luz) numa câmara fechada gerava mudanças de pressão e volume nesse gás. O efeito fotoacústico em líquidos e sólidos, no entanto, foi alvo de diversas teorias. Rayleigh acreditava que o efeito se devia a um movimento mecânico no sólido. Bell dizia que a luz modulada incidente numa amostra porosa expandia as partículas desta, provocando um ciclo de expulsão e reabsorção do ar nos poros. Foram contestados por Preece [2], que após suas experiências sugeriu a expansão e contração do gás dentro da célula fotoacústica como causadores do efeito. Mercadier [3] concluiu que o aquecimento periódico fazia vibrar a camada de gás em contato com a amostra (esta é a idéia básica utilizada para explicar o modelo da *difusão térmica*, como será visto adiante).

A falta de detetores apropriados para o sinal fotoacústico (usava-se o próprio ouvido) transformou a descoberta em mera curiosidade. O interesse pelo estudo da fotoacústica só foi retomado com a invenção do microfone. Mesmo assim, as pesquisas na área se restringiram a aplicações em gases até 1973, quando se iniciaram estudos de espectroscopia em sólidos utilizando o efeito fotoacústico (Rosencwaig, [4]). Com o surgimento da teoria do efeito fotoacústico em sólidos, o chamado Modelo Rosencwaig-Gersho [5], a técnica passou a ser empregada nas mais diversas aplicações.

## I.1.b - Fotossíntese

A fotossíntese, ou síntese de matéria orgânica por plantas em presença de luz, é o processo básico da vida na Terra. Criação de vida a partir de materiais inorgânicos, reabastecimento do oxigênio atmosférico e armazenamento de energia luminosa solar (utilizada para a subsistência de diversos organismos) são razões mais que suficientes para justificar qualquer estudo sobre o tema. Conforme afirmam Rabinowitch e Govindjee em seu livro introdutório sobre fotossíntese [ref.6], o fato de a criação de vida implicar em um decréscimo local de entropia (matéria sendo agrupada de modo a formar organismos altamente ordenados) é um atrativo adicional para os pesquisadores. O sol atua como reservatório externo que fornece energia para a Terra, e as plantas são os organismos capazes de converter a energia luminosa em energia química.

Até o final do século XVIII, a opinião de Aristóteles sobre o crescimento das plantas ainda era aceita: ele havia afirmado que estas se alimentavam de uma substância do solo chamada “humus”. Por volta de 1770 [6], o químico inglês Joseph Priestley colocou sementes de hortelã num recipiente fechado de vidro contendo água e “ar danificado pela queima de velas”. Notando que as plantas cresciam nessas condições, algumas semanas depois inseriu uma vela acesa na montagem e verificou que esta “queimava perfeitamente bem”. Concluiu dessa observação que as plantas poderiam restaurar o “ar danificado” (ou seja, produzir oxigênio, como hoje sabemos).

Quando soube do estudo de Priestley, o médico alemão Jan Ingenhousz resolveu fazer suas próprias experiências. Em 1779, realizou nas proximidades de Londres uma série de estudos e publicou um livro intitulado “*Experiments Upon Vegetables, Discovering Their Great Power of Purifying the Common Air in Sunshine and Injuring It in the Shade and at Night*”.

Ingenhousz havia descoberto que as plantas “purificavam o ar” na presença da luz do sol, mas na sombra ou à noite respiravam como os animais. Mais que isso, apontava as folhas verdes como as principais responsáveis pelo processo (hoje sabemos que a clorofila é um pigmento fundamental para a fotossíntese). No entanto, foi o pastor suíço Jean Senebier que, anos depois, notou a importância da presença de gás carbônico para que a reação química ocorresse. Ainda faltava descobrir o mais comum dos reagentes: a água.

Em 1804, o suíço Théodore de Saussure mostrou que a soma dos pesos da matéria orgânica e do oxigênio produzidos pelas plantas era muito maior que o peso do gás consumido (gás carbônico). Partindo do princípio já conhecido de que o peso dos produtos da reação devia ser igual ao peso dos reagentes, concluiu que a água também era um reagente da fotossíntese, uma vez que as plantas em seus experimentos só recebiam água e ar. Quarenta anos depois, o alemão Julius Mayer partiu de sua recém-formulada lei de conservação da energia para afirmar que as plantas armazenavam a energia luminosa solar na forma de energia química. Assim, finalmente foi possível escrever uma equação para o balanço material e energético da fotossíntese:



### I.1.c - Aplicações da Fotoacústica na Biologia

Levando em conta a história envolvendo a descoberta do efeito fotoacústico (no século XIX) e a compreensão da fotossíntese (iniciada no século XVIII), o encontro destas áreas pode ser considerado recente. Em 1976, Adams e colaboradores [7] extraíram clorofila de folhas de espinafre e obtiveram o espectro fotoacústico da solução preparada. Em 1978, Rosencwaig [8] mostrou que era possível obter o espectro fotoacústico da própria folha vegetal, colocando um pedaço desta numa célula fotoacústica fechada. No mesmo ano, Cahen e colaboradores [9] demonstraram a possibilidade de estudar o processo fotossintético através da fotoacústica.

Em 1982, Bults, Horwitz, Malkin e Cahen [10] estudaram a atividade fotossintética (evolução de gases) em folhas de tabaco através da técnica fotoacústica. A partir daí, sucederam-se diversos trabalhos em que a fotoacústica foi utilizada no estudo de sistemas vegetais. Podemos citar as seguintes aplicações:

- observação de estresse hídrico e estudos de desidratação em folhas - verificou-se que a deficiência de água na folha reduz o nível de oxigênio evoluído, aumentando significativamente a componente térmica do sinal fotoacústico [11];
- estudo do perfil de profundidade das folhas vegetais (evidenciando a existência da camada de cera nas folhas) [7, 12];
- análise da ação de herbicidas em plantas [12];
- estudo do efeito da toxidez metálica do solo em plantas de milho (através da espectroscopia fotoacústica) [13, 14];
- estudo da heterose em folhas de milho (medidas de indução fotossintética em folhas adaptadas ao escuro permitiram discriminar o milho híbrido de suas linhagens parentais) [15];
- medidas de evolução de oxigênio e energia armazenada em folhas [10, 15].

Em particular, obteve-se um grande avanço no estudo fotoacústico de sistemas vegetais com o desenvolvimento da *célula aberta* (OPC) [16].

## I.2 - Teoria

O efeito fotoacústico consiste na produção de som pela absorção de luz modulada (ou pulsada). A energia luminosa absorvida se converte em calor, provocando modulação de temperatura; esta, por sua vez, gera o efeito mecânico de expansão e contração periódicas, dando origem a ondas sonoras. Assim, o efeito fotoacústico investiga processos de desexcitação não radiativa que ocorrem num sistema periodicamente excitado por absorção de luz. Através do efeito fotoacústico, detecta-se variações de pressão correspondentes à modulação da temperatura.

Quando se começou a utilizar a técnica fotoacústica para estudar plantas, esperava-se observar apenas o efeito térmico resultante da conversão parcial da energia luminosa em calor (parte da energia seria armazenada para participar das reações fotossintéticas). No entanto, os estudos feitos permitiram concluir que o sinal fotoacústico observado refletia a ocorrência de outros efeitos além do térmico; particularmente, o processo da fotossíntese implica em liberação - ou absorção - de gás, o que produz mudanças de pressão no volume restrito da câmara fotoacústica. Este efeito de variação de pressão foi chamado de **efeito bórico**; é detetado em folhas, para frequências de modulação baixas (tipicamente dezenas de hertz), quando há uma fase gasosa adjacente à célula fotossintetizante, e se deve principalmente à produção de oxigênio (embora possa haver também absorção de oxigênio pelo fotossistema I).

Existem maneiras de observar separadamente cada uma dessas contribuições ao sinal fotoacústico (como será explicado mais adiante), o que permite extrair diferentes informações sobre o processo fotossintético:

- **sinal térmico** - fornece dados sobre a conversão de luz em calor e a energia armazenada;
- **sinal bórico** - permite monitorar a produção de oxigênio (que ocorre no *fotossistema II*) ou a absorção de oxigênio (no *fotossistema I*).

Por ser uma técnica não-destrutiva e muito sensível, a fotoacústica é um excelente método para se estudar fotossíntese (em particular a fotossíntese de folhas *in vivo* e *in situ*, utilizando-se a técnica da célula fotoacústica aberta, que veremos a seguir). Além disso, por ser um método que trabalha com sinais modulados, a fotoacústica apresenta as seguintes vantagens:

- **eliminam-se ruídos**, respostas moduladas em frequências diferentes da referência e respostas não-moduladas. Nos estudos em plantas, a respiração é contínua e, para as frequências de modulação utilizadas, a absorção do CO<sub>2</sub> não acompanha a modulação da luz (ver item 1.2.d);
- **pode-se mudar as condições da amostra** durante a medição, incidindo sobre esta luz não modulada (que não contribui diretamente para o sinal);
- **a dependência do sinal com a frequência** fornece o perfil de profundidade da amostra, além de permitir que se obtenha um sinal correspondente ao oxigênio evoluído ou à energia armazenada, conforme a frequência de modulação utilizada.

Há vários mecanismos de geração do sinal fotoacústico em sólidos:

- Difusão térmica
- Expansão térmica
- Flexão termoelástica
- Evolução de gases

No estudo de amostras vegetais, os principais mecanismos que devem ser considerados são a **difusão térmica** e a **evolução de gases**. Assim, veremos estes dois tópicos mais detalhadamente.

## I.2.a - Mecanismos de Geração do Sinal Fotoacústico

### 1) DIFUSÃO TÉRMICA

Radiação eletromagnética modulada é absorvida pela amostra sólida e convertida (total ou parcialmente) em calor. O calor modulado produzido na amostra difunde-se até o gás em contato com esta, dentro da célula fotoacústica. O modelo apresentado por Rosencwaig e Gersho [5] para a difusão térmica assume que a camada de gás mais próxima da amostra sofre expansão e contração periódicas, atuando como um pistão vibratório no restante do gás. As variações de pressão assim produzidas geram ondas acústicas captadas pelo microfone acoplado à célula fotoacústica (figura 1.1).

## **2) EXPANSÃO TÉRMICA**

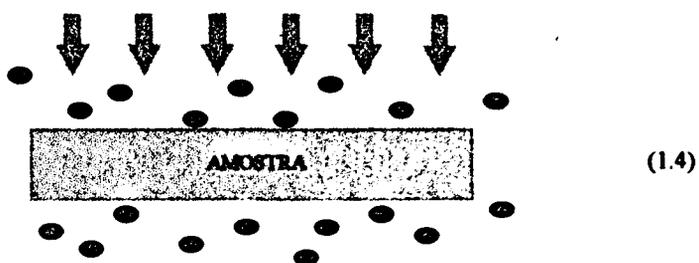
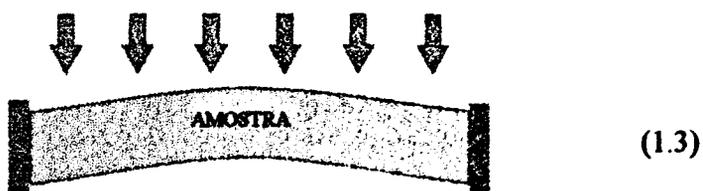
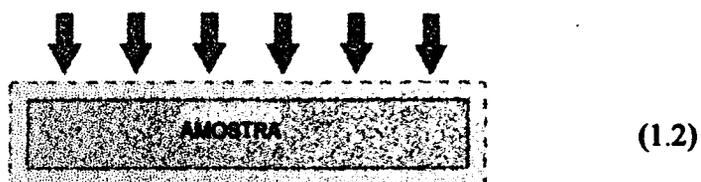
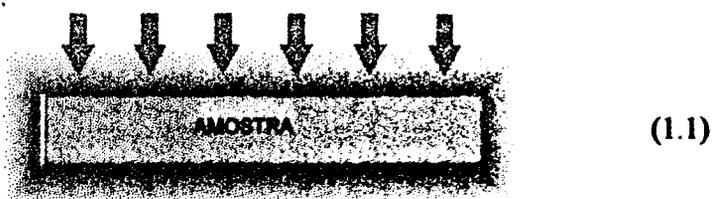
Segundo a teoria de McDonald e Wetsel [17], o aquecimento causado pela absorção de radiação modulada pode fazer a própria amostra expandir-se periodicamente; assim, a superfície da amostra apresentaria vibração mecânica, agindo como outro pistão vibratório além do considerado por Rosencwaig e Gersho. O efeito de expansão térmica (figura 1.2) é dominante nos casos de frequências de modulação altas e amostras com baixo coeficiente de absorção ótica, sendo normalmente desprezível nas medidas efetuadas em folhas vegetais.

## **3) FLEXÃO TERMOELÁSTICA**

A flexão termoelástica, considerada por Rousset e colaboradores [18], pode ser observada quando a absorção da luz modulada produz um gradiente de temperatura dentro da amostra. Esse gradiente, perpendicular à superfície da amostra, faz com que a expansão térmica sofrida por esta varie com a profundidade em relação à superfície iluminada. Deste modo, a amostra é flexionada periodicamente conforme a direção do gradiente de temperatura (figura 1.3), e essa flexão gera sinal acústico.

## **4) EVOLUÇÃO DE GASES**

Em 1982, Bults e colaboradores [10] observaram, através da técnica fotoacústica, que a incidência de luz em determinadas amostras pode induzir reações fotoquímicas que resultem na liberação (ou absorção) de gases. No caso das folhas vegetais, sob incidência de luz parte da energia absorvida se converte em energia química. Neste processo, que é a fotossíntese, há troca de gases entre a amostra e a atmosfera. O microfone da célula fotoacústica capta variações de pressão correspondentes às trocas gasosas entre a folha e o gás presente na câmara; deste modo, a evolução de gases contribui para o sinal observado (figura 1.4).



*Figuras 1.1 a 1.4 - Mecanismos de geração do sinal fotoacústico*

- (1.1)-Difusão Térmica
- (1.2)-Expansão Térmica
- (1.3)-Flexão Termoelástica
- (1.4)-Evolução de Gases

## I.2.b - A Equação de Difusão

O fluxo de calor pode ser expresso por:

$$\vec{\Phi}(\vec{r}, t) = -\kappa \vec{\nabla} T(\vec{r}, t) \quad (\text{eq.1.1})$$

onde  $\kappa$  é a condutividade térmica e  $T$  a temperatura. A variação da quantidade de calor  $Q$  com o tempo num volume unitário é correspondente ao fluxo de calor que o atravessa, mais a taxa de calor gerado (ou absorvido) por fontes (ou sumidouros) nesse volume:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = - \oint_s \vec{\Phi}(\vec{r}, t) \cdot d\vec{s} + \int_v s(\vec{r}, t) dV \quad (\text{eq.1.2})$$

onde o termo  $s(\vec{r}, t)$  representa as fontes de calor. Aplicando a primeira equação à segunda, obtemos

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = \oint_s \kappa \vec{\nabla} T(\vec{r}, t) \cdot d\vec{s} + \int_v s(\vec{r}, t) dV \quad (\text{eq.1.3})$$

Usando o teorema da divergência de Gauss,

$$\oint_s \vec{A} \cdot d\vec{S} = \int_v \vec{\nabla} \cdot \vec{A} dV \quad (\text{eq.1.4})$$

chega-se em

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = \int_v (\kappa \vec{\nabla} \cdot \vec{\nabla} T(\vec{r}, t) + s(\vec{r}, t)) dV \quad (\text{eq.1.5})$$

Usando-se

$$Q = mc\Delta T \Rightarrow \frac{\partial Q}{\partial t} = \int_v \rho c \frac{\partial T}{\partial t}(\vec{r}, t) dV \quad (\text{eq.1.6})$$

onde  $c$  é o calor específico e  $\rho$  a densidade do meio, obtém-se

$$\frac{1}{\alpha} \frac{\partial T}{\partial t}(\vec{r}, t) = \nabla^2 T(\vec{r}, t) + \frac{s(\vec{r}, t)}{k} \quad (\text{eq.1.7})$$

onde  $\alpha = k/\rho c$  é a difusividade térmica do meio.

A equação (1.7) é chamada de equação de difusão térmica.

A equação de difusão térmica em uma dimensão é dada por

$$\frac{\partial^2}{\partial x^2} T(x, t) - \frac{1}{\alpha} \frac{\partial}{\partial t} T(x, t) + \frac{s(x, t)}{\kappa} = 0 \quad (\text{eq.1.8})$$

onde o termo  $s/\kappa$  representa fontes de calor geradas no meio pela absorção da luz incidente. Considerando uma dependência temporal harmônica  $e^{j\omega t}$ , onde  $\omega = 2\pi f$ , sendo  $f$  a frequência de modulação da radiação incidente, obtém-se

$$\frac{1}{\alpha} \frac{\partial}{\partial t} T(x, t) = \frac{j\omega}{\alpha} T(x) e^{j\omega t} \quad (\text{eq.1.9})$$

O próximo passo é definir o **comprimento de difusão térmica**  $\mu = (\alpha/\pi f)^{1/2}$  e o **coeficiente complexo de difusão térmica**  $\sigma = (1+j)/\mu$ ; como  $\sigma^2 = j\omega/\alpha$ , pode-se escrever as seguintes equações respectivamente para meios com e sem fontes:

$$\frac{d^2 T(x)}{dx^2} - \sigma^2 T(x) + \frac{s(x)}{\kappa} = 0 \quad (\text{eq.1.10})$$

e

$$\frac{d^2 T(x)}{dx^2} - \sigma^2 T(x) = 0 \quad (\text{eq.1.11})$$

A figura 1.5 ilustra o esquema de uma célula fotoacústica convencional. Considera-se que o gás (g) e o suporte (b) não absorvem a radiação incidente; assim, a equação (1.10) se refere à amostra (s), sendo a equação (1.11) referente às regiões do suporte e do gás. A solução para a equação homogênea (1.11) na região do gás é

$$T(x) = T(0) e^{-\sigma_g x} \quad (\text{eq.1.12})$$

onde  $T(0)$  é a temperatura na interface amostra-gás ( $x = 0$ ). Verifica-se deste resultado que a amplitude de oscilação da temperatura é atenuada com a distância em relação à fonte de calor (amostra).

O **modelo unidimensional de Rosencwaig-Gersho** (*modelo RG*) considera que as espessuras do gás e do suporte na célula fotoacústica são muito maiores que seus comprimentos de difusão térmica ( $\mu_g$  e  $\mu_b$ ). Como as ondas que propagam o fluxo de calor modulado são exponencialmente atenuadas ao longo da distância de propagação, a uma distância  $2\pi\mu_g$  a modulação da temperatura no gás é desprezível. Assim, pode-se assumir que apenas a camada de gás localizada a uma distância  $x$  da amostra não superior a  $2\pi\mu_g$  responderá termicamente à modulação da temperatura na superfície da amostra. Deste modo, segundo o *modelo RG* somente a camada de gás mais próxima da amostra sofre expansão e contração periódicas, atuando como um pistão vibratório no resto do gás.

Para encontrar a temperatura na interface amostra-gás, resolve-se as equações de difusão para a amostra, o gás e o suporte aplicando as condições de contorno - continuidade da temperatura e do fluxo de calor nas interfaces. O resultado obtido para  $x = 0$  é [19]:

$$T(0) = \frac{\int_{-1}^0 [(b+1)e^{\sigma_s(1+\xi)} - (b-1)e^{-\sigma_s(1+\xi)}] s(\xi) d\xi}{\sigma_s \kappa [(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l}]} \quad (\text{eq.1.13})$$

onde  $g = \kappa_g \sigma_g / \kappa_s \sigma_s$  e  $b = \kappa_b \sigma_b / \kappa_s \sigma_s$ . Esta é a equação geral para a temperatura na interface amostra-gás.

Seguindo o modelo *RG*, a partir de  $T(0)$  calcula-se a temperatura média na camada de gás fronteiriça à amostra:

$$\bar{T}(t) = \frac{1}{2\pi\mu_g} \int_0^{2\pi\mu_g} T(0) e^{-\sigma_g x + j\omega t} dx \approx \frac{1}{2\pi\sqrt{2}} T(0) e^{j(\omega t - \pi/4)} \quad (\text{eq.1.14})$$

A variação de pressão na câmara fotoacústica é então calculada supondo-se que o gás é ideal e que a camada de gás com espessura  $2\pi\mu_g$  sofre expansão isobárica, comprimindo adiabaticamente o resto do gás. Assim, obtém-se

$$\delta P(t) = \frac{\gamma P_0}{\sqrt{2}} \frac{\mu_g T(0)}{l_g T_0} e^{j(\omega t - \pi/4)} \quad (\text{eq.1.15})$$

onde  $T_0$  e  $P_0$  são respectivamente temperatura e pressão médias no gás e  $\gamma$  é a razão entre os calores específicos do ar a pressão e a volume constantes.

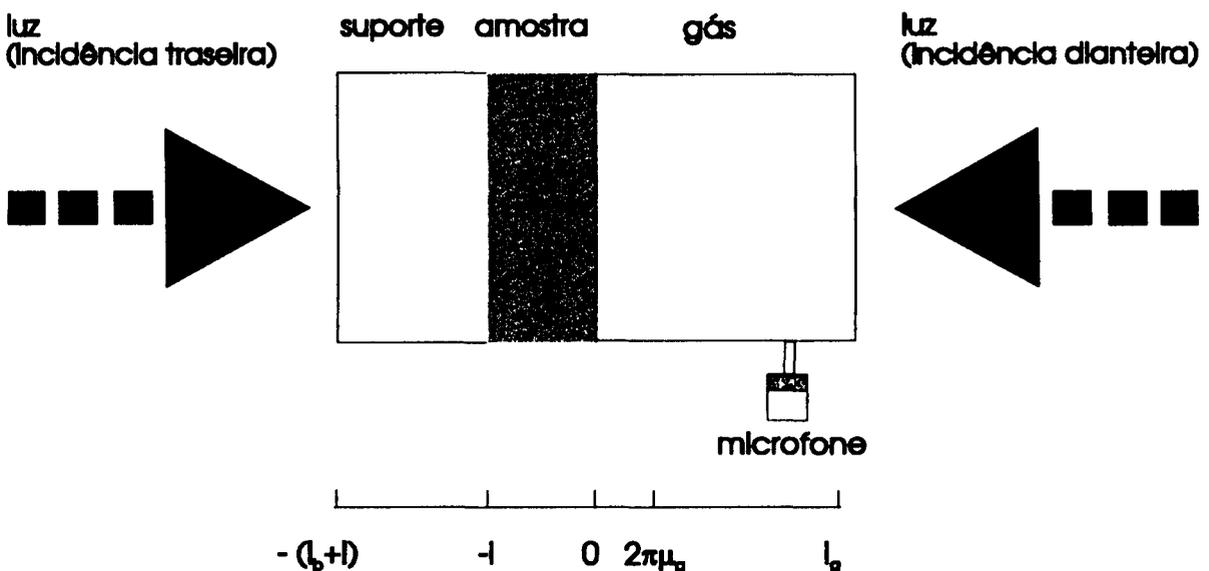


Figura 1.5 - Esquema da célula fotoacústica convencional

## 1.2.c - Absorção Volumétrica e absorção superficial

A radiação incidente num meio pode ser absorvida de diversas formas. Trataremos nesta seção dos casos relevantes para este trabalho: absorção de Beer e absorção superficial. Para cada um desses tipos de absorção, vamos considerar as alternativas de incidência dianteira e traseira, obtendo assim expressões que serão úteis mais adiante.

### ABSORÇÃO VOLUMÉTRICA

Segundo a Lei de Beer, se  $I_0$  é a intensidade da radiação incidente em  $x = 0$  (incidência dianteira na superfície da amostra), a intensidade na posição  $x$  é dada por

$$I(x) = I_0 e^{-\beta(\lambda)x} \quad (\text{eq.1.16})$$

onde  $\beta(\lambda)$  é o coeficiente de absorção ótica da amostra. A taxa de calor depositada por unidade de volume na posição  $x$  é

$$s(x) = \eta_t \left[ \frac{I(x+dx) - I(x)}{dx} \right] = \eta_t \frac{dI(x)}{dx} = \eta_t I_0 \beta e^{-\beta x} \quad (\text{eq.1.17})$$

onde  $\eta_t$  representa o *rendimento quântico térmico*, ou seja, a fração de energia absorvida que é convertida em calor.

Para incidência traseira, a absorção volumétrica fornece a seguinte expressão para a intensidade na posição  $x$ :

$$I(x) = I_0 e^{-\beta(\lambda)(1+x)} \quad (\text{eq.1.18})$$

sendo a taxa de calor depositada (por unidade de volume na posição  $x$ ) igual a

$$s(x) = \eta_t I_0 \beta e^{-\beta(1+x)} \quad (\text{eq.1.19})$$

Substituindo estes termos de fonte em (1.13), verifica-se que as expressões abaixo correspondem às soluções para a temperatura na superfície da amostra:

- para incidência dianteira,

$$T(0) = \frac{\eta_t \beta I_0}{\kappa_s (\sigma_s^2 - \beta^2)} \left[ \frac{(1-r)(1+b)e^{\sigma_s l} - (1+r)(1-b)e^{-\sigma_s l} + 2(r-b)e^{-\beta l}}{(1+g)(1+b)e^{\sigma_s l} - (1-g)(1-b)e^{-\sigma_s l}} \right] \quad (\text{eq.1.20})$$

onde  $r = \beta / \sigma_s$ . No caso experimental de interesse, ocorre absorção volumétrica na amostra vegetal. O suporte é o ar; assim,  $b = g \cong 0$ . Com estas aproximações, obtemos a expressão

$$T(0) = \frac{\eta_t \beta I_0}{\kappa_s (\sigma_s^2 - \beta^2)} \left[ 1 - r \frac{\cosh(\sigma_s l)}{\sinh(\sigma_s l)} + r \frac{e^{-\beta l}}{\sinh(\sigma_s l)} \right] \quad (\text{eq.1.21})$$

• para incidência traseira, temos

$$T(0) = \frac{\eta_t \beta I_0 e^{-\beta l}}{\kappa_s (\sigma_s^2 - \beta^2)} \left[ \frac{(1+r)(1+b)e^{\sigma_s l} - (1-r)(1-b)e^{-\sigma_s l} - 2(r+b)e^{\beta l}}{(1+g)(1+b)e^{\sigma_s l} - (1-g)(1-b)e^{-\sigma_s l}} \right] \quad (\text{eq.1.22})$$

Utilizando as aproximações especificadas anteriormente, chegamos em

$$T(0) = \frac{\eta_t \beta I_0 e^{-\beta l}}{\kappa_s (\sigma_s^2 - \beta^2)} \left[ 1 + r \frac{\cosh(\sigma_s l)}{\sinh(\sigma_s l)} - r \frac{e^{\beta l}}{\sinh(\sigma_s l)} \right] \quad (\text{eq.1.23})$$

## ABSORÇÃO SUPERFICIAL

Se considerarmos a absorção da radiação na superfície da amostra, o termo de fonte será dado por

$$s(x) = \eta_t \beta' I_0 \delta(x_0) \quad (\text{eq.1.24})$$

onde o termo adimensional  $\beta'$  representa o coeficiente de absorção superficial, e  $x_0$  é a posição da absorção.

Para resolver a equação (1.13), utiliza-se o termo de fonte dado por (1.24). Na configuração experimental utilizada (célula fotoacústica aberta, ver ítem II.3), poderá ocorrer absorção localizada na superfície da membrana do microfone; mais uma vez, o suporte é o próprio ar, e  $b = g \cong 0$ .

Tomando a incidência da radiação como dianteira, a absorção superficial ocorre em  $x_0 = 0$ ; para incidência traseira, a absorção superficial se dá em  $x_0 = -l$  (conforme fig.1.5). Com isso, obtém-se as seguintes expressões para a temperatura  $T_0$  [15]:

• para incidência dianteira,

$$T(0) = \frac{\eta_t \beta' I_0}{\kappa_s \sigma_s} \frac{\cosh(\sigma_s l)}{\sinh(\sigma_s l)} \quad (\text{eq.1.25})$$

- para incidência traseira,

$$T(0) = \frac{\eta_i \beta' I_0}{\kappa_i \sigma_i} \frac{1}{\sinh(\sigma_i l)} \quad (\text{eq.1.26})$$

Faz-se necessário observar que os cálculos efetuados até agora assumem geração instantânea de calor. Passemos a considerar a ocorrência de relaxação lenta num sistema de dois níveis. A radiação absorvida pela amostra leva elétrons do nível fundamental até o nível excitado; a desexcitação não-radiativa ocorrerá após um tempo  $\tau$ , o chamado **tempo de relaxação não-radiativa**. Pode-se mostrar [20] que as expressões para as fontes de calor neste processo de desexcitação lenta são análogas às obtidas para geração instantânea de calor, bastando multiplicar estas últimas pelo fator  $(1+j\omega\tau)^{-1}$ .

## 1.2.d - Componentes do Sinal Fotoacústico em Amostras Vegetais

O sinal fotoacústico gerado pelas amostras vegetais se deve essencialmente a dois mecanismos, responsáveis pelas duas componentes do sinal:

- **difusão térmica** - componente térmica, devida à conversão de parte da radiação modulada em calor, que é transmitido ao gás da câmara fotoacústica;
- **evolução de gases** - componente bária: parte da radiação absorvida atua no ciclo da fotossíntese; a excitação periódica do sistema fotossintético da folha gera oxigênio, liberado moduladamente e detetado pela célula fotoacústica.

Ambas as contribuições são originadas nos cloroplastos, no interior das células vegetais. O calor e o oxigênio aí produzidos se difundem até o gás através dos espaços intercelulares. Enquanto a componente térmica pode ser detectada imediatamente após a incidência da radiação modulada, a componente bária demanda um certo tempo para ser observada, devido à complexa cadeia de reações fotoquímicas que deve ser percorrida até a liberação do  $O_2$ . Quando a frequência de modulação é baixa (tipicamente  $f < 200\text{Hz}$ ), o sinal fotoacústico é dado pela soma das duas contribuições; para  $f > 200\text{Hz}$ , só a componente térmica é observada. A seguir, cada uma dessas contribuições será detalhada.

## 1.2.d.α - Componente Térmica

Quando a luz incidente é absorvida pela amostra, parte dessa luz se converte em calor, que gera modulação de temperatura e, conseqüentemente, expansão e contração periódicas na camada de gás fronteira. Em amostras sólidas, o calor modulado produzido na amostra precisa atravessá-la e chegar até sua superfície antes de gerar as ondas sonoras (que serão propagadas pelo gás em contato com a amostra). Como a amplitude das **ondas térmicas** (que propagam o fluxo de calor modulado) diminui exponencialmente com a distância, só a parcela de radiação absorvida a uma distância de até um comprimento de difusão térmica ( $\mu_s$ ) da superfície será responsável pela componente térmica do sinal fotoacústico.

Pode-se obter uma boa estimativa para o comprimento de difusão térmica  $\mu_s$  nas medidas em folhas vegetais utilizando o fato de que a difusividade térmica destas amostras é muito próxima à da água. Substituindo-se na expressão  $\mu_s = [\alpha/\pi f]^{1/2}$  a frequência de modulação utilizada ( $f = 17$  Hz) e a difusividade térmica da água ( $\alpha_{\text{H}_2\text{O}} = 1,4 \cdot 10^{-3}$  cm<sup>2</sup>/s), encontra-se  $\mu_s \cong 50$  μm.

Para se classificar uma amostra quanto ao regime térmico, pode-se comparar sua espessura  $l$  ao comprimento de difusão térmica:

- quando  $l > \mu_s$  , a amostra é **termicamente grossa**;
- quando  $l < \mu_s$  , a amostra é **termicamente fina** .

O efeito térmico será observado independentemente da frequência de modulação, mas a frequência determinará se a amostra é termicamente grossa ou fina. Para as frequências normalmente utilizadas nas medições em plantas (frequências superiores a 2 Hz), o comprimento de difusão térmica (dezenas de μm) é bem menor que a espessura das amostras ( $l$  é da ordem de centenas de μm); neste caso, temos amostras **termicamente grossas**.

Como as folhas vegetais são termicamente grossas, pode-se analisar o perfil de profundidade das mesmas. Isto é feito variando-se a frequência de modulação  $f$ , uma vez que o comprimento de difusão térmica é inversamente proporcional à raiz de  $f$ . Portanto, é possível controlar o alcance das ondas térmicas através de mudanças na frequência de modulação.

## 1.2.d.β - Componente Bórica

A contribuição bórica foi descoberta quando se observou que a incidência de luz contínua intensa provocava uma acentuada queda na amplitude do sinal fotoacústico (para luz modulada a baixa frequência). Paralelamente à queda na amplitude, via-se um grande deslocamento na fase do sinal. Este efeito indicava a existência de uma outra componente (além da fototérmica) relevante para o sinal fotoacústico - uma componente que era eliminada com a adição de luz contínua fotossinteticamente saturante. Como esta contribuição adicional refletia variações de pressão no interior da câmara fotoacústica, chamou-se o sinal assim gerado de **fotobórico** (ou, simplesmente, **bórico**).

Estas variações de pressão na câmara se originam da evolução (ou absorção) modulada de gases envolvidos no processo fotossintético, ou seja, produção de oxigênio e/ou absorção de gás carbônico. Pode-se associar a cada um destes gases um comprimento de difusão de concentração  $\mu_{\text{gas}} = [D/\pi f]^{1/2}$ , onde o coeficiente de difusão (D) do gás está associado a seu peso molecular. Como a difusão dos gases é lenta, a componente bórica só será efetivamente modulada para luz incidente com frequência de modulação inferior a 200 Hz.

A equação de difusão para o O<sub>2</sub> é dada por

$$D_{\text{O}_2} \nabla^2 \psi - \frac{\partial \psi}{\partial t} = - \frac{d[\text{O}_2]}{dt} \quad (\text{eq.1.27})$$

onde  $D_{\text{O}_2}$  é o coeficiente de difusão do oxigênio no meio,  $\psi$  representa a parte variável da concentração de O<sub>2</sub> e o termo à direita da equação é o termo de fonte. Em uma dimensão, a equação (1.27) pode ser reescrita como

$$D_{\text{O}_2} \frac{\partial \psi}{\partial x} - \frac{\partial \psi}{\partial t} = - \frac{d[\text{O}_2]}{dt} \quad (\text{eq.1.28})$$

Nas regiões fora do cloroplasto, o termo de fonte é nulo e a equação diferencial torna-se

$$D_{\text{O}_2} \frac{\partial \psi}{\partial x} - \frac{\partial \psi}{\partial t} = 0 \quad (\text{eq.1.29})$$

Tomando dependência temporal na forma  $e^{i\omega t}$ , a solução de (1.29) é

$$\psi(x) = \psi(0)e^{-\xi x} \quad (\text{eq.1.30})$$

com  $\xi = (1+j)/\mu_{\text{O}_2}$ , onde  $\mu_{\text{O}_2}$  (comprimento de difusão do O<sub>2</sub>) =  $(2 D_{\text{O}_2}/\omega)^{1/2}$ .

As condições de contorno utilizadas foram  $\psi(x \rightarrow \infty) = 0$  e  $\psi(x=0) = \psi(0)$ . Assim, nota-se que  $\psi(x)$  decai exponencialmente a partir de  $x = 0$ . O comprimento de difusão  $\mu_{O_2}$  depende do meio. Para frequência de modulação de 20 Hz, no ar,  $\mu_{O_2} \cong 500 \mu\text{m}$ . A 1 kHz,  $\mu_{O_2} \cong 80 \mu\text{m}$ . Como estas dimensões são grandes comparadas com as dos interstícios da folha, podemos considerar que a variação na concentração de  $O_2$  é uniforme no gás intercelular. Deste modo, a variação de pressão  $\delta P$  pode ser descrita por um único processo termodinâmico: o aumento isovolumétrico da pressão. Assim, a partir da lei dos gases, relaciona-se a variação de pressão na câmara que corresponde à componente bária do sinal com a variação da concentração gasosa:

$$V_i \delta P = RT \delta n \rightarrow \delta P = RT \frac{\delta n}{V_i} \rightarrow \delta P = RT \psi(0) \quad (\text{eq.1.31})$$

onde 0 significa interface da parede celular com o interstício gasoso e  $V_i$  é o volume intersticial.

No caso do  $O_2$  difundir-se até a interface folha/câmara fotoacústica, devido ao comprimento desta câmara ser bem maior que  $\mu_{O_2}$ , devemos considerar dois processos termodinâmicos: expansão isobárica de uma camada fronteira de comprimento  $2\pi\mu_{O_2}$ , seguida da compressão adiabática do restante da coluna de gás. Para o primeiro processo, pode-se escrever

$$P_0 A \delta l = \langle \delta n \rangle RT_0 = \frac{\langle \delta n \rangle}{V_0} l_g A RT_0 = \langle \psi \rangle l_g A RT_0 \quad (\text{eq.1.32})$$

onde  $V_0$  é o volume da câmara,  $A$  sua seção reta,  $l_g$  o comprimento da camada de gás,  $\delta l$  a variação de espessura na camada fronteira e

$$\langle \psi \rangle = \frac{1}{2\pi\mu_{O_2}} \int_0^{\infty} \psi(0) e^{-\xi x} dx = \frac{\psi(0)}{2\pi\mu_{O_2} \xi} = \frac{\psi(0)}{2\pi(1+j)} = \frac{\psi(0) e^{-j\pi/4}}{2\pi\sqrt{2}} \quad (\text{eq.1.33})$$

Substituindo a expressão acima em (1.32), obtém-se

$$\delta l = \frac{\psi(0) e^{-j\pi/4} l_g RT_0}{2\pi\sqrt{2} P_0} \quad (\text{eq.1.34})$$

Para a compressão adiabática,

$$PV^\gamma = \text{cte.} \rightarrow \delta P V^\gamma + \gamma P V^{\gamma-1} \delta V = 0 \rightarrow \frac{\delta P}{P} + \gamma \frac{\delta V}{V} = 0 \quad (\text{eq.1.35})$$

$$\delta P = \gamma \frac{P_0}{V} \delta V = \frac{\gamma P_0}{A l_g} A \delta l$$

$$\delta P = \frac{\gamma P_0 \delta l}{l_g} = \frac{\gamma P_0 \psi(0) e^{-j\pi/4}}{l_g 2\pi\sqrt{2} P_0} l_g RT_0 \quad (\text{eqs.1.36})$$

$$\delta P = \gamma RT_0 \frac{\psi(0) e^{-j\pi/4}}{2\pi\sqrt{2}} = \gamma RT_0 \langle \psi \rangle$$

Como o coeficiente de difusão do  $O_2$  é bem maior que o do  $CO_2$  (devido, por exemplo, à diferença no peso das moléculas), nas medidas realizadas a frequências da ordem de dezenas de Hz a evolução de oxigênio pode acompanhar a modulação da luz, enquanto a absorção de gás carbônico é essencialmente contínua. Assim, o sinal bórico representa principalmente a evolução do oxigênio. No entanto, como o coeficiente de difusão do  $O_2$  na água é da ordem de  $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , o comprimento de difusão  $\mu_{O_2}$  correspondente será menor que  $1 \text{ }\mu\text{m}$  para  $f \cong 200 \text{ Hz}$ ; isto impede que variações na concentração de  $O_2$  sejam percebidas nos interstícios para  $f > 200 \text{ Hz}$ .

Muitos fatores são coerentes com a interpretação dada para o sinal bórico:

- a mudança do ângulo de fase quando se aplica luz contínua indica a existência de pelo menos duas contribuições distintas (com diferentes ângulos de fase);
- a observação de transientes na contribuição não-térmica, durante o período de indução fotossintética, coerentes com o comportamento da evolução fotossintética do oxigênio;
- a necessidade de haver uma fase gasosa bem próxima às membranas fotossintéticas; infiltração de água nos espaços intercelulares elimina a contribuição não-térmica (pois dificulta a difusão do oxigênio);
- o comportamento da razão entre as amplitudes térmica e não-térmica, que depende da frequência de modulação;
- a correspondência com vários fenômenos relacionados à evolução de oxigênio.

A excitação da amostra pela absorção de luz modulada gera uma corrente alternada no microfone da célula fotoacústica. Matematicamente, a luz modulada pode ser descrita por

$$I = I_0 \text{sen}(2\pi ft) ,$$

onde  $I_0$  é a intensidade,  $f$  a frequência e  $t$  o tempo. O *amplificador síncrono* usa como referência em relação à luz modulada um sinal dado por

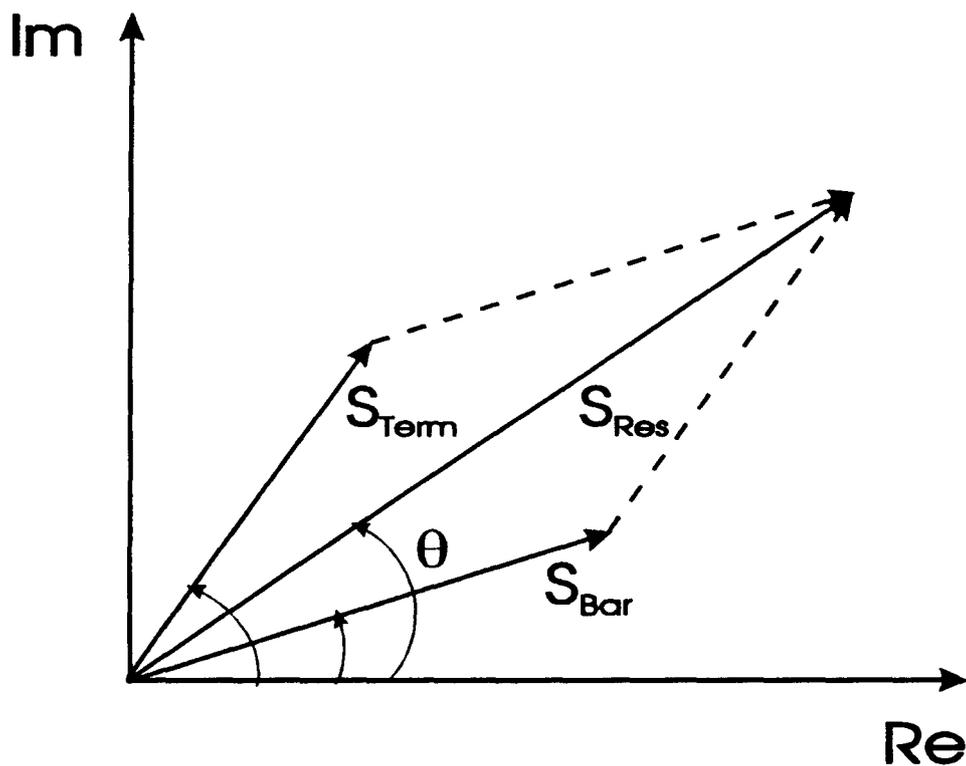
$$R = R_0 \text{sen}(2\pi ft - \varepsilon) ,$$

onde  $\varepsilon$  é o ângulo de fase ajustado arbitrariamente. De modo análogo, o sinal do microfone é representado por

$$S = S_0 \text{sen}(2\pi ft - \delta)$$

O *amplificador síncrono* mede a amplitude  $S_0$  e o desvio de fase  $[\delta - \varepsilon]$  entre o sinal do microfone e a referência. Assim, o sinal fotoacústico pode ser decomposto em coordenadas do plano complexo.

Na verdade, ao separar a contribuição b́arica da t́ermica nas medidas efetuadas, verifica-se que h́a uma diferença de fase entre as duas componentes do sinal fotoacústico. Por isso, deve-se ter em mente que, *quando o sinal fotoacústico é produto de diferentes contribuições, estas devem ser somadas como números complexos*.



*Figura 1.6 - As componentes térmica ( $S_{Term}$ ) e b́arica ( $S_{Bar}$ ) do sinal fotoacústico no plano complexo;  $S_{Res}$  é o sinal resultante*

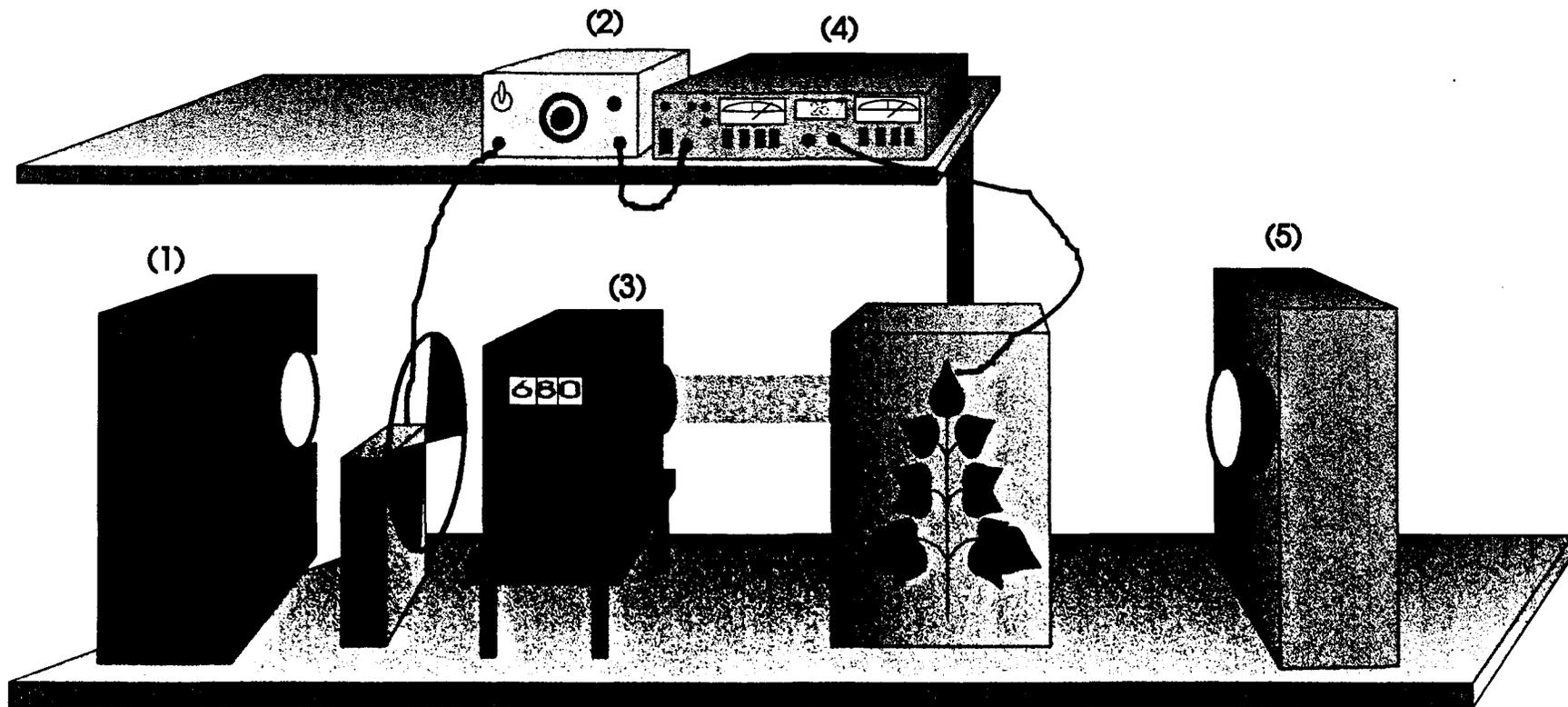
# CAPÍTULO II : MATERIAIS E MÉTODOS

## II.1 - Montagem Experimental

A montagem experimental utilizada para observação do efeito fotoacústico é apresentada na figura 2.1. Observe-se que há duas fontes de luz: uma lâmpada de arco de Xenônio (Oriel, mod.6128, 1000W) e uma lâmpada de filamento de Tungstênio (Ushio / ELC, 250W). À frente da lâmpada de Xenônio, coloca-se um modulador (*chopper*, PAR, mod.192). Este modulador tem uma célula fotoelétrica responsável pelo sinal de referência da modulação. A fase do sinal fotoacústico será dada em relação a esta referência.

Para obter luz modulada em um comprimento de onda específico, utiliza-se um monocromador (Oriel, mod.77250). A abertura de fenda selecionada permite controlar a resolução do comprimento de onda; a resolução utilizada neste trabalho foi de  $\lambda \pm 5$  nm. Filtros óticos limitam a luz emitida pela lâmpada de filamento à faixa visível do espectro. Usa-se lentes e espelhos para focalizar cada feixe luminoso num dos ramos de entrada de um cabo ótico bifurcado, cuja extremidade oposta é posicionada sobre a célula fotoacústica. É importante garantir que a intensidade da luz contínua branca seja suficientemente alta (tipicamente  $200 \text{ W/m}^2$  ou maior), para que se possa saturar a reação fotossintética (este assunto será tratado no item III.3, *saturação fotossintética*).

O modulador e o microfone da célula fotoacústica são conectados a um amplificador síncrono (*lock-in*, PAR-EG&G, mod.5210) que deste modo recebe informações sobre a frequência de referência e o sinal fotoacústico. O amplificador síncrono mede simultaneamente a amplitude e a defasagem do sinal do microfone em relação à referência fornecida pelo modulador, e é conectado (via GPIB) a um microcomputador para aquisição dos dados experimentais.



- (1)-Lâmpada de Xenônio
- (2)-Modulador
- (3)-Monocromador
- (4)-Amplificador Síncrono
- (5)-Lâmpada de Tungstênio

Figura 2.1 - Montagem experimental para medidas fotoacústicas

## II.2 - Célula Fotoacústica

A célula fotoacústica consiste de uma câmara com uma reentrância na qual é colocada a amostra; esta câmara é ligada a um microfone através de um canal de ar. A modulação da pressão gera um movimento oscilatório no diafragma do microfone; isto é detetado pelas mudanças na capacitância entre o diafragma e a placa metálica fixa montada atrás deste. Para garantir o isolamento acústico, a cavidade é geralmente vedada com uma janela transparente e anéis de borracha (*o-rings*, fig.2.2).

O volume de gás (ar) na câmara precisa ser pequeno, para se detectar a expansão e contração periódicas na camada próxima à amostra com maior sensibilidade. O problema é que a fotossíntese implica em absorção do CO<sub>2</sub> contido na câmara, e mudanças na atmosfera local podem comprometer os resultados experimentais. Nas células fotoacústicas convencionais, o problema é contornado expondo-se parte da folha ao exterior - o CO<sub>2</sub> é carregado por difusão lateral - ou bombeando CO<sub>2</sub> (com o auxílio de uma válvula) na câmara, entre as medições (durante as medições, o bombeamento provocaria ruído no sinal fotoacústico).

Estudos fotoacústicos em sistemas fotossintéticos são feitos através de medidas em discos de folhas ou suspensões aquosas. A análise de soluções aquosas é complexa: para obter respostas de amplitude razoável, precisa-se de altas concentrações de clorofila, o que dificulta a manipulação e reprodutibilidade do experimento. Isso é contornado posicionando-se tais amostras sobre um suporte sólido (como um filtro de papel, por exemplo). Folhas são melhores amostras para análise.

## II.3 - Célula Fotoacústica Aberta (OPC)

A célula fotoacústica aberta [16, 21] (OPC, fig.2.3), substitui as células convencionais com vantagens. O detetor dos sinais fotoacústicos é um microfone de eletreto comercial, de fácil aquisição e boa sensibilidade (10 mV/Pa). Este microfone consiste em um diafragma de eletreto metalizado (espessura da ordem de 10 µm, com filme metálico de 50-100 nm) e uma placa de metal separados por uma camada de ar de 45 µm.

A entrada de som é um orifício circular com diâmetro de 3 mm e a câmara de ar adjacente à face metalizada do diafragma tem 7 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Um resistor conecta a camada metálica da membrana à placa metálica de fundo. As oscilações de pressão na câmara de ar provocam deflexões na membrana que geram uma voltagem através do resistor. Esta voltagem passa por um pré-amplificador FET interno ao microfone.

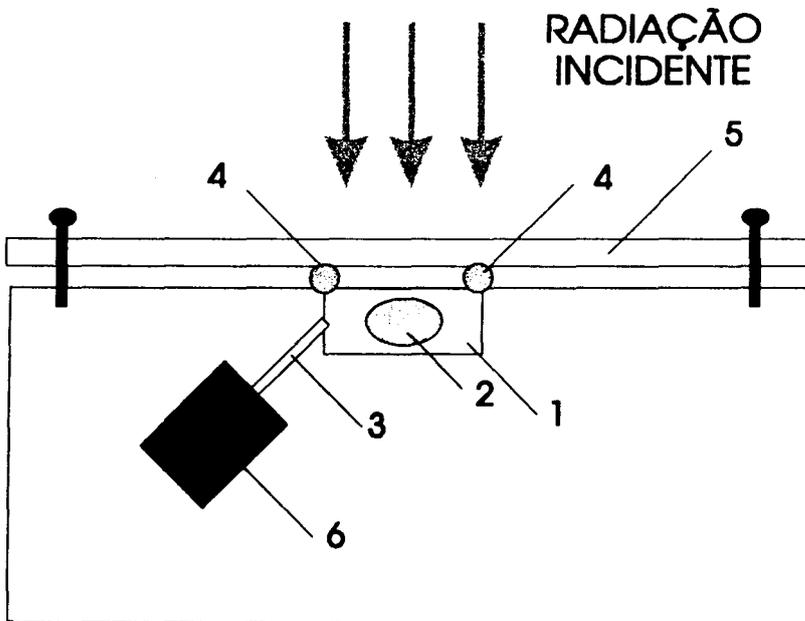
A principal vantagem da OPC é o fato de que a própria amostra veda a câmara. Deste modo, a medida pode ser feita sem que se precise cortar uma folha da planta, ou seja, torna-se possível realizar medidas *in vivo* e *in situ*. Para evitar vazamento de ar (que comprometeria a precisão das medidas), aplica-se graxa de silicone nas bordas da câmara para prender a amostra, vedando a câmara.

Outro benefício verificado é que a configuração da OPC minimiza a mudança da atmosfera interna da câmara (na montagem convencional a absorção do CO<sub>2</sub> contido na câmara é problemática, como vimos), pois trabalha-se com a folha inteira, e parte desta fica exposta ao exterior, ocorrendo captação do CO<sub>2</sub> externo. Uma vantagem adicional é a economia e praticidade do equipamento, que se baseia no microfone de eletreto, de baixo custo.

Os resultados das medidas de evolução fotossintética de oxigênio através da técnica fotoacústica são relativos. Têm grande utilidade na comparação entre plantas diferentes, onde "diferentes" pode indicar espécies ou tratamentos diversos. No entanto, pode-se obter resultados absolutos, sendo necessário para tanto calibrar a célula fotoacústica, relacionando-a a um detector apropriado. Pereira e colaboradores [22] utilizaram o eletrodo de Clark para realizar este tipo de calibração, a fim de quantificar o oxigênio produzido pelas folhas vegetais em estudo. Utilizando dados apresentados nesta referência, pode-se obter a seguinte correlação entre a componente bária do sinal fotoacústico,  $\Delta S$ , e a taxa de oxigênio evoluído:

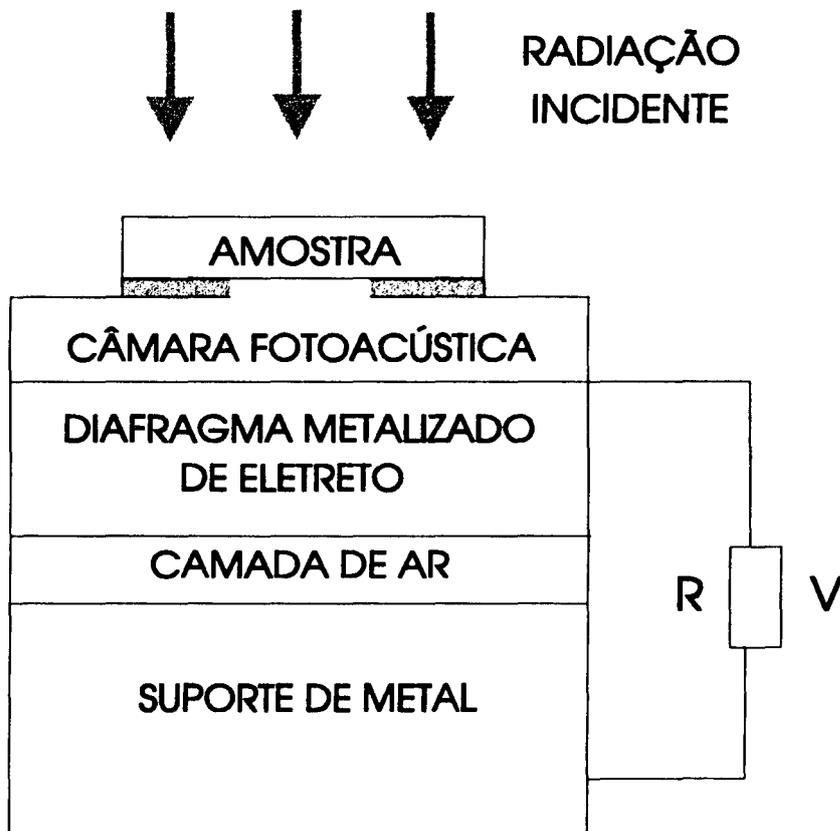
$$\text{Taxa de O}_2 (\mu\text{g/s.m}^2) = 0,126 \cdot \Delta S (\mu\text{V})$$

Uma vez feita a calibração, a técnica da OPC permite que se obtenha valores absolutos da produção de oxigênio para amostras vegetais *in vivo* e *in situ*. A sensibilidade da técnica foi comprovada em medidas de O<sub>2</sub> evoluído fotossinteticamente em folhas de milho [23]. Isso foi feito incidindo-se luz monocromática ( $\lambda = 680\text{nm}$ ) até que o sistema entrasse em equilíbrio, fornecendo leitura constante. As medidas (feitas com o eletrodo e, logo após, com a célula fotoacústica) foram repetidas para diversas intensidades luminosas.



1 - Câmara fotoacústica ; 2 - amostra ; 3 - duto ;  
4 - anel de borracha ; 5 - janela ; 6 - microfone

*Figura 2.2 - Célula fotoacústica convencional*



*Figura 2.3 - Célula fotoacústica aberta*

## II.4 - As Amostras Vegetais

Como foi dito anteriormente, o uso da célula fotoacústica aberta permite realizar medições *in vivo* e *in situ*. As amostras vegetais são plantadas em pequenos recipientes e aclimatadas em estufas até atingirem idade e tamanho adequados para o estudo fotoacústico. É desejável que as plantas apresentem altura em torno de 30 cm, para maior praticidade no manuseio; é difícil transportar e posicionar na montagem amostras com mais de 60 cm de altura. Por outro lado, a folha analisada deve ter uma largura mínima de 1 cm e máxima de 4 cm, para caber adequadamente sobre a célula fotoacústica aberta. É mais fácil estudar folhas lisas; folhas ásperas ou com muitas nervuras devem estar bem fixas sobre a célula fotoacústica, para evitar o vazamento do ar da câmara. A figura 2.4 ilustra uma amostra vegetal típica posicionada na montagem.

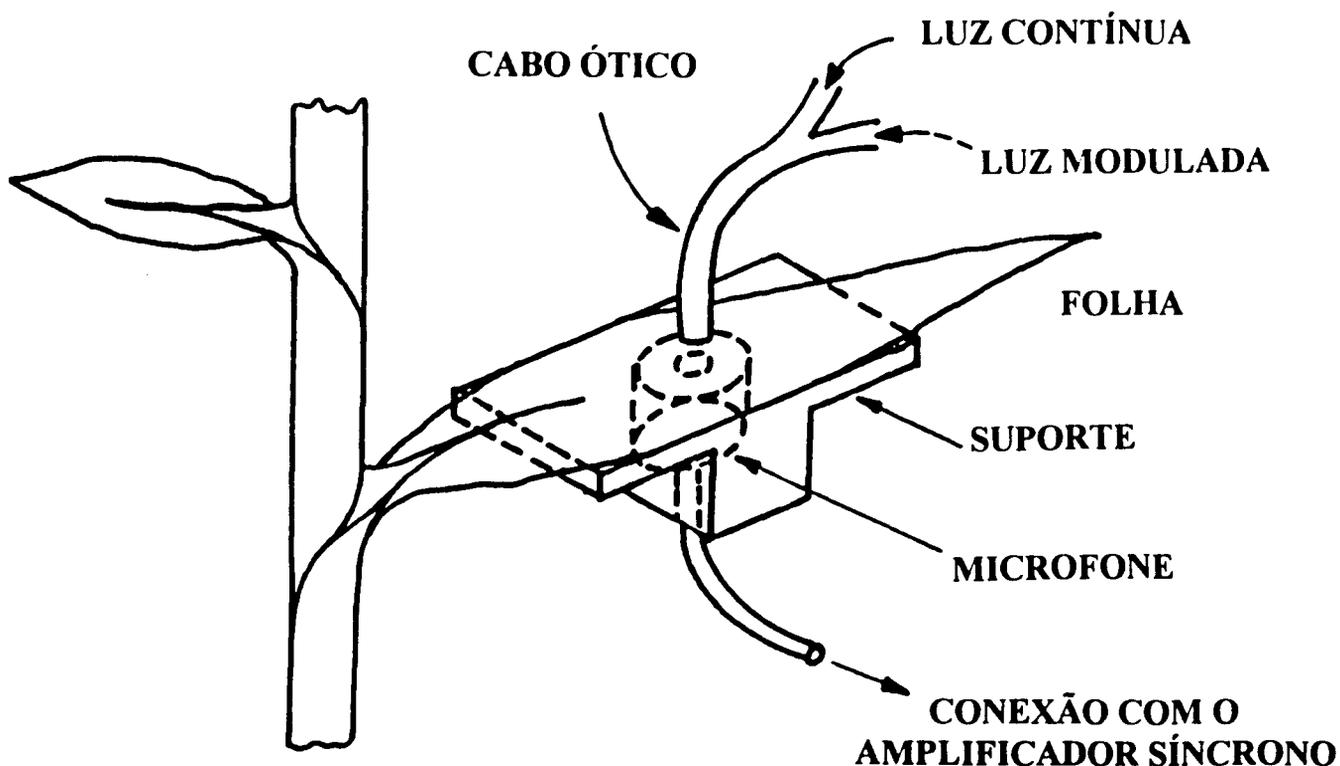


Figura 2.4 - Amostra vegetal posicionada na montagem fotoacústica

## II.4 - As Amostras Vegetais

Como foi dito anteriormente, o uso da célula fotoacústica aberta permite realizar medições *in vivo* e *in situ*. As amostras vegetais são plantadas em pequenos recipientes e aclimatadas em estufas até atingirem idade e tamanho adequados para o estudo fotoacústico. É desejável que as plantas apresentem altura em torno de 30 cm, para maior praticidade no manuseio; é difícil transportar e posicionar na montagem amostras com mais de 60 cm de altura. Por outro lado, a folha analisada deve ter uma largura mínima de 1 cm e máxima de 4 cm, para caber adequadamente sobre a célula fotoacústica aberta. É mais fácil estudar folhas lisas; folhas ásperas ou com muitas nervuras devem estar bem fixas sobre a célula fotoacústica, para evitar o vazamento do ar da câmara. A figura 2.4 ilustra uma amostra vegetal típica posicionada na montagem.

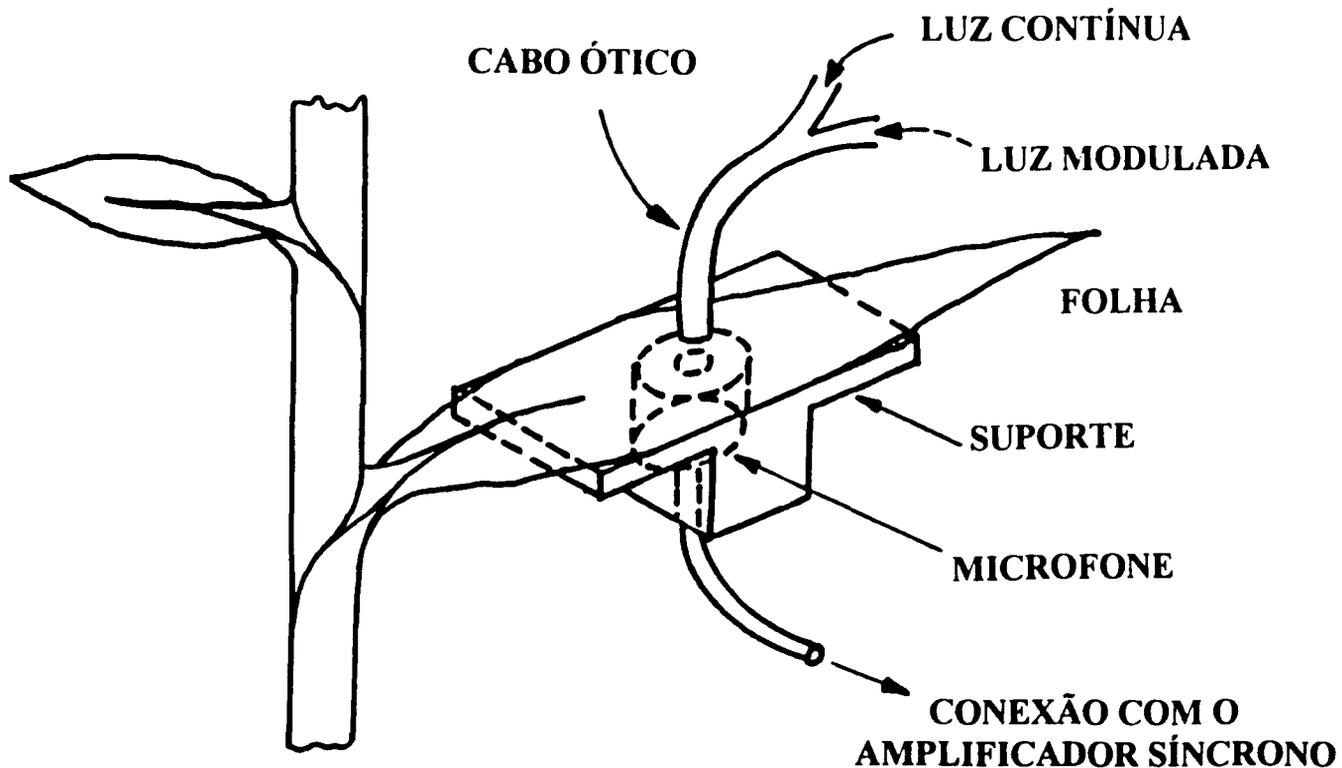


Figura 2.4 - Amostra vegetal posicionada na montagem fotoacústica

# CAPÍTULO III : ESTUDO DE PARÂMETROS FÍSICOS DA FOTOSSÍNTESE ATRAVÉS DA FOTOACÚSTICA

## III.1 - A Fotossíntese

O sol fornece a radiação utilizada pelas plantas na fotossíntese. Este processo é vital para o homem e os animais, que dependem do consumo de oxigênio para sua subsistência. No entanto, a característica fundamental da fotossíntese não é a liberação de oxigênio, e sim a produção e armazenamento de energia química pelas plantas, enquanto os outros seres vivos a convertem em outras formas de energia (calor, energia mecânica etc).

A fotossíntese consiste na conversão de parte da energia luminosa absorvida pelos vegetais em energia química seguida de liberação de oxigênio. Este processo pode ser resumido através da reação



onde o primeiro termo do lado direito representa os produtos sintetizados a partir da energia armazenada pela folha, e o último corresponde ao oxigênio liberado. Assim, a planta utiliza energia luminosa para remover elétrons da água, liberando oxigênio; estes elétrons são responsáveis pela redução do  $\text{CO}_2$  a carboidratos (matéria orgânica).

A fotossíntese ocorre nos **cloroplastos**, presentes nas células das folhas vegetais. Estas organelas apresentam diversos pigmentos que podem ser agrupados em três classes: as clorofilas, os carotenóides e (somente nas algas) as ficobilinas. Destes pigmentos, os mais importantes para a fotossíntese são as clorofilas.

A **clorofila a**, encontrada em todos os vegetais, possui picos de absorção em  $\lambda = 680\text{nm}$  e  $\lambda = 700\text{nm}$ , enquanto a **clorofila b**, encontrada em vegetais superiores e algas, tem picos de absorção em  $\lambda = 480\text{nm}$  e  $\lambda = 650\text{nm}$ . Os carotenóides apresentam picos de absorção entre  $400\text{nm}$  e  $500\text{nm}$ , e podem transmitir energia absorvida à clorofila *a*.

As figuras 3.1 e 3.2 mostram, respectivamente, o perfil de uma folha vegetal e um cloroplasto visto sob microscópio eletrônico (aumento de 38400x, imagem obtida em microscópio do Instituto de Biologia da Unicamp).

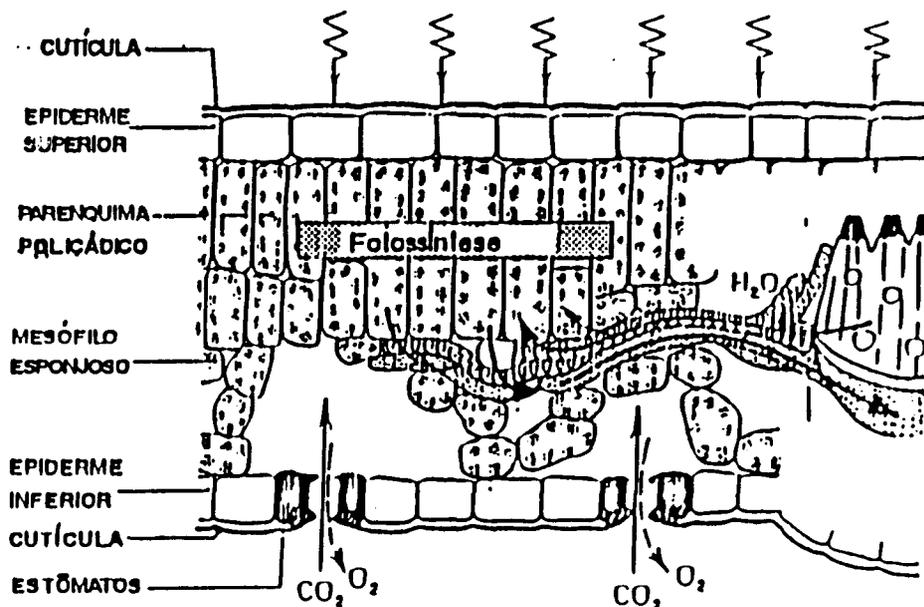


Figura 3.1 - Perfil de uma folha vegetal (planta de ciclo fotossintético C3)



Figura 3.2 - Cloroplasto visto sob microscópio eletrônico

# CAPÍTULO III : ESTUDO DE PARÂMETROS FÍSICOS DA FOTOSÍNTESE ATRVÉS DA FOTOACÚSTICA

## III.1 - A Fotossíntese

O sol fornece a radiação utilizada pelas plantas na fotossíntese. Este processo é vital para o homem e os animais, que dependem do consumo de oxigênio para sua subsistência. No entanto, a característica fundamental da fotossíntese não é a liberação de oxigênio, e sim a produção e armazenamento de energia química pelas plantas, enquanto os outros seres vivos a convertem em outras formas de energia (calor, energia mecânica etc).

A fotossíntese consiste na conversão de parte da energia luminosa absorvida pelos vegetais em energia química seguida de liberação de oxigênio. Este processo pode ser resumido através da reação

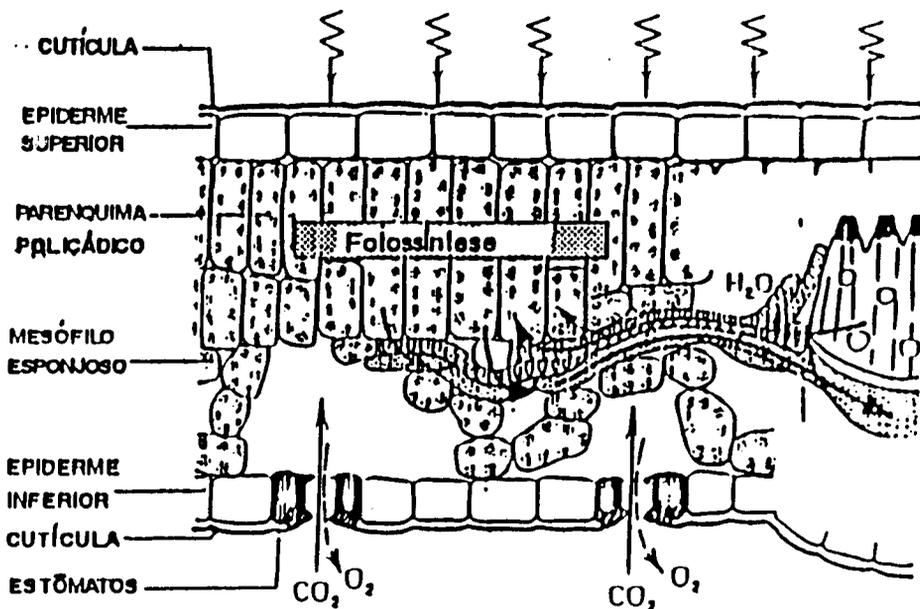


onde o primeiro termo do lado direito representa os produtos sintetizados a partir da energia armazenada pela folha, e o último corresponde ao oxigênio liberado. Assim, a planta utiliza energia luminosa para remover elétrons da água, liberando oxigênio; estes elétrons são responsáveis pela redução do  $\text{CO}_2$  a carboidratos (matéria orgânica).

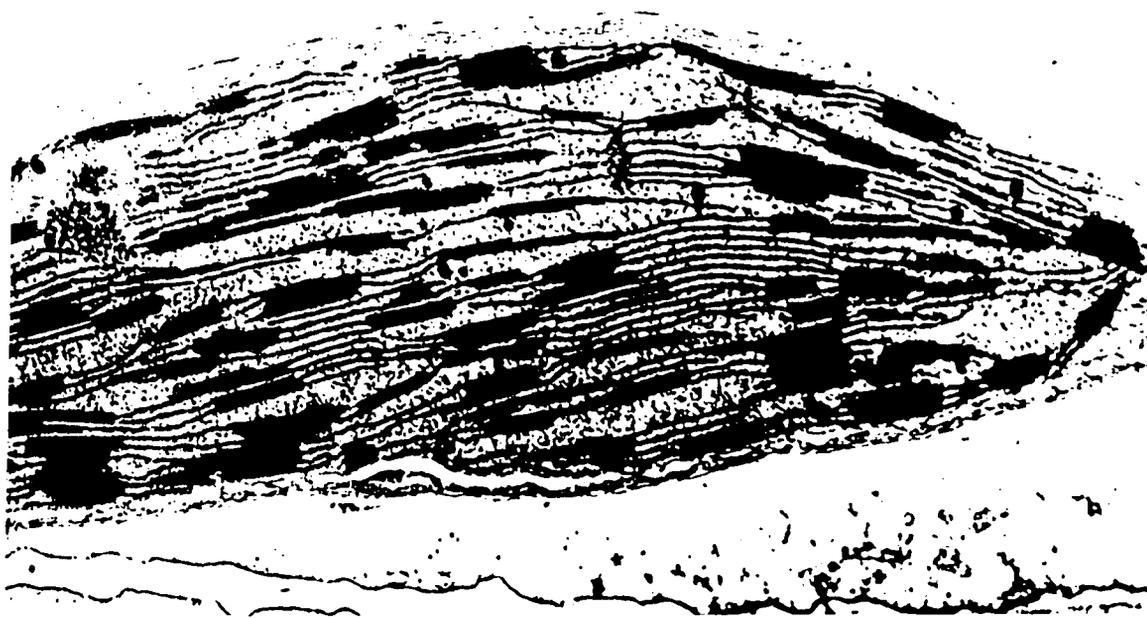
A fotossíntese ocorre nos **cloroplastos**, presentes nas células das folhas vegetais. Estas organelas apresentam diversos pigmentos que podem ser agrupados em três classes: as clorofilas, os carotenóides e (somente nas algas) as ficobilinas. Destes pigmentos, os mais importantes para a fotossíntese são as clorofilas.

A **clorofila a**, encontrada em todos os vegetais, possui picos de absorção em  $\lambda = 680\text{nm}$  e  $\lambda = 700\text{nm}$ , enquanto a **clorofila b**, encontrada em vegetais superiores e algas, tem picos de absorção em  $\lambda = 480\text{nm}$  e  $\lambda = 650\text{nm}$ . Os carotenóides apresentam picos de absorção entre  $400\text{nm}$  e  $500\text{nm}$ , e podem transmitir energia absorvida à clorofila *a*.

As figuras 3.1 e 3.2 mostram, respectivamente, o perfil de uma folha vegetal e um cloroplasto visto sob microscópio eletrônico (aumento de 38400x, imagem obtida em microscópio do Instituto de Biologia da Unicamp).

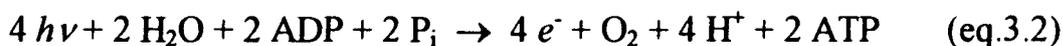


*Figura 3.1* - Perfil de uma folha vegetal (planta de ciclo fotossintético C3)



*Figura 3.2* - Cloroplasto visto sob microscópio eletrônico

A fotossíntese pode ser dividida em três processos principais [24]: formação de oxigênio livre, redução de NADP e conversão de gás carbônico em açúcar. No primeiro processo, a quebra da molécula de água para formação de oxigênio, parte da energia luminosa absorvida é utilizada para sintetizar moléculas de ATP (trifosfato adenosina) a partir de ADP (difosfato adenosina) e  $P_i$  (fosfato inorgânico). A reação que resume este processo é



As moléculas de ATP produzidas nesta reação são compostos armazenadores de energia: podem ser transformadas de volta em ADP e fosfato inorgânico, liberando 12,5 kcal/mol. Os elétrons liberados na reação (3.2) não podem reduzir diretamente moléculas de  $CO_2$  a  $C_nH_{2n}O_n$ , e uma segunda cadeia de transportadores de elétrons transforma a energia luminosa adicional necessária numa forma quimicamente útil. A energia luminosa adicionada no segundo processo da fotossíntese é utilizada para formar o NADPH, outro composto usado para armazenar energia e que pode facilmente ser oxidado, servindo como forte agente redutor. Este segundo processo é sumarizado pela reação



A fixação de gás carbônico e sua redução a açúcares é o principal resultado líquido da fotossíntese. Os açúcares formados são da forma  $C_nH_{2n}O_n$ , com  $n$  variando de 3 a 7, destacando-se em quantidade as chamadas hexoses (açúcares com 6 átomos de carbono). A formação da hexose requer 116 kcal/mol de energia. Esta energia é fornecida pela oxidação do NADPH e hidrólise do ATP, sintetizados respectivamente nas reações (3.3) e (3.2). A conversão de  $CO_2$  em açúcar é representada pela reação



A figura 3.3 (extraída da referência [24]) mostra o encadeamento das reações tratadas acima. A reação (3.4) consiste no chamado ciclo do carbono (ou ciclo de Calvin), ilustrado na figura e responsável pela produção de carboidratos.

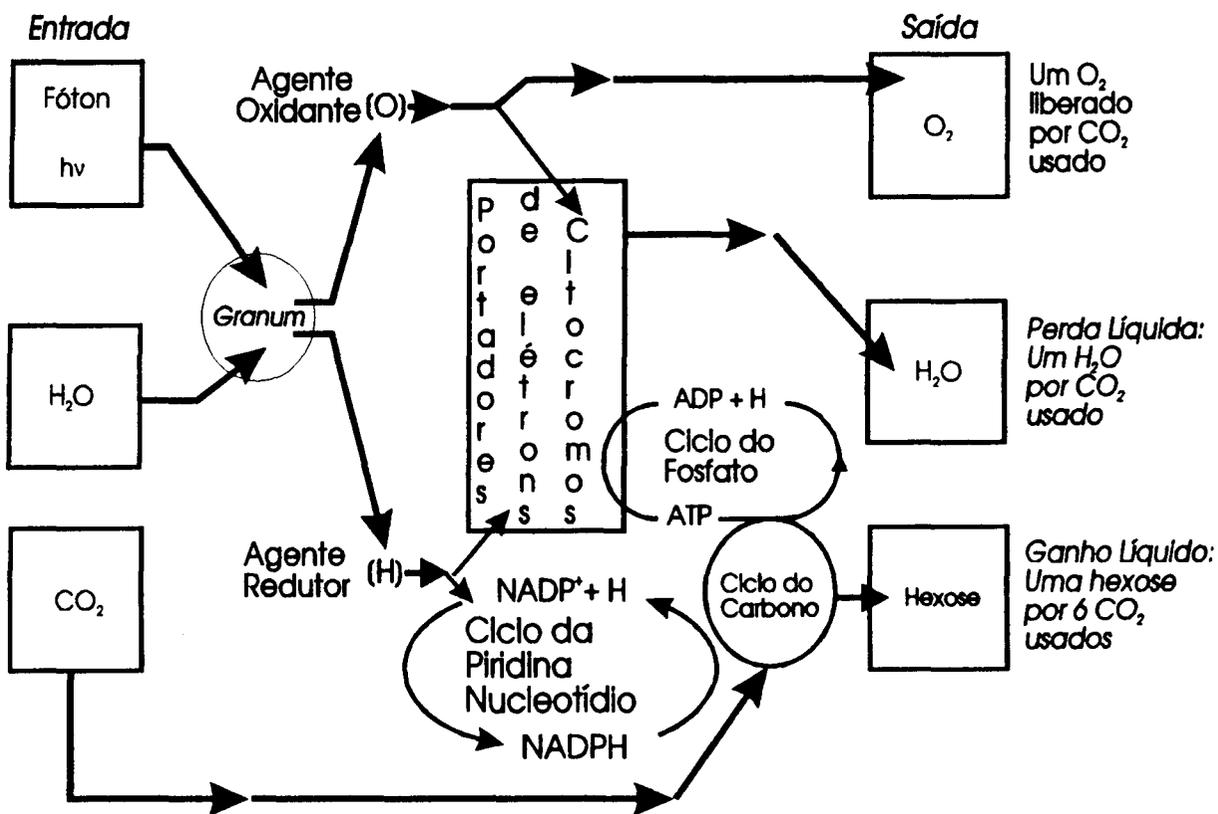
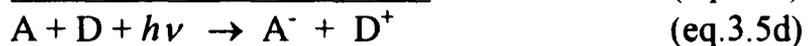


Figura 3.3 - Esquema ilustrativo dos 3 processos básicos da fotossíntese  
 ( extraído de "Biophysical Science", Ackerman/Ellis/Williams )

Dos três processos básicos analisados, a formação de O<sub>2</sub> e a formação de NADPH ocorrem sob incidência de energia luminosa nas plantas. Cada uma dessas reações requer um sistema pigmentar próprio para captar a energia necessária. Estes são os chamados **fotossistemas**, assim caracterizados [24, 25]:

- **fotossistema I (PS I)** - tem alta concentração de *clorofila a*, captando essencialmente radiações de comprimento de onda longo. É responsável pela formação do NADPH;
- **fotossistema II (PS II)** - possui maior concentração de *clorofila b*, sendo responsável pela captação de comprimentos de onda mais curtos e pela liberação do oxigênio fotossintético.

Os fótons que participam das reações fotossintéticas são absorvidos por diferentes pigmentos<sup>1</sup>, que assim passam para um nível excitado. Os pigmentos são acoplados de modo que a energia absorvida por um deles pode ser transferida para outro. Ao ser transferida para um centro de reação P700, a energia pode ser utilizada na primeira reação da fotossíntese. O elétron excitado pode ser transferido para um nível energético mais baixo numa molécula aceitadora A, e a molécula do pigmento pode então receber em seu nível fundamental um elétron de uma molécula doadora D. Temos assim a sequência de reações abaixo:



Um processo análogo é observado para um centro de reação P680. A luz que excita o fotossistema II resulta na transferência de um elétron da feofitina para o citocroma C550. Após doar quatro elétrons, esse doador toma quatro elétrons da água, permitindo a formação de uma molécula de oxigênio. Do citocroma C550, os elétrons são transferidos sucessivamente para o citocroma b559, a plastoquinona, o citocroma f e a plastocianina. A passagem da plastoquinona para o citocroma f fornece energia para formar ATP a partir de ADP.

A luz que atinge o fotossistema I promove a transferência sucessiva de um elétron da plastocianina para diversos compostos, até a enzima ferredoxina-NADP<sup>+</sup> redutase, responsável pela transferência final de elétrons na fotossíntese, a redução de NADP<sup>+</sup> a NADPH.

<sup>1</sup> As moléculas desses pigmentos são em geral nomeadas por uma letra seguida pelo número correspondente ao seu pico de absorção em nm.

As primeiras transferências de elétrons no fotossistema II ocorrem num tempo da ordem de centenas de picossegundos; a transferência do centro de reação P680 até o complexo de citocromas C550-b<sub>6</sub>-f leva milissegundos, e a redução do P680<sup>+</sup> demora cerca de 400 ns. Já a transferência do complexo de citocromas C550-b<sub>6</sub>-f ao centro de reação P700 (do fotossistema I) pode levar até 300 μs [26].

A figura 3.4 (também extraída da referência [24]) ilustra o fluxo de elétrons nos processos fotossintéticos; os transportadores de elétrons são mostrados em função dos respectivos potenciais de redução.

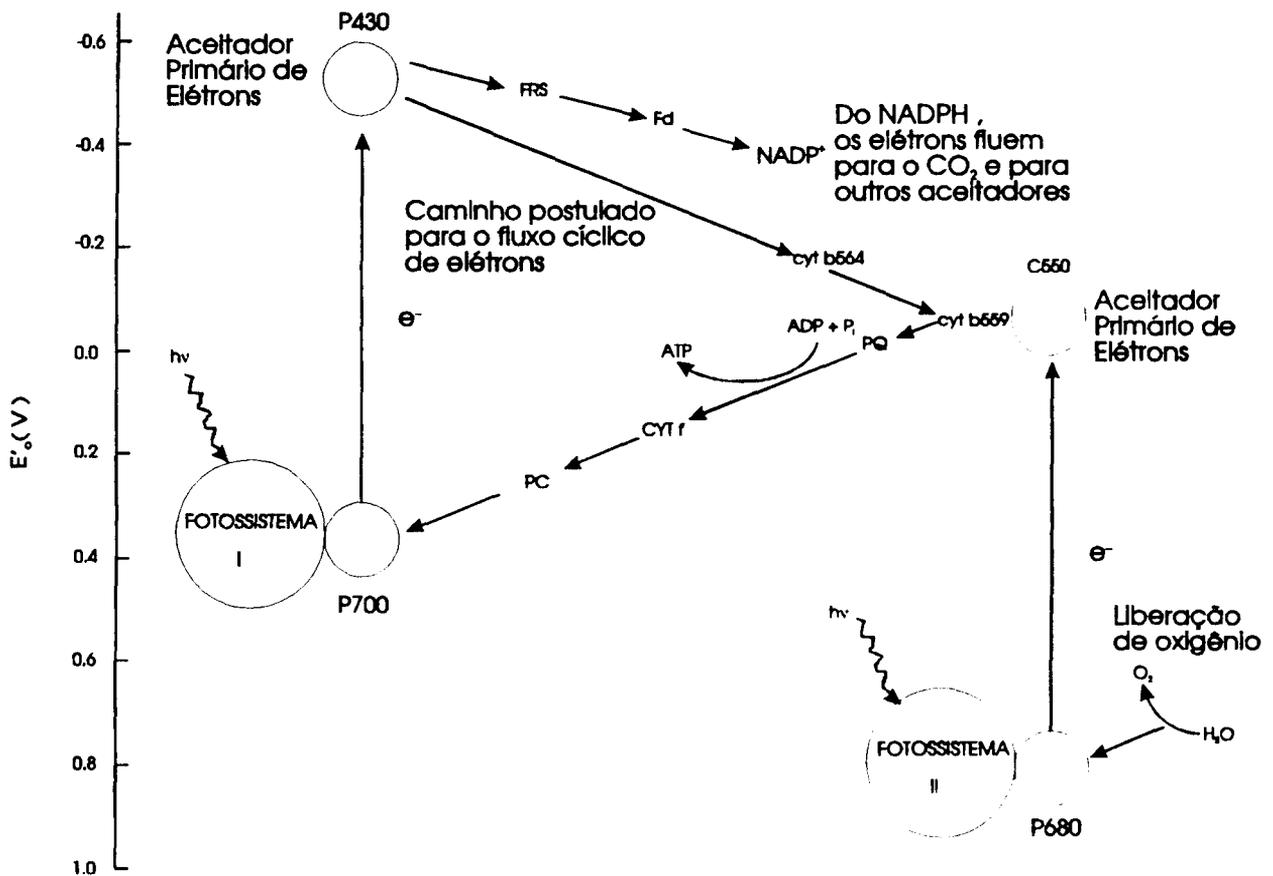


Figura 3.4 - Diagrama do fluxo de elétrons na fotossíntese  
( extraído de "Biophysical Science", Ackerman/Ellis/Williams )

## III.2 - Modelo: Fotoacústica e Fotossíntese

Nesta seção, apresentaremos um modelo para o estudo de parâmetros físicos da fotossíntese. Conforme visto na seção anterior, o processo fotossintético consiste numa intrincada sequência de reações das quais participam diversos pigmentos, cada um dos quais apresentando muitos níveis de energia. Não obstante, a seguir trataremos a fotossíntese utilizando um esquema simplificado de dois níveis energéticos, o que facilita o desenvolvimento do modelo teórico. A principal finalidade deste modelo é demonstrar a existência da saturação fotossintética, observada experimentalmente (ver capítulo IV).

Consideremos a incidência de radiação eletromagnética de comprimento de onda  $\lambda$  (650 nm, por exemplo) e potência  $F$  (em número de fótons por unidade de tempo) na superfície da folha vegetal. Os pigmentos (clorofilas em particular) atuam como antenas que, absorvendo a energia incidente, geram elétrons no estado excitado, com uma eficiência de conversão fóton-elétron designada por  $\epsilon$ . A energia absorvida pode ser transferida para outras moléculas (normalmente a própria clorofila) através da migração de elétrons ou por via excitônica, atingindo finalmente uma molécula doadora (de modo geral uma clorofila  $a$ ) que pode, então, ceder o elétron excitado ao primeiro aceitador da cadeia fotoquímica, a feofitina. Durante todo o processo, o elétron pode decair para o estado fundamental por via térmica ou por via radiativa (fluorescência). A eficiência quântica da via radiativa é muito baixa ( $\sim 3\%$ ), de modo que vamos aqui considerar apenas duas vias de relaxação: via térmica e via fotoquímica. A figura 3.5 mostra o esquema de níveis e as vias de desexcitação.

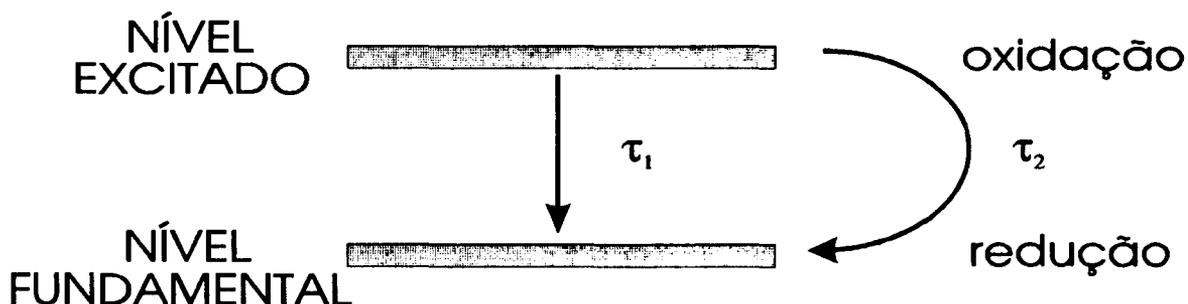


Figura 3.5 - Esquema das duas principais vias de decaimento de elétrons excitados no sistema fotossintético considerado (esquema simplificado de 2 níveis).

O tempo de vida do elétron é dado por

$$\tau_e = \frac{\tau_1 \tau_2}{\tau_1 + \tau_2} \quad (\text{eq.3.6})$$

onde  $\tau_1$  é o tempo de decaimento pela via térmica e  $\tau_2$ , pela via fotoquímica.

Considerando intensidades luminosas baixas o suficiente para não saturar a absorção, e desprezando os efeitos da intensidade no tempo de vida  $\tau_e$  (via  $\tau_2$ ), temos a seguinte equação diferencial para o número  $E$  de elétrons no estado excitado:

$$\frac{dE}{dt} = \varepsilon F - \frac{E}{\tau_e} \quad (\text{eq.3.7})$$

O termo  $\varepsilon F$  representa o número de elétrons excitados por unidade de tempo, enquanto o termo  $E/\tau_e$  representa os elétrons desexcitados por unidade de tempo, tomando absorção e desexcitação lineares.

A solução para (eq.3.7) é

$$E(t) = \varepsilon F \tau_e (1 - e^{-t/\tau_e}) \quad (\text{eq.3.8})$$

Da expressão acima vê-se que, se a folha for iluminada por um tempo  $t \gg \tau_e$ , o número de elétrons no estado excitado de equilíbrio será dado por

$$E_{eq} = \varepsilon \tau_e F \quad (\text{eq.3.9})$$

Os elétrons que decaem por reações fotoquímicas excitam os aceitadores de elétrons do sistema. Consideremos um número  $N$  de aceitadores,  $n$  dos quais se encontram excitados. A equação diferencial para o número de aceitadores excitados é

$$\frac{dn}{dt} = \frac{E}{\tau_2} - \frac{n}{\tau_q} \quad (\text{eq.3.10})$$

onde o primeiro termo à direita é o número de aceitadores que sofrem excitação por unidade de tempo e  $\tau_q$  é o tempo de vida dos aceitadores excitados.

Pode-se entender  $\tau_2$  (anteriormente definido como tempo de decaimento do elétron por reação fotoquímica) como sendo o *tempo de choque entre o elétron excitado e o aceitador*. Este varia com o fluxo  $F$  de fótons: para  $F$  tendendo a zero, o número  $n$  de aceitadores excitados tende a zero, e  $\tau_2$  tende a um valor  $\tau_{20}$ . Além disso, esse tempo de choque deve ser proporcional à fração de aceitadores ainda não excitados, dada por  $(N-n)/N$  (assim, se todos os aceitadores já estivessem excitados, os elétrons excitados levariam um tempo infinito para atingir um aceitador não excitado). Estes argumentos nos levam a

$$\tau_2(n) = \frac{N\tau_{20}}{(N-n)} \quad (\text{eq.3.11})$$

Substituindo as expressões (3.9) e (3.11) na equação diferencial (3.10), obtemos

$$\frac{dn}{dt} = \varepsilon \left( \frac{\tau_e}{\tau_{20}} \right) \left( 1 - \frac{n}{N} \right) F - \frac{n}{\tau_q} \quad (\text{eq.3.12})$$

Lembrando agora que assumimos  $\tau_e$  independente de F, podemos reescrevê-lo como

$$\tau_e = \frac{\tau_1 \tau_{20}}{\tau_1 + \tau_{20}} \quad (\text{eq.3.13})$$

A *eficiência quântica fotoquímica*  $\eta_0$ , definida para F tendendo a zero, é um parâmetro que indica a fração de energia absorvida utilizada nas reações fotoquímicas. Partindo das definições de  $\tau_{20}$  e  $\tau_e$ , a *eficiência quântica fotoquímica* é dada pela relação

$$\eta_0 = \frac{\tau_e}{\tau_{20}} = \frac{\tau_1}{\tau_1 + \tau_{20}} \quad (\text{eq.3.18})$$

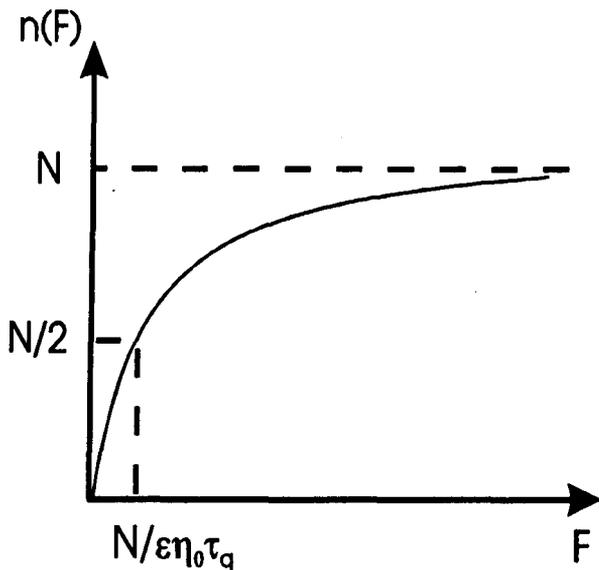
Podemos agora reescrever a equação diferencial para o número de aceitadores excitados em termos de  $\eta_0$ :

$$\frac{dn}{dt} + \left( \frac{\varepsilon \eta_0 F}{N} + \frac{1}{\tau_q} \right) n = \varepsilon \eta_0 F \quad (\text{eq.3.19})$$

cuja solução é

$$n(t) = \frac{\varepsilon \eta_0 \tau_q F}{1 + \frac{\varepsilon \eta_0 \tau_q}{N} F} \left( 1 - e^{-\left( \frac{\varepsilon \eta_0 F}{N} + \frac{1}{\tau_q} \right) t} \right) \quad (\text{eq.3.20})$$

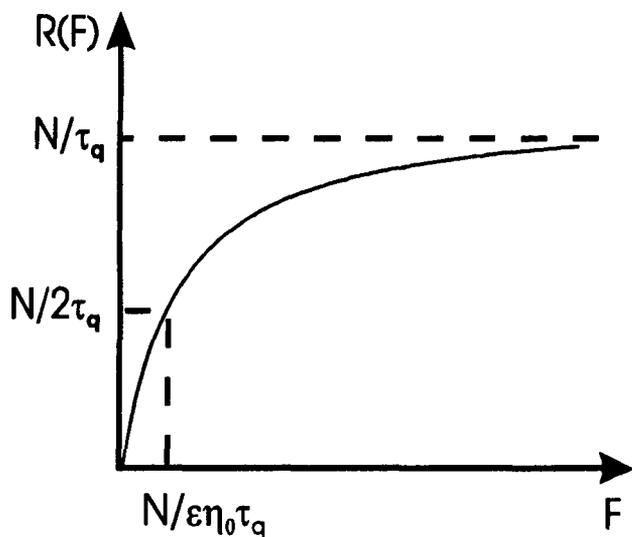
Para  $t \gg \tau_q$ , a população de equilíbrio para os aceitadores no estado excitado é



$$n_{eq} = \frac{\epsilon \eta_0 \tau_q I'}{1 + \frac{\epsilon \eta_0 \tau_q}{N} F} \quad (\text{eq.3.21})$$

Figura 3.6 - Gráfico do número de aceitadores excitados em função da taxa F de fótons

A taxa R de atividade fotossintética é proporcional ao número de elétrons usados na fotossíntese por unidade de tempo, sendo dada por



$$R = \frac{n_{eq}}{\tau_q} = \frac{\epsilon \eta_0 F}{1 + \frac{\epsilon \eta_0 \tau_q F}{N}} \quad (\text{eq.3.22})$$

Figura 3.7 - Taxa de atividade fotossintética em função da taxa de fótons

O comportamento assintótico da taxa de atividade fotossintética, observado na figura 3.7, evidencia a saturação da fotossíntese. Verifica-se da expressão (3.22) que a eficiência quântica fotoquímica para  $F \rightarrow 0$  é

$$\left. \frac{dR}{d(\epsilon F)} \right|_{F=0} = \eta_0 \quad (\text{eq.3.23})$$

### **III.3 - Saturação fotossintética**

A folha vegetal converte parte da luz modulada absorvida em energia química, liberando o restante como calor e luz (fluorescência). Usa-se luz contínua branca de alta intensidade para eliminar a atividade fotossintética modulada. A luz contínua fecha os centros de reação dos fotossistemas I e II, anulando a concentração de aceitadores não-ocupados de elétrons. Assim, a eficiência de conversão da luz modulada em energia química (através das reações fotoquímicas) vai a zero [10] e todo o oxigênio produzido pela folha passa a ser liberado continuamente, devido à luz não-modulada. Em consequência, toda a luz modulada absorvida passa a ser liberada como calor (desconsiderando-se a fluorescência). Desta forma, a incidência de luz contínua intensa gera dois efeitos no sinal fotoacústico observado:

- elimina a componente fotobárica;
- aumenta a componente fototérmica.

Para saturar a fotossíntese com luz contínua branca, a intensidade desta deve ser da ordem de  $100 \text{ W/m}^2$  ou maior. A figura 3.7 mostra o tipo de curva da taxa de fotossíntese em função da intensidade luminosa incidente.

## III.4 - Efeitos negativo e positivo: evolução de O<sub>2</sub> e energia armazenada

A incidência da luz de saturação produz efeitos diferentes, conforme a frequência de modulação da outra luz aplicada. Estes efeitos são úteis na determinação do oxigênio evoluído e da energia armazenada. São eles [15]:

### III.4.a - EFEITO NEGATIVO

A frequências baixas, adição de luz contínua suficientemente intensa leva à saturação da fotossíntese, eliminando a componente da evolução modulada de oxigênio (componente fotobárica). O sinal fotoacústico sofre então um decréscimo, que chamamos de efeito negativo (*EN*), definido por

$$EN = \frac{PA_- - PA_+}{PA_+} \quad (\text{eq.3.24})$$

onde  $PA_+$  é o sinal na ausência da luz de saturação e  $PA_-$ , na presença da luz de saturação. Este efeito determina o oxigênio evoluído através da fotossíntese.

### III.4.b - EFEITO POSITIVO

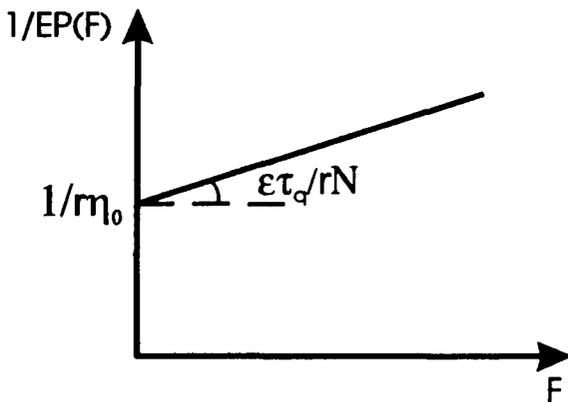
Quando se aumenta a frequência de modulação, a contribuição do oxigênio evoluído é progressivamente atenuada, pois sua difusão torna-se lenta considerando-se a frequência de modulação. Como o oxigênio é produzido dentro dos cloroplastos, precisa de tempo para se difundir até uma região onde ocorra geração da onda acústica. Assim, se a frequência de modulação é alta, a evolução de O<sub>2</sub> se torna praticamente contínua, e o sinal fotoacústico observado é essencialmente devido à componente térmica (fração de luz convertida em calor). Nesse caso, a incidência de luz contínua saturante aumenta a amplitude do sinal fotoacústico, pois a energia modulada absorvida passa a ser quase totalmente convertida em calor. Define-se o efeito positivo (*EP*) como:

$$EP = \frac{PA_+ - PA_-}{PA_-} \quad (\text{eq.3.25})$$

O efeito positivo está relacionado às reações fotossintéticas da seguinte forma: quando o elétron cedido ao aceitador entra na cadeia de reações fotoquímicas, parte de sua energia fica armazenada na forma química e parte é transformada em calor. Os tempos de liberação deste calor são muito maiores que o tempo  $\tau_1$  (definido em III.2). Se, no decorrer do processo, o elétron que entrou na cadeia fotoquímica tem uma fração  $(1 - r)$  de sua energia convertida em calor, então o efeito positivo pode ser escrito como:

$$EP(F) = \frac{rR}{\varepsilon F} = \frac{r\eta_0}{1 + \frac{\varepsilon\eta_0\tau_q}{N} F} \quad (\text{eq.3.26})$$

Da equação 3.26, vê-se que o inverso de  $EP(F)$  pode ser escrito como



$$\frac{1}{EP}(F) = \frac{1}{r\eta_0} + \frac{\varepsilon\tau_q}{rN} F \quad (\text{eq.3.27})$$

Figura 3.8 - Gráfico de  $EP^{-1}(F)$

Esta diferença relativa entre a componente térmica do sinal respectivamente com e sem luz de saturação corresponde à fração de energia utilizada nas reações da fotossíntese, e assim equivale à razão entre a taxa de elétrons usados na fotossíntese e a taxa de elétrons injetados no sistema (eq.3.26). As figuras 3.9 e 3.10 mostram gráficos de medições dos efeitos positivo e negativo.

Figura 3.9 - Efeito positivo em *Eucalyptus urophylla* ;  
intensidade de luz de 650nm :  $11.3 \text{ W/m}^2$  ; frequência de modulação : 450 Hz .  
seta para cima indica luz de saturação ( $360 \text{ W/m}^2$ ) ligada;  
para baixo, luz de saturação desligada

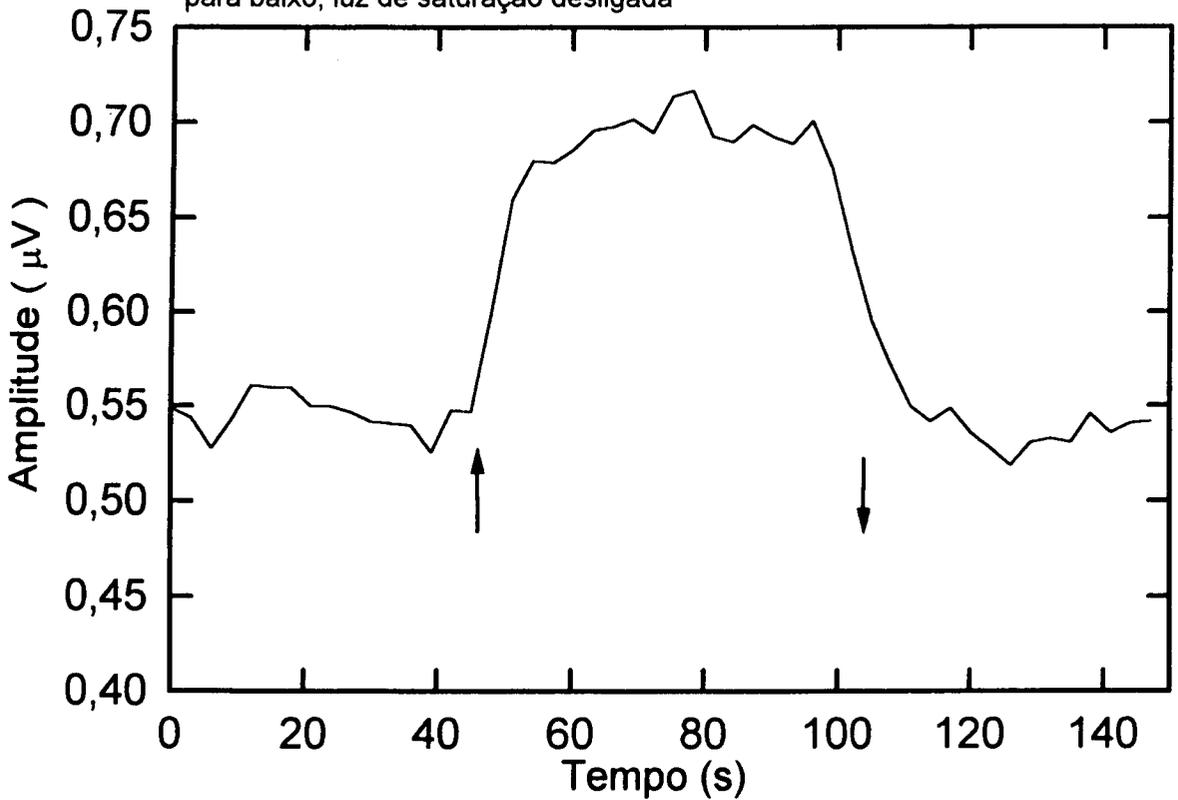
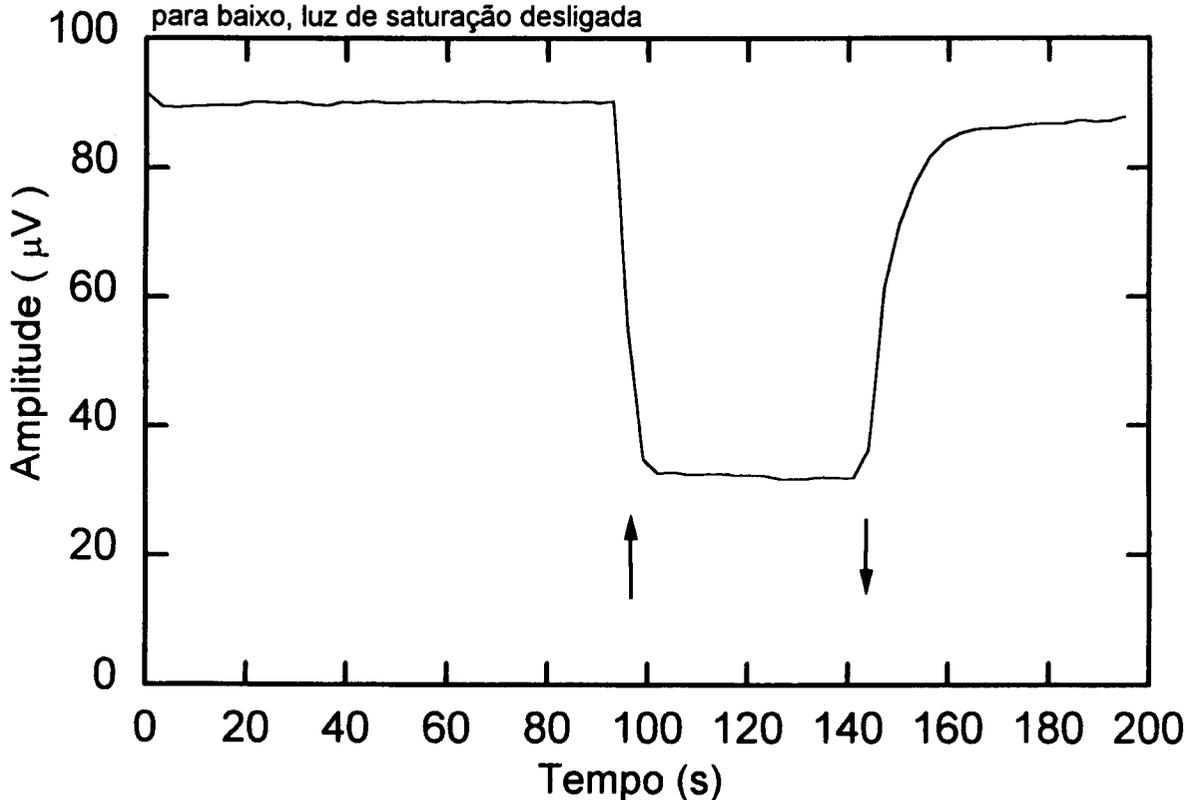


Figura 3.10 - Efeito negativo em *Eucalyptus urophylla* ;  
intensidade da luz de 650nm :  $11.3 \text{ W/m}^2$  ; frequência de modulação : 17Hz  
seta para cima indica luz de saturação ( $360 \text{ W/m}^2$ ) ligada;  
para baixo, luz de saturação desligada



### III.5 - Perda Fotoquímica

Grande parte da energia incidente na folha é armazenada como energia química, sendo posteriormente utilizada na síntese de compostos necessários ao desenvolvimento da planta. Este armazenamento diminui a quantidade de luz absorvida que é transformada em calor. Assim, este efeito é chamado de **perda fotoquímica**. Podemos escrever a seguinte equação para o balanço de energia do sistema vegetal sob incidência de luz:

$$hv = H + \phi hv_f + \eta \Delta E \quad (\text{eq.3.28})$$

onde  $hv$  é a energia do fóton absorvido,  $H$  o calor instantaneamente liberado por fóton absorvido,  $v_f$  a frequência média de um fóton de fluorescência,  $\phi$  e  $\eta$  as eficiências quânticas respectivamente da fluorescência e da fotoquímica e  $\Delta E$  a energia fotoquímica armazenada por fóton absorvido. Note-se que, na seção III.2, desprezou-se o termo de fluorescência (muito menor que o calor  $H$  liberado), fazendo  $\phi hv_f \cong 0$  e  $\Delta E \cong hv$ , do que resulta  $H \cong (1-\eta)hv$ . A partir da equação 3.28, desprezando-se a fluorescência, a perda fotoquímica ( $PF$ ) é definida como a razão

$$PF = \frac{hv - H}{hv} \quad (\text{eq.3.29})$$

Este parâmetro indica o déficit observado no sinal fotoacústico devido aos processos intermediários da fotossíntese.

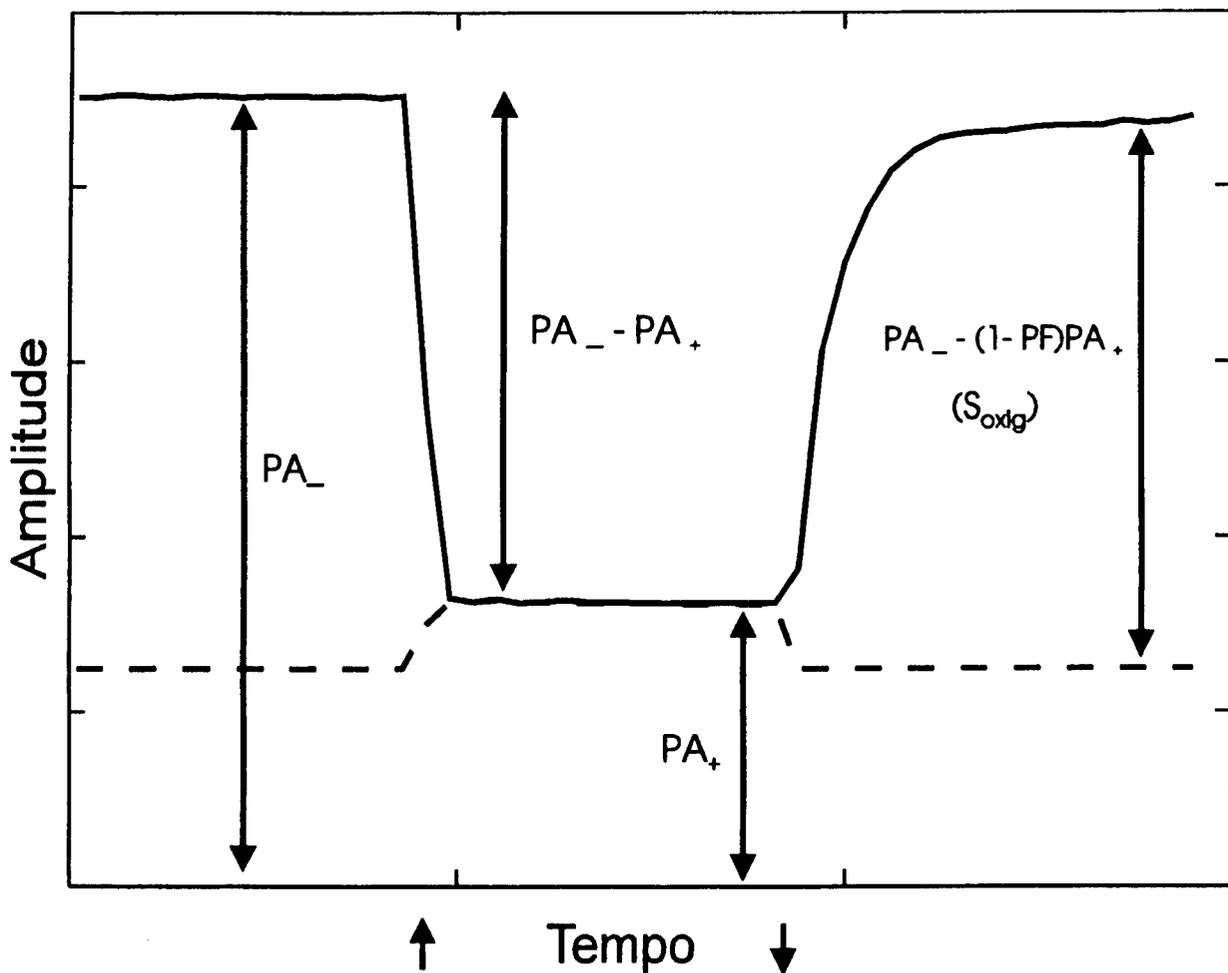
A partir das considerações da seção anterior, observa-se que o efeito positivo corresponde à perda fotoquímica ( $PF$ ). A diferença relativa entre o sinal térmico máximo (obtido com incidência de luz contínua saturante) e o sinal térmico observado apenas sob incidência de luz modulada reflete a parcela de energia que a planta armazena como energia química e que será utilizada nas reações fotossintéticas. Com efeito, a fração de energia armazenada é dada por

$$PF = EP \quad (\text{eq.3.30})$$

onde  $EP$  é o efeito positivo.

Em baixas frequências de modulação, o efeito negativo observado é o resultado da eliminação da componente bária do sinal, que o reduz, sobreposto ao acréscimo da componente térmica - devido à supressão da perda fotoquímica (figura 3.11). Neste caso, o sinal do oxigênio evoluído é dado por

$$\text{Sinal}_{\text{oxig}} = PA_- - (1 - PF)PA_+ \quad (\text{eq.3.31})$$



*Figura 3.11* - Curva ilustrando a simultânea supressão da componente b́arica e aumento da componente t́ermica com a incidência de luz saturante a baixas frequências de modulação; abaixo do eixo temporal, seta para cima indica o instante em que a luz de saturação é ligada; para baixo, o instante em que é desligada.

## III.6 - Indução Fotossintética

Quando uma planta é colocada no escuro, seus centros de reação fotossintética vão gradualmente se desativando. Após um certo período de adaptação, poucos pigmentos (na região do infravermelho) se mantêm ativos [11]. O tempo necessário para a plena adaptação da planta à condição de escuro varia fortemente (de alguns minutos a várias horas), conforme a espécie da planta.

Com a planta adaptada ao escuro, incidência de luz dá origem ao processo de **indução fotossintética** [15, 27]: a folha se readapta progressivamente à luz, reiniciando o processo da fotossíntese. O estado estacionário da atividade fotossintética é atingido depois de um período transiente que depende de vários fatores, como:

- espécie da planta
- intensidade luminosa
- tempo de adaptação ao escuro
- condições atmosféricas locais

A figura 3.12 mostra curvas típicas de indução fotossintética para medições efetuadas em nosso laboratório. Note-se que as medidas em eucalipto apresentam um transiente curto (3 a 5 minutos), enquanto o transiente para amostras de milho é bem longo, podendo chegar a meia hora. Isto pode estar associado ao fato de que estas plantas apresentam diferenças em seus ciclos fotossintéticos, demonstrando o tipo de estudo comparativo entre plantas que pode ser realizado através de medidas de indução fotossintética.

Entre os temas que já foram estudados utilizando a indução fotossintética com a técnica fotoacústica, podemos destacar a heterose do milho [27]. No próximo capítulo, mostraremos como a indução fotossintética foi usada no estudo de parâmetros que afetam a fotossíntese de plantas de eucalipto.

Figura 3.12 a) Indução fotossintética em planta de milho adaptada ao escuro; intensidade da luz 680nm:  $8 \text{ W/m}^2$ ; frequência de modulação: 17 Hz; para  $t > 2850$ , há incidência de luz branca saturante ( $200 \text{ W/m}^2$ , seta para cima)

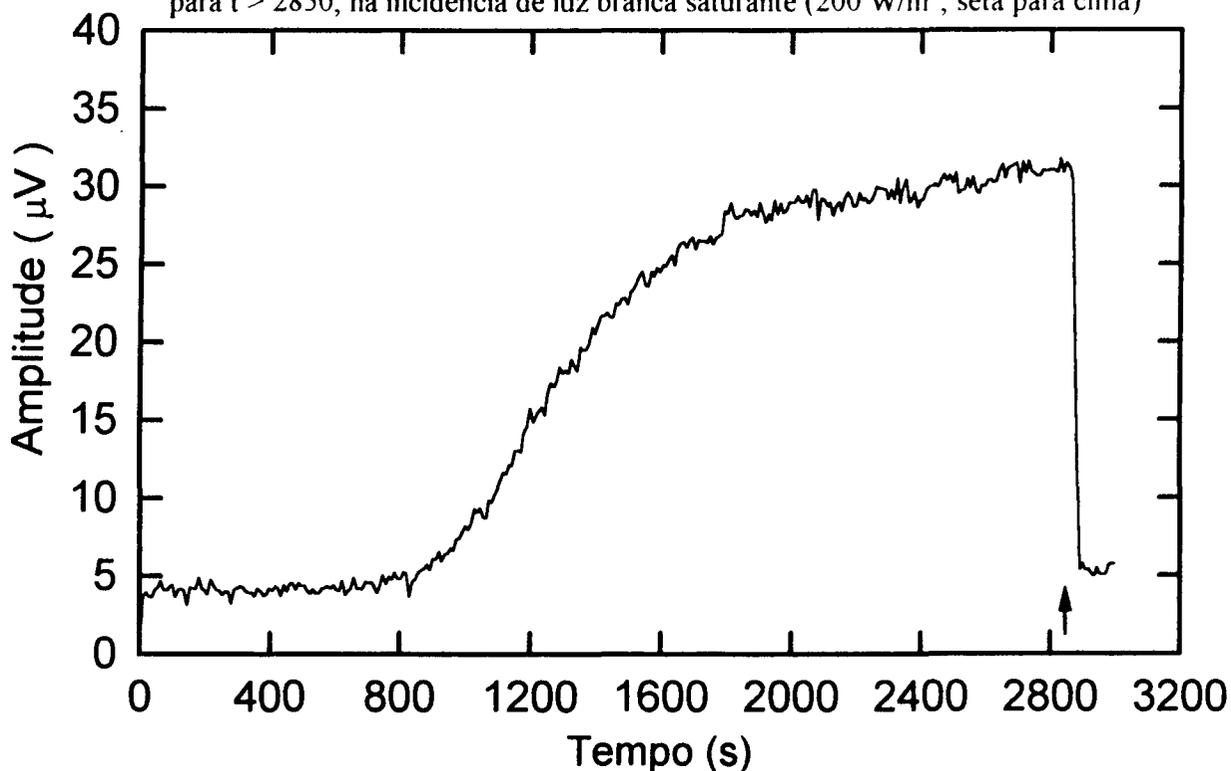


Figura 3.12 b) Indução fotossintética em *Eucalyptus urophylla* adaptada ao escuro; intensidade da luz 680nm:  $8 \text{ W/m}^2$ ; frequência de modulação: 17 Hz; para  $300\text{s} < t < 340\text{s}$ , há incidência de luz branca saturante ( $100 \text{ W/m}^2$ , ver setas)

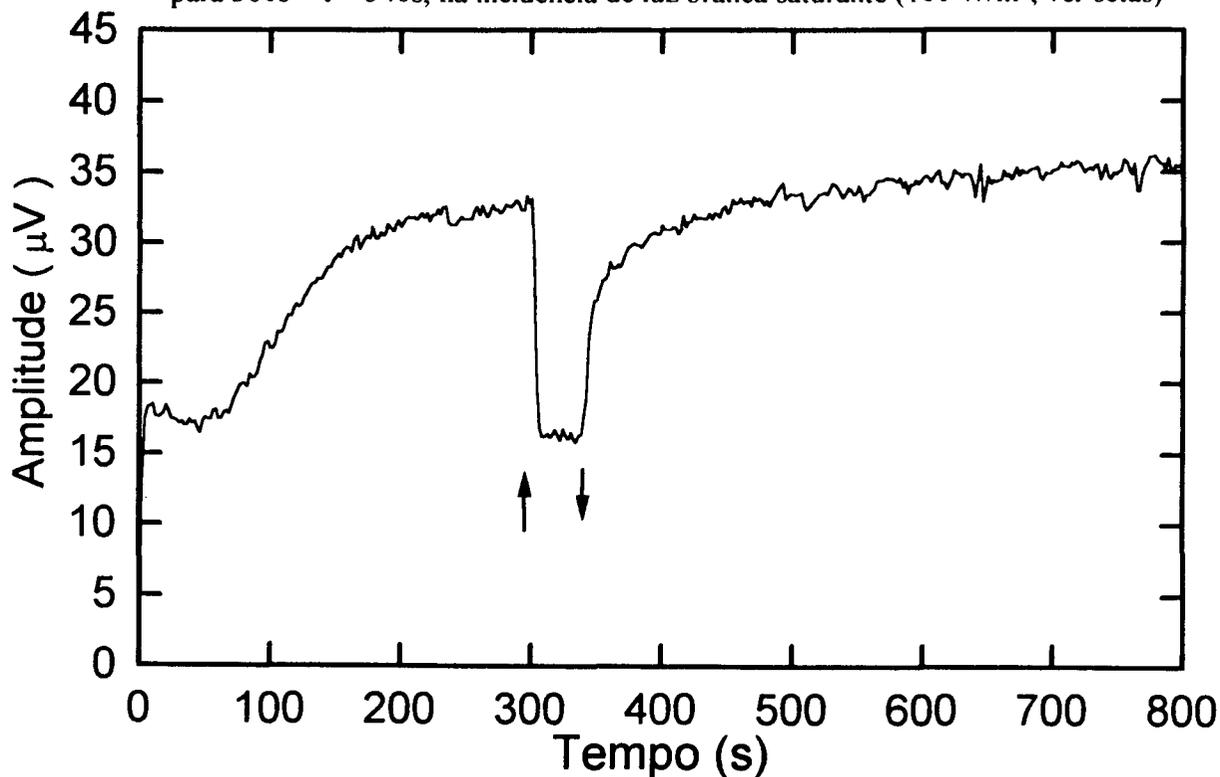


Figura 3.12 - Curvas de indução fotossintética respectivamente para amostras de milho e eucalipto

# **CAPÍTULO IV :**

## **RESULTADOS EXPERIMENTAIS EM PLANTAS DE EUCALIPTO**

### **IV.1 - Informações gerais sobre o eucalipto**

#### **IV.1.a - Introdução**

O eucalipto é a essência florestal mais plantada em todo o Brasil. Isso se deve principalmente ao fornecimento de matéria prima para indústrias de celulose e papel, além da siderurgia a carvão vegetal. A espécie *E.grandis* é uma das mais plantadas, devido a seu rápido crescimento e facilidade de adaptação a diferentes climas. A espécie *E.urophylla* apresenta crescimento mais lento, sendo porém mais tolerante a períodos de estiagem. O cruzamento dessas duas espécies originou o híbrido *Eucalyptus urograndis*, que se caracteriza pelo rápido crescimento e resistência à seca. No entanto, por ser um híbrido de desenvolvimento recente, ainda são poucas as informações conclusivas sobre seu comportamento.

O cultivo do eucalipto no Brasil é feito a partir de mudas produzidas em viveiros, com a semeadura sendo realizada em recipientes especiais (*tubetes*) e as mudas obtidas sendo posteriormente transplantadas para o campo. Com o aumento das áreas reflorestadas anualmente, a produção de mudas tem crescido, buscando-se também o aprimoramento das mesmas.

Diversos fatores influenciam no estabelecimento das mudas no campo. A adaptabilidade da planta às condições de campo pode ser avaliada pelo desempenho fotossintético das mudas [28]. Isto motivou o estudo (desenvolvido em mudas de eucalipto das espécies *E.grandis*, *E.urophylla* e do híbrido *E.urograndis*) que será apresentado neste capítulo.

## IV.1.b - Fotoinibição

Vários trabalhos recentes mostram que plantas do tipo C3 - particularmente sensíveis à falta de água no solo e melhor aclimatadas a temperaturas mais amenas - adaptadas a baixos níveis de irradiância ficam sujeitas à inibição da fotossíntese quando transferidas para ambientes com irradiância alta. Esta **fotoinibição** ocorre quando a planta não consegue dissipar a irradiância excessiva recebida e passa a acumular radicais livres fortemente oxidantes (o que causa danos a componentes do fotossistema II, tais como a destruição dos pigmentos fotossintetizantes). A fotoinibição é associada a uma diminuição da eficiência fotossintética e consequente queda na capacidade de conversão da energia radiante em matéria seca (carboidratos), sendo geralmente causada pela associação de alta irradiância com baixas temperaturas ou outros tipos de estresse induzidos.

A metodologia normalmente utilizada no cultivo de eucalipto (ver *Material e métodos*, a seguir) pode intensificar o fenômeno da fotoinibição quando as mudas passam da condição de sombreamento para a de pleno sol, ou seja, quando deixam a luminosidade controlada dos viveiros e têm que se adaptar às condições de campo.

Os efeitos da fotoinibição sobre as plantas têm sido investigados através de medidas de fluorescência da clorofila *a* [29]. Aqui usaremos a técnica fotoacústica para estudar tais efeitos.

## IV.1.c - Material e Métodos

Utilizou-se, para este estudo, mudas de eucalipto do viveiro da CELPAV Florestal S.A., em Santa Rita do Passa Quatro (SP). O substrato, acondicionado em tubetes plásticos com volume de 50 cm<sup>3</sup>, é composto por uma mistura adubada de vermiculita (35%), bagaço de cana (35%), terra (20%) e turfa (10%). A semeadura é realizada manualmente, depositando-se sobre a superfície do substrato cerca de 5 sementes (por tubete) que depois são cobertas por uma fina camada do mesmo substrato peneirado. Um mês após a semeadura é feito o desbaste, deixando-se uma planta, mais uniforme em vigor e altura, por tubete.

Até o desbaste, as mudas crescem sob *sombrite* (tela preta de polioleifinas) que atenua a luminosidade solar em até 50%. Após o desbaste, o *sombrite* só será mantido nas horas mais quentes do dia. Passados 40 dias da sementeira, elimina-se definitivamente o sombreamento, com a exposição das mudas a pleno sol. Essa transição pode induzir o chamado *estresse hídrico* (deficiência de água).

#### IV.1.d - Objetivos

Com este trabalho pretende-se investigar as reações fotoquímicas do processo fotossintético utilizando a técnica não invasiva da fotoacústica *in vivo* e *in situ*. A grande maioria dos trabalhos até hoje desenvolvidos utilizando esta técnica no estudo da fotossíntese foi realizada em plantas herbáceas ou arbustivas (milho, tomate, espinafre, feijão etc). Nesta pesquisa, usa-se a fotoacústica para estudar uma planta arbórea e menos “domesticada”, o eucalipto. Deste modo, pretende-se demonstrar a versatilidade da técnica fotoacústica, capaz de permitir comparações entre o comportamento fotossintético de diferentes plantas.

Considerando que condições de estresse como a alta irradiância geram perdas na produtividade do eucalipto (uma planta economicamente importante devido às aplicações citadas no item IV.1.a), o estudo dos mecanismos de adaptação dessa planta a diferentes situações se justifica, não só pela investigação dos processos fotossintéticos em si, como também pela importância no aperfeiçoamento dos métodos de seu cultivo. Além disso, espera-se identificar parâmetros discriminatórios do processo de aclimação à irradiância para as três espécies de eucalipto mencionadas (*E.grandis*, *E.urophylla* e *E.urograndis*). Conhecendo melhor as características de cada espécie, pode-se indicar qual a espécie mais apropriada a determinada condição de cultivo.

## **IV.2 - Indução Fotossintética**

Como um dos objetivos deste estudo era comparar curvas de indução fotossintética para diferentes espécies de eucalipto, inicialmente realizou-se uma série de medidas com o intuito de verificar qual a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Observou-se uma dispersão bastante grande entre curvas obtidas para amostras da mesma espécie. Isto pode ser explicado se considerarmos que o estudo de sistemas vivos é geralmente mais complexo que o estudo de amostras sintetizadas em laboratório. Enquanto num laboratório pode-se controlar rigorosamente parâmetros como temperatura, umidade e condições gerais sob as quais ocorre o crescimento da amostra, num ambiente externo (como o campo ou mesmo uma estufa) tais parâmetros são de difícil controle. Como qualquer diferença nas condições de crescimento das mudas pode gerar variações no comportamento fotossintético das plantas, as medidas apresentam uma variabilidade inerente ao trabalho com sistemas vegetais vivos.

A partir dessa constatação, tornou-se claro que o plano de trabalho a ser seguido deveria englobar um número grande de repetições para cada medida efetuada. Para minimizar a variabilidade introduzida pelas mudanças de clima entre diferentes datas de medições, buscou-se realizar o mesmo número de medidas para cada espécie num mesmo dia.

As medidas foram realizadas em mudas de eucalipto com cerca de 45 dias de idade. O cronograma adotado no cultivo das mudas (ver item IV.1.c) permite constatar que a fase crítica de cultivo ocorre quando estas atingem a idade de quarenta dias e são transferidas de um ambiente de sombreamento parcial (telado) para o campo, com incidência plena de sol. Assim, a decisão de estudar mudas em idade de transplante para o campo se justifica: neste período o monitoramento se faz importante. Por outro lado, foi feito um acompanhamento de diversas amostras e medidas efetuadas em mudas de até quatro meses de idade mostraram que o comportamento fotossintético das mesmas não sofre alteração substancial para idades superiores a um mês e meio. Estas razões fundamentaram a decisão de se estudar mudas com a idade padrão de 45 dias.

Estabelecido o plano de trabalho e a idade das amostras, era necessário padronizar o tempo de adaptação destas ao escuro. Para tanto, foram feitas diversas medidas de indução fotossintética para diferentes períodos de adaptação, sempre com potência incidente de  $8 \text{ W/m}^2$ . Observou-se que as amostras adaptadas ao escuro por tempos superiores a três horas apresentavam comportamentos equivalentes quanto à indução fotossintética. Isto mostra o tempo necessário para que o eucalipto esteja plenamente adaptado à condição de escuro. Para manter uma boa margem de segurança, todas as curvas de indução fotossintética apresentadas neste trabalho foram feitas após uma adaptação ao escuro de pelo menos dez horas.

A influência do tempo de adaptação ao escuro no comportamento fotossintético das plantas se explica da seguinte forma: é necessário um tempo mínimo de escuro para desativar completamente os fotossistemas, responsáveis pelas reações da fotossíntese. Além disso, **há compostos sintetizados e armazenados pela planta cuja concentração se estabiliza apenas depois de um certo tempo de escuro**. A concentração destes compostos pode influenciar na indução, como veremos a seguir.

As curvas de indução fotossintética foram obtidas sob as seguintes condições experimentais:

- Luz monocromática:  $\lambda = (680 \pm 5)$  nm, intensidade de  $8 \text{ W/m}^2$ , modulada a uma frequência de 17 Hz;
- Luz contínua de saturação:  $400 < \lambda < 700$  nm, intensidade de  $200 \text{ W/m}^2$ .

## TRANSIENTE INICIAL

Plantas de eucalipto (e outras, como as de espinafre) apresentam nitidamente um pico no sinal fotoacústico (seguido por uma depressão) na fase inicial da indução fotossintética (fig.4.1). A origem desse comportamento ainda não foi claramente determinada. Prinsley e Leegood [30] citam artigo de Franck [31] segundo o qual estes transientes (evolução e absorção gasosas iniciais) refletem a redução fotoquímica de compostos acumulados durante o período de escuro e disponíveis para redução no primeiro minuto de iluminação. Esta hipótese é fortalecida pela observação experimental de que, nas plantas de espinafre estudadas por Prinsley e Leegood, a concentração do composto 3-fosfoglicerato é mantida no escuro e decresce rapidamente sob incidência de luz, indicando sua redução.

Badger [32] afirma que, no período inicial de iluminação, as atividades de oxidação fotorrespiratória (ciclo PCO) e redução fotossintética do carbono (ciclo PCR) não estão totalmente ativadas, o que causaria uma forte absorção inicial de  $\text{O}_2$ , reduzida conforme a fixação de  $\text{CO}_2$  atinge seu estado estacionário. O transiente inicial no sinal fotoacústico poderia traduzir esse comportamento.

Bults e colaboradores [10] observam que, neste período transiente inicial, aplicação de luz contínua saturante resulta no chamado efeito positivo (isto foi confirmado em medições realizadas por Carmen Gorvenia no *Laboratório de Fototérmica / IFGW*). Isto indica uma eficiência fotoquímica notável - mesmo sem evolução de oxigênio -, ou seja, parte da energia incidente está sendo utilizada para a rápida redução de compostos acumulados nas folhas. O tempo característico para que ocorra a redução (cerca de 30 segundos após o início da incidência luminosa, ainda de acordo com medições de Prinsley e Leegood) coincide com o transiente inicial observado nas medidas fotoacústicas.

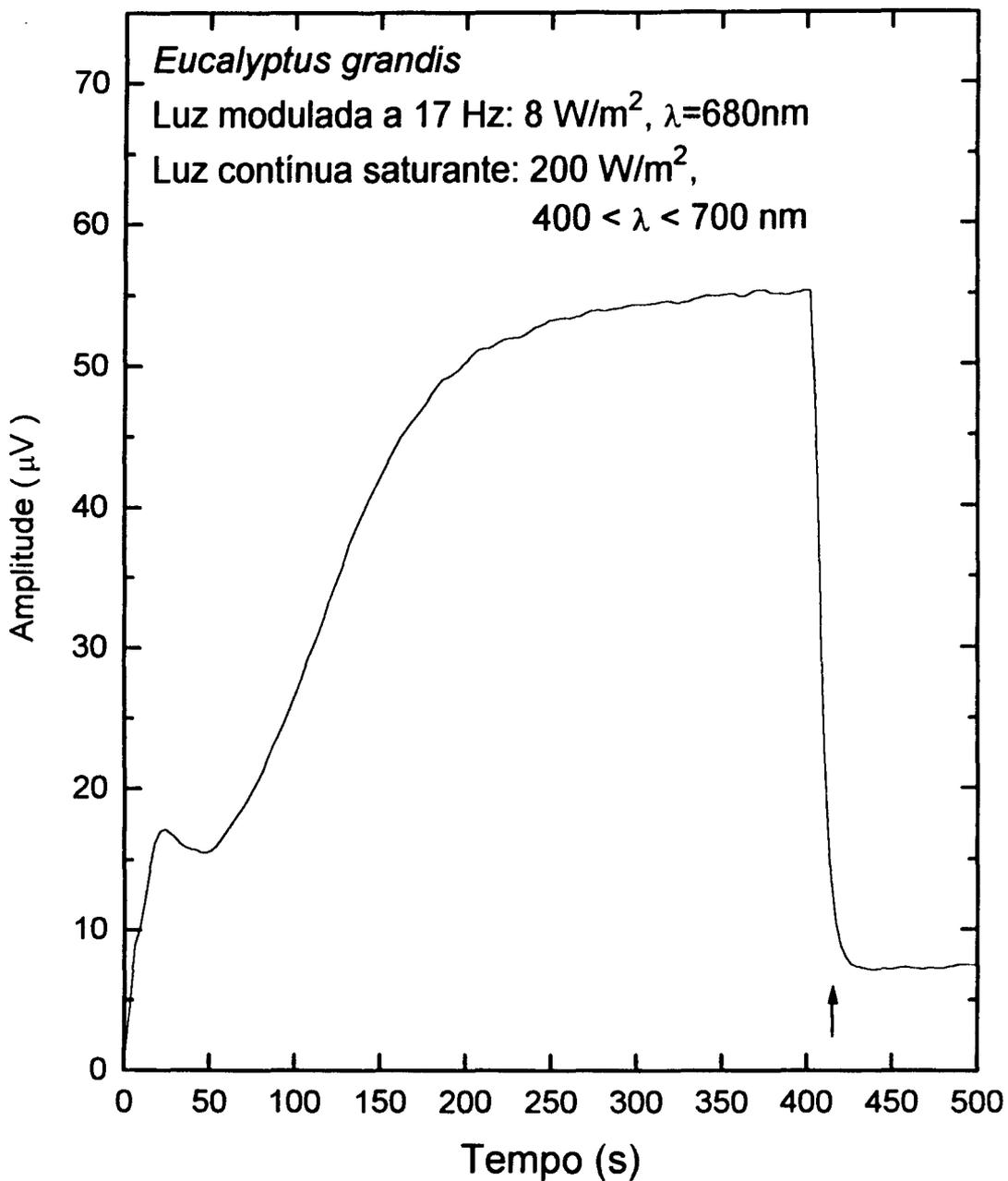


Figura 4.1 - Curva típica de indução fotossintética em folha de eucalipto; seta para cima indica o instante em que a luz de saturação foi ligada

## AMPLITUDE DO SINAL FOTOACÚSTICO (componentes b́arica e térmica)

Uma vez que as curvas de indução atingem um sinal estacionário, através da incidência de luz fotossinteticamente saturante é possível separar as componentes térmica (relativa à parcela de energia absorvida que a planta converte em calor) e b́arica (correspondente à evolução de oxigênio) do sinal fotoacústico. A tabela a seguir resume os resultados obtidos para as componentes térmica e b́arica do sinal fotoacústico em plantas de três espécies de eucalipto. Estudou-se amostras adaptadas por 24 horas a diferentes temperaturas (25°C e 10°C). Cada média corresponde a cerca de trinta medidas efetuadas; ainda assim, os desvios são grandes.

**Tabela 1** - Médias das componentes do sinal fotoacústico para as três espécies de eucalipto estudadas ( média ± desvio quadrático médio )

Espécie	<i>Eucalyptus grandis</i>		<i>Eucalyptus urophylla</i>		<i>Eucalyptus urograndis</i>	
	25	10	25	10	25	10
Temperatura (°C)						
Sinal Térmico (μV)	8 ± 5	7 ± 4	11 ± 5	11 ± 5	10 ± 5	9 ± 5
Sinal B́arico O <sub>2</sub> evoluído (μV)	31 ± 8	29 ± 7	28 ± 8	26 ± 9	33 ± 9	34 ± 9

Observe-se que as barras de erro são tais que os dados apresentados na tabela 1 não permitem discriminar o comportamento das diferentes espécies de eucalipto estudadas.

## TEMPO DE INDUÇÃO

Outro parâmetro a ser analisado a partir das curvas experimentais é o tempo de indução, ou seja, o tempo que a planta inicialmente adaptada ao escuro leva para atingir um estado estacionário que reflete a plena produção de oxigênio. Enquanto o milho, bastante conhecido e estudado em trabalhos de fotoacústica ([15], [23]), necessita de pelo menos 20 minutos de incidência de luz até alcançar uma produção máxima constante de oxigênio, as medidas efetuadas mostram que o eucalipto atinge o estado estacionário num período médio de 5 minutos. Esta observação pode estar associada a diferenças no ciclo fotossintético dessas plantas.

Com o objetivo de comparar o tempo necessário para que as diferentes espécies de eucalipto estudadas atingissem o estado estacionário, foi feito o ajuste das curvas de indução através da curva logística

$$S(t) = S_0 + \frac{\Delta S \cdot e^{(t-t_0)/\Delta t}}{1 + e^{(t-t_0)/\Delta t}} \quad (\text{eq.4.1})$$

onde  $S_0$  é o sinal fotoacústico inicial,  $\Delta S$  a variação do sinal até atingir o valor de saturação num tempo  $\Delta t$  e  $t_0$  é o instante no qual  $(S-S_0)/\Delta S = 0,5$ . A equação 4.1 representa uma curva em  $S$  e foi usada na referência [27] para ajustar curvas de indução fotossintética em plantas de milho. No caso do eucalipto, a ocorrência do transiente inicial faz com que o início da curva não seja perfeitamente ajustado por esta expressão. No entanto, não há prejuízo na obtenção dos parâmetros  $\Delta t$  e  $t_0$ , bastando eliminar a região onde ocorre o pico deste transiente inicial (de modo geral, em  $t < 20$  s). Assim, a tabela 2 mostra os resultados obtidos para os parâmetros  $t_0$  e  $\Delta t$  das curvas de indução fotossintética. As curvas ajustadas correspondem ao mesmo conjunto de medidas que originou a tabela 1.

**Tabela 2** - Médias dos parâmetros  $t_0$  e  $\Delta t$  das curvas de ajuste de indução fotossintética para as três espécies de eucalipto estudadas ( médias  $\pm$  desvio quadrático médio )

Espécie	<i>Eucalyptus grandis</i>		<i>Eucalyptus urophylla</i>		<i>Eucalyptus urograndis</i>	
	25	10	25	10	25	10
Temperatura (°C)						
$t_0$ (s)	90 $\pm$ 20	60 $\pm$ 10	100 $\pm$ 20	80 $\pm$ 20	90 $\pm$ 20	70 $\pm$ 20
$\Delta t$ (s)	22 $\pm$ 9	18 $\pm$ 7	22 $\pm$ 8	26 $\pm$ 9	21 $\pm$ 9	23 $\pm$ 9

Tomando os valores de sinal térmico e de sinal bórico da tabela 1 respectivamente como  $S_0$  e  $\Delta S$ , a partir dos valores da tabela 2 para  $t_0$  e  $\Delta t$  pode-se construir curvas médias de indução fotossintética para as espécies de eucalipto estudadas a 10°C e a 25°C. As curvas obtidas são mostradas na figura 4.2. A observação destas curvas permite constatações sobre o comportamento das diferentes espécies de eucalipto.

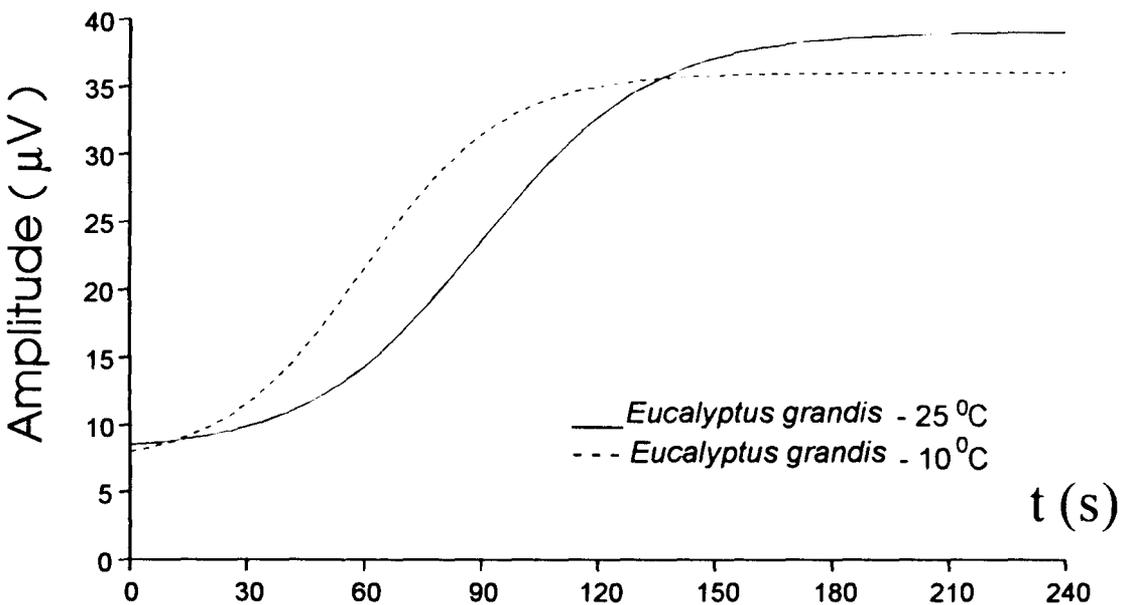
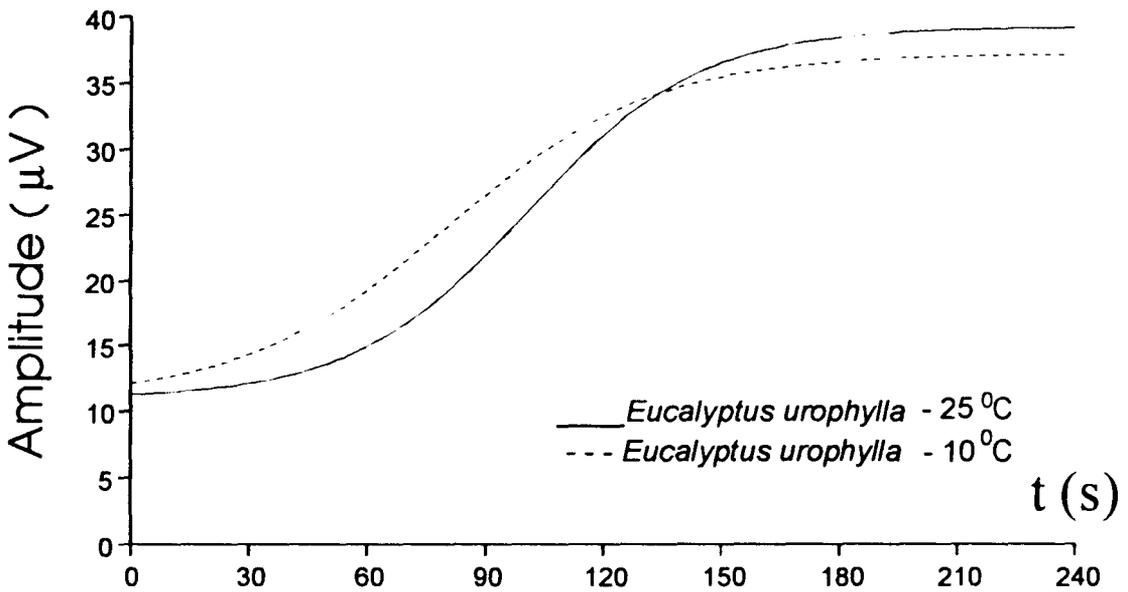
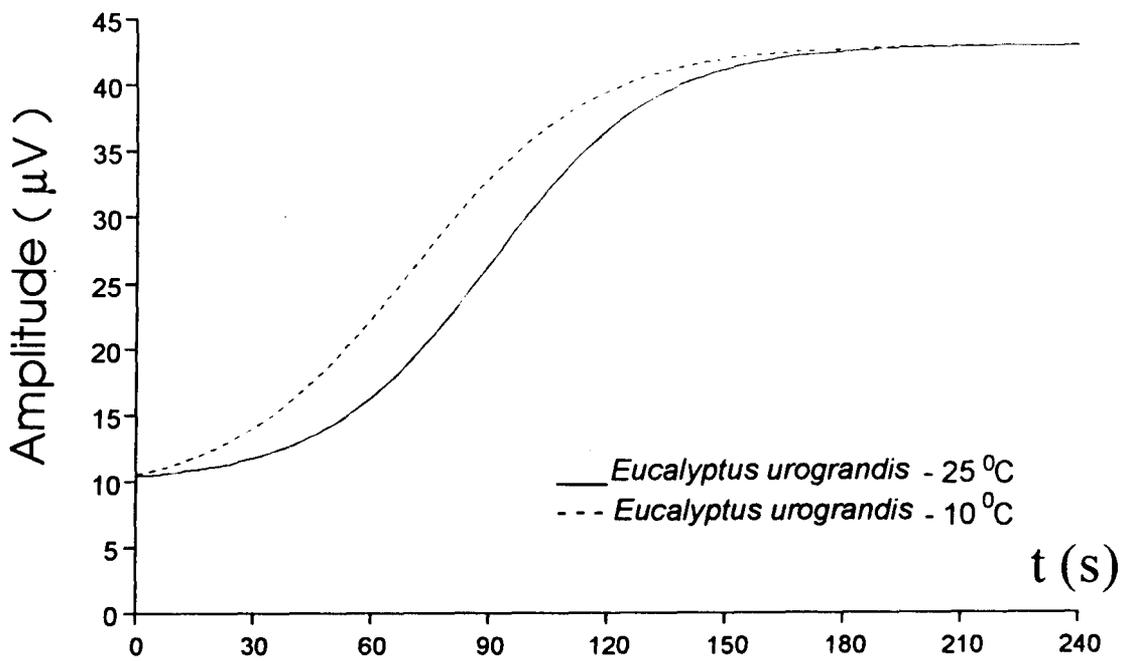


Figura 4.2 - Curvas médias de indução fotossintética para cada espécie e temperatura de adaptação

Para as três espécies de eucalipto analisadas, observa-se que a temperatura influi no tempo de indução fotossintética. Amostras adaptadas à temperatura de 10<sup>0</sup>C atingem mais rapidamente um sinal fotoacústico estável, ou seja, a taxa de produção de O<sub>2</sub> se estabiliza mais cedo para amostras aclimatadas a temperaturas mais baixas. Este comportamento pode ser explicado em termos do acoplamento dos transportadores de elétrons responsáveis pela redução de ADP e fosfato inorgânico a ATP. Esse acoplamento é menor para temperaturas mais amenas (como 10<sup>0</sup>C), o que poderia diminuir o tempo de indução.

Esta hipótese poderá ser comprovada com a aplicação de substâncias químicas desacopladoras às folhas sob estudo, no caso de tais substâncias deslocarem a ocorrência do transiente (como as curvas para amostras adaptadas a 10<sup>0</sup>C em comparação àquelas para amostras adaptadas a 25<sup>0</sup>C, na figura 4.2). Esta é uma perspectiva para estudos futuros, conforme será visto no capítulo V.

## IV.3 - Fotoinibição em Plantas de Eucalipto

Após o estudo das curvas de indução fotossintética, o passo seguinte foi investigar a ocorrência de fotoinibição por excesso de irradiância nas mudas de eucalipto. Para isso, fez-se medições divididas em três fases (sempre sob incidência de luz modulada a 17 Hz, com  $\lambda = 680$  nm e intensidade de  $8 \text{ W/m}^2$ ): após a estabilização do sinal fotoacústico na fase de indução fotossintética, incidia-se luz contínua (com  $400 < \lambda < 700$  nm) de intensidade saturante por 15 minutos; a seguir, retirava-se a luz contínua para observar a volta do sinal de evolução de oxigênio. Caracteriza-se a fotoinibição quando este sinal básico pós-luz contínua não volta ao valor encontrado antes da incidência da referida luz de saturação. Neste caso, diz-se que a luz de saturação fotoinibiu a fotossíntese.

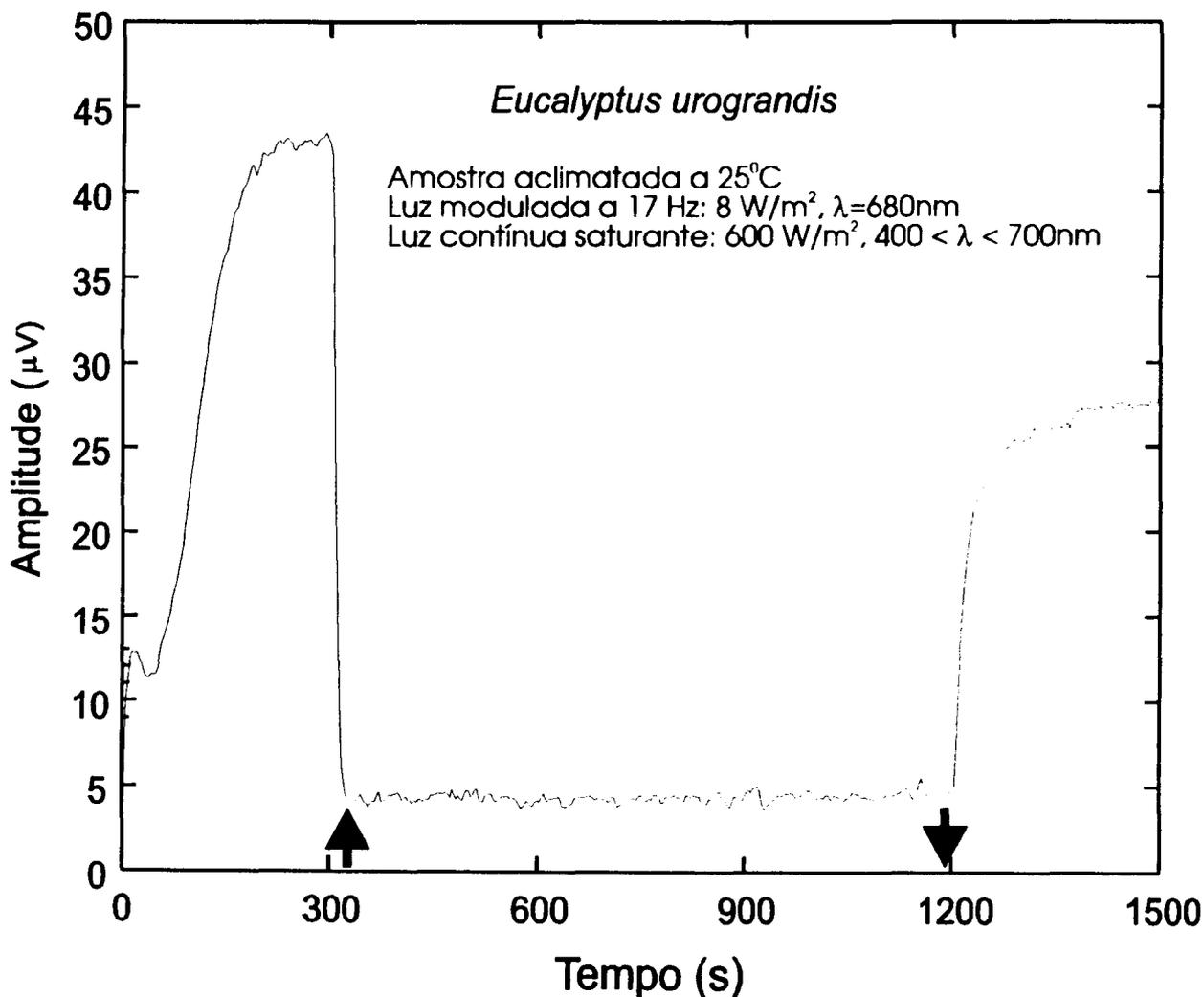
A escolha do tempo de 15 minutos para incidência da luz contínua intensa se deu após várias medidas preliminares, nas quais se constatou que este é um período suficiente para que a fotoinibição, caso existente, seja observada. Variando-se esse tempo de cinco minutos até duas horas, verificou-se que a fotoinibição não variava para tempos superiores a 15 minutos. A figura 4.3 mostra uma curva experimental típica deste estudo.

Efetou-se medidas para diversas intensidades da luz contínua saturante, com o objetivo de obter curvas da fotoinibição em função da intensidade luminosa incidente. Observou-se a relação entre o sinal de oxigênio evoluído antes e depois da incidência da luz de saturação. As figuras 4.4 a 4.9 mostram os resultados obtidos. Nestas figuras, cada ponto corresponde à média de cinco a seis medidas. De modo geral, para luz de saturação com intensidade superior a  $400 \text{ W/m}^2$ , ocorreu fotoinibição nas amostras estudadas. A espécie *E.urophylla* parece ser mais susceptível à fotoinibição, havendo uma queda brusca no sinal de oxigênio após incidência de luz saturante com intensidade a partir de  $350 \text{ W/m}^2$ , para amostras adaptadas a  $25^\circ\text{C}$ .

Os gráficos 4.4 a 4.9 permitem constatar que o aumento na intensidade da luz de saturação aplicada intensifica o fenômeno da fotoinibição. Em alguns casos, intensidades de aproximadamente  $600 \text{ W/m}^2$  levaram a uma fotoinibição em torno de 40%, isto é, o sinal correspondente ao oxigênio evoluído caiu 40% após a incidência de luz saturante. No entanto, mais uma vez não foi possível discriminar as espécies de eucalipto quanto ao seu comportamento. As três espécies estudadas apresentaram resultados semelhantes quanto à fotoinibição. Também não houve discriminação quanto à temperatura de aclimação prévia: a fotoinibição se mostrou semelhante para amostras adaptadas a  $10^\circ\text{C}$  e a  $25^\circ\text{C}$ .

Deve-se destacar que a aclimação prévia foi de apenas 24 horas, em câmara escura, ou seja, a planta foi simultaneamente adaptada ao escuro e a uma determinada temperatura. É possível que seja necessária uma aclimação por períodos mais longos (e sob luminosidade controlada) para que se detecte a influência deste parâmetro na fotoinibição.

Os resultados obtidos para as folhas de eucalipto são próximos aos valores encontrados na literatura. Em particular, Havaux e Eyleters [33] encontraram fotoinibição próxima a 30% para folhas de *Pisum sativum* (ervilha) expostas por 15 minutos à luz azul-verde com a intensidade saturante de  $400 \text{ W/m}^2$ .



*Figura 4.3* - Curva experimental típica para estudo de fotoinibição. Seta para cima indica o instante em que a luz de saturação foi ligada; para baixo, o instante em que foi desligada

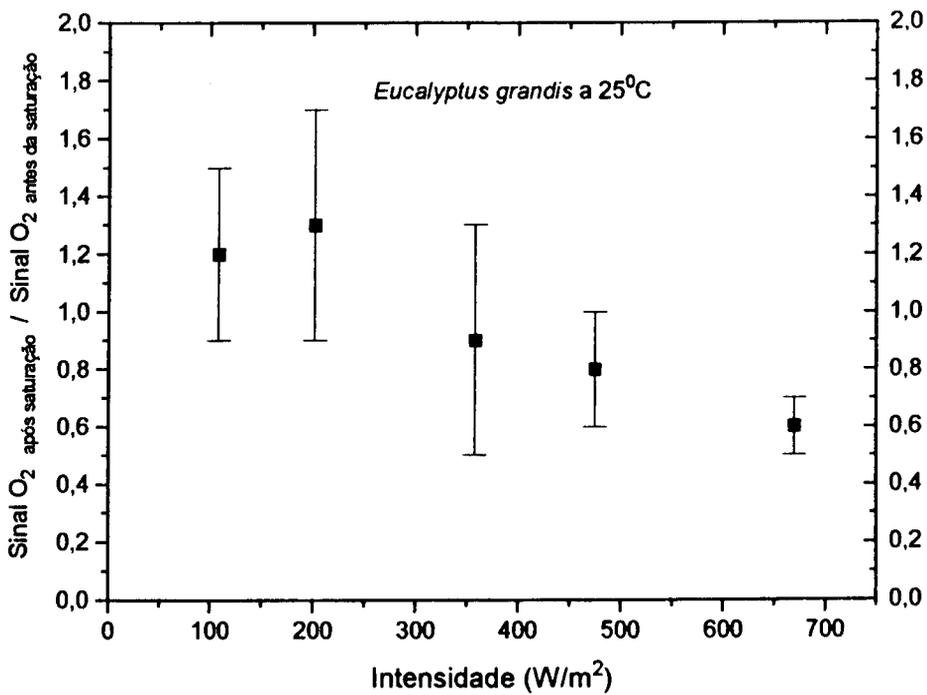


Figura 4.4 - Relação entre atividade fotossintética de *Eucalyptus grandis* adaptada a 25<sup>0</sup>C antes e depois da incidência de luz saturante

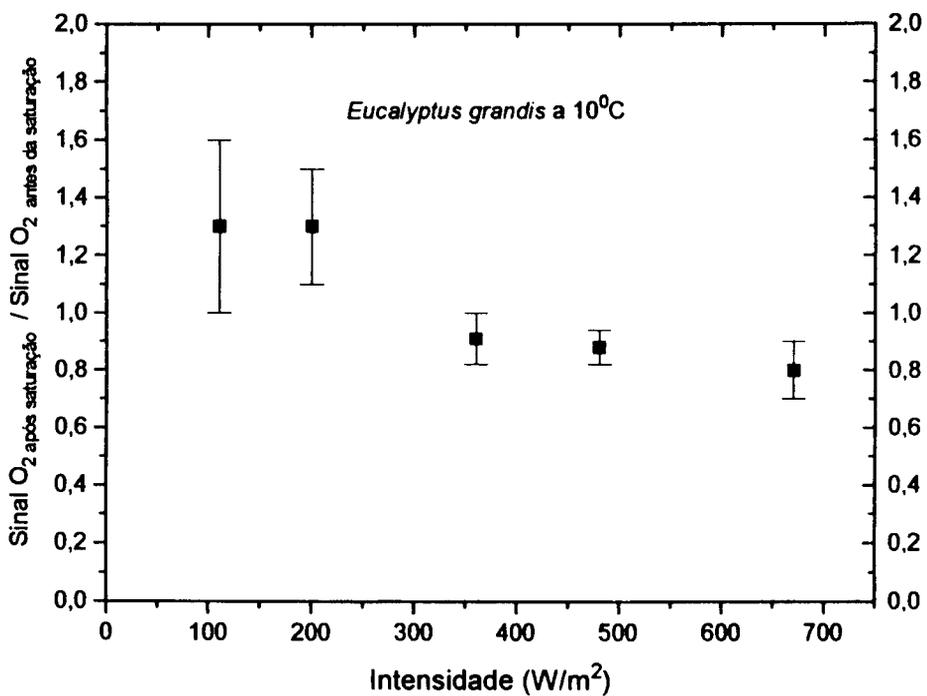


Figura 4.5 - Relação entre atividade fotossintética de *Eucalyptus grandis* adaptada a 10<sup>0</sup>C antes e depois da incidência de luz saturante

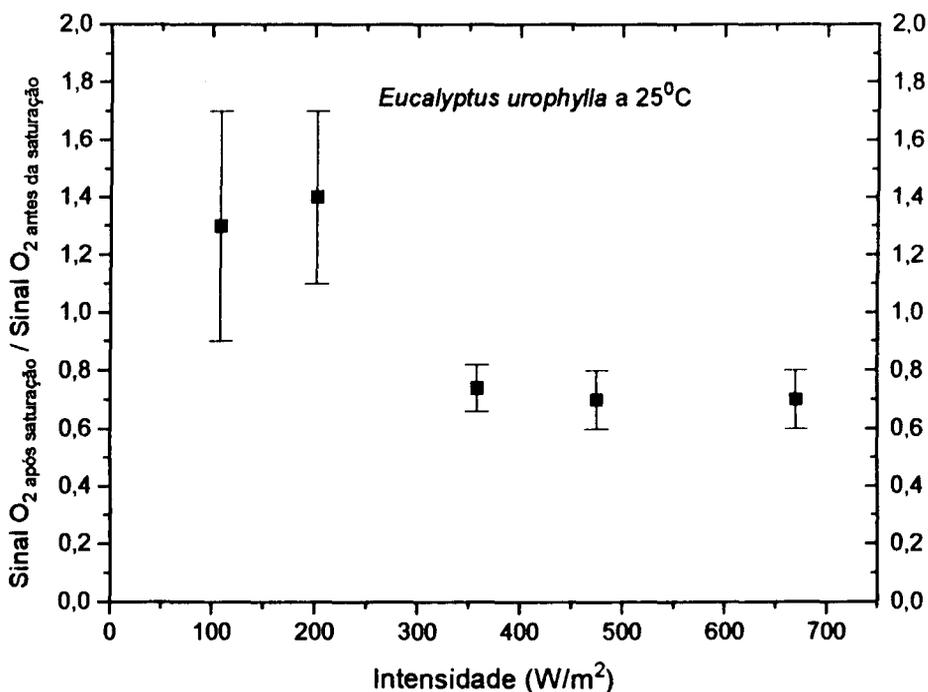


Figura 4.6 - Relação entre atividade fotossintética de *Eucalyptus urophylla* adaptada a 25°C antes e depois da incidência de luz saturante

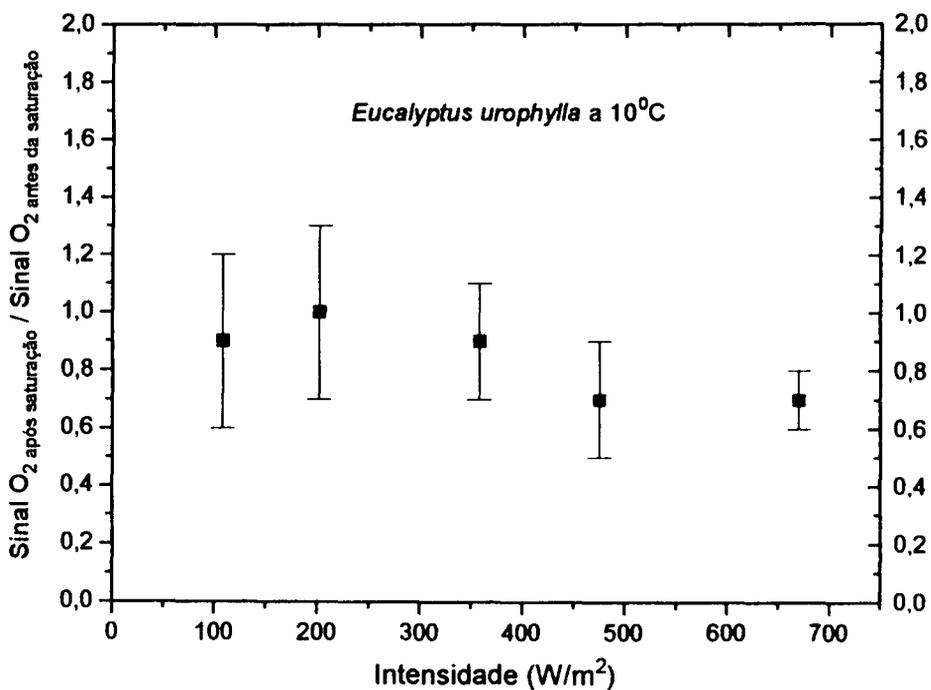


Figura 4.7 - Relação entre atividade fotossintética de *Eucalyptus urophylla* adaptada a 10°C antes e depois da incidência de luz saturante

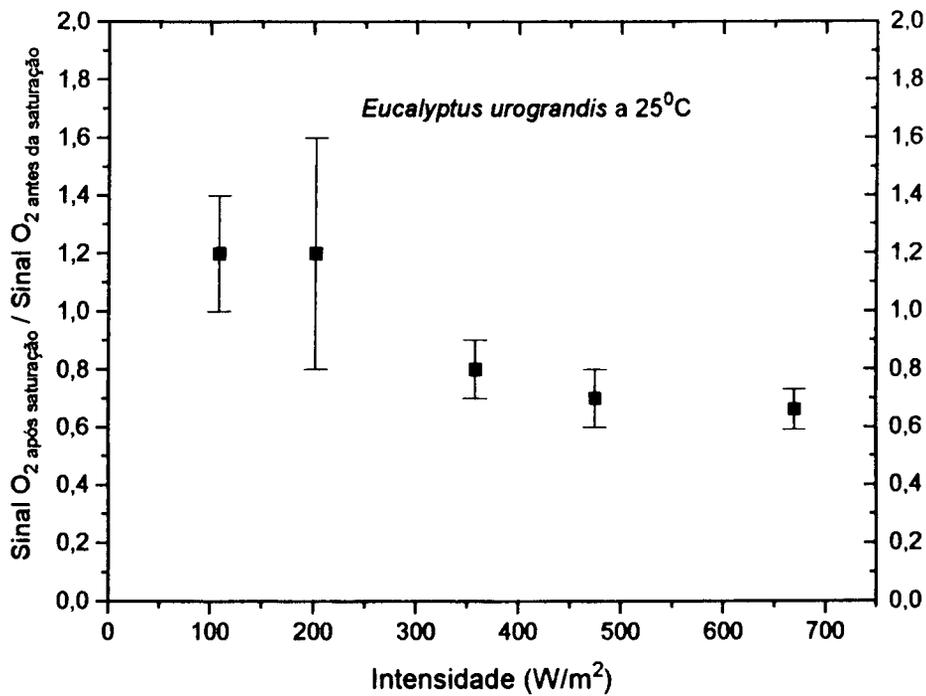


Figura 4.8 - Relação entre atividade fotossintética de *Eucalyptus urograndis* adaptada a 25°C antes e depois da incidência de luz saturante

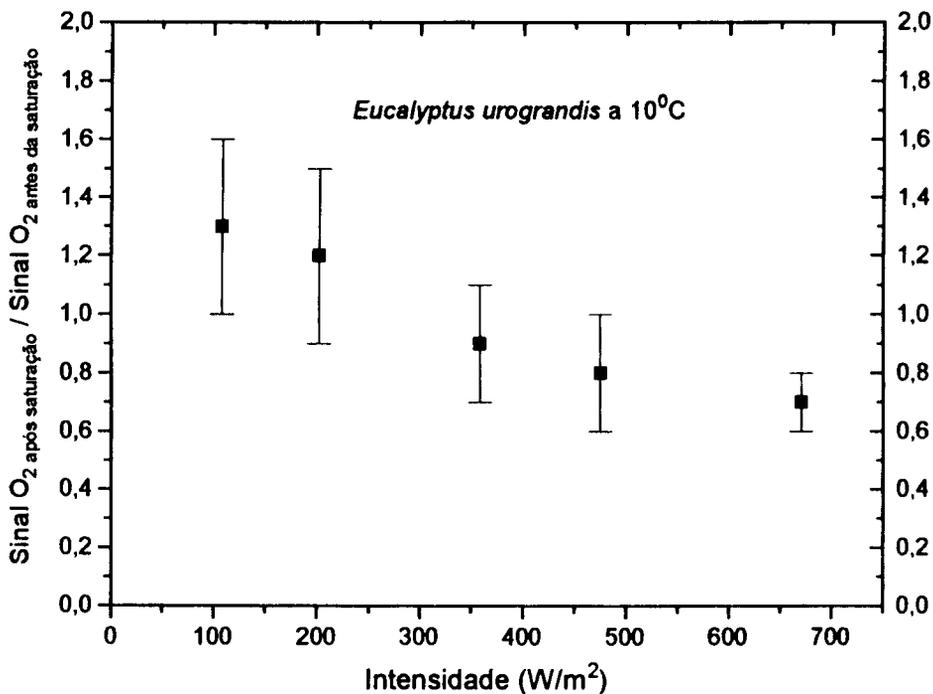


Figura 4.9 - Relação entre atividade fotossintética de *Eucalyptus urograndis* adaptada a 10°C antes e depois da incidência de luz saturante

## IV.4 - Curvas de Saturação

Outro estudo realizado foi a comparação das curvas de saturação fotossintética para as diferentes espécies de eucalipto. Novamente, o objetivo foi discriminar estas espécies através de medidas utilizando a técnica fotoacústica. A curva de saturação mostra a atividade fotossintética em função da intensidade da luz modulada incidente; é obtida variando-se a intensidade dessa luz e observando, após a estabilização do sinal fotoacústico e com o auxílio da incidência de luz saturante, a respectiva componente bária. Paralelamente a cada curva de saturação, o efeito negativo permitiu medir a componente térmica correspondente em função da intensidade luminosa.

Conforme discutido no capítulo III, para baixa frequência de modulação o sinal fotoacústico total é uma soma das componentes bária e térmica; para isolar cada uma dessas componentes - através do efeito negativo - deve-se levar em conta a perda fotoquímica. Para obter o valor dessa perda fotoquímica é necessário medir o chamado efeito positivo em função da intensidade luminosa, o que é feito à frequência de modulação alta (para este trabalho, utilizou-se  $f = 450$  Hz).

Nas medidas de efeito positivo, realizadas a alta frequência de modulação, é importante descontar do sinal medido a componente devida à luz que atinge a membrana do microfone (gerando sinal térmico). O sinal da folha é traseiro e o da membrana dianteiro. Em medições a frequências baixas, a componente da membrana é da ordem de 1% do sinal total observado, podendo ser desprezada. Isso não ocorre a frequências altas, onde o sinal fotoacústico é menor (devido à mudança no comprimento de difusão térmica), e a participação dessa componente no sinal total se torna proporcionalmente bem maior.

Para quantificar o sinal térmico da membrana do microfone, deve-se inicialmente verificar a transmitância da folha vegetal sob análise, no comprimento de onda utilizado nas medições. Para isso, compara-se o sinal fotoacústico para incidência direta na membrana do microfone com o sinal observado na presença da amostra. A transmitância é dada por:

$$\frac{S_{c',folha}}{S_{s',folha}} = \text{Transmitância} \quad (\text{eq.4.2})$$

As medidas efetuadas forneceram o valor de 4% para a transmitância em folhas de eucalipto, para luz incidente com  $\lambda = 680\text{nm}$ .

Multiplicando-se o sinal fotoacústico para incidência direta na membrana do microfone pelo valor da transmitância, obtém-se o sinal da membrana nas medidas de efeito positivo, para radiação incidente com uma dada intensidade. Como este sinal é diretamente proporcional à intensidade luminosa, pode-se calcular o sinal da membrana para outros valores de intensidade.

Uma vez obtido o sinal térmico correspondente à membrana do microfone, as curvas de efeito positivo são corrigidas descontando-se este sinal da membrana (amplitude e fase) e o sinal parasita detectado experimentalmente (sinal residual observado para luz incidente nula e que pode ser causado por vibrações mecânicas provocadas pelo modulador na mesa fotoacústica, nas medidas a altas frequências de modulação).

Um modo de verificar a correção da curva obtida é observar a fase do sinal fotoacústico resultante; esta fase deve assumir um valor constante independente da intensidade luminosa (pois o sinal observado a frequência de modulação alta é puramente térmico, apresentando portanto uma fase determinada).

A curva de saturação da atividade fotossintética é obtida eliminando-se da curva experimental em função da intensidade luminosa a componente térmica (através do efeito negativo, já considerando a energia armazenada). Como na curva de efeito positivo, a correção do sinal bórico é garantida pela constância na fase do mesmo, após a eliminação das outras componentes.

O procedimento descrito acima foi repetido para diversas amostras das espécies de eucalipto *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. urograndis*. As curvas de saturação assim obtidas foram ajustadas com o auxílio do modelo teórico apresentado no capítulo III, onde foi visto que estas curvas são do tipo

$$R = \frac{\varepsilon \eta_0 F}{1 + \frac{\varepsilon \eta_0 \tau_q F}{N}} \quad (\text{eq.4.3})$$

onde  $F$  (fluxo de fótons) é obviamente proporcional à intensidade da radiação incidente. O comportamento assintótico das curvas permite comparar as amostras analisadas em termos de dois parâmetros principais: o valor de saturação para a taxa de atividade fotossintética e a intensidade luminosa para a qual esta taxa atinge metade do valor de saturação.

Após encontrar as curvas de saturação da atividade fotossintética, pode-se obter uma expressão correspondente para o ajuste das curvas de sinal térmico. Sendo proporcional à energia dos portadores que não vão para a via fotoquímica somada à fração de energia convertida em calor durante as reações fotoquímicas, o sinal térmico é dado por

$$T = \varepsilon F - rR = \varepsilon F \left( 1 - \frac{r \eta_0}{1 + \frac{\varepsilon \eta_0 \tau_q F}{N}} \right) \quad (\text{eq.4.4})$$

onde  $\varepsilon F$  é a taxa total de elétrons injetados e R é dado pela equação anterior.

Na verdade, a curva experimental de sinal bário é dada pela equação 4.3 a menos de uma constante multiplicativa arbitrária. Do mesmo modo, a curva experimental correspondente ao sinal térmico também apresenta uma constante multiplicativa arbitrária em relação à equação 4.4. Estas constantes dependem de diversos parâmetros experimentais como resposta do microfone etc. Além disso, a constante que aparece à frente do sinal bário é diferente da que aparece à frente do sinal térmico, pois cada componente reflete uma via distinta de geração do sinal fotoacústico que depende de parâmetros específicos.

A seguir, a tabela 3 mostra os valores médios obtidos para o sinal de saturação da atividade fotossintética e a intensidade luminosa para a qual esta taxa atinge metade do valor de saturação. Mais uma vez, utilizou-se luz modulada a 17 Hz e com  $\lambda = (680 \pm 5)$  nm. Para permitir a comparação entre as espécies de eucalipto quanto ao sinal térmico, a tabela apresenta os valores calculados da componente térmica para intensidade luminosa de  $100 \text{ W/m}^2$ . Cada valor da tabela corresponde à média de 5 medidas.

**Tabela 3** - Médias de parâmetros das curvas de saturação para as três espécies de eucalipto estudadas (média  $\pm$  desvio quadrático médio)

Amostra	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	<i>Eucalyptus urograndis</i>
Valor de saturação da atividade fotossintética ( $\mu\text{V}$ )	230 $\pm$ 40	240 $\pm$ 50	340 $\pm$ 66
Intensidade de meia-saturação ( $\text{W/m}^2$ )	36 $\pm$ 8	40 $\pm$ 10	60 $\pm$ 23
Sinal térmico a $100 \text{ W/m}^2$ ( $\mu\text{V}$ )	70 $\pm$ 7	100 $\pm$ 15	69 $\pm$ 5

A figura 4.10 mostra um exemplo das medidas efetuadas; na figura, os pontos experimentais são acompanhados dos ajustes teóricos correspondentes.

Os dados apresentados na tabela 3 (e visualizados na figura 4.11) permitem discriminar as espécies de eucalipto analisadas. A espécie *E.urograndis* mostra atividade fotossintética superior às demais: maior intensidade luminosa é necessária para saturar a atividade fotossintética em mudas dessa espécie, e a saturação ocorre a um nível mais alto de atividade em comparação com as amostras de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*. Isto parece indicar maior adaptabilidade das amostras *Eucalyptus urograndis* a ambientes caracterizados pela exposição a altas intensidades luminosas. Por outro lado, a espécie *E.urophylla* se destaca por apresentar maior nível de sinal térmico em relação às demais. Isso pode indicar diferenças na morfologia das folhas (espessuras ou texturas foliares diferentes, por exemplo).

Estes resultados estão em acordo com os estudos de indução fotossintética, em que as barras de erro impediram discriminação entre as espécies. Observe-se que as medidas de indução foram realizadas para luz modulada de 680 nm com  $8 \text{ W/m}^2$ . Este valor de intensidade é muito baixo para que se possa discriminar a resposta apresentada pelas três espécies de eucalipto estudadas.

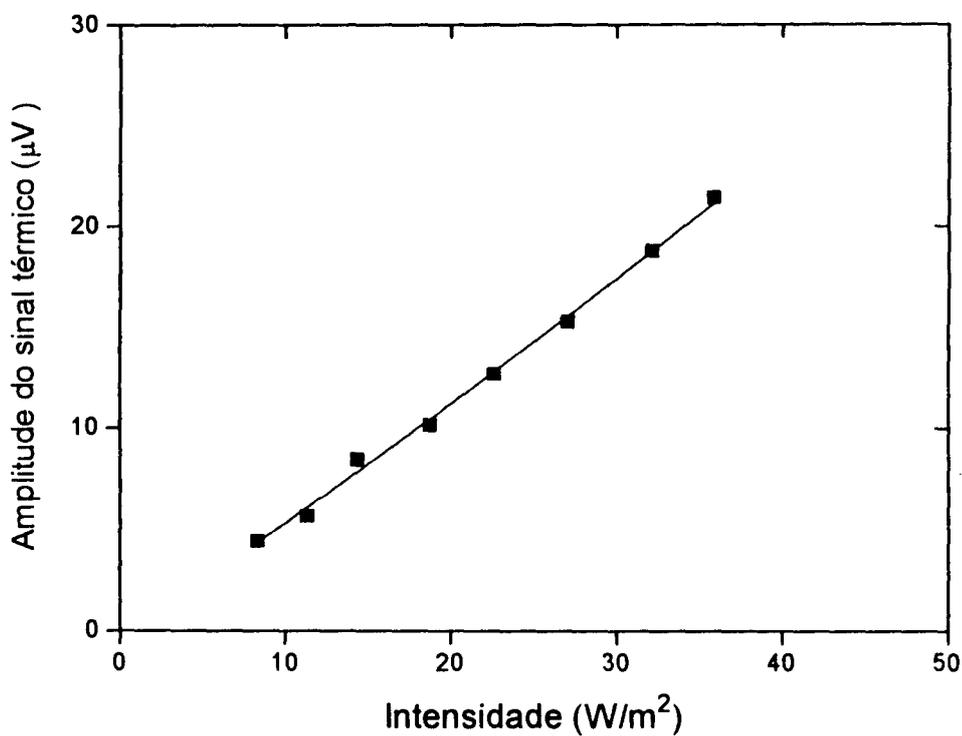
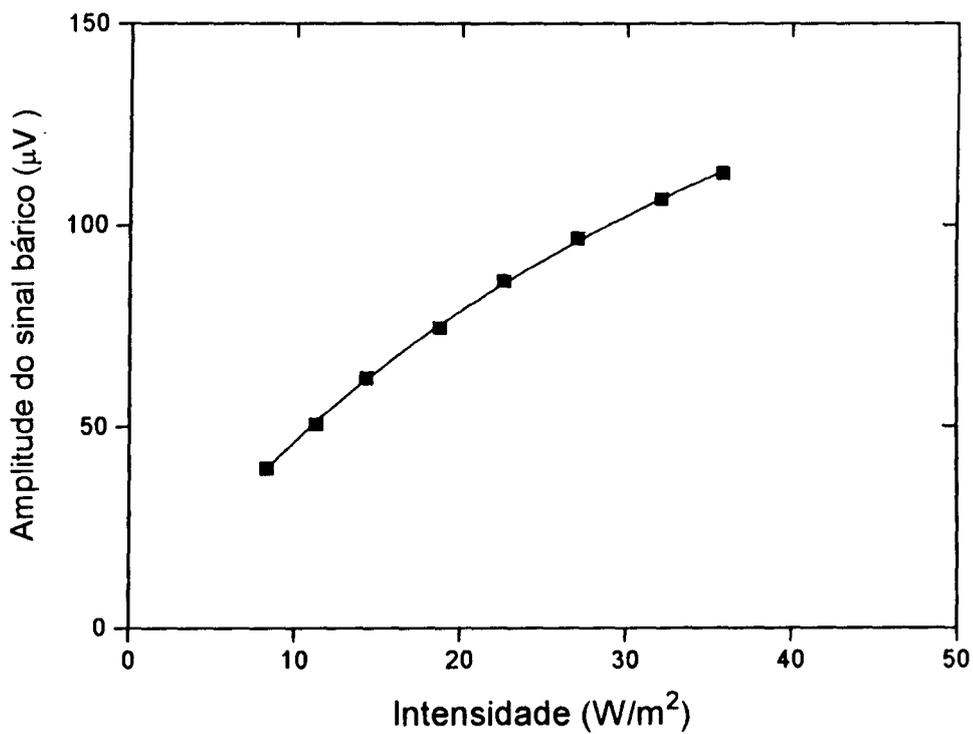


Figura 4.10 - Exemplo de medidas de saturação fotossintética e sinal térmico em função da intensidade. Os pontos correspondem aos dados experimentais; a curva sólida indica o ajuste teórico (medidas efetuadas em folha de *Eucalyptus grandis*)

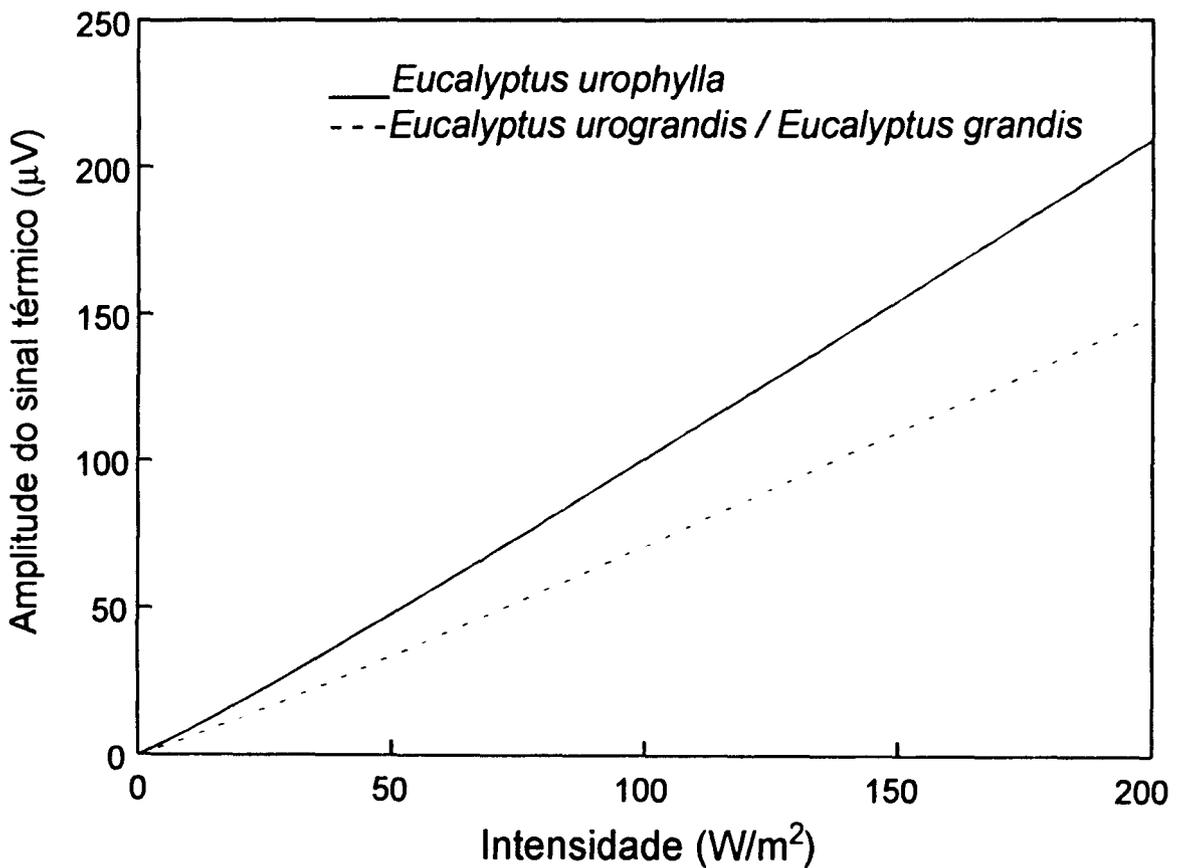
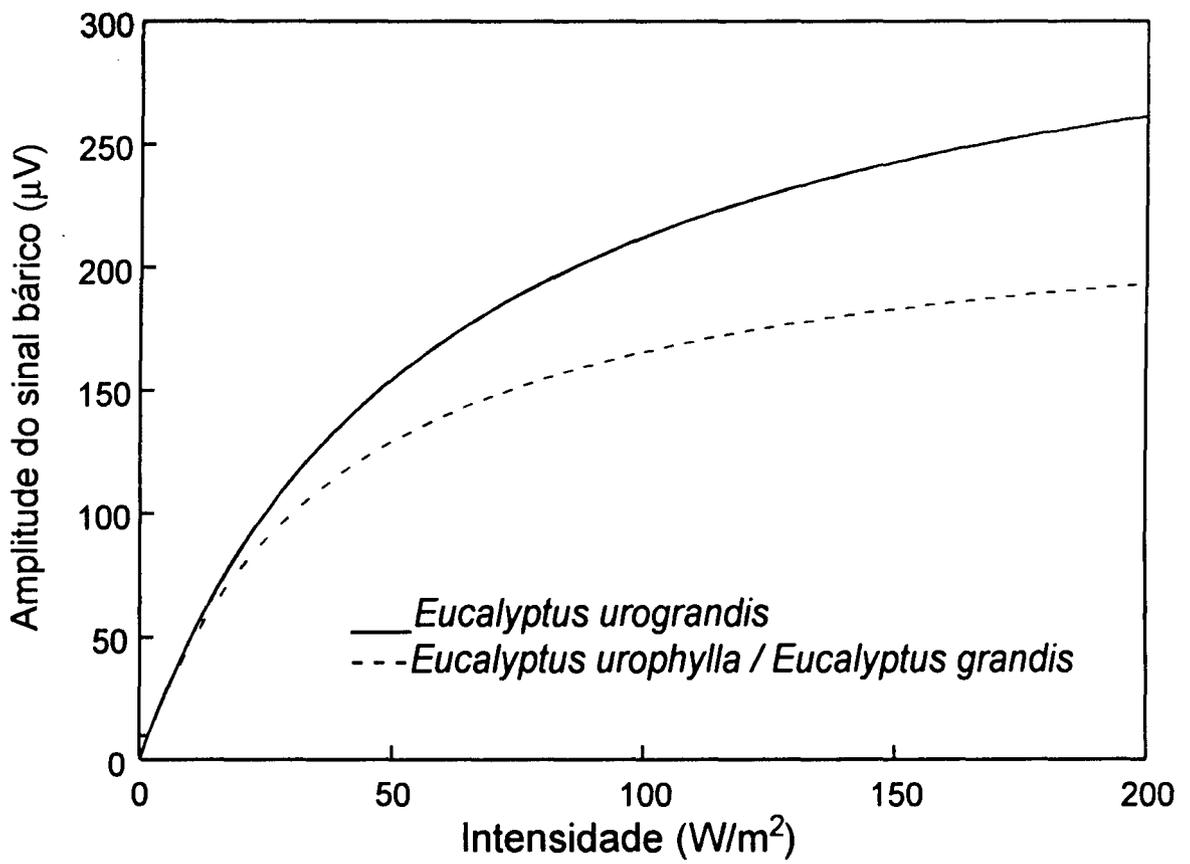


Figura 4.11 - Ajustes respectivamente das curvas de saturação fotossintética e sinal térmico para as três espécies de eucalipto

## CAPÍTULO V :

# CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Após a realização de todas as medições compreendidas pelo estudo aqui apresentado, pode-se afirmar que a fotoacústica é uma ferramenta poderosa no estudo de sistemas vegetais. Permite realizar uma série de experimentos úteis em análises comparativas entre plantas de espécies e/ou gêneros diferentes. A possibilidade de que essas medidas sejam realizadas *in vivo* e *in situ* é um fator que motiva este tipo de estudo, uma vez que suspensões aquosas de cloroplastos não podem reproduzir o comportamento de amostras vivas, e folhas destacadas do caule podem ter sua resposta comprometida pela desidratação. Assim, é importante frisar que, além de versátil, a técnica fotoacústica é não destrutiva.

As medidas fotoacústicas são úteis para se avaliar diferentes condições de estresse impostas às plantas, uma vez que o sinal observado se altera em função de mudanças na temperatura, na intensidade da luz incidente ou em parâmetros morfológicos das folhas, entre outros fatores.

O estudo desenvolvido em mudas de eucalipto mostra a utilidade da técnica fotoacústica na análise do comportamento fotossintético de plantas arbóreas, normalmente menos estudadas. Verifica-se experimentalmente a ocorrência de fotoinibição para as três espécies de eucalipto estudadas. As curvas de indução fotossintética permitem discriminar o comportamento de amostras aclimatadas a diferentes temperaturas, enquanto as curvas de saturação fotossintética e de sinal térmico em função da intensidade luminosa incidente evidenciam a discriminação entre as espécies *E.grandis*, *E.urophylla* e *E.urograndis*. Destaca-se a maior amplitude de sinal térmico para as amostras da espécie *E.urophylla*, enquanto amostras da espécie *E.urograndis* apresentam as maiores taxas de atividade fotossintética.

As perspectivas do estudo fotoacústico em sistemas vegetais são amplas e incluem a repetição de medidas (particularmente no item “indução fotossintética”) numa gama cada vez mais ampla de plantas, visando principalmente comparar as respostas entre estas plantas para evidenciar possíveis diferenças no ciclo fotossintético das mesmas.

Conforme exposto no capítulo III, a perda fotoquímica pode ser obtida através de medidas de efeito positivo. Este parâmetro indica a energia armazenada pela planta como energia química. A figura 5.1 mostra um exemplo desse tipo de curva. Assim, através da fotoacústica pode-se estudar comparativamente a perda fotoquímica em diferentes espécies vegetais.

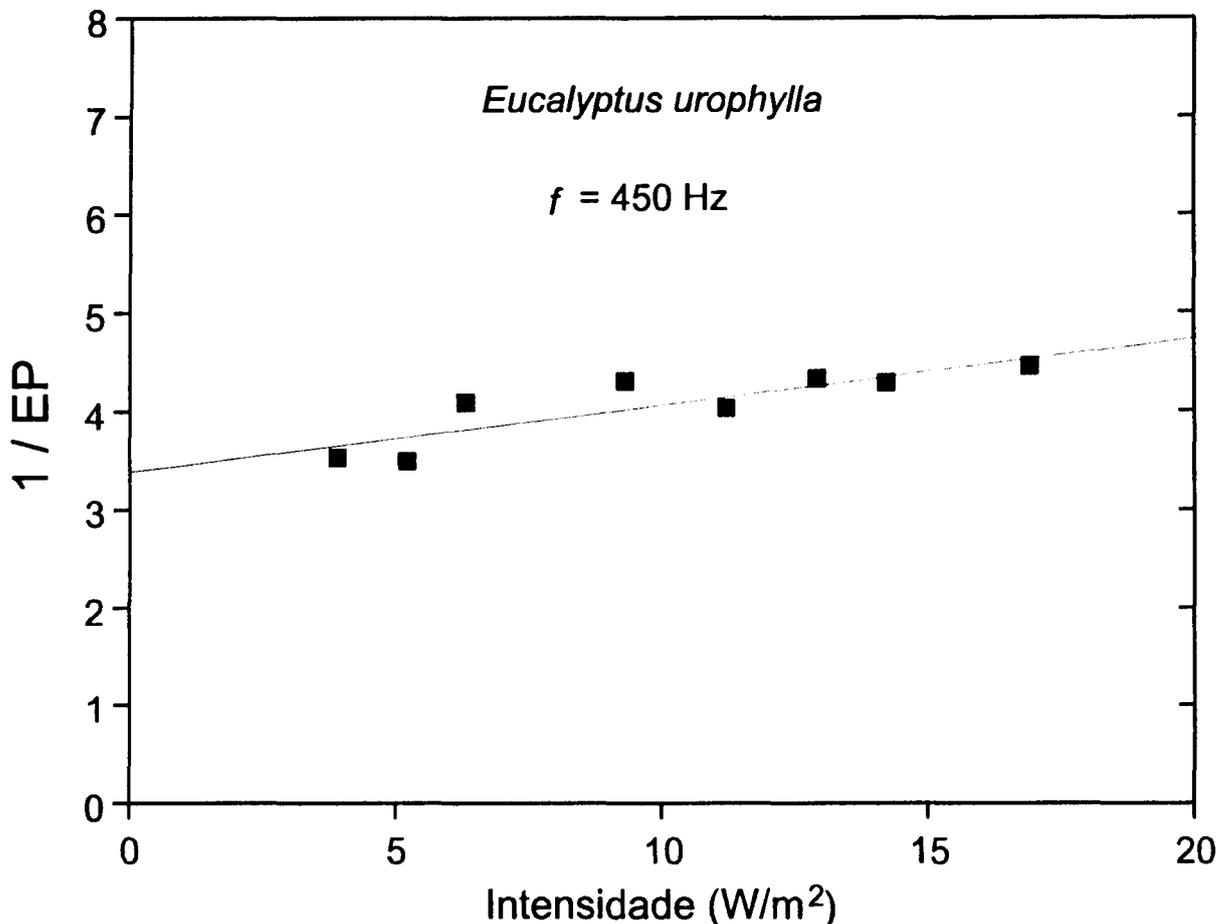


Figura 5.1 - Exemplo de gráfico de perda fotoquímica; o ajuste efetuado fornece  $EP(0) = 0,29$  para esta medida específica.

Outra perspectiva de estudo diz respeito à observação do chamado “efeito Emerson” (apêndice I). Este efeito consiste na maximização da atividade fotossintética com a excitação simultânea dos dois fotossistemas. Como a fotoacústica permite a observação do efeito Emerson, pode-se estudar a possível influência da radiação Emerson no tempo de vida dos aceitadores eletrônicos excitados.

Quanto à hipótese de o acoplamento dos transportadores de elétrons responsáveis pela síntese de ATP influir no tempo de indução fotossintética, a aplicação de substâncias químicas desacopladoras às folhas sob estudo permitirá avaliar sua correção.

O controle da atmosfera sob a qual ficam expostas as plantas nas medições fotoacústicas abre a perspectiva de se estudar a influência dessa atmosfera na atividade fotossintética das folhas.

Paralelamente às linhas de pesquisa aqui citadas, busca-se aprimorar a técnica é o monitoramento das plantas para garantir uma maior reprodutibilidade das medidas (questão essencial e delicada, quando se trata de amostras *vivas*).

O uso da técnica fotoacústica no estudo da fotossíntese é um exemplo da interdisciplinariedade que caracteriza um número cada vez maior de pesquisas nos dias atuais. Assim, deve-se enfatizar que o trabalho desenvolvido e apresentado ao longo desta tese surge como fruto de um esforço conjunto de uma equipe de físicos, agrônomos e biólogos, e esta colaboração é vital para que se maximize os resultados experimentais e as discussões por eles geradas.

## Apêndice I - O Efeito Emerson

Conforme foi visto na seção III.1, as plantas possuem dois fotossistemas responsáveis pela captação da luz a ser usada nos processos da fotossíntese. Como o **fotossistema I (PS I)** tem absorção máxima para radiação em torno de 700 nm e o **fotossistema II (PS II)** apresenta seu pico de absorção próximo a 670 nm, é possível estimular especificamente *um* dos fotossistemas, utilizando-se luz monocromática no comprimento de onda apropriado.

Voltando à saturação fotossintética: enquanto a luz branca satura os centros de reação de ambos os fotossistemas, luz próxima do infravermelho ( $\lambda$  acima de 700 nm) é absorvida apenas pelo **PS I**. Em 1957, o fisiologista Robert Emerson descobriu que a incidência desta luz (o “vermelho distante”) intensificava a liberação de oxigênio. Na verdade, foram as observações de Emerson que levaram ao conceito da existência de dois fotossistemas na fotossíntese [34].

O efeito Emerson consiste na otimização da fotossíntese com a excitação simultânea dos dois fotossistemas. Em outras palavras, **a taxa de fotossíntese na presença de luz de ambos os comprimentos de onda é maior que a soma das taxas para cada comprimento de onda em separado** [6, 35]. Se o sistema é iluminado com luz monocromática *modulada* capaz de excitar um dos fotossistemas, o acréscimo de luz *contínua* num comprimento de onda capaz de excitar o outro fotossistema leva a um aumento no sinal fotoacústico de  $O_2$  evoluído. Isso evidencia experimentalmente o acoplamento entre os dois fotossistemas (o simples acréscimo de luz contínua não pode, por si só, influenciar no sinal fotoacústico, que é modulado).

Assim, o efeito Emerson pode ser definido como o ganho no sinal quando se acrescenta iluminação contínua em comprimento de onda longo ( $\lambda > 700$  nm) a um sistema iluminado com radiação modulada de  $\lambda$  curto ( $\lambda \cong 650$  nm):

$$E = \frac{S_{oxig}^{\lambda_{curto} + \lambda_{longo}} - S_{oxig}^{\lambda_{cu}}}{S_{oxig}^{\lambda_{curto}}} \quad (\text{eq. A1})$$

- [27] W. J. Silva, L. M. Prioli, A. C. N. Magalhães, A. C. Pereira, H. Vargas, A.M.Mansanares, N.Cella, L.C.M.Miranda & J.Alvarado-Gil, *Plant Science* **104**, 177 (1995)
- [28] Y.Inoue, A.Watanabe & K.Shibata, *FEBS Letters* **101**, 321 (1979)
- [29] S.B.Powles, *Ann. Rev. Plant Phys.* **35**, 15 (1984)
- [30] R.T.Prinsley & R.C.Leegood, *Biochem. Biophys. Acta* **849**, 244 (1986)
- [31] Franck, *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 190 (1953)
- [32] M.R.Badger, *Ann. Rev. Plant Phys.* **36**, 27 (1985)
- [33] M.Havaux e M.Eyletters, *Z.Naturforsch* **46c**, 1038 (1991)
- [34] R.Bidwell, "*Plant Physiology*", Macmillan Publishing Co. (1974), cap.7
- [35] O.Canaani, D.Cahen & S.Malkin, *FEBS Letters* **150**, 142 (1982)

Além das referências acima, fez-se uso das seguintes obras na redação desta tese:

- [1] Novo Dicionário Básico da Língua Portuguesa *Folha Aurélio*, Aurélio Buarque de Holanda Ferreira, Nova Fronteira (1995)
- [2] Manual de Redação e Estilo *O Estado de São Paulo*, Eduardo Martins (org.), O Estado de S.Paulo (1990)

# BIBLIOGRAFIA

- [1] A.G.Bell, Am.J.Sci. **20**, 305 (1880)
- [2] W.H.Preece, Proc. R. Soc. London **31**, 506 (1881)
- [3] M.E.Mercadier, C. R. Acad. Sci. Paris **92**, 409 (1881)
- [4] A.Rosencwaig, Science **181**, 657 (1973)
- [5] A.Rosencwaig & A.Gersho, J. Appl. Phys. **47**, 64 (1976)
- [6] E.Rabinowitch & Govindjee, "*Photosynthesis*", Wiley & Sons (1969), caps. 1 e 13
- [7] M.J.Adams, B.C.Beadle, A.A.King & G.F.Kirkbright, Analyst **101**, 553 (1976)
- [8] A.Rosencwaig, Advances in Eletronics and Electron Physics **46**, Acad. Press (1978)
- [9] D.Cahen, S.Malkin & E.I.Lerner, FEBS Letters **91**, 339 (1978)
- [10] G.Bults, B.A.Horwitz, S.Malkin & D.Cahen, Biochem. Biophys. Acta **679**, 452 (1982)
- [11] M.Havaux, O.Canaani & S.Malkin, Plant Phys. **82**, 827 (1986)
- [12] J. W. Nery, O. Pessoa Jr, H. Vargas, F. de A. Reis, A. C. Gabrielli, L.C.M.Miranda & C.A.Vinha, Analyst **112**, 1487 (1987)
- [13] M.V.Marquezini, Tese de Mestrado, IFGW / Unicamp (1990)
- [14] N.Cella, Tese de Doutorado, IFGW / Unicamp (1990)
- [15] A.C.Pereira, Tese de Doutorado, IFGW / Unicamp (1993)
- [16] A.C.Pereira, M.Zerbetto, G.C.Silva, W.J.Silva, H.Vargas, G.O.Netto, N.Cella & L.C.M.Miranda, Meas. Sci. Technol. **3**, 931 (1992)
- [17] F.A.McDonald & G.C.Wetsel Jr., J. Appl. Phys. **49**, 2313 (1978)
- [18] G.Rousset, F.Lepoutre & L.Bertrand, J. Appl. Phys. **54**, 2383 (1983)
- [19] A.M.Mansanares, Tese de Doutorado, IFGW / Unicamp (1991)
- [20] G.A.Lima, M.L.Baesso, A.P.Arguello, E.C.da Silva, H.Vargas & L.C.Miranda, Phys. Rev. B **36**, 9812 (1987)
- [21] M.V.Marquezini, N.Cella, A.M.Mansanares, H.Vargas & L.C.M. Miranda, Meas. Sci. Technol. **2**, 396 (1991)
- [22] A.C.Pereira, G.O.Netto, H.Vargas, N.Cella & L.C.M.Miranda, Rev. Sci. Instrum. **65**, 1512 (1994)
- [23] A.C.Pereira, L.M.Prioli, W.J.da Silva, G.O.Netto, H.Vargas, N.Cella & J.Alvarado-Gil, Plant Science **96**, 203 (1994)
- [24] E.Ackerman, L.Ellis & L.Williams, "*Biophysical Science*", cap.20, s/data
- [25] K.Veeranjaneyulu, M.Charland, D.Charlebois, R.M.Lebanc, Photos. Research **30**, 131 (1991)
- [26] W.Haehnel, Ann. Rev. Plant Phys. **35**, 659 (1984)

- [27] W. J. Silva, L. M. Prioli, A. C. N. Magalhães, A. C. Pereira, H. Vargas, A.M.Mansanares, N.Cella, L.C.M.Miranda & J.Alvarado-Gil, *Plant Science* **104**, 177 (1995)
- [28] Y.Inoue, A.Watanabe & K.Shibata, *FEBS Letters* **101**, 321 (1979)
- [29] S.B.Powles, *Ann. Rev. Plant Phys.* **35**, 15 (1984)
- [30] R.T.Prinsley & R.C.Leegood, *Biochem. Biophys. Acta* **849**, 244 (1986)
- [31] Franck, *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 190 (1953)
- [32] M.R.Badger, *Ann. Rev. Plant Phys.* **36**, 27 (1985)
- [33] M.Havaux e M.Eyletters, *Z.Naturforsch* **46c**, 1038 (1991)
- [34] R.Bidwell, "*Plant Physiology*", Macmillan Publishing Co. (1974), cap.7
- [35] O.Canaani, D.Cahen & S.Malkin, *FEBS Letters* **150**, 142 (1982)

Além das referências acima, fez-se uso das seguintes obras na redação desta tese:

- [1] Novo Dicionário Básico da Língua Portuguesa *Folha Aurélio*, Aurélio Buarque de Holanda Ferreira, Nova Fronteira (1995)
- [2] Manual de Redação e Estilo *O Estado de São Paulo*, Eduardo Martins (org.), O Estado de S.Paulo (1990)