

APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA AO ESTUDO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

*Este exemplar deve ser enviado à redação final
da Tese defendida pela aluna Miriam
Zerbetto e aprovada pela Comissão julgadora*

*Campinas, 2 de julho de
1993,
Helion Vargas*

**Orientador:
Prof. Helion Vargas**

Tese apresentada ao Instituto de Física
"Gleb Wataghin", Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do título
de Mestre em Física.

Campinas - junho de 1993.

Dedico com especial afeto este trabalho aos meus pais Luiz e Mércia, à minha irmã Sandra e ao Maurício.

Agradecimentos

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial :

- ao Prof. Helion Vargas, pela dedicada orientação e amizade durante este trabalho;
- ao Prof. Edson Correa da Silva , pela amizade e bom humor constante no laboratório;
- ao Prof. Curt E. Hennies, pelas sugestões e contribuições nos trabalhos, em especial nos problemas com o computador;
- ao pessoal do laboratório de Metais e Ligas, Prof. Flávio C. Gandra, Antonio Medina, Rogério e Lobato, pelas contribuições e amizade;
- aos Professores Luiz Carlos Miranda e William José da Silva pelas proveitosas discussões e contribuições nos trabalhos;
- à professora Elza C.C. Vasconcellos, que me iniciou no campo da pesquisa;
- à Dinah, pela amizade e apoio nos momentos difíceis;
- aos amigos Alexandre, Antonio e Guilherme, pela especial dedicação e amizade desde o meu início no laboratório;
- à Ana, pela grande amizade e carinho desde nossa entrada na faculdade e pelas longas noites de estudo;
- aos ex-alunos do laboratório, Antonio Mansanares, Bento, Norberto, Ossamu e Mauro, nas sugestões e discussões.
- aos amigos Marivaldo e Marcelo Parma, pela amizade e pelos momentos de descontração;
- à Cora, Myoko, Stella, Melita, Marta, Rose e Rose, da secretaria do DEQ, à Maria Inês, Cidinha e Armando da secretaria de Pós-Graduação, ao pessoal da biblioteca da Física, em especial à Nilza e à Ângela;
- ao Prof. William J. da Silva, Professora Laudénir M. Prioli e Marcelo, pelas sementes de milho e pelas plantas usadas no experimento de fotossíntese e pela disposição em nos ajudar nos eventuais problemas;
- aos meus pais que investiram em mim e sempre torceram pelo sucesso de meu trabalho;
- à minha irmã Sandra pelas sugestões e esclarecimentos sobre as disciplinas, e pela amizade;
- ao Maurício, que esteve o tempo todo ao meu lado durante este trabalho me incentivando, pelo especial carinho e dedicação que tem por mim, e pelas correções e edição deste trabalho;
- aos meus avós, ao Edécio, à Tia Célia, ao Danilo e à Camila pelo apoio e constante interesse em meu trabalho;
- ao suporte financeiro dado pelo CNPq;

Resumo

Neste trabalho a espectroscopia fotoacústica é aplicada em materiais biológicos através de diversas situações experimentais.

A técnica fotoacústica da "Célula Aberta" é aplicada para a obtenção do espectro de absorção fotoacústico de plantas, bem como para a observação dos efeitos negativo e positivo, ligados respectivamente à evolução de oxigênio e à energia armazenada da planta. Esses experimentos foram realizados "in vivo" e "in situ" em plantas verdes e albinas de milho. Através do espectro de absorção é observada a ausência de pigmentos responsáveis pela fotossíntese nas folhas albinas e como consequência desta ausência não é observado o efeito negativo. No caso das folhas verdes o efeito negativo é bastante pronunciado, comprovando que o oxigênio modulado produzido pela planta contribui para o sinal fotoacústico.

As propriedades térmicas e mecânica do pericarpo de milho comum e de pipoca são investigadas com o objetivo de estudar a evolução do milho e encontrar uma explicação para o estouro da pipoca. As propriedades térmicas obtidas são a difusividade e a condutividade térmica medidas pelo "Método dos Dois Feixes" e pela "Técnica de elevação da temperatura sob iluminação contínua", respectivamente. A propriedade mecânica medida é a rigidez flexural do pericarpo. Relacionando essas propriedades é mostrado que o pericarpo age como uma cápsula no modelo de vaso de pressão produzindo o estouro. Os dados experimentais obtidos mostram que o pericarpo do milho de pipoca está mais apto a permitir o estouro do que o milho comum.

Summary

The Open Photoacoustic Cell technique is applied to obtain the absorption spectrum of plants and to the observation of the positive and negative effects, which refer respectively to the evolution of oxygen and to the energy storage by the plant. These experiments are made "in vivo" and "in situ", in green and albinos corn plants. Through the absorption spectrum, the absence of the pigments responsible for the photosynthesis in albino leaves is observed, and consequently the negative effect is not detected. In the case of the green leaves, the negative effect is highly pronounced, which proves that the modulated oxygen produced by the plant contributes to the photoacoustic signal.

The thermal and mechanical properties of the corn and popcorn pericarps are investigated with the purpose of studying the evolution of the corn plant and to explain why does popcorn pop. The measured thermal properties are the thermal diffusivity and conductivity, obtained with the "Two beams method" and "Light-induced temperature rise method", respectively. The measured mechanical property is the flexural rigidity of the pericarp. Combining these results it is shown that the pericarp acts as a cap in the pressure vessel model, producing the pop. The experimental data obtained show that the popcorn pericarp is more apt to permit the pop than the one of the corn.

Conteúdo

I	Aspectos Gerais da Espectroscopia Fotoacústica	1
I.1	Introdução histórica	1
I.2	Efeito fotoacústico em sólidos	2
I.2.1	Mecanismos de geração do sinal fotoacústico	2
I.2.2	Modelo de Rosencwaig-Gersho	4
I.2.2.1	Absorção por incidência traseira	7
I.2.2.2	Absorção superficial	8
I.2.3	Casos limites	9
	Referências	11
II	Sistemas Biológicos: Generalidades	12
II.1	Fotossíntese em folhas vegetais	12
II.1.1	Introdução histórica	12
II.1.2	Equação geral da fotossíntese	13
II.1.3	Anatomia e pigmentos de uma folha	14
II.1.4	O processo da fotossíntese	18
II.2	Características gerais de um grão de milho	21
	Referências	23
III	Técnicas Experimentais	24
III.1	Utilização da técnica OPC(Open Photoacoustic Cell) em estudos de plantas "in vivo" e "in situ"	24
III.1.1	Detector OPC	25
III.1.2	Sinal fotoacústico em folhas vegetais	30

III.1.3	Arranjos experimentais	33
III.1.3.1	Espectro de absorção	33
III.1.3.2	Efeitos positivo e negativo	36
III.2	Determinação da difusividade térmica (α) pelo Método dos Dois Feixes	38
III.3	Determinação da condutividade térmica (k) pela Técnica de Elevação Contínua da Temperatura sob Iluminação Contínua	42
III.4	Medidas de rigidez mecânica	45
	Referências	48
IV	Experimentos " <i>in situ</i> " e " <i>in vivo</i> " em folhas de milho usando a Técnica OPC	50
IV.1	Espectro de absorção fotoacústico	50
IV.2	Observação dos efeitos positivo e negativo	53
IV.3	Discussão	57
	Referências	59
V	Caracterização das Propriedades Térmicas e Mecânica do pericarpo de milho	60
V.1	Preparação das amostras	60
V.2	Medidas das propriedades térmicas: Difusividade e Condutividade Térmica	61
V.3	Medidas de rigidez mecânica	66
V.4	Modelo do vaso de pressão	67
V.5	Discussão	71
	Referências	76
VI	Conclusões Finais	77

Apresentação

O objetivo do presente trabalho é o estudo de materiais biológicos através da espectroscopia fotoacústica. O estudo desses materiais tem sido de grande interesse, pois permite o estudo da evolução das espécies bem como o desenvolvimento de novas espécies, através da caracterização das propriedades ópticas e térmicas.

Constituído de seis capítulos, o trabalho está apresentado da seguinte forma:

- No capítulo I são apresentados os aspectos gerais da espectroscopia fotoacústica, em particular, o modelo teórico unidimensional de Rosencwaig-Gersho para a geração do sinal fotoacústico.

- Os sistemas biológicos de interesse neste trabalho são apresentados no capítulo II, ou seja, um breve estudo da fotossíntese em plantas e as características gerais de um grão de milho.

- O capítulo III mostra as técnicas experimentais utilizadas durante este trabalho. Além das técnicas baseadas no efeito fotoacústico, são apresentadas as técnicas para a medida da condutividade térmica e para a medida de rigidez mecânica.

- No capítulo IV é apresentado um estudo "in situ" e "in vivo" com folhas de milho usando o efeito fotoacústico, onde obteve-se espectros de absorção fotoacústicos e também observou-se a evolução de oxigênio pela planta realizando fotossíntese. Além disto, foi mostrado a importância da realização de medidas "in situ" e "in vivo".

- O capítulo V mostra como foi feita a caracterização das propriedades térmicas e mecânica dos pericarpos de milho comum e de pipoca, onde o objetivo foi o estudo da evolução do milho, bem como a explicação de como o milho de pipoca estoura.

- As conclusões finais e as perspectivas do trabalho são apresentadas no capítulo VI.

O trabalho desenvolvido nesta tese deu origem às seguintes publicações:

1. Pereira, A.C., Zerbetto, M., Silva, G.C., Vargas, H., Silva, W.J., Cella, N., Miranda, L.C.M., "*OPC technique for "in vivo" studies in plant photosynthesis research*", Meas. Sci. Technol. **3** (1992).

2. Silva, W.J., Vidal, B.C., Martins, M.E.Q., Vargas, H., Pereira, A.C., Zerbetto, M., Miranda, L.C.M., "*What makes popcorn to pop*", Nature, **362**, 417(1993).

CAPÍTULO I

ASPECTOS GERAIS DA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Neste capítulo será feita uma síntese da teoria do Efeito Fotoacústico, nos restringindo ao efeito em sólidos, e dentro deste, faremos um estudo do modelo teórico unidimensional de Rosencwaig-Gersho para a geração do sinal fotoacústico.

I.1- Introdução

A geração de um sinal acústico numa gás devido à absorção de radiação modulada por uma amostra, contida em uma célula fechada, é o princípio do Efeito Fotoacústico. Quando a amostra absorve a radiação, os seus níveis internos de energia são excitados, e o decaimento na forma não radiativa causa um aquecimento local, que é transmitido ao gás ao redor da amostra através de uma onda térmica. A camada de gás sofre um aquecimento e se expande, gerando ondas acústicas no interior da célula. Além deste mecanismo de geração da onda acústica existem outros relacionados com a expansão térmica da amostra ao ser aquecida pela absorção da radiação.

O Efeito Fotoacústico foi acidentalmente descoberto, em 1880, por Alexandre Graham Bell[1], enquanto trabalhava em seu fonofone. Durante seu trabalho, Bell observou que era possível obter um efeito sonoro ao incidir um feixe de luz solar modulada sobre um sólido, dentro de uma célula fechada. Motivados pela descoberta de Bell, Tyndall[2] e Röntgen[3] também investigaram o Efeito Fotoacústico em gases.

Apesar do valor da descoberta, o Efeito Fotoacústico foi visto como uma mera curiosidade e foi esquecido. Na década de 30, com o surgimento do microfone, foram retomadas as investigações do Efeito Fotoacústico em gases, quando Viengerov[4] começou a usar este efeito para estudar a absorção de luz, no infravermelho, por gases e avaliar a concentração de certos gases em uma mistura

gasosa. O uso dos microfones ficou restrito ao Efeito Fotoacústico em gases até a década de 70, quando o efeito em sólidos foi retomado[5,6]. Em 1976, a teoria do Efeito Fotoacústico em sólidos foi desenvolvida por Rosencwaig-Gersho[7], explicando a maioria dos resultados experimentais obtidos. Desde então, muitas aplicações têm sido desenvolvidas nesta área[8-11].

I.2-Efeito fotoacústico em sólidos

I.2.1-Mecanismos de geração do sinal fotoacústico

Os possíveis mecanismos de geração do sinal fotoacústico em sólidos são:difusão térmica, expansão térmica, flexão termoelástica e efeito fotobárico.

O mecanismo de difusão térmica(figura I.1a), assume que o sinal fotoacústico é produzido pela condução de calor, gerado pela amostra, para o gás da célula. Em 1976, Rosencwaig e Gersho[7] desenvolveram um modelo teórico baseado neste mecanismo de geração do sinal fotoacústico, denominado Modelo de Difusão Térmica. Neste modelo, a amostra sólida absorve luz modulada, sendo esta energia absorvida convertida, parcial ou totalmente, em calor por processo de decaimento não-radiativo. Esse calor é transferido por condução à camada fronteira de gás, em contato com a amostra, que irá se expandir e contrair, na mesma frequência de modulação da luz. Essa expansão e contração faz com que a camada fronteira de gás funcione como um pistão vibratório no resto do gás, flexionando a membrana do microfone acoplado à célula e gerando assim o sinal fotoacústico.

O mecanismo de expansão térmica(figura I.1b) foi proposto como um modelo de pistão composto, onde a amostra aquecida pela absorção de radiação se expande periodicamente, funcionando como um pistão vibratório, comprimindo e expandindo o gás da célula, gerando assim o sinal fotoacústico.

A flexão termoelástica(figura I.1c) faz-se presente quando há um gradiente de temperatura na amostra, devido à absorção da luz modulada perpendicular ao seu plano. Desta forma, a expansão da amostra depende da profundidade com relação à superfície iluminada, resultando em uma flexão periódica, produzindo assim o sinal fotoacústico.

A ocorrência do quarto mecanismo denominado efeito fotobárico(figura I.1d) dá-se em amostras fotoquimicamente ativas, com troca gasosa entre a amostra e o gás da célula fotoacústica.

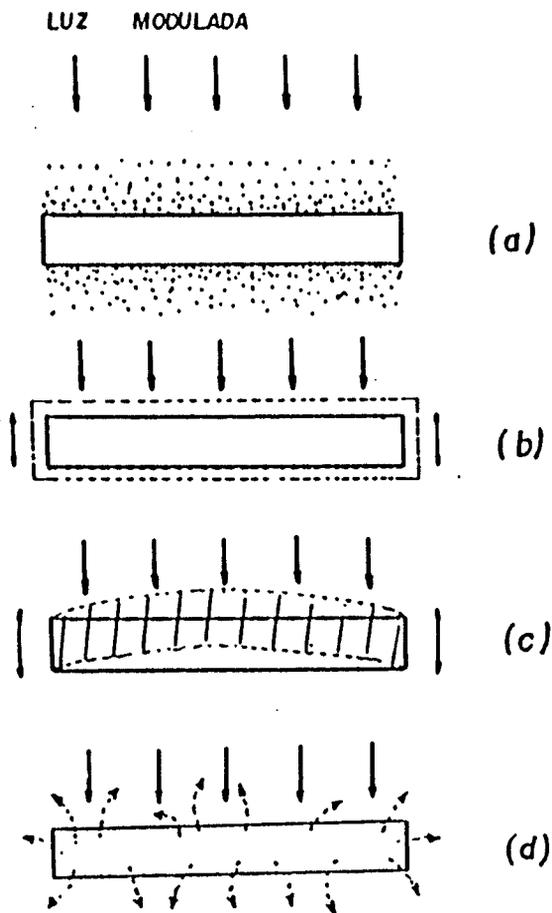


Figura I.1- Mecanismos de geração do sinal fotoacústico:

- (a) difusão térmica**
- (b) expansão térmica**
- (c) flexão termoelástica**
- (d) efeito fotobárico**

Geralmente estes mecanismos estão simultaneamente presentes, porém existem situações experimentais que fazem com que um determinado mecanismo seja predominante sobre os outros.

I.2.2-Modelo de Rosencwaig-Gersho

O Modelo RG[8], baseado no mecanismo de difusão térmica, faz uma análise unidimensional da produção do sinal fotoacústico na célula esquematizada na figura I.2. Uma face da amostra de espessura l_s está em contato com um suporte de espessura l_b e baixa condutividade térmica, e a outra face está em contato com a câmara de gás de espessura l_g , fechada por uma janela de quartzo, por onde incide a luz modulada. Um microfone é acoplado à câmara para detectar as variações de pressão no gás. Considera-se que o suporte e a câmara de gás não absorvem luz.

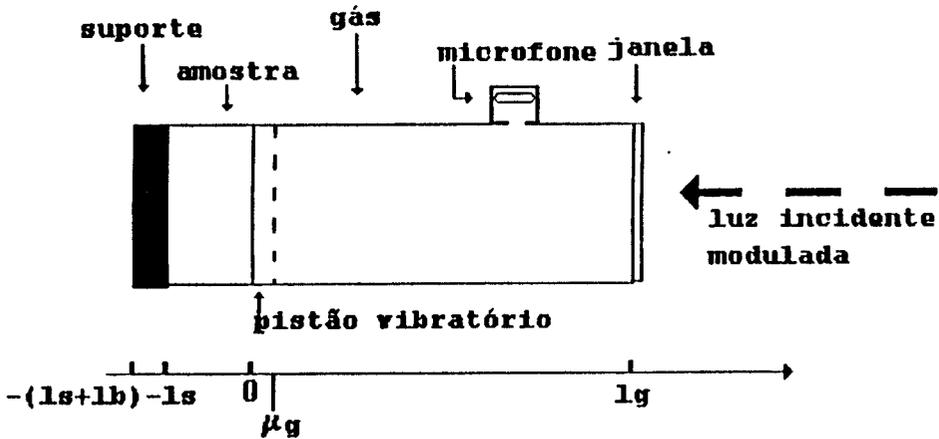


Figura I.2-Esquema da secção reta de uma célula fotoacústica convencional.

Primeiramente, vamos definir os parâmetros usados neste modelo, onde o índice i representará o material: $i=s$ (amostra), $i=g$ (gás) e $i=b$ (suporte).

$k_i \rightarrow$ condutividade térmica ($cal/cm.s. ^\circ C$)

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

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

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

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

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

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

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

onde $\omega = 2\pi f$ é a frequência de modulação da luz incidente.

Considerando a intensidade da luz monocromática modulada incidente na forma senoidal, temos:

$$I = (1/2) \cdot I_0(1 + e^{j\omega t}) \quad (1.1)$$

onde I_0 é o fluxo de luz monocromática incidente (W/cm^2).

No modelo RG toda a luz absorvida pela amostra é convertida em calor, isto é, só há relaxação térmica (decaimento não-radiativo). A intensidade da luz absorvida diminui exponencialmente ao penetrar na amostra, segundo a lei de Beer:

$$I(x,t) = I(t)e^{-\beta x} \quad (1.2)$$

exceto no caso de absorção superficial. Desta forma, a densidade de calor produzida em um ponto x da amostra, devido à absorção de luz será dada por:

$$s(x,t) = -dI(x,t)/dt = 1/2(\beta I_0) \cdot e^{-\beta x} \cdot (1 + e^{j\omega t}) \quad (1.3)$$

onde x assume valores negativos, dado que a amostra estende-se de $x=0$ a $x=-l_s$, com a luz incidindo em $x=0$.

A expressão para o sinal fotoacústico proveniente da variação de pressão na câmara, no modelo RG, é obtida aplicando-se a equação de difusão térmica à amostra, ao gás e ao suporte, respectivamente:

$$\partial^2 T(x,t)/\partial x^2 = (1/\alpha_s)\partial T(x,t)/\partial t + f(x,t) \quad (1.4a)$$

$$\partial^2 T(x,t)/\partial x^2 = (1/\alpha_g)\partial T(x,t)/\partial t \quad (1.4b)$$

$$\partial^2 T(x,t)/\partial x^2 = (1/\alpha_b)\partial T(x,t)/\partial t \quad (1.4c)$$

onde $f(x,t) = s(x,t)/k_s = (\beta I_0/2k_s) \cdot e^{-\beta x} \cdot (1 + e^{j\omega t})$ é o termo que considera a absorção da radiação incidente pela amostra, gerando calor.

Obtendo as soluções das equações (1.4), e aplicando as condições de contorno apropriadas, ou seja, a continuidade da temperatura e do fluxo de calor nas superfícies da amostra $x=0$ e $x=-l_s$, e a restrição de que a temperatura nas paredes da célula, $x=l_g$ e $x=-(l_s+l_b)$, seja a temperatura ambiente, chegamos a:

$$T_g(x,t) = \theta_0 \cdot e^{-(\sigma x + j\omega t)} \quad (1.5)$$

onde θ_0 é a temperatura na interface amostra-gás ($x=0$), dada por:

$$\theta_0 = \frac{\beta I_0}{2k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \cdot \frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s} + 2(b-r)e^{\beta l_s}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s}} \quad (1.6)$$

com:

$$b = \frac{k_b \sigma_b}{k_s \sigma_s} \quad (1.7)$$

$$g = \frac{k_g \sigma_g}{k_s \sigma_s} \quad (1.8)$$

$$r = \beta / \sigma_s \quad (1.9)$$

A equação (1.5) mostra que a componente oscilatória dependente do tempo no gás tende rapidamente a zero, com o aumento da distância da superfície da amostra. Desta forma, Rosencwaig e Gersho consideraram como pistão vibratório a camada de gás entre $x=0$ e $x=2\pi\mu_g$, dado que para $x > 2\pi\mu_g$ a oscilação atenua-se fortemente tendendo a zero.

Supondo que o pistão vibratório é formado por uma camada de gás ideal, e que o resto do gás responde adiabaticamente à ação do pistão, a variação física de pressão será dada pela parte real de:

$$\delta P(t) = Q \cdot e^{j(\omega t - \pi/4)} \quad (1.10)$$

$$\text{onde } Q = \frac{\gamma P_0 \theta_0}{\sqrt{2 l_g a_g T_0}} \quad (1.11)$$

sendo $\gamma = c_p/c_v$, a razão entre os calores específicos, P_0 a pressão ambiente e T_0 a temperatura média na superfície da amostra.

Substituindo θ_0 , dado pela eq.(I.6), na eq.(I.11) obtém-se:

$$Q = \frac{\beta l_0 \gamma P_0 \cdot [(r-1)(b+1)e^{\sigma_0 l_0} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_0 l_0} + 2(b-r)e^{\beta l_0}]}{2\sqrt{2 l_g a_g T_0} k_a (\beta^2 - \sigma_0^2) \cdot [(g+1)(b+1)e^{\sigma_0 l_0} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_0 l_0}]} \quad (1.12)$$

que pode ser interpretado como sendo a amplitude e a fase da onda acústica de pressão, produzida na célula pelo efeito fotoacústico, ou seja, podemos representar a eq.(I.10) como:

$$\vec{\delta P} = \vec{S}_F \cdot e^{j\omega t}, \text{ onde } \vec{S}_F = Q \cdot e^{-j\pi/4} \quad (1.13)$$

I.2.2.1-Absorção por incidência traseira

O Modelo desenvolvido por Rosencwaig e Gersho, descrito anteriormente, considerou apenas o caso de absorção por incidência frontal, ou seja, a luz incidindo sobre a superfície da amostra, que está em contato com o gás ($x=0$). Se agora incidirmos luz na superfície da amostra oposta ao gás ($x=-l_0$), teremos o caso de absorção por incidência traseira. Neste caso, o suporte poderá ser o próprio ar. Assim, temos [12]:

$$I(x,t) = I(t)e^{-\beta(l_0-x)} \quad (1.14)$$

fazendo com que a equação de RG, para a temperatura na superfície amostra-gás, seja dada por:

$$\theta_o = \frac{\beta I_o}{k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \cdot \frac{[(r+1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (r-1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s}]e^{-\beta l_s} + 2(b+r)}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s}} \quad (1.15)$$

1.2.2.2-Absorção superficial

Neste caso, representamos a absorção superficial a uma profundidade x_o por uma função delta " δ ", de forma que [12]:

$$f(x_o) = \frac{-I_o \beta'_s}{k_s} \cdot \delta(x_o) \quad (1.16)$$

onde β'_s é o coeficiente adimensional de absorção superficial.

A temperatura na interface amostra-gás fica sendo dada por:

$$\theta_o = \frac{I_o \beta'_s}{k_s \sigma_s} \cdot \frac{(b+1)e^{\sigma_s(l_s - x_o)} - (b-1)e^{-\sigma_s(l_s - x_o)}}{(b+1)e^{\sigma_s l_s} + (b-1)e^{-\sigma_s l_s}} \quad (1.17)$$

Estes dois casos apresentados, Absorção por Incidência Traseira e Absorção Superficial, são de grande importância na Técnica OPC (Open Photoacoustic Cell), que será discutida na secção III.1, do capítulo III.

Já no Método dos Dois Feixes, que será apresentado na secção III.2, do capítulo III, consideraremos a ocorrência de absorção superficial, tanto na incidência traseira ($x = -l_s$) quanto na incidência frontal ($x = 0$). Neste caso, o nosso suporte será o próprio ar ($g = b \approx 0$), e as temperaturas na interface amostra-gás, para os dois casos, serão dadas por:

INCIDÊNCIA FRONTAL:

$$\theta_o = \frac{I_F \beta'_F}{k_s \sigma_s} \cdot \frac{\cosh(\sigma_s l_s)}{\sinh(\sigma_s l_s)} \quad (1.18a)$$

INCIDÊNCIA TRASEIRA:

$$\theta_o = \frac{I_T \beta'_T}{k_s \sigma_s} \cdot \frac{1}{\sinh(\sigma_s l_s)} \quad (1.18b)$$

I.2.3-Casos limites

A expressão geral para o sinal fotoacústico(1.13) pode ser bastante simplificada, dependendo das classificações ópticas e térmicas da amostra.

Uma amostra é classificada opticamente quando o seu comprimento de absorção óptica(l_β) é comparado com a sua espessura l_s . O comprimento de absorção óptica é a distância em que a luz incidente penetra na amostra, até ter sua intensidade reduzida a $1/e$. Deste modo, temos a seguinte classificação:

- amostra opticamente opaca $\rightarrow l_\beta < l_s$
- amostra absorvedora $\rightarrow l_\beta \sim l_s$
- amostra opticamente transparente $\rightarrow l_\beta > l_s$

A classificação térmica da amostra é feita comparando-se o seu comprimento de difusão térmica $\mu_s = (\alpha_s / \pi f)^{1/2}$ com a sua espessura l_s . O comprimento de difusão térmica é a distância em que a oscilação térmica transmitida atenua-se ao valor $1/e$. Esse parâmetro μ_s não é uma propriedade intrínseca do material, pois depende da frequência de modulação, permitindo fazer um estudo de profundidade variando-se a frequência de modulação. Assim, temos a seguinte classificação:

- amostra termicamente fina $\rightarrow \mu_s > l_s$
- amostra termicamente grossa $\rightarrow \mu_s < l_s$

A transição do regime termicamente fino para termicamente grosso ocorre quando $\mu_s = l_s$, permitindo assim achar uma frequência de corte f_c , que é dada por:

$$f_c = \alpha_s / \pi l_s^2 \quad (1.19)$$

Na tabela I.1 temos os casos limites no modelo de RG, segundo as classificações ópticas e térmicas da amostra.

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

Tabela I.1-Casos limites do Efeito Fotoacústico: Modelo de Rosecwaig-Gersho.

Referências

- [1] Bell, A. G., *On the Production and Reproduction of Sound by Light*, Am. J. Sci., 20, 305 (1880).
- [2] Tyndall, J., Proc. R. Soc. London, 31, 307 (1881).
- [3] Röntgen, W. C., Philos. Mag., 11, 308 (1881).
- [4] Viengerov, M. L., Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 19, 687 (1938).
- [5] Parker, J. G., Appl. Opt., 12(12), 2974 (1973).
- [6] Rosencwaig, A., Opt. Comm., 7(4), 305 (1973).
- [7] Rosencwaig, A., Gersho, A., J. Appl. Phys., 47(1), 64 (1976).
- [8] Rosencwaig, A., *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*, John Wiley & Sons, N. Y. (1980).
- [9] Mandelis, A., *Photoacoustic and Thermal Waves Phenomena in Semiconductors*, North-Holland, Amsterdam (1987).
- [10] Tam, A. C., Rev. Mod. Phys., 58, 381 (1986).
- [11] Vargas, H., Miranda, L. C. M., Phys. Rept., 161, 43 (1988).
- [12] Pessoa Jr., O., *Tese de Mestrado*, IFGW-UNICAMP (1985).

CAPÍTULO II

SISTEMAS BIOLÓGICOS: GENERALIDADES

Neste capítulo faremos uma breve exposição dos materiais e processos biológicos de interesse neste trabalho. O milho, material biológico de nosso estudo, tem sido grande alvo na área de desenvolvimento genético de novas espécies, dado o grande interesse das empresas de biotecnologia e alimentícia.

II.1-Fotossíntese em folhas vegetais

II.1.1-Introdução histórica[1-3]

Os estudos em fotossíntese foram iniciados, em 1771, pelo químico inglês John Priestley. Anteriormente, só haviam suposições de que a luz era necessária para o crescimento das plantas. Para as suas observações, Priestley aqueceu uma caixa fechada até que o ar dentro da mesma não sofresse mais combustão. Colocou então uma planta dentro da caixa, e descobriu, que após alguns dias, o ar no interior da caixa estava novamente sofrendo combustão. Concluindo assim que a planta era capaz de produzir alguma substância, que fazia com que o ar ficasse combustível. Hoje, sabemos que esta substância combustível é a molécula de oxigênio(O₂).

Em 1779, Jan Ingenhousz completou os trabalhos de Priestley mostrando que a substância combustível aparecia somente na presença de luz e de tecidos verdes. Senebier, em 1782, demonstrou que o gás combustível(O₂) era formado devido à presença de um outro gás, chamado de "gás fixo", que foi mais tarde identificado como sendo o dióxido de carbono(CO₂). Finalmente, em 1804, de Saussure mostrou que a maior parte do peso da planta vem da água e do dióxido de carbono(CO₂).

O conceito de energia química surgiu aproximadamente meio século mais tarde, permitindo a descoberta, em 1845, de que a energia luminosa do Sol é transformada em energia química pela planta.

Desde aquela época até os dias atuais, diversos cientistas, nas áreas de Biologia, Física e Química, pesquisam o processo da fotossíntese, para cada vez melhor explicar seu processo passo a passo.

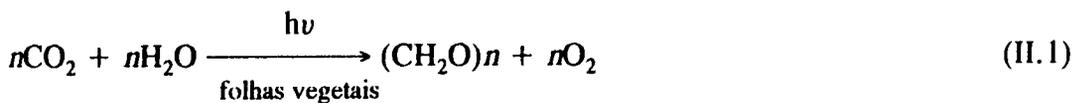
II.1.2-Equação geral da fotossíntese[1-4]

A fotossíntese, do ponto de vista químico, é um processo de óxido-redução usando a energia luminosa.

A energia luminosa é usada para guiar a oxidação da água, produzindo oxigênio(O₂), íons hidrogênio(H⁺) e elétrons. Parte dos íons hidrogênio e dos elétrons são transferidos para o dióxido de carbono(CO₂), resultando em produtos orgânicos. A outra parte dos íons hidrogênio e dos elétrons são usados para transformar nitrato e sulfato em aminoácidos.

Os principais produtos orgânicos produzidos pelos tecidos verdes, na fotossíntese, são os carboidratos, ou usualmente conhecidos como açúcares, cuja fórmula geral é CH₂O.

O processo da fotossíntese, em folhas vegetais, pode ser então resumido na reação:



Essa equação é resumida pois, na realidade, a fotossíntese compreende uma cadeia de reações, através da qual a energia luminosa é transformada em energia química. Essas reações ocorrem em dois estágios: estágio *luz* e estágio *escuro*.

No estágio *luz* ocorrem reações fotoquímicas, resultando na síntese de ATP e NADPH.

No estágio *escuro* ocorrem reações controladas por enzimas, onde o ATP e o NAPH são usados para reduzir o CO₂ (dióxido de carbono) em compostos orgânicos. A assimilação do carbono inorgânico em compostos orgânicos é a chamada de *Fixação do Carbono*.

Além de carboidratos e do O_2 (oxigênio), outros produtos são formados na fotossíntese, tais como, aminoácidos, proteínas, lipídeos, pigmentos e outros compostos orgânicos necessários aos tecidos verdes.

A taxa de fotossíntese pode ser definida como sendo a taxa de oxigênio produzido por unidade de massa(ou área) nos tecidos verdes das plantas. Desta forma, observando a equação (II.1) conclui-se que os fatores que influenciam diretamente na taxa de fotossíntese são: a intensidade luminosa, a quantidade de CO_2 (dióxido de carbono) e de água no ambiente. Além destes fatores, a temperatura pode influenciar na taxa de fotossíntese, porém sua influência está nas reações enzimáticas(estágio *escuro*). Muitos trabalhos em fotossíntese foram realizados com o objetivo de se encontrar uma condição ótima ambiental para uma taxa máxima, mas os resultados obtidos foram conflitantes e de difícil avaliação. Isto se deve ao fato de que a fotossíntese é um processo altamente complexo, e a condição ótima de um dos fatores pode afetar outros fatores. Desta forma, concluiu-se que os fatores estão todos interligados, e todos, em maior ou menor extensão, são dependentes das características fisiológicas e anatômicas das plantas.

II.1.3-Anatomia e pigmentos de uma folha[4-6]

É de conhecimento geral que o processo da fotossíntese em vegetais ocorre no interior das folhas, mais especificamente nos cloroplastos, onde estão localizados os pigmentos. Portanto, é interessante conhecermos um pouco da anatomia das folhas e os seus pigmentos.

Uma folha é constituída basicamente de três camadas: epiderme superior, mesófilo e epiderme inferior. A figura II.1 mostra esquematicamente a secção transversal típica de uma folha.

O mesófilo é o conjunto formado pelas células paliçádicas e esponjosas, que possui um largo espaçamento intercelular com ar saturado de umidade, servindo para o intercâmbio gasoso de H_2O , CO_2 e O_2 .

As epidermes superior e inferior contém poros(estômatos) por onde ocorre a troca gasosa de CO_2 e O_2 . O mecanismo de abrir e fechar os estômatos é controlado pelas células guardas adjacentes.

A cutícula que reveste as epidermes tem a função de proteger a folha dos raios ultravioleta proveniente do Sol, da perda de água excessiva e dos agentes externos, como os fungos.

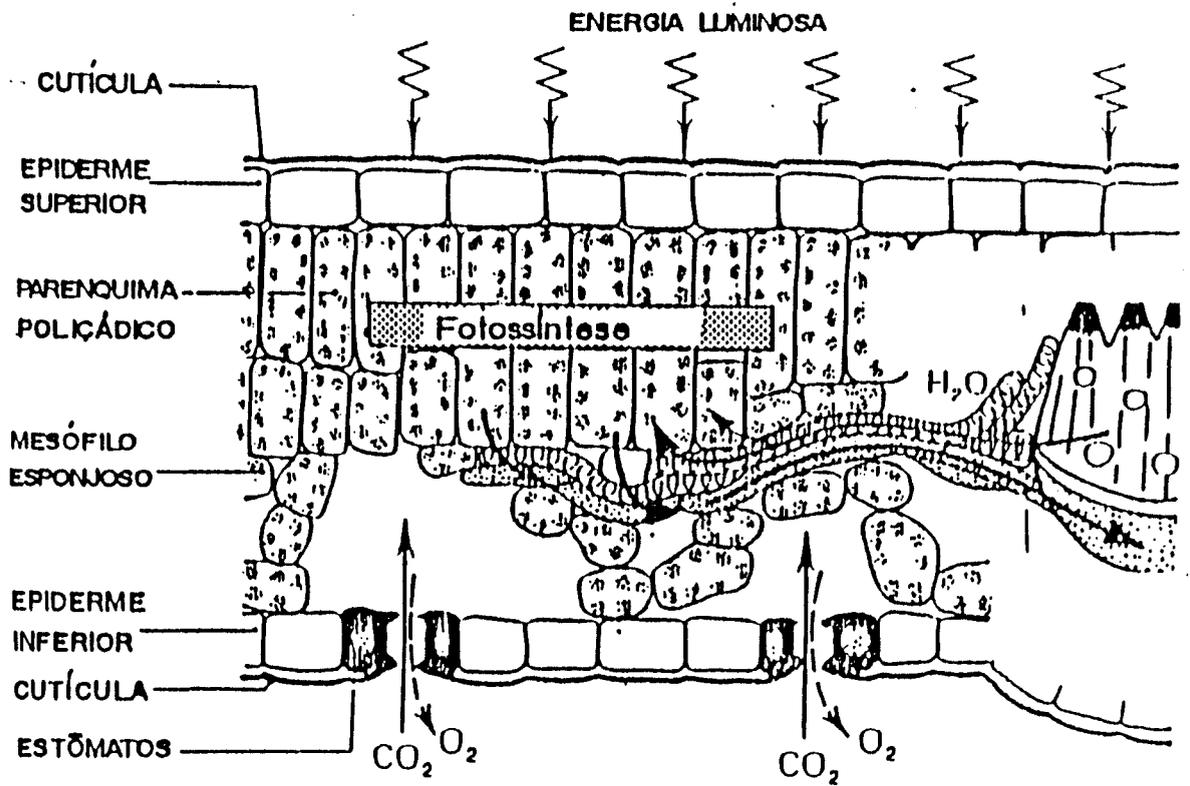


Figura II.1-Representação esquemática de um corte longitudinal de uma folha.

Os pigmentos absorvedores de luz na folha são encontrados em organelas chamadas de cloroplastos. Sua distribuição não é uniforme em uma folha, sendo que a maioria dos cloroplastos são encontrados nas células paliçádicas no mesófilo. Os cloroplastos na epiderme são encontrados somente nas células guarda.

Os pigmentos encontrados geralmente nos cloroplastos de uma folha são: clorofilas, carotenos e xantófilas, sendo que a quantidade destes pigmentos nos cloroplastos é altamente variável de espécie para espécie.

Dentre os vários tipos de clorofilas existentes, dois tipos são os mais importantes: a clorofila a, encontrada em todas as plantas fotossintetizantes, e a clorofila b, menos abundante é encontrada na maioria das plantas fotossintetizantes. Além das clorofilas, os outros pigmentos, carotenos e xantófilas, podem absorver luz em uma folha. A energia luminosa absorvida por eles é transferida às clorofilas antes da conversão de energia luminosa em energia química.

Na figura II.2 temos os espectros de absorção óptica para os principais pigmentos da folha. Podemos observar que as clorofilas absorvem na região do vermelho e do azul, e os carotenos absorvem na região do azul do espectro.

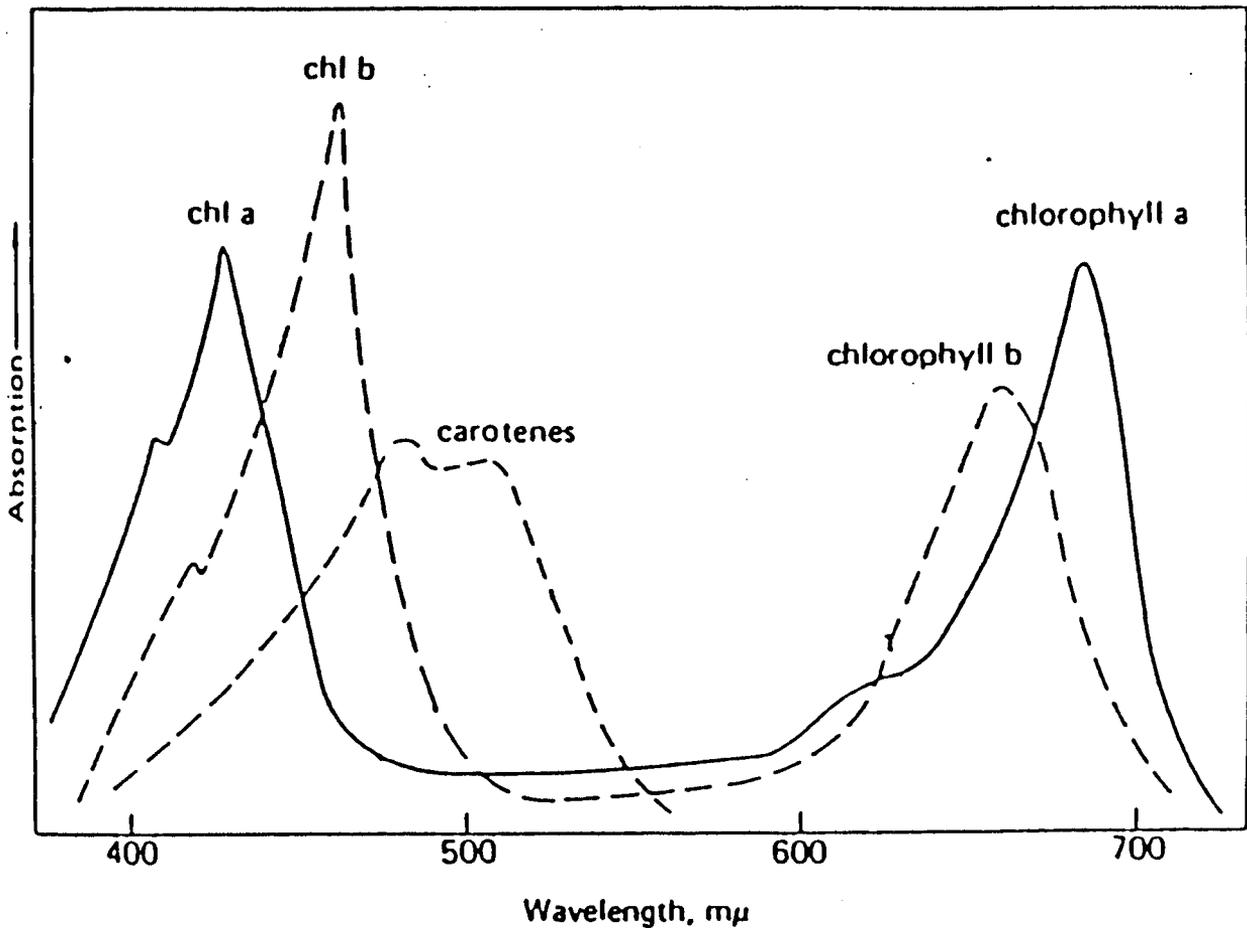


Figura II.2-Espectro de absorção de alguns pigmentos fotossintéticos.

II.1.4-O processo da fotossíntese[3,4]

Como foi visto na secção anterior, a fotossíntese ocorre nos cloroplastos, onde estão localizados os pigmentos. Estes pigmentos estão organizados em dois grupos funcionais denominados Fotossistema I e Fotossistema II, e estão ligados a cadeias de transporte de elétrons distintas.

O Fotossistema I é caracterizado por um tipo de clorofila a, que tem a propriedade de apresentar máxima absorção de luz em 700 nm. Por esta razão, este tipo de clorofila é denominada de P₇₀₀. Por outro lado, o Fotossistema II também é caracterizado por um tipo de clorofila a, porém com máxima absorção em 680 nm, sendo então denominada de P₆₈₀.

A evidência de que haviam duas reações com a luz(dois Fotossistemas) foi mostrada inicialmente pelo bioquímico Robert Emerson. Uma alga *Chlorella* foi iluminada com luz vermelha somente, com luz azul somente e com ambas as luzes vermelha e azul simultaneamente. A evolução de oxigênio foi medida em cada caso, sendo substancial com a luz azul sozinha, mas não com a luz vermelha sozinha. Com ambas as luzes, a quantidade de oxigênio produzido excedeu a soma das quantidades produzidas com as luzes vermelha e azul separadamente. Estes dados experimentais apontaram a existência de dois Fotossistemas que, quando operam juntos, fazem com que a taxa de oxigênio seja alta.

Na figura II.3 temos o esquema das reações fotoquímicas ocorrendo nos Fotossistemas I e II. A incidência de luz no Fotossistema II produz dois efeitos iniciais: a decomposição da água em oxigênio, prótons e elétrons, onde os elétrons são doados ao Fotossistema II, e a excitação da P₆₈₀ para um nível de energia mais alto, tal que dois elétrons de sua estrutura possam ser transferidos para um receptor primário de elétrons. No caso, o receptor primário de elétrons pode ser uma feofitína(molécula similar à clorofila), na qual transfere esses elétrons a uma cadeia de moléculas composta de citocromos, Plastoquinonas e Plastocianinas, sofrendo uma sucesiva queda de energia a cada tranferência. Nesta fase, ocorre uma reação denominada de Fotofosforilação, onde o ADP(Adenosina Difosfato) em presença de um fosfato inorgânico(Pi) é transformado em ATP(Adenosina Trifosfato), segundo a reação:



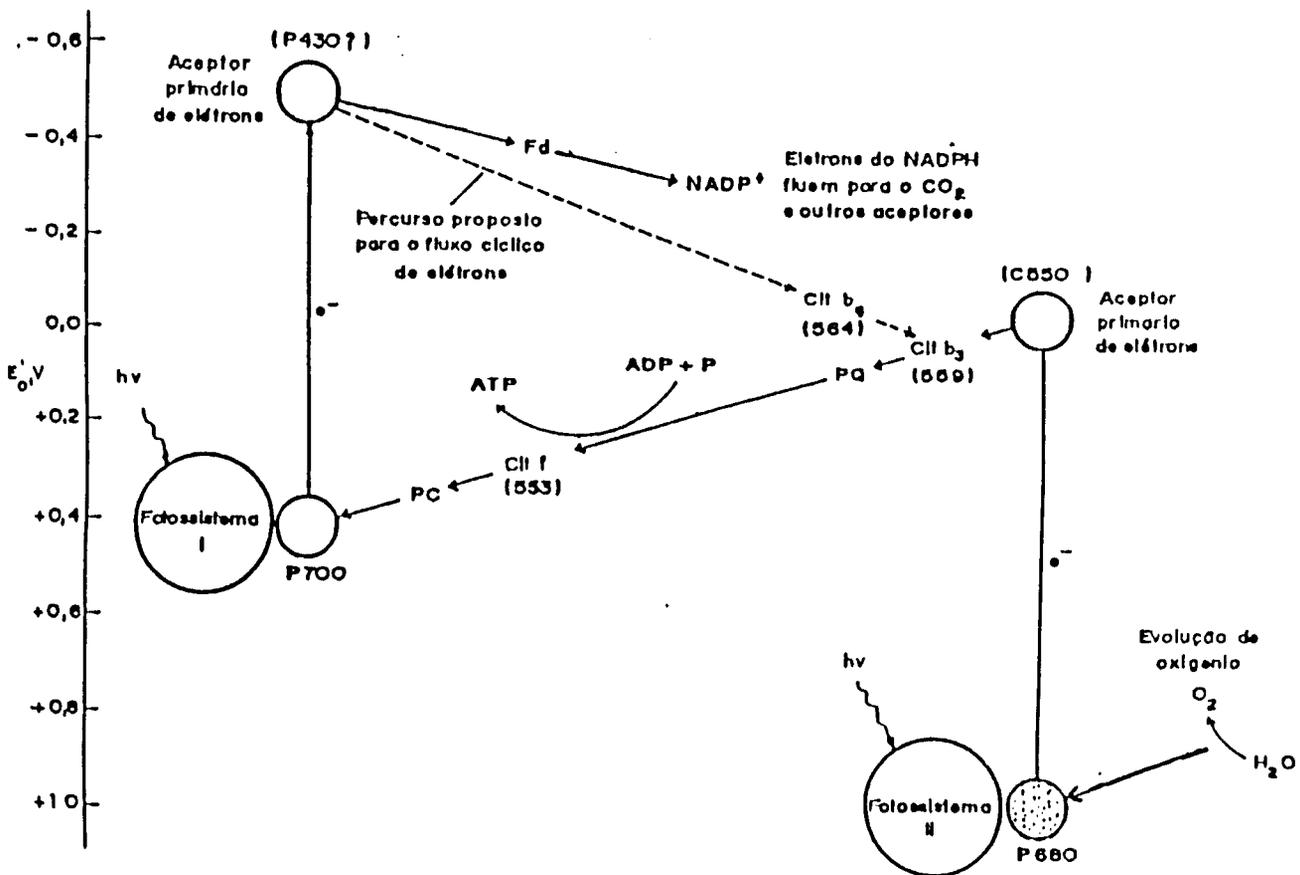
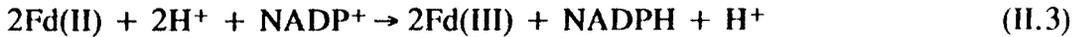


Figura II.3-Representação esquemática da cadeia de reações que compõe a fotossíntese.

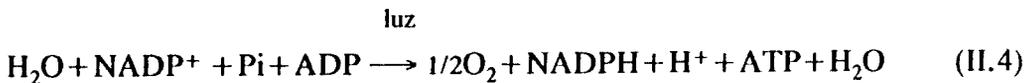
No Fotossistema I, a incidência de luz provoca a excitação da P₇₀₀ e a perda de dois elétrons a seu receptor primário de elétrons, cuja identidade ainda não foi perfeitamente definida. Esses elétrons são capturados pela Ferredoxina(Fd), na qual transfere os elétrons para o NADP⁺(Trifosfopiridina-Dinucleotídeo-Fosfato), reduzindo-o na presença de prótons a NADPH. Esta reação é escrita na forma:



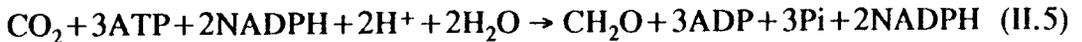
onde durante a reação a Fd(II) passa para a sua forma oxidada Fd(III).

A ligação entre os Fotossistemas I e II ocorre através de uma transferência de elétrons do I para o II, numa cadeia de citocromos e após a Fotofosforilação. Essa transferência de elétrons compensa a perda de elétrons inicial do Fotossistema II, e fecha o ciclo de reações fotoquímicas da fotossíntese.

A equação que resume as reações fotoquímicas da fotossíntese é escrita como:



O ciclo completo da fotossíntese é obtido com a reação no escuro, resumida pela equação:



Da equação acima, podemos observar a redução do CO₂ a carboidrato CH₂O, responsável pelo armazenamento de energia na planta. Essa energia nos carboidratos é transferida posteriormente ao ATP, molécula responsável pelo transporte de energia, que será usada para satisfazer as necessidades da célula.

Desta forma, concluímos que a fotossíntese desempenha a importante função de formar os principais compostos necessários para o desenvolvimento de uma planta.

II.2- Características gerais de um grão de milho[7-8]

O grão de milho é um fruto de uma semente, ou cariopse, característico das gramíneas.

O desenvolvimento do grão se completa após cerca de 50 dias da fertilização, e envolve um aumento de volume, do ovário até o grão, de 1400 vezes.

Na figura II.4 temos o esquema de um corte longitudinal de um grão de milho.

A camada mais externa é chamada de pericarpo, sendo derivada da parede do ovário. A coloração desta camada pode ser incolor, vermelha, marrom ou laranja.

A ponta do grão denominada de pedúnculo é a parte remanescente do tecido que conecta o grão ao sabugo, e permite a absorção de umidade.

No interior do grão temos o endosperma e o embrião. O endosperma é constituído principalmente de amido, e é responsável por aproximadamente 85% do peso total, sendo o embrião 10% e o pericarpo 5%. Sua cor pode ser branca amarela ou laranja.

Existem vários tipos de milho, tais como, dentado, duro, farináceo, doce, ceroso e pipoca. A diferença entre eles está no conteúdo de açúcar e proteína, e também no tipo, estrutura e concentração dos grãos.

Os milhos de pipoca constituem um tipo de milho duro e de grãos pequenos, que sob a ação do calor estouram originando a pipoca. Como os demais tipos de milho, pertence à espécie *Zea mays mays*, logo a característica de pipocamento constitui a diferença básica entre esse e os outros tipos. Os milhos duros(ou "flints") são usualmente de textura dura devido ao denso arranjo dos grãos de amido com proteína. Já os grãos de amido dos farináceos são mais frouxamente dispostos. Os milhos dentados possuem uma estrutura intermediária, onde os grãos de amido são densamente arranjados nas laterais do grão formando um cilindro aberto, e na parte central são menos densamente dispostos. Nos milhos doces, a conversão normal de açúcar em amido é menor.

O milho de pipoca é utilizado desde há muito pelos indígenas, como fonte de alimento e muito ligado à tradição popular, esse tipo de milho desperta hoje a atenção dos melhoristas, visando o desenvolvimento de espécies aperfeiçoadas, que atendam à demanda e às exigências em qualidade, por parte do mercado consumidor.

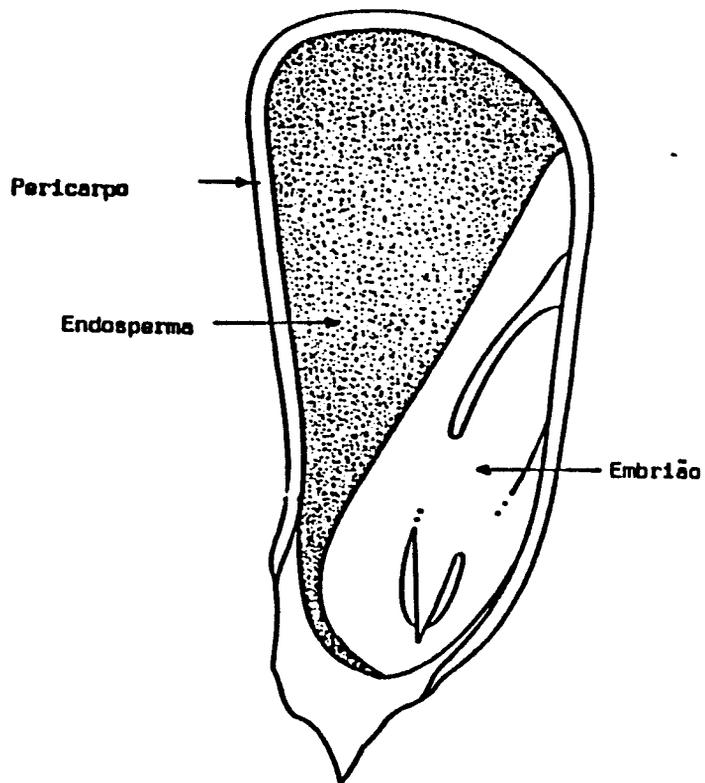


Figura II.4-Representação esquemática do corte longitudinal do grão de milho.

Referências

- [1] Encyclopaedia Britannica, *Photosynthesis*, 808-815.
- [2] Rabinowitch, E., Govindje, *Photosynthesis*, John Wiley & Sons(1969).
- [3] Bidwell, R.G.S., *Plant Physiology*, Macmillan Publishing Co, Inc.-New York(1974).
- [4] Vinha, A.C., *Tese de Doutorado*, IFGW-UNICAMP(1988).
- [5] Marquezini, M.V., *Tese de Mestrado*, IFGW-UNICAMP(1990).
- [6] Bultas, G., Horwitz, A., Malkin, S., Cahen, D., *Leaf Physiology and Anatomy by Photoacoustic*, Biochemistry and Structural Departments, The Weizmann Institute of Science, Israel.
- [7] Paterniani, E., Viégas, G.P., *Melhoramento e Produção de Milho*, 1, Fundação Cargill(1987).
- [8] Paterniani, E., Viégas, G.P., *Melhoramento e Produção de Milho*, 2, Fundação Cargill(1987).

CAPÍTULO III

TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo serão mostradas as técnicas experimentais usadas no desenvolvimento deste trabalho. Para o estudo de plantas "*in vivo*" e "*in situ*" foi usada a técnica OPC(Open Photoacoustic Cell). As técnicas restantes foram usadas para a determinação das propriedades térmicas e mecânicas de nossas amostras.

III.1- Utilização da técnica OPC(Open Photoacoustic Cell) em estudos de plantas "*in vivo*" e "*in situ*"

A técnica OPC(Open Photoacoustic Cell) é um método alternativo de detecção fotoacústica[1,2], onde não há necessidade de um meio transdutor adicional, tal como a câmara de ar na detecção fotoacústica[3,4]. Neste caso, a amostra é colocada diretamente sobre um microfone de eletreto circular.

Esta técnica tem sido muito utilizada para estudos espectroscópicos de folhas vegetais "*in vivo*"[5], estudos da toxicidade do Al^{+3} em plantas de milho "*in vivo*"[6], estudo da atividade fotossintética das plantas[7], etc.

Nesta secção será mostrado a aplicação desta técnica ao estudo da fotossíntese em folhas, onde os experimentos são realizados "*in vivo*" e "*in situ*", não danificando a planta e evitando a desidratação da mesma.

III.1.1- Detector OPC

Na figura III.1 temos o esquema da secção reta de uma célula aberta. O microfone de eletreto[8,9] consiste de um diafragma de eletreto metalizado(tipicamente um FEP* com uma camada de 50-100 μm de metal depositado). Sob este diafragma há uma camada de ar de aproximadamente 45 μm e abaixo da camada de ar uma placa metálica de fundo. Sobre o diafragma há uma outra camada de ar, que desempenha o papel de câmara fotoacústica, de 1 mm de altura e 7 mm de diâmetro. Acima desta camada, na face superior, há uma abertura circular de 3 mm de diâmetro. A amostra é fixada sobre esta abertura com o auxílio de graxa de vácuo.

A camada metálica do diafragma é ligada a placa metálica de fundo através de um resistor. A luz modulada incide sobre a amostra fazendo com que haja uma flutuação periódica de temperatura, provocando uma variação de pressão dentro da câmara de ar do microfone, e conseqüentemente flexionando a membrana. Esta flexão gera uma tensão V através do resistor R , que é realimentada por um pré-amplificador FET, já instalado no microfone. Essa tensão V de saída do microfone, relacionada com a pressão na câmara fotoacústica(δP), é dada por[5,10]:

$$V = V_o \cdot \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \cdot \frac{\delta P}{\gamma P_o} \cdot \exp(j\omega t) \quad (\text{III.1})$$

onde:

$\omega = 2\pi f$ é a frequência angular de modulação

C é a capacitância do microfone

P_o é a pressão ambiente

γ é a razão dos calores específicos

$V_o = |b|_m \sigma_o / [l_b \epsilon + l_m \epsilon_o]$ é a tensão dependente dos constituintes do microfone, sendo l_b e l_m as espessuras da camada de ar adjacente ao suporte e da membrana, respectivamente; ϵ e ϵ_o as constantes dielétricas do eletreto e do ar, respectivamente e σ_o é a densidade superficial de carga do eletreto.

A variação de pressão δP é explicitada assumindo o modelo de Rosencwaig-Gersho para a geração do sinal fotoacústico, exposto no capítulo I, e considerando a configuração esquemática da OPC, mostrada na figura III.2. De acordo

* Tetrafluoroethylene/Hexafluoropropylene Copolymers

com o modelo, a variação de pressão se deve somente ao fluxo de calor (resultante da absorção de luz) da amostra e/ou membrana para o gás, sendo dada por:

$$\delta P = \frac{\gamma P_o}{T_o} \cdot \langle T_g \rangle \quad (III.2)$$

onde T_o é a temperatura ambiente e $\langle T_g \rangle$ é a temperatura média espacial do ar na câmara fotoacústica (ou seja, na região $x = -l_g$ a $x = 0$).

Substituindo (III.2) em (III.1) temos:

$$V = \frac{V_o}{T_o} \cdot \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \cdot \langle T_g \rangle \cdot \exp(j\omega t) \quad (III.3)$$

A temperatura média $\langle T_g \rangle$ é a solução da equação de difusão para o sistema amostra-gás membrana, aplicada a configuração mostrada na figura III.2, assumindo que há duas fontes de calor: uma devido à absorção da radiação pela amostra e outra devido à absorção da radiação transmitida, pela membrana do microfone. Desta forma, temos:

$$\langle T_g \rangle = \theta_m + \theta_s \quad (III.4)$$

onde

$$\theta_m = \frac{\beta' I_o e^{-\beta l_s} \cosh(l_m \sigma_m) [\cosh(l_g \sigma_g) - 1]}{[(l_g \sigma_g k_m \sigma_m) \sinh(l_m \sigma_m) \sinh(l_g \sigma_g)]} \quad (III.5a)$$

$$\theta_s = \frac{I_o r [\cosh(l_g \sigma_g) - 1] \{2r - e^{-\beta l_s} [(r+1)e^{l_s \sigma_s} + (r-1)e^{-l_s \sigma_s}]\}}{(1 + j\omega \tau) l_g \sigma_g k_s^2 (r-1) \sinh(l_g \sigma_g) [e^{l_s \sigma_s} - e^{-l_s \sigma_s}]} \quad (III.5b)$$

sendo $r = \beta / \sigma_s$, τ o tempo de relaxação não-radiativa na amostra e os demais símbolos já definidos no capítulo I (secção I.2). Os índices $i = s$, $i = g$ e $i = m$ referem-se à amostra, ao gás e a membrana, respectivamente. As equações (III.5a) e (III.5b) representam, respectivamente, as contribuições da membrana e da amostra para a variação de pressão na câmara fotoacústica. Portanto, a tensão de saída do microfone fica sendo:

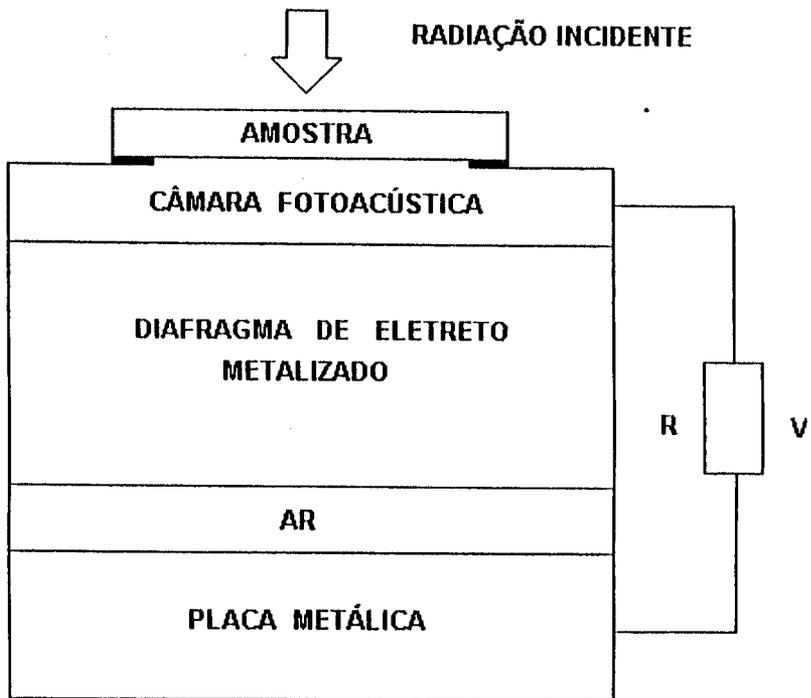


Figura III.1-Esquema da secção reta da célula OPC. A câmara frontal do microfone de eletreto é usada como câmara fotoacústica.

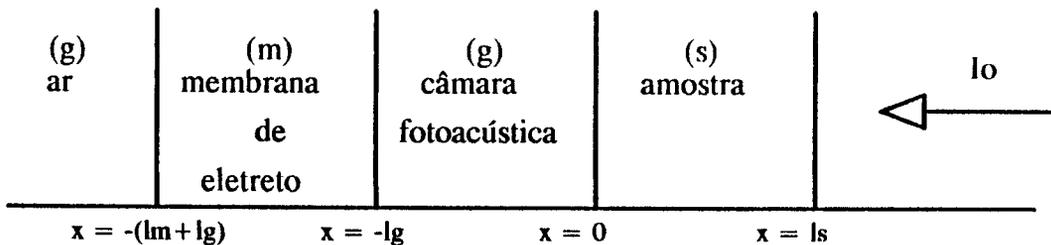


Figura III.2-Representação esquemática da geometria da célula OPC, segundo o modelo de RG.

$$V = \frac{V_o}{T_o} \cdot \frac{j\omega RC}{1+j\omega RC} \cdot \theta_m + \theta_s \cdot \exp(j\omega t) \quad (III.6)$$

A equação (III.6) é bastante complicada, já que representa a equação geral para o sinal fotoacústico. Contudo, esta expressão pode ser simplificada se analisada para um caso específico de amostra, de acordo com suas propriedades ópticas e térmicas. No nosso caso, a amostra usada é uma folha vegetal, que se enquadra no caso de amostra transparente e termicamente grossa ($l_s \sigma_s \gg 1$). A difusividade térmica e a espessura de uma folha são aproximadamente, $0.001 \text{ cm}^2/\text{s}$ e $150 \text{ } \mu\text{m}$, respectivamente, resultando em uma frequência de corte de aproximadamente 2 Hz. Logo para a faixa de frequência por nós utilizada, entre 15 e 150 Hz, a folha é considerada termicamente grossa.

Desta forma, para amostras opticamente transparentes e termicamente grossas, o sinal fotoacústico fica reduzido a:

$$V_{OPC} \approx V_o \chi G \cdot \frac{I_o e^{-\beta l_s}}{T_o l_g \sigma_g k_s \sigma_s} \cdot \frac{\beta' k_s (\alpha_m / \alpha_s)^{1/2}}{k_m} \cdot \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} \cdot e^{j\omega t} \quad (III.7)$$

onde $\chi = j\omega \tau_e / (1 + j\omega \tau_e)$, $\tau_e = RC$ é a função resposta do microfone e $G = \cosh[(l_g \sigma_g) - 1] / \sinh(l_g \sigma_g)$.

No caso da amostra opticamente transparente, haverá a contribuição da membrana no sinal fotoacústico. Logo, se estamos interessados no espectro de absorção da amostra devemos normalizar o sinal. Para a normalização, devemos saber qual é a tensão de saída devido à incidência direta na membrana. Neste caso, β e θ_s são iguais a zero e a equação (III.6) torna-se:

$$V_D = V_o \chi G \cdot \frac{I_o}{T_o l_g \sigma_g k_s \sigma_s} \cdot \frac{\beta' k_s (\alpha_m / \alpha_s)^{1/2}}{k_m} \cdot F_m \cdot e^{j\omega t} \quad (III.8)$$

O espectro de absorção normalizado é obtido calculando-se o sinal normalizado que é dado por:

$$V_N = \frac{V_D - V_{OPC}}{V_D} = 1 - \exp(-\beta l_s) = \alpha \quad (III.9)$$

onde $1 - \exp(-\beta l_s) = \alpha$ é a absorvância da amostra, sendo para amostras transparentes $\beta l_s = \alpha$.

III.1.2-Sinal fotoacústico em folhas vegetais

Sendo a amostra analisada, na célula OPC, uma folha vegetal, o sinal fotoacústico terá duas contribuições:

1.Contribuição fototérmica: devido à conversão, total ou parcial, da luz incidente modulada em calor, que é transmitida ao gás.

2.Contribuição fotobárica: devido à liberação de oxigênio pela planta, na mesma modulação da luz incidente, gerando ondas acústicas na câmara de gás.

Além destas contribuições, existe uma que faz o sinal diminuir: a perda fotoquímica. Neste caso, parte da luz absorvida pela folha é gasta nas reações químicas, diminuindo a quantidade de luz absorvida que é transformada em calor.

A evolução modulada de oxigênio e a perda fotoquímica podem ser eliminadas simultaneamente com o auxílio de uma luz branca de fundo, não modulada e bastante intensa, juntamente com a luz modulada[11,12]. A luz branca de fundo não interfere no sinal fotoacústico, já que é não modulada. A intensidade desta luz deve ser suficiente para saturar a atividade fotossintética da planta. Desta forma, o oxigênio será liberado continuamente não afetando o sinal fotoacústico, e toda a energia gasta nas reações químicas será fornecida pela luz de fundo, resultando portanto em uma conversão máxima da luz modulada absorvida em calor.

Em altas frequências de modulação da luz, a contribuição fotobárica desaparece devido à lenta difusão do oxigênio produzido nos cloroplastos até a superfície, comparada à frequência de modulação, e apenas a perda fotoquímica interfere no sinal. Neste caso, quando a luz branca de fundo é adicionada o sinal fotoacústico aumenta, dado que quando só há luz modulada parte da luz absorvida é gasta nas reações químicas da fotossíntese. Este é o chamado **efeito positivo**, ilustrado na figura III.3a.

Já em baixas frequências de modulação, a contribuição fotobárica está presente. Neste caso, adicionando a luz branca de fundo o sinal fotoacústico diminui, pois a evolução modulada de oxigênio foi eliminada, e esta é mais significativa que a contribuição por perda fotoquímica. Este é o chamado **efeito negativo**, ilustrado na figura III.3b.

A evolução de oxigênio e a energia armazenada são dois parâmetros importantes no estudo das atividades fotossintéticas. A evolução de oxigênio está ligada ao **efeito negativo**, enquanto que a energia armazenada está ligada ao **efeito positivo**.

A evolução de oxigênio[13] é obtida através dos sinais fotoacústicos, na presença(PA+) e na ausência(PA-) de luz branca de fundo, e da correção devido à mudança do nível fototérmico. Então,

$$O_2 = (PA+) - (1-PL).(PA+) \quad (III.10)$$

onde PL é a perda fotoquímica, definida como o aumento relativo do sinal, quando a luz de saturação é aplicada em altas frequências de modulação.

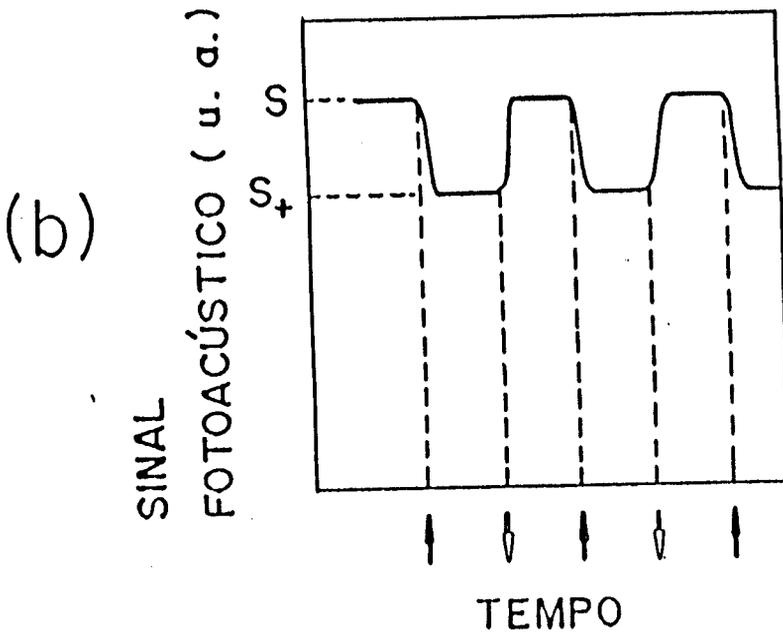
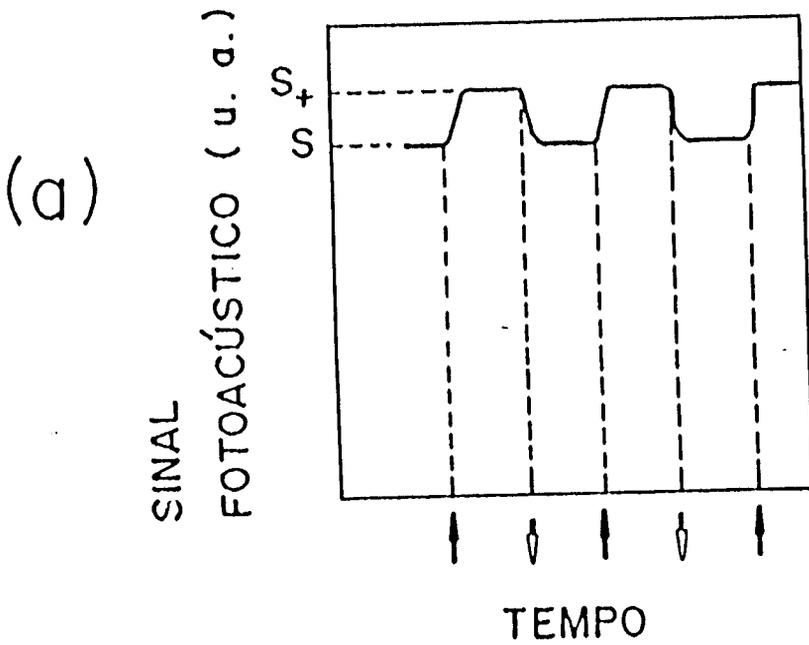


Figura III.3-Efeitos Positivo(a) e Negativo(b).

S -Sinal fotoacústico só com a luz modulada.

S+-Sinal fotoacústico com a luz modulada + luz branca.

↑ luz branca ligada e ↓ luz branca desligada.

III.1.3-Arranjos experimentais

Dois experimentos foram realizados com folhas de milho usando a técnica OPC, onde as medidas foram feitas "*in vivo*" e "*in situ*", ou seja, as folhas intactas e ligadas ao caule são expostas diretamente à luz modulada. O primeiro consiste na obtenção do espectro fotoacústico, e o segundo na observação dos efeitos positivo e negativo.

III.1.3.1-Espectro de absorção

O espectro de absorção fotoacústico da folha de milho foi obtido usando o espectrômetro fotoacústico mostrado na figura III.4.

A fonte de radiação é uma lâmpada de Xe(Oriel Corp., modelo 6269,1000W) de emissão contínua, do ultravioleta ao infravermelho próximo.

A luz emitida pela lâmpada de Xe passa por um modulador(PAR.modelo 191), e em seguida passa por um monocromador de varredura(Oriel Corp., modelo 77250) onde é selecionado um certo comprimento de onda (λ). A rede de difração utilizada foi a de 1200 linhas/mm e a banda passante foi de 10 nm. A existência de ordens superiores de difração obriga o uso de um filtro amarelo(Newport Corp.,OG 515), que corta picos de segunda ordem, que surgem depois de 580 nm.

O feixe de luz monocromático é então focalizado, com o auxílio de uma lente, na entrada de um guia de luz feito de fibra óptica. Este guia conduz o feixe de luz monocromático até a célula fotoacústica, onde se encontra a amostra.

A célula fotoacústica usada foi a OPC, com microfone de eletreto comercial, esquematizada na figura III.5.

O sinal do microfone é levado a um amplificador "lock-in"(PAR, modelo5210), e posteriormente armazenado em um microcomputador.

Para obtermos o espectro da folha, eliminando a produção de oxigênio modulado, fixamos um vidro no orifício da câmara com graxa de vácuo, e sobre ele a folha, fixada com uma placa de alumínio. Desta forma, evitamos o fluxo de oxigênio modulado para dentro da câmara.

Assim, para cada comprimento de onda(λ) foi obtido um sinal V_{OPC} , que foi subtraído do sinal V_D (incidência direta sobre a membrana), segundo a normalização apropriada(III,9).

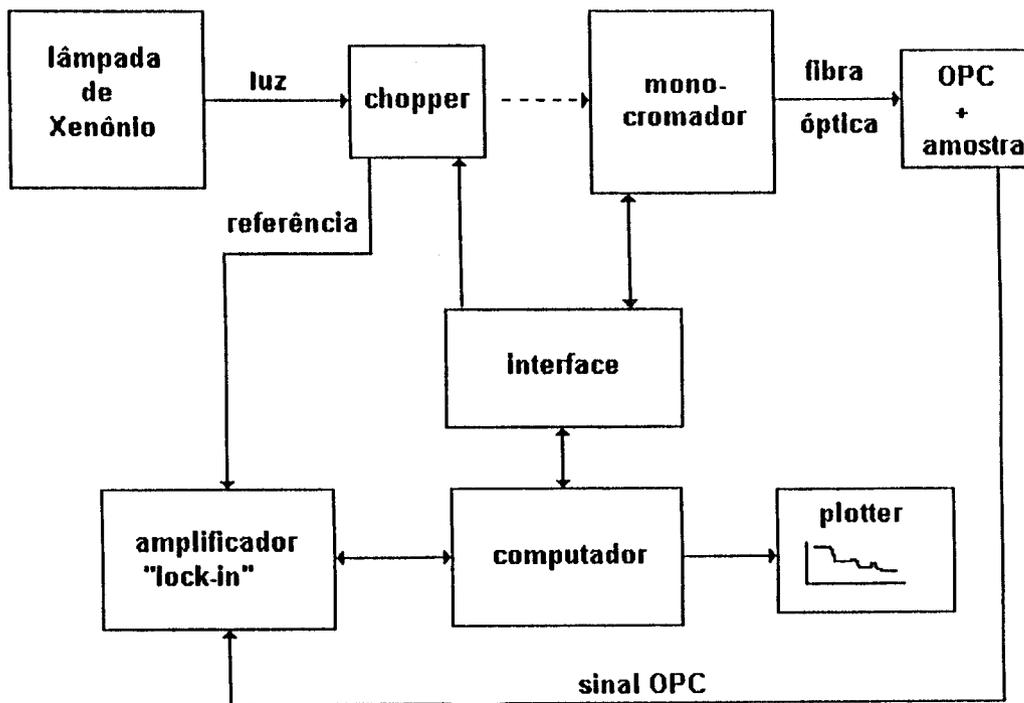


Figura III.4-Diagrama do arranjo experimental para a obtenção do espectro de absorção fotoacústico de uma folha vegetal.

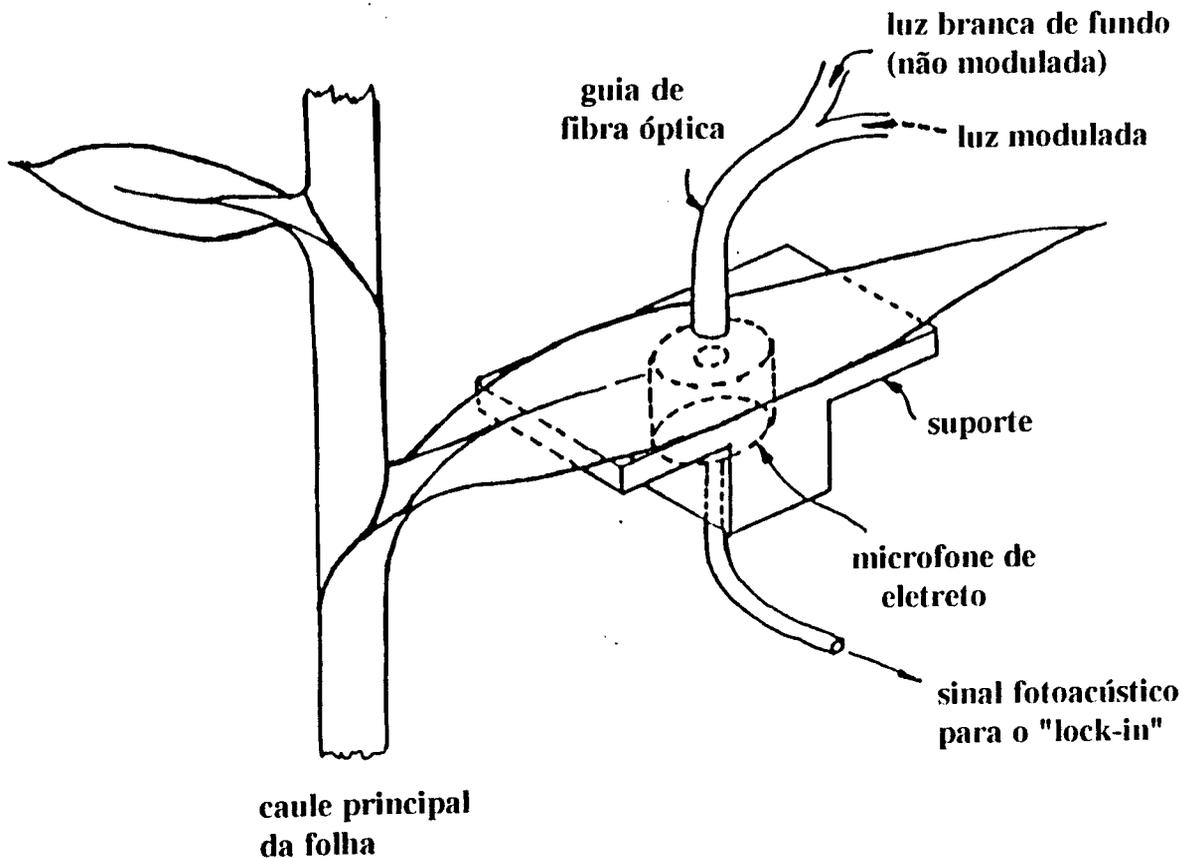


Figura III.5-Célula OPC utilizada para medidas "in vivo" e "in situ".

III.1.3.2-Efeitos positivo e negativo

O arranjo experimental para a observação dos efeitos positivo e negativo está mostrado na figura III.6, sendo que neste caso o monocromador está fixo em 680 nm (pico de absorção da clorofila a). A luz de fundo não modulada, proporcionada por uma lâmpada de halogêneo (250W), passa por uma camada de água de 6 cm, que faz o papel de filtro de infravermelho, resultando em uma forte luz branca capaz de saturar a fotossíntese na folha. As luzes modulada e de fundo (não modulada) são combinadas e levadas, através de um ramo duplo de guia de luz de fibra óptica, sobre a folha. A intensidade da luz de fundo pode ser controlada, e é medida com um fotodiodo calibrado.

Após a absorção de luz modulada (680 nm) pela folha, a pressão na câmara OPC oscila na frequência do "chopper", devido às contribuições fototérmica e fotobárica, gerando uma tensão V_{OPC} . A amplitude e fase deste sinal OPC são analisadas pelo amplificador "lock-in", ligado ao microcomputador, que faz a leitura a cada 3 segundos.

As amostras de milho, que estão plantadas em potes, ficam em local uniformemente iluminado. No momento da medida, a planta é levada à célula e fixada com o auxílio de graxa de vácuo. Sobre a amostra é colocada uma placa de alumínio para ajudar na fixação, sendo o seu centro vazado e ocupado por um disco de vidro, garantindo assim a entrada de luz e forçando o oxigênio modulado a ser liberado pela epiderme inferior, ou seja, para dentro da câmara fotoacústica produzindo o sinal.

III.2-Determinação da difusividade térmica(α) pelo Método dos Dois Feixes

O Método dos Dois Feixes [14] consiste na medida da diferença de fase ($\Delta\Phi = \Phi_F - \Phi_T$) entre os sinais obtidos por iluminação frontal e traseira, respectivamente. Na figura III.7 temos o esquema da célula fotoacústica, usada neste método para as medidas de difusividade térmica.

Esta método é aplicado quando trabalhamos em baixas frequências de modulação e a amostra têm absorção superficial em ambas as faces. Desta forma, usando as equações (I.18a) e (I.18b) obtidas no modelo RG, supondo a amostra opaca, a razão S_F/S_T entre as amplitudes, e a diferença de fase $\Delta\Phi$ dos sinais são respectivamente:

$$\frac{S_F}{S_T} = \frac{I_F \beta'_F}{I_T \beta'_T} \cdot [\cosh^2(l_s a_s) - \text{sen}^2(l_s a_s)]^{1/2} \quad (\text{III.11})$$

$$\tan(\Delta\Phi) = \tan(\Phi_F - \Phi_T) = \tanh(l_s a_s) \cdot \tan(l_s a_s) \quad (\text{III.12})$$

A expressão (III.11) foi usada por Yasa e Amer[15], para a obtenção da difusividade térmica, e depende de um monitoramento preciso da potência do laser de cada feixe, e das condições idênticas de superfície em cada lado da amostra. Já a expressão (III.12), usada no Método dos Dois Feixes, depende somente de $l_s a_s$. Então, conhecendo-se a espessura da amostra, e medindo-se as fases dos sinais frontal e traseiro, determina-se o coeficiente de difusão térmica a_s . Desta forma, a difusividade térmica α_s da amostra pode ser obtida com uma única frequência de modulação, pela relação:

$$\alpha_s = \pi f \cdot (1/a_s^2) \quad (\text{III.13})$$

Este método pode ser usado tanto para amostras termicamente finas ($l_s a_s < 1$), quanto para amostras termicamente grossas ($l_s a_s > 1$). No caso de amostras termicamente finas, a amplitude do sinal fotoacústico por incidência traseira decresce na forma $f^{-1.5}$, a medida que f cresce. Já para amostras termicamente grossas, a amplitude do sinal fotoacústico comporta-se na forma $(1/f) \exp(-A_s f^{1/2})$, onde $A_s = 1/(\pi/\alpha_s)^{1/2}$. A amplitude do sinal por incidência frontal decresce em ambos os casos na forma f^{-1} , a medida que f cresce. Estas dependências são válidas para o modelo de difusão térmica.

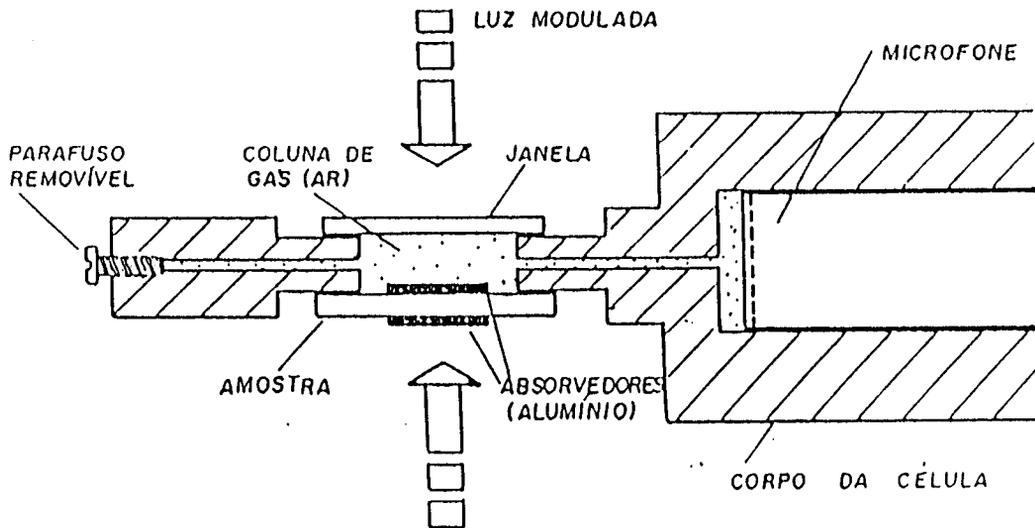


Figura III.7-Célula Fotoacústica para o Método dos Dois Feixes.

No nosso caso, onde medimos a difusividade de amostras opticamente transparentes, a condição de absorção superficial foi satisfeita fixando uma folha de alumínio($\lambda_{Al}=20 \mu\text{m}$) em cada face da amostra. O contato térmico entre a amostra e o alumínio foi feito com uma fina camada de óleo, que só interfere no sinal em frequências acima de 1 KHz. O alumínio tem alta difusividade térmica, $\alpha_{Al}=0.90 \text{ cm}^2/\text{s}$), quando comparado às amostras medidas, introduzindo uma atenuação desprezível no sinal em relação ao da própria amostra.

O Método dos Dois Feixes tem sido utilizado com sucesso, tanto para amostras opacas[14], quanto para amostras transparentes[16,17].

O arranjo experimental para este método está esquematizado na figura III.8. Um feixe de laser de Ar(Coherent Radiation, modelo CR-8, principais linhas em 514 e 488 nm), é modulado mecanicamente por um "chopper"(HMS, com variador), e focalizado sobre uma das faces da amostra. A amostra plana é fixada na célula com o auxílio de graxa de vácuo, fazendo com que uma das paredes da célula seja a própria amostra.

A célula fotoacústica convencional é uma célula de latão, com formato cilíndrico, com raio e comprimento de 2mm. A abertura da célula onde é colocada a amostra tem também um raio de 2 mm. A face oposta à amostra é fechada com uma janela de quartzo(transparente à radiação incidente).

O microfone acoplado à célula é um microfone condensador da Bruel&Kjaer(modelo4166), com resposta constante entre 5 Hz e 5 KHz.

A amplitude e fase do sinal são medidas por um "lock-in"(PAR,modelo5210), ligado a um microcomputador, que controla a frequência de modulação, lê a amplitude e a fase do sinal.

Realizamos primeiramente a aquisição do sinal traseiro, em uma faixa de frequência onde não há mudança de regime. Posteriormente, viramos de 180° a célula, para que a luz incida frontalmente na amostra, e então fizemos a aquisição na mesma faixa de frequência. Usando um programa desenvolvido no Laboratório de Fotoacústica-UNICAMP, obtemos a diferença de fase e a difusividade térmica para cada frequência, tendo como resposta final uma difusividade térmica média e seu desvio padrão.

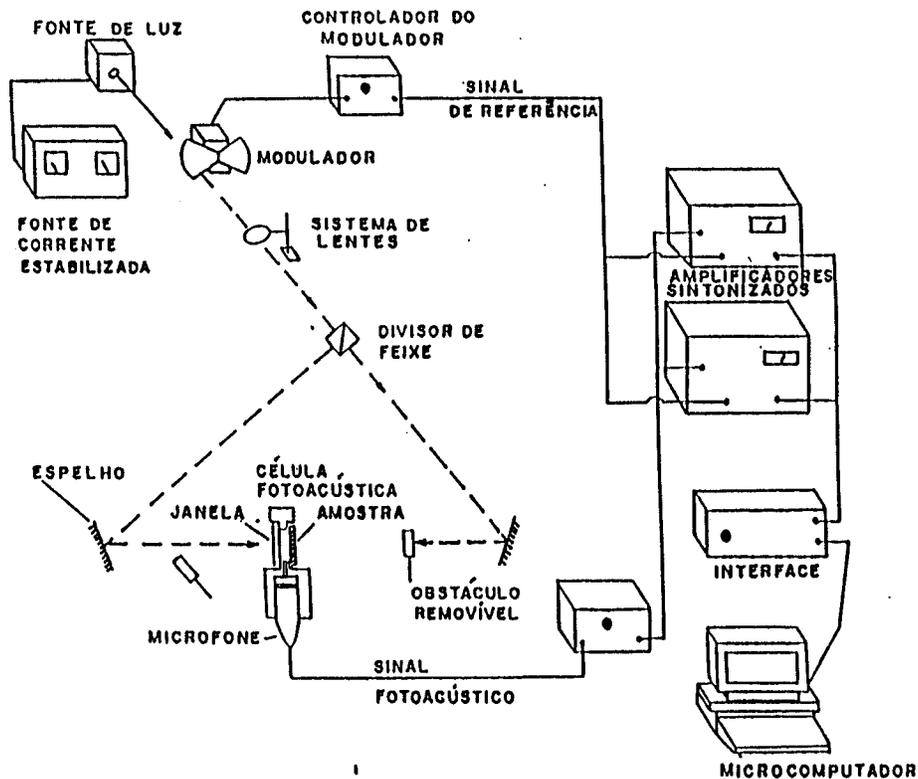


Figura III.8-Esquema do arranjo experimental para o Método dos Dois Feixes.

III.3-Determinação da condutividade térmica (k) pela Técnica de Elevação Contínua da Temperatura sob Iluminação Contínua

O aparato experimental para a utilização desta técnica[18-20] está esquematizado na figura III.9.

A amostra é suspensa adiabaticamente dentro de um Dewar, no qual foi feito vácuo (10^{-3} Torr). A incidência de luz branca contínua, em uma das faces da amostra, é feita através de uma janela de vidro no Dewar. Na face oposta da amostra é acoplado um termopar de Chromel-Alumel, cujo contato é feito com pasta térmica. Afim de garantirmos uma emissividade igual e conhecida nas duas faces da amostra, e uma boa absorção superficial, pintamos as amostras com uma camada de tinta preta ($\epsilon = 1$).

A variação de energia($\partial Q/\partial t$) na amostra ao aquecê-la com a luz de potência P_0 , é dada por:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = P_0 - L \quad (\text{III.14})$$

onde L é a potência perdida por radiação(desconsiderando as perdas por condução e convecção, que possam eventualmente existir), dada por:

$$L = A\epsilon\sigma(T^4 - T_0^4) \quad (\text{III.15})$$

onde A é a área da superfície da amostra, ϵ é a emissividade da amostra ($\epsilon \approx 1$), T é a temperatura da amostra, T_0 é a temperatura inicial da amostra (ambiente) e $\sigma = 5.67 \times 10^{-12} \text{ W/cm}^2\text{K}^4$ é a constante de Stefan-Boltzmann.

Podemos escrever a temperatura da amostra na forma:

$$T = T_0 + \Delta T \quad (\text{III.16})$$

Considerando que $\Delta T \ll T_0$, temos:

$$T^4 = (T_0 + \Delta T)^4 = T_0^4 + 4T_0^3\Delta T + \dots \quad (\text{III.17})$$

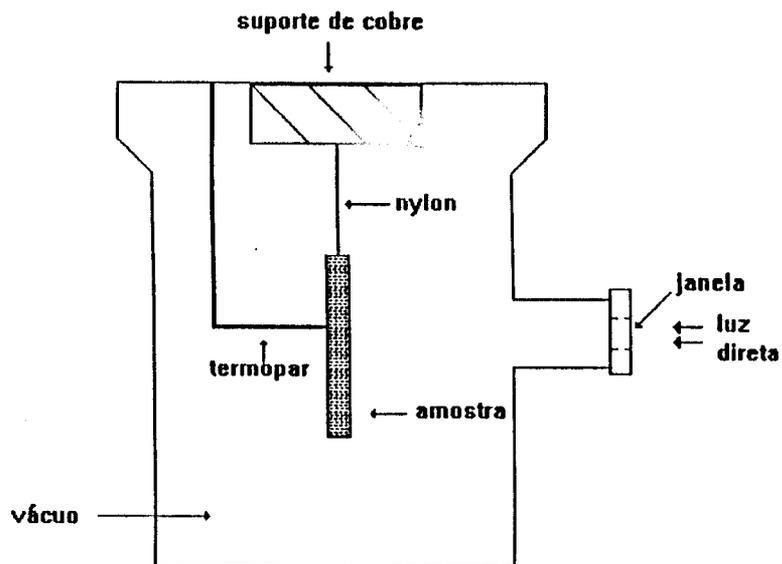


Figura III.9-Detalhe do aparato experimental utilizado para a determinação da condutividade térmica(k).

Substituindo (III.17) em (III.15) chega-se a:

$$L \approx 4A\varepsilon\sigma T_0^3 \Delta T \quad (III.18)$$

Por outro lado, a energia gerada pela variação de temperatura é dada por:

$$Q = \rho CV \Delta T \quad (III.19)$$

onde ρ é a densidade da amostra, C é o calor específico e V é o volume da amostra.

Derivando a equação (III.19) em relação ao tempo, e igualando a (III.14), substituindo L por (III.18), obtém-se:

$$\frac{\partial \Delta T}{\partial t} + \frac{H}{V\rho C} \cdot \Delta T = \frac{P_0}{V\rho C} \quad (III.20)$$

onde $H = 4A\varepsilon\sigma T_0^3$ é o coeficiente de transferência de calor.

A solução desta equação diferencial, impondo a condição de contorno $\Delta T(0)=0$, é dada por:

$$\Delta T(t) = \frac{P_0}{H} \cdot [1 - \exp(-t/\tau)] \quad (III.21)$$

onde $\tau = l_s \rho C / 8\varepsilon\sigma T_0^3$, sendo l_s a espessura da amostra.

Assim, os dados experimentais obtidos, fazendo-se a subida de temperatura em função do tempo, são ajustados pela expressão (III.21). O valor de ρC é obtido através do parâmetro ajustado τ , e conhecendo-se a difusividade térmica (α) da amostra, pode-se obter a condutividade térmica (k) através da relação:

$$\alpha = \frac{k}{\rho C} \quad (III.22)$$

A temperatura da amostra fica saturada quando o equilíbrio térmico é atingido ($L=P_0$). Se interrompemos a luz neste ponto, a temperatura da amostra passa a decrescer, obedecendo à equação:

$$\Delta T(t) = \frac{P_0}{H} \cdot \exp(-t/\tau) \quad (\text{III.23})$$

Da mesma forma, podemos ajustar os dados experimentais de descida da temperatura em função do tempo, e obtermos a condutividade térmica(k) através do parâmetro ajustado τ .

III.4-Medidas de rigidez mecânica

As medidas de rigidez mecânica foram realizadas usando um experimento simples esquematizado na figura (III.10).

Uma amostra de espessura l_s é fixada sobre uma célula de pressão cilíndrica com uma tampa de rosca, que possui uma abertura circular de raio a . A amostra é iluminada continuamente por um laser de He-Ne, e submetida durante um certo intervalo de tempo a uma pressão homogênea aplicada ΔP . A luz difusa espalhada pela superfície da amostra atua como uma fonte de luz puntual, onde a intensidade da luz varia com a distância à superfície da amostra com s^{-2} . Quando a pressão ΔP é aplicada, a amostra sofre um deslocamento da sua posição de equilíbrio, que é inversamente proporcional a sua rigidez.

O deslocamento da membrana [21] $u(r)$ é obtido através da solução da equação dada por:

$$D\nabla^4 u = \Delta P \quad (\text{III.24})$$

onde $D = Eh^3/12(1-\nu^2)$ é a rigidez flexural da membrana, E e h são o Módulo de Young e a razão de Poisson da membrana, respectivamente.

A solução da equação (III.24) é:

$$u(r) = u_0 [1 - (r/a)^2]^2 \quad (\text{III.25})$$

onde $u_0 = \Delta Pa^4/64D$, tal que o deslocamento médio da membrana $\langle u \rangle$ é igual a:

$$\langle u \rangle = \frac{u_0}{3} = \frac{\Delta Pa^4}{192D} \quad (\text{III.26})$$

Da equação (III.26) vemos que quanto maior a rigidez D da amostra, menor será o deslocamento médio $\langle u \rangle$, quando submetido a uma pressão ΔP .

Esse deslocamento da membrana é medido usando um fotodiodo de área A , posicionado a uma distância s do centro da membrana. Denotando a intensidade radiante da fonte de luz por I e a responsividade do fotodiodo por χ , o sinal detectado pode ser escrito como:

$$S = (\chi IA)/s^2 \quad (III.27)$$

Para uma pressão aplicada ΔP , $s = s_0 - \langle u \rangle$, onde s_0 é a distância inicial entre a amostra e o detector. Então, para pequenos deslocamentos, a equação (III.27) reduz-se a:

$$S = \frac{\chi IA}{s_0} \cdot [1 + 2(\langle u \rangle / s_0)] = S_0 + \Delta S \quad (III.28)$$

onde $S_0 = \chi IA/s_0^2$ é o sinal de saída do fotodiodo, quando não há pressão aplicada, e $\Delta S = S_0 \cdot 2(\langle u \rangle / s_0)$ é o deslocamento do sinal no fotodiodo devido à pressão aplicada.

Logo, combinando (III.26) com (III.28) chegamos a:

$$D = \frac{\Delta P a^4}{96 s_0 (\Delta S / S_0)} \quad (III.29)$$

Vemos da equação (III.29) que, para medirmos a rigidez de uma amostra, precisamos conhecer a razão $\Delta S/S_0$ para uma pressão aplicada.

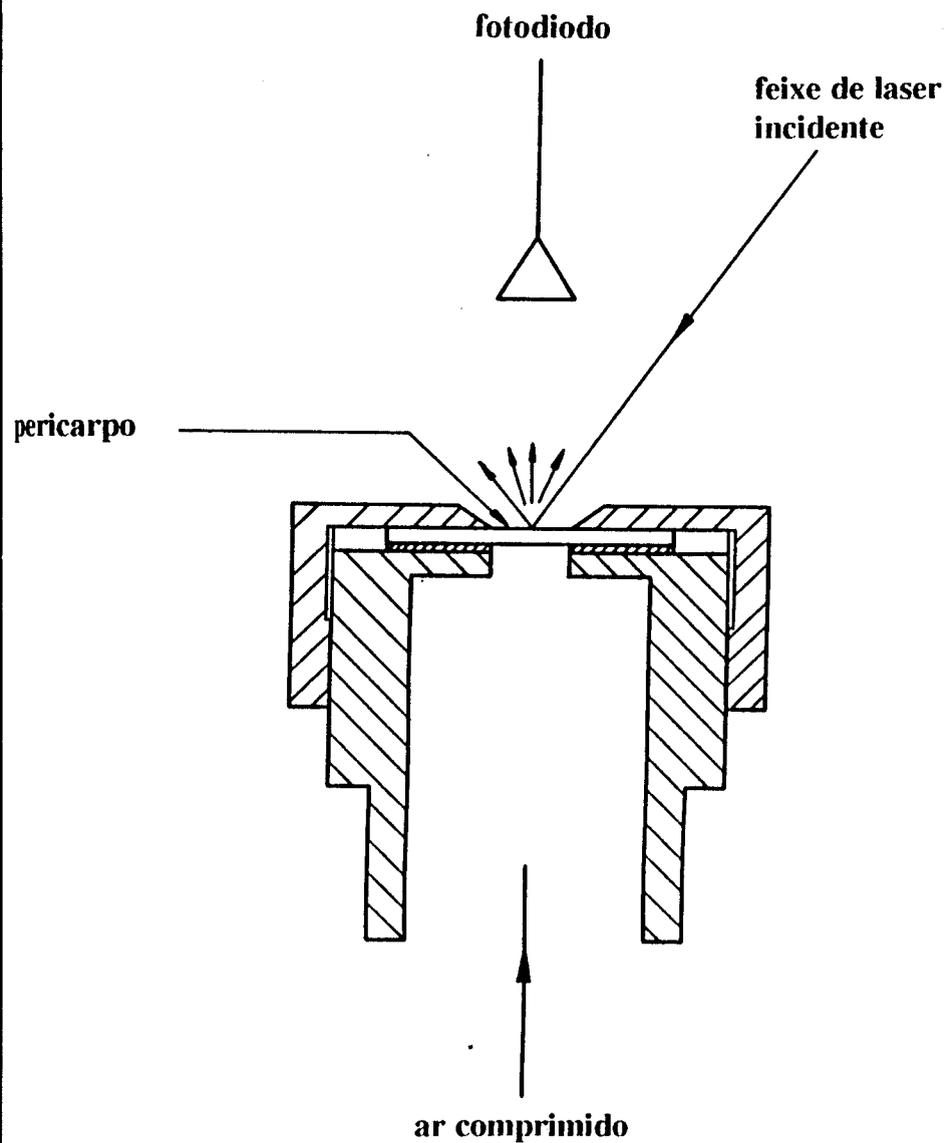


Figura III.10-Arranjo esquemático da célula de pressão para medidas de rigidez mecânica.

Referências

- [1] Silva, M. D., Bandeira, I. N., Miranda, L. C. M., *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, 20, 1476(1987).
- [2] Perondi, L. F., Miranda, L. C. M., *J. Appl. Phys.*, 62, 2955(1987).
- [3] Rosencwaig, A., *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*, John Wiley & Sons, N. Y. (1980).
- [4] Vargas, H., Miranda, L. C. M., *Phys. Rep.*, 161, 45(1988).
- [5] Marquezini, M. V., Cella, N., Mansanares, A. M., Vargas, H., Miranda, L. C. M., *Meas. Sci. Technol.*, 2, 396(1991).
- [6] Marquezini, M. V., Cella, N., Silva, E. C., Serra, D. B., Lima, C. A. S., Vargas, H., Prioli, A. J., Silva, W. J., *Analyst*, 115, 341 (1990).
- [7] Pereira, A. C., Zerbetto, M., Silva, G. C., Vargas, H., Silva, W. J., Neto, G. O., Cella, N., Miranda, L. C. M., *Meas. Sci. Technol.*, 3(1992).
- [8] Sessler, G. M., *J. Acoust. Soc. Am.*, 35, 1354(1963).
- [9] Sessler, G. M., West, J. E., *Electrets*, Topics in Applied Physics, editado por G. M. Sessler Springer Series, Springer, Berlin, 33, 347, (1980).
- [10] Morse, P. M., *Vibrations and Sound*, Mc Graw-Hill, New York(1948).
- [11] Kanstad, S. O., Cahen, D., Malkin, S., *Biochimica et Biophysica Acta*, 722, 182(1983).
- [12] Poulet, P., Cahen, D., Malkin, S., *Biochimica et Biophysica Acta*, 724, 433(1983).
- [13] Malkin, S., Morgan, C. L., Austin, R. B., *Photosyn. Res.*, 7 (1948).
- [14] Pessoa Jr., O., Cesar, C. L., Patel, N. A., Vargas, H., Ghizoni, C. C., Miranda, L. C. M., *J. Appl. Phys.*, 59(4), 1316(1988).
- [15] Yasa, Z., Amer, N. M., *Topical Meeting on Photoacoustic Spectroscopy*, Ames, WA5.
- [16] Leite, N. F., Cella, N., Vargas, H., Miranda, L. C. M., *J. Appl. Phys.*, 61(8), 3025(1987).
- [17] Cella, N., Galembeck, E., Galembeck, F., Miranda, L. C. M., *Jour. Polym. Scioen.* 27, 313(1989).
- [18] Hatta, I., *Rev. Sci. Instrum.*, 50(3), 292(1979).
- [19] Mansanares, A. M., Bento, A. C., Vargas, H., Leite, N. F., Miranda, L. C. M., *Phys. Rev. B*, 42, 4477(1990).

- [20] Bento, A. C., *Tese de Doutorado*, IFGW-UNICAMP(1990).
- [21] Timoshenko, S., *Theory of Plates and Shells*, Mc Graw-Hill, New York(1940).

CAPÍTULO IV

EXPERIMENTOS "*IN SITU*" E "*IN VIVO*" EM FOLHAS DE MILHO USANDO A TÉCNICA OPC

Neste capítulo serão mostrados os dois experimentos, descritos no capítulo III, com folhas de milho, usando a técnica OPC, sendo as medidas feitas "*in vivo*" e "*in situ*". Em nossos experimentos usamos folhas de milho albino e verde, pertencentes à mesma família de milhos, fornecidas pela professora Laudénir M. Prioli, do Instituto de Biologia-UNICAMP.

IV.1-Espectro de absorção fotoacústico

Sendo a folha de milho transparente e termicamente grossa, para o intervalo de frequência usado por nós, dado que a frequência de corte está em torno de 2 Hz, a expressão teórica para o sinal V_{opc} e a normalização para se obter o espectro de absorção correspondem às expressões (III.7) e (III.9), respectivamente.

Desta forma, primeiramente obtivemos o espectro de absorção da membrana (sinal V_a) para posteriormente podermos normalizar os espectros das folhas de milho. Para isto, usamos uma janela de vidro BK-7, de aproximadamente 300 μm de espessura, no lugar da amostra. Esse vidro tem cerca de 96% de transmissão óptica no visível, não contribuindo para o sinal fotoacústico[1].

Os espectros de absorção "*in situ*" e "*in vivo*" das folhas de milho verde (a) e albino (c) estão na figura IV.1. O espectro (b) é de uma estria verde presente na folha albina, que foi colocada na célula de tal forma que a luz incidisse sobre ela. A frequência de modulação usada foi de 17 Hz.

No espectro da folha verde (a) de milho podemos observar os picos de absorção das clorofilas a e b, em 680 e 650 nm, respectivamente.

Já no espectro da folha albina (c) observamos que não há absorção de luz em 680 e 650 nm, comprovando a falta de pigmentação nos milhos albinos, exceto nas estrias verdes (b).

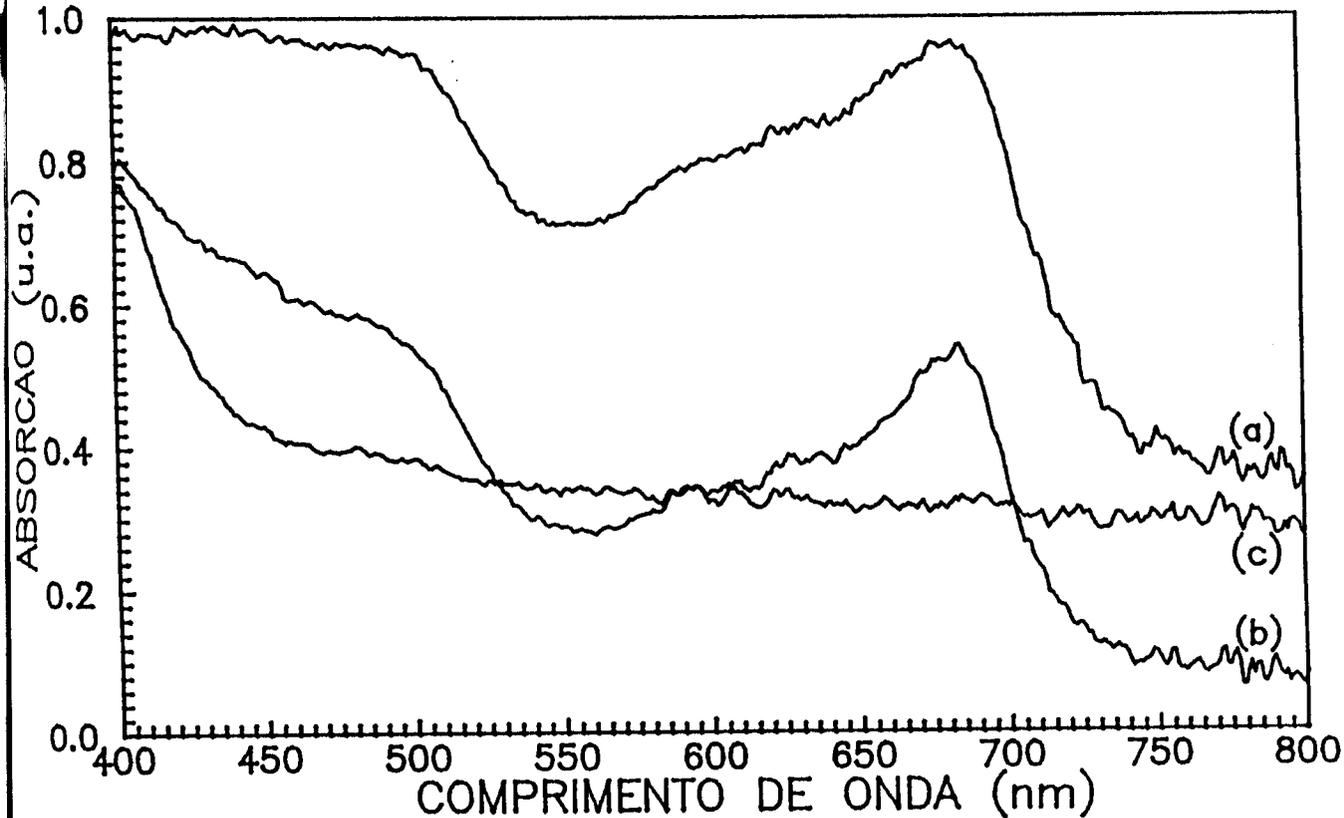


Figura IV.1-Espectros de absorção fotoacústicos de uma folha verde de milho (a) e de uma folha albina de milho (c). O espectro (b) é referente a uma estria verde presente na folha albina.

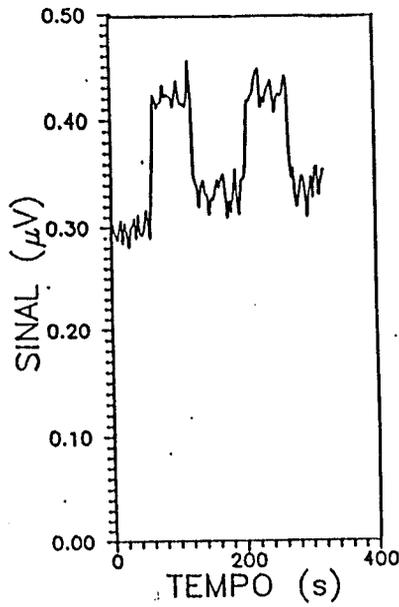
IV.2-Observação dos efeitos positivo e negativo

Os efeitos positivo e negativo nas folhas verdes de milho foram observados em alta e baixa frequência de modulação, 250 e 17 Hz, respectivamente. Realizamos medidas sucessivas do sinal fotoacústico, ora apenas com a luz modulada, ora simultaneamente com a luz modulada e a luz branca de fundo incidindo sobre a amostra. A figura IV.2 mostra a amplitude do sinal fotoacústico versus o tempo, para a folha verde de milho, nas frequências de 17 Hz para a observação do efeito negativo (a), e de 250 Hz para a observação do efeito positivo (b).

No caso da folha albina de milho observamos apenas o efeito negativo em uma estria verde presente na folha, apresentado na figura IV.3, na frequência de 17 Hz, dado a dificuldade de obtermos o sinal fotoacústico em altas frequências. Na parte totalmente albina da folha o efeito negativo não está presente, como é mostrado na figura IV.4.

Como foi dito anteriormente no capítulo III, a produção de oxigênio está relacionada ao efeito negativo. Desta forma, comparando o efeito negativo nas folhas verde e albina vemos que o efeito é nulo na folha albina, dado que esta apresenta falta de pigmentação, e conseqüentemente não faz fotossíntese. Quando uma estria da folha albina é iluminada dentro da célula o efeito negativo se faz presente, porém em uma taxa menor, dado que apenas uma parte da célula está preenchida com a parte verde da folha.

(a)



(b)

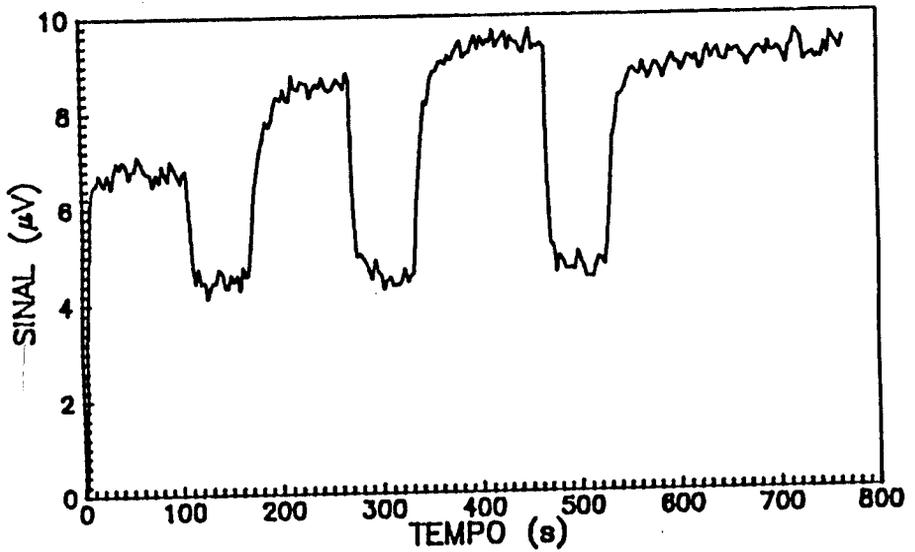


Figura IV.2-Efeito positivo (a) e efeito negativo (b) folhas verdes de milho, nas frequências de 250 e 17 Hz, respectivamente.

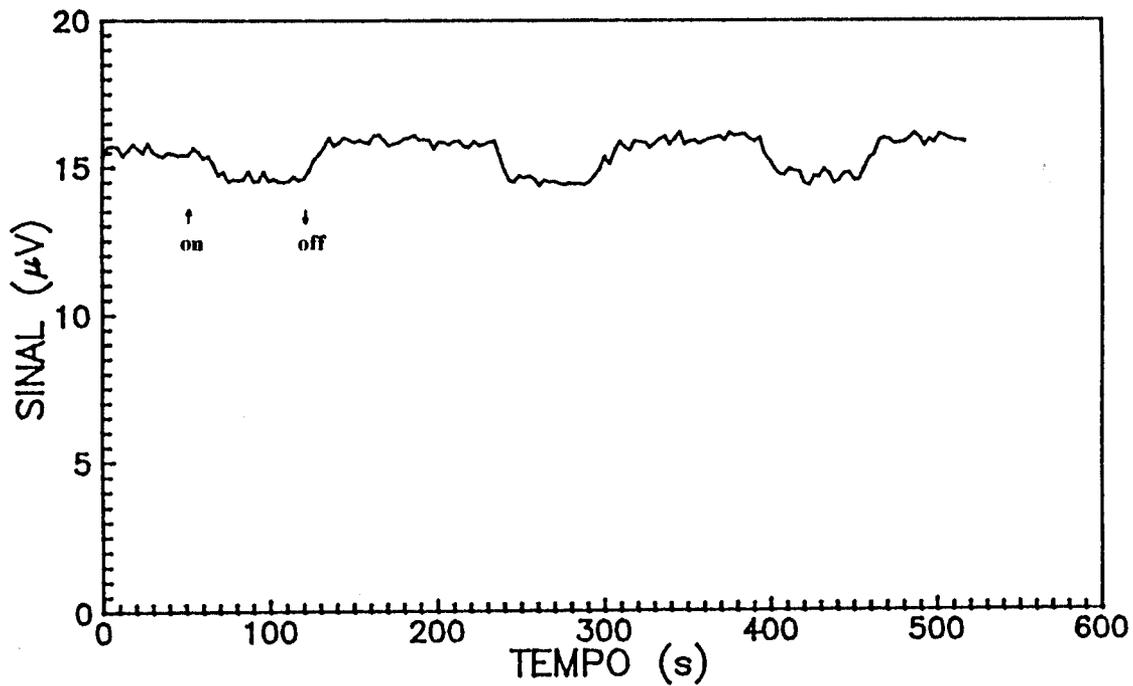


Figura IV.3-Efeito negativo em uma estria verde da folha albina de milho, na frequência de 17 Hz.

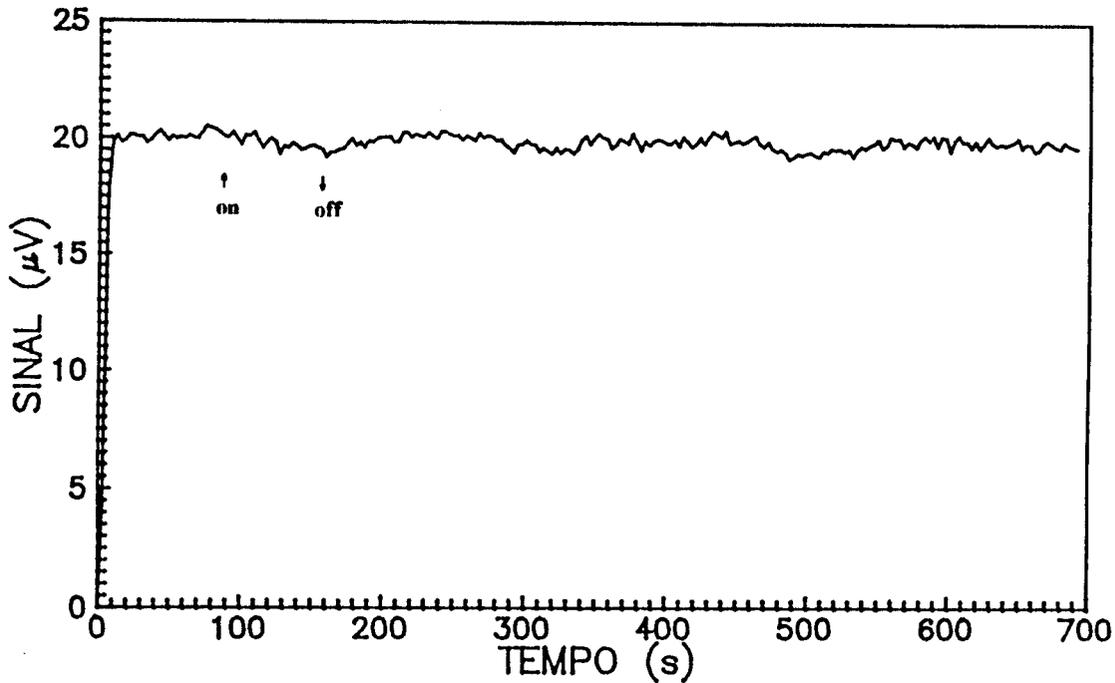


Figura IV.4- Resultado da aplicação da luz branca de fundo sobre o sinal fotoacústico na frequência de 17 Hz para observação do efeito negativo em folha albina de milho.

IV.3-Discussão

Primeiramente, podemos notar através do que foi mostrado o desempenho e a versatilidade da técnica OPC em estudos com plantas, ressaltando o poder da técnica no sentido de realizar estudos "*in situ*" e "*in vivo*" [2]. Além destes fatos, a técnica não exige nenhum preparo prévio da amostra.

Quando nos referimos à medidas realizadas "*in situ*" e "*in vivo*" queremos dizer que estamos trabalhando com a planta nas suas condições reais de vida. Na figura IV.5 mostramos o efeito da desidratação e a mudança nas atividades fotossintéticas de uma folha de soja [2], quando esta é cortada do caule. A taxa de evolução de oxigênio (relacionada ao efeito negativo) diminui com o tempo, mostrando o efeito da desidratação sobre as atividades fotossintéticas, sendo similar o efeito em discos cortados de folhas vegetais expostos à atmosfera (forma utilizada em medidas anteriores à técnica OPC). Isto demonstra a grande importância da realização de medidas "*in situ*" e "*in vivo*", permitindo um monitoramento das atividades fotossintéticas das plantas mediante mudanças nas condições ambientais e morfológicas.

A comprovação de que estamos medindo realmente a evolução de oxigênio está na comparação do efeito negativo entre as folhas verde e albina. No caso da folha albina vemos que o efeito negativo é nulo, exceto nas estrias onde há alguma pigmentação verde.

Enfim, esta técnica pode ser muito útil quando queremos comparar as atividades fotossintéticas entre plantas, dado que a produtividade de uma planta está intimamente ligada à produção de oxigênio.

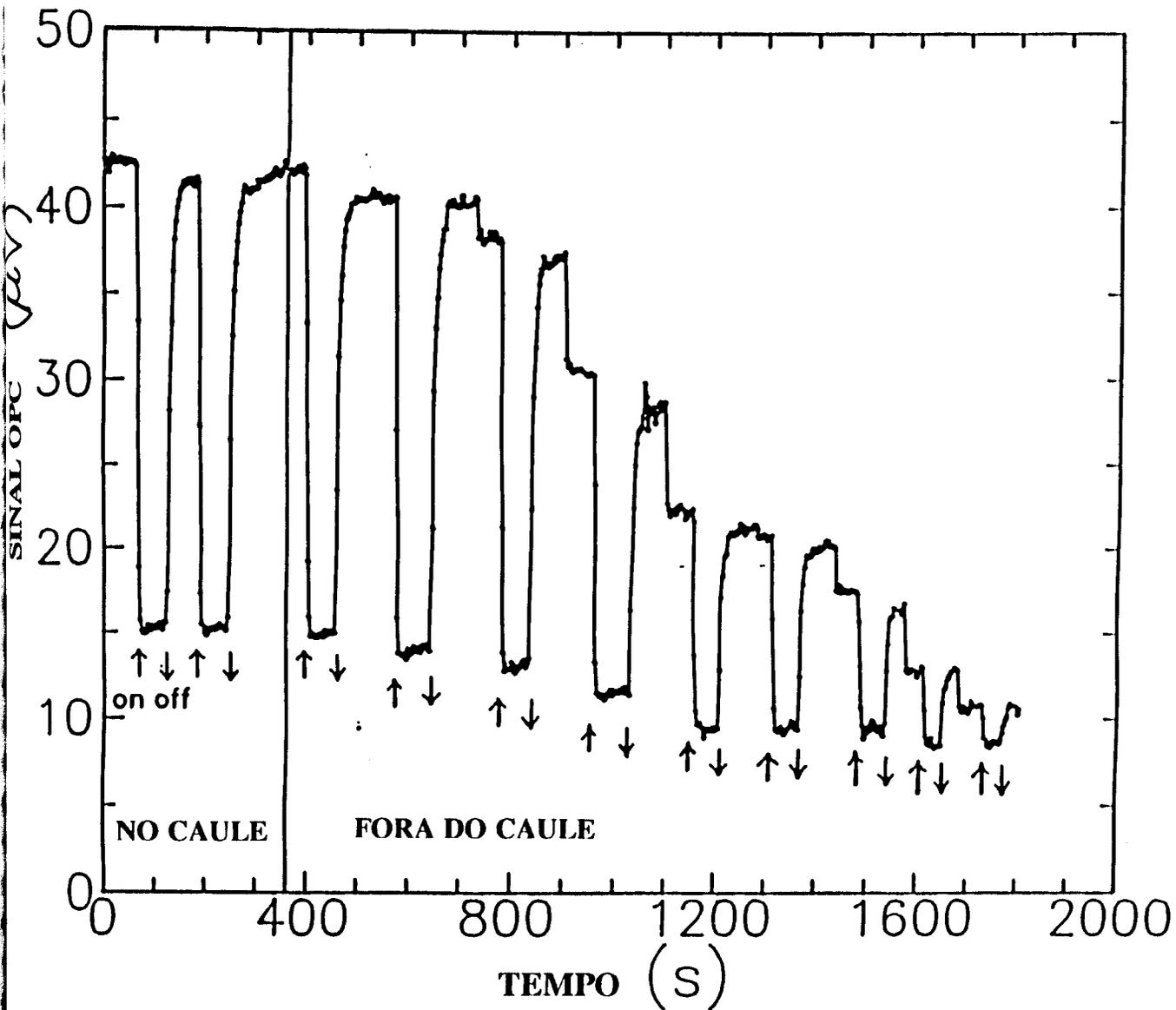


Figura IV.5-Efeito da desidratação sobre as atividades fotossintéticas em uma folha de soja. O efeito negativo é constante enquanto a folha está ligada ao caule, após cortá-la o efeito negativo decresce.

Referências

- [1] Marquezini, M. V., *Tese de Mestrado*, IFGW-UNICAMP (1990).
- [2] Pereira, A. C., Zerbetto, M., Silva, G. C., Vargas, H.,
Silva, W. J., Cella, N., Miranda, L. C. M., *Meas. Sci. Technol.* **3**
(1992).

CAPÍTULO V

CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES TÉRMICAS E MECÂNICA DO PERICARPO DE MILHO

Apesar do milho de pipoca e do milho comum pertencerem à mesma espécie de planta *Zea mays mays*[1], o milho de pipoca apresenta uma característica particular: a habilidade de estourar. Estudos na área da Biologia, restritos ao milho de pipoca, demonstram que o pericarpo e o amido desempenham papéis importantes no estouro da pipoca[2]. Em nosso trabalho, realizamos uma série de medidas em pericarpos de variedades de milho comum e de pipoca, com o objetivo de encontrarmos diferenças em suas propriedades estruturais, térmicas e mecânica. Como consequência, foi possível explicarmos como e porquê o milho de pipoca estoura, bem como a evolução genética do milho.

V.1-Preparação das amostras

Para os nossos experimentos usamos quatro variedades distintas de milho comum (C08, C10, C12 e C16) e duas variedades de milho de pipoca (P60 e P61), fornecidas pelo Prof. William José da Silva, do Dept. de Genética da UNICAMP.

Os pericarpos foram removidos dos milhos após ficarem imersos em água por 4 a 6 horas, e depois comprimidos entre duas folhas de papel sob um peso, de aproximadamente 2 kg, durante pelo menos 12 horas, garantindo assim a forma plana da amostra. Após este tempo, os pericarpos estavam prontos para serem medidos.

V.2-Medidas das propriedades térmicas: Difusividade e Condutividade Térmica

Para as medidas de difusividade térmica usamos o Método dos Dois Feixes, descrito no capítulo III. Como nossas amostras eram transparentes, a condição de absorção superficial foi satisfeita colocando-se as folhas de alumínio nas duas faces da amostra. A potência do laser foi de 80 mW em todas as medidas.

Dado o grande número de variedades de milho que tínhamos que caracterizar, adotamos a seguinte sistemática: de cada variedade tomamos cinco amostras e medimos cada amostra três vezes.

A frequência de modulação utilizada foi entre 10 e 50 Hz, dado que nesta faixa a amostra é termicamente grossa e o mecanismo predominante de geração do sinal é a difusão térmica (isto foi verificado através da amplitude do sinal traseiro fazendo-se uma varredura de frequência em um intervalo maior).

Nas figuras V.1(a) e V.1(b) mostramos, em um gráfico semilog, a amplitude do sinal traseiro em função da raiz da frequência de modulação, para as variedades C10 e P61 de milho comum e de pipoca, respectivamente. Podemos notar que, nesta faixa de frequência a amplitude do sinal traseiro é dominada pelo comportamento exponencial [$\sim \exp(-a\sqrt{f})$], como prevê o modelo de difusão térmica para amostras termicamente grossas. As outras variedades de milho apresentaram o mesmo comportamento.

Na tabela V.1 temos o valor da difusividade térmica, bem como da espessura, de cada variedade de milho. Os resultados apresentados representam a média dos valores obtidos para cada amostra da mesma variedade. O desvio padrão da difusividade térmica para cada variedade não excede os 10%.

Para as medidas de condutividade térmica, utilizamos a técnica de elevação da temperatura sob iluminação contínua também descrita no capítulo III. O aquecimento da amostra foi feito com o auxílio de uma lâmpada de halogêneo, com uma tensão de 12 V.

A partir dos ajustes dos dados de subida (e descida) da temperatura para cada variedade de milho, encontramos os valores de ρc e conhecendo-se a difusividade térmica de cada variedade, obtidas anteriormente, encontramos a condutividade térmica através de:

$$\alpha = k/(\rho c) \quad (V.1)$$

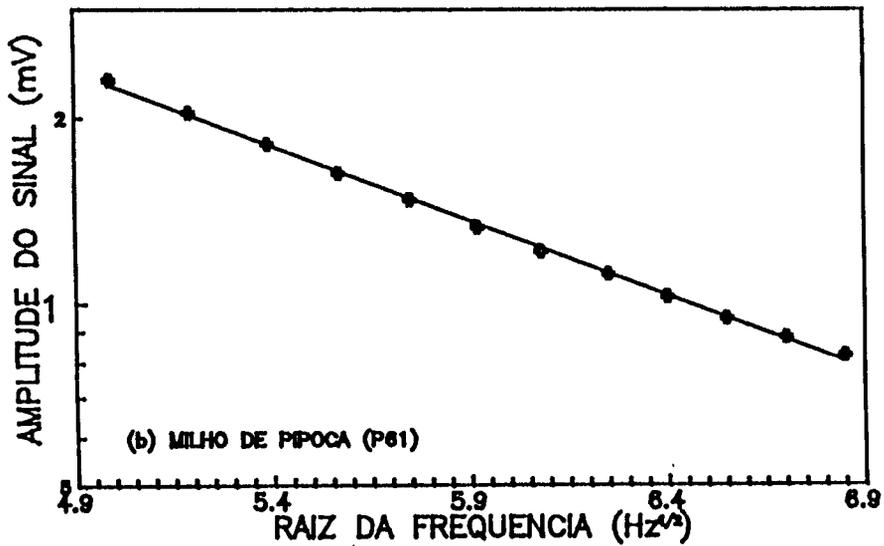
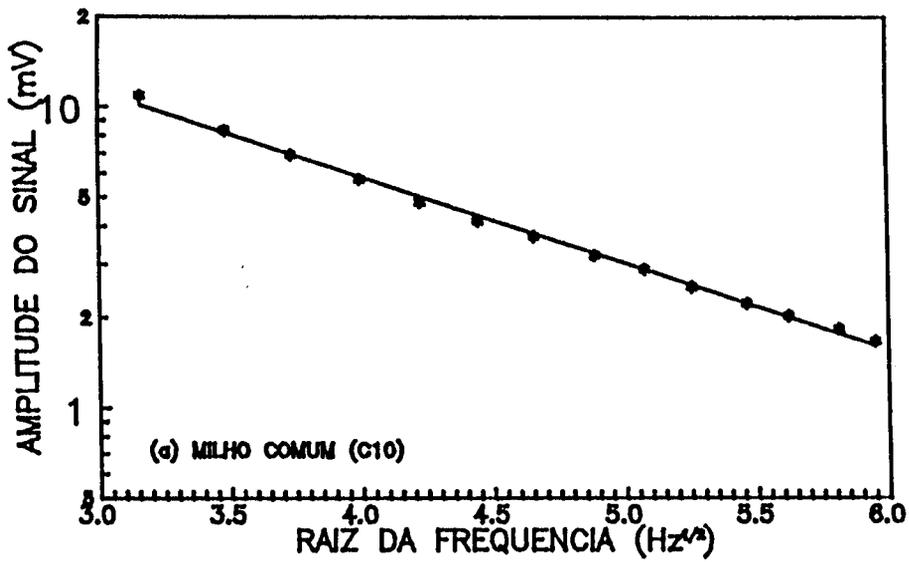


Figura V.1- Dependência do sinal traseiro com a raiz da frequência para o milho comum (a) e para o milho de pipoca (b).

Variedades	C10	C12	C16	C08	P60	P61
Difusividade Térmica (α) <i>cm²/s x 10⁻³</i>	0.32	0.45	0.55	0.77	1.42	1.56
Condutividade Térmica (k) <i>mW/cmK</i>	0.62	0.95	1.31	1.79	2.27	2.30
Calor Específico (ρc) <i>J/cm³K</i>	1.93	2.12	2.37	2.33	1.60	1.45
Espessura média (μm)	50	50	55	60	60	110

Tabela V.1- Valores das propriedades térmicas e da espessura dos pericarpos das variedades de milho e de pipoca.

As figuras V.2(a) e V.2(b) mostram os dados experimentais de subida (e descida) de temperatura e os ajustes pelas expressões III.21 e III.23, respectivamente, em função do tempo, para as respectivas variedades de milho comum (C10) e de pipoca (P61). As variedades restantes de milho comum e de pipoca apresentaram o mesmo comportamento. Os valores obtidos para a condutividade térmica de cada variedade estão apresentados na tabela V.1.

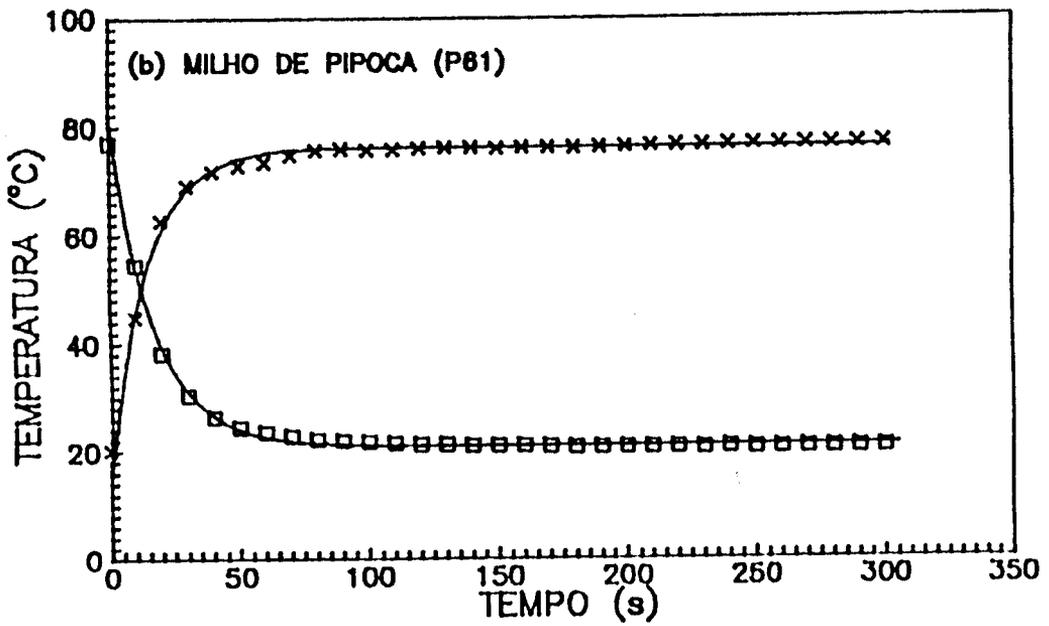
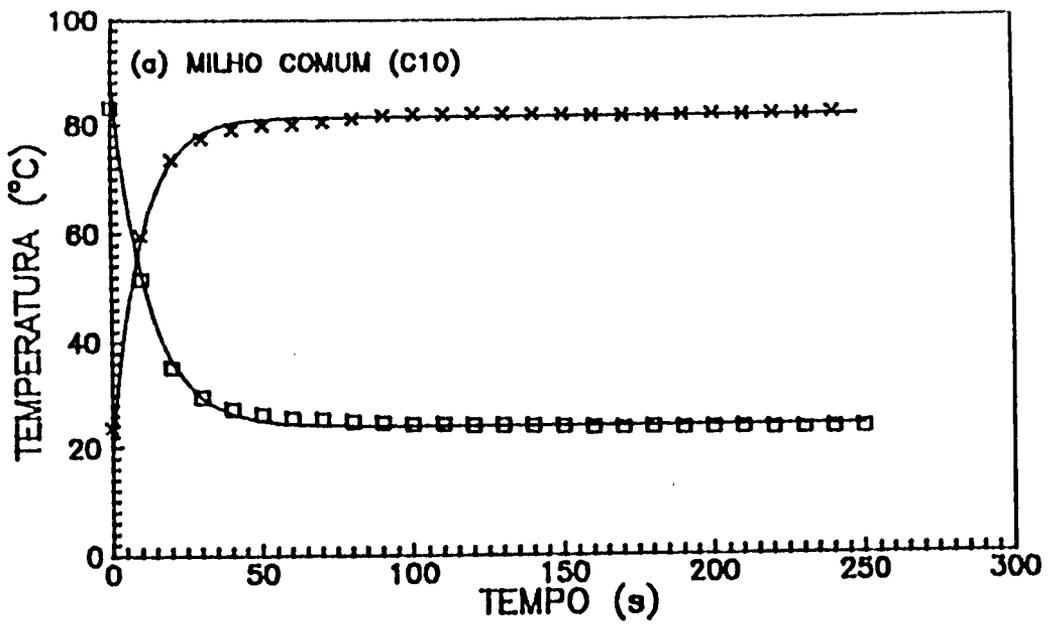


Figura V.2- Variação da temperatura do pericarpo de milho comum (a) e de pipoca (b) em função do tempo: aumento da temperatura sob iluminação contínua, e diminuição da temperatura com a interrupção do feixe luminoso. As linhas contínuas representam os ajustes pelas expressões (V.21) e (V.23).

V.3-Medidas de rigidez mecânica

As medidas de rigidez mecânica nos pericarpos de milho foram feitas conforme descrito no capítulo III. A aquisição do dados foi feita através de um registrador XY, ligado ao fotodiodo, com uma velocidade de varredura igual a 5 cm/s e escala de sensibilidade de 10 mV.

A pressão aplicada em cada pericarpo variou, pois cada variedade suporta uma determinada pressão diferente, e dependendo desta o pericarpo se rompe ou deforma. Portanto, não foi possível uniformizarmos a pressão.

No nosso caso, o diâmetro iluminado da amostra era de 3mm e a distância da amostra ao fotodiodo era de 20 cm.

Na tabela V.2 temos os valores da rigidez mecânica dos pericarpos de cada variedade.

Variedades	C10	C12	C16	C08	P60	P61
Pressão utilizada (psi)	18	21	33	18	36	36
Rigidez Mecânica (D) $atm.cm^3 \times (4.2 \times 10^{-5})$	66.7	95.3	118.0	20.6	245.0	262.0
Espessura média (μm)	50	50	55	60	60	110

Tabela V.2- Valores da propriedade mecânica, para as variedades de milho comum e de pipoca, medidas mediante uma variação de pressão.

V.4-Modelo do vaso de pressão

Para relacionarmos as propriedades térmicas e mecânica do pericarpo com o mecanismo de estouro da pipoca consideramos o modelo do vaso de pressão[1,4,5].

No nosso caso, o grão de milho faz o papel de um vaso esférico de raio efetivo R , que troca calor com a sua vizinhança através de uma fina parede esférica (pericarpo), de espessura l_p e condutividade térmica k_p , sendo o coeficiente de transferência de calor h igual a $h = k_p/l_p$. O material (amido+água), que preenche o interior deste vaso, possui uma densidade ρ , uma condutividade térmica k e uma difusividade térmica α .

Aquecendo o vaso através de um fluxo de calor constante ϕ_0 , estando inicialmente a uma pressão P_0 e uma temperatura T_0 , podemos encontrar a temperatura final atingida por ele. Para isto, usamos a equação de difusão térmica escrita como:

$$\nabla^2 T = (1/\alpha) \cdot \partial T / \partial t - (1/k) \cdot [\phi_0 \cdot \theta(t) - hT] \cdot \delta(r-R) \quad (V.2)$$

onde $\theta(t)$ é a função degrau unitária.

A solução da equação (V.2), obtida através da técnica da transformada de Laplace, é dada por:

$$T(r,s) = (\phi_0 R / 2sr) \cdot \{ (e^{\sigma r} - e^{-\sigma r}) / [h \cdot \sinh(\sigma r) + (k/R) \cdot \sigma \cdot \cosh(\sigma r)] \} \quad (V.3)$$

Calculando a média temporal da temperatura, e tomando a transformada de Laplace inversa, chegamos à expressão da temperatura no domínio do tempo, que é dada por:

$$T(t) = (\phi_0 / h) \cdot (1 - e^{-t/\tau}) \quad (V.4)$$

onde $\tau = R^2 / \alpha$ é o tempo de relaxação para o vaso atingir a temperatura final ϕ/h .

Da equação (V.4) podemos observar que, quanto maior o vaso mais longo será o tempo para atingir a temperatura final. Além disto, quanto maior o coeficiente de transferência de calor, menor será a temperatura final. No caso do grão de milho, pequenos grãos com alto coeficiente de transferência de calor (milho de

pipoca) atingem rapidamente a temperatura final, sendo esta menor se comparada ao caso de grandes grãos com baixo coeficiente de transferência de calor (milho comum).

Usando os dados das propriedades térmicas obtidos anteriormente, para as variedades de milho de pipoca (P61) e comum (C10), as expressões para a temperatura são, respectivamente:

$$T_p(t) = (\phi_o/h_p).(1 - e^{-x}) \quad (V.5)$$

$$T_c(t) = (\phi_o/h_p).1.89.(1 - e^{-x/8}) \quad (V.6)$$

onde $x = t/\tau_p$, sendo $\tau_c = 8\tau_p$ e $h_p = 1.89h_c$.

Na figura V.3 temos as curvas de temperatura versus tempo, obtidas através das expressões (V.5) e (V.6), para o milho de pipoca e comum, respectivamente.

Até aqui foi negligenciado o fato de que com o aumento da temperatura o amido começa a se decompor. A temperatura de decomposição do amido está em torno de 105°C, significando portanto que devemos considerar este fato em nosso modelo.

A expressão da temperatura na superfície do vaso em função do tempo é obtida fazendo $r = R$, e considerando $\sigma R \gg 1$ na expressão (V.3), resultando em:

$$T(R,s) = (\phi_o/h).[1 - \exp(a^2t).\text{erfc}(at^{1/2})] \quad (V.7)$$

onde $a = h\alpha^{1/2}/k$ e $\text{erfc}(x) = (2/\pi^{1/2}). \int_x^\infty dz.\exp(-z^2)$.

Fazendo $x = a^2t$ e considerando x pequeno, levando em conta que $a_c = 0.5a_p$ e $h_p = 2h_c$, chegamos às expressões para as variedades de milho de pipoca (P61) e comum (C10), respectivamente:

$$T_p(R,t) = (\phi_o/h_p).\{1 - e^{-x}[1 - (1 - \exp(-4x/\pi))^{1/2}]\} \quad (V.8)$$

$$T_c(R,t) = (\phi_o/h_p).2\{1 - e^{0.25x}[1 - (1 - \exp(-x/\pi))^{1/2}]\} \quad (V.9)$$

As curvas referentes às expressões (V.8) e (V.9) para os milhos de pipoca e comum, estão na figura V.4.

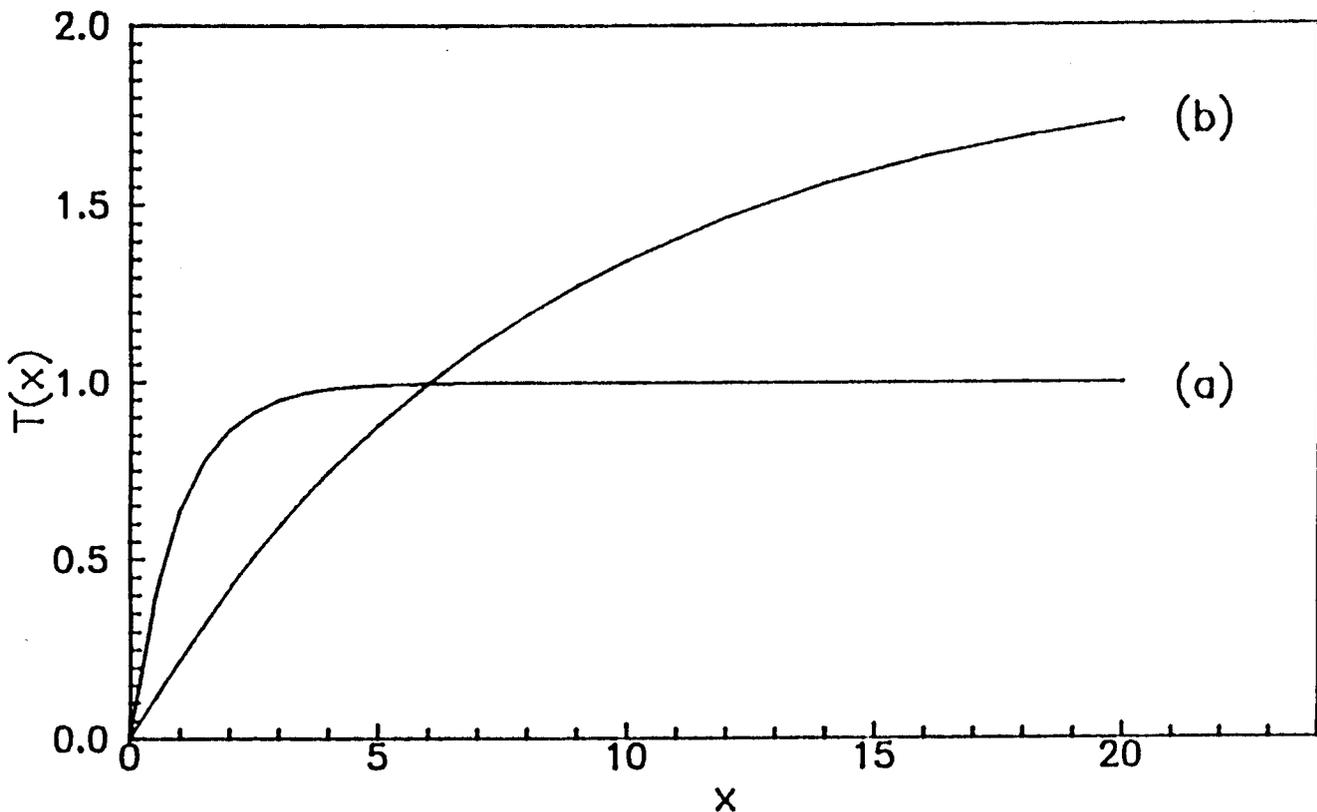


Figura V.3- Curvas de temperatura em função do tempo ($x = t/\tau_p$) obtidas para pericarpo de milho de pipoca (a) e comum (b), obtidas através das expressões (V.5) e (V.6), respectivamente.

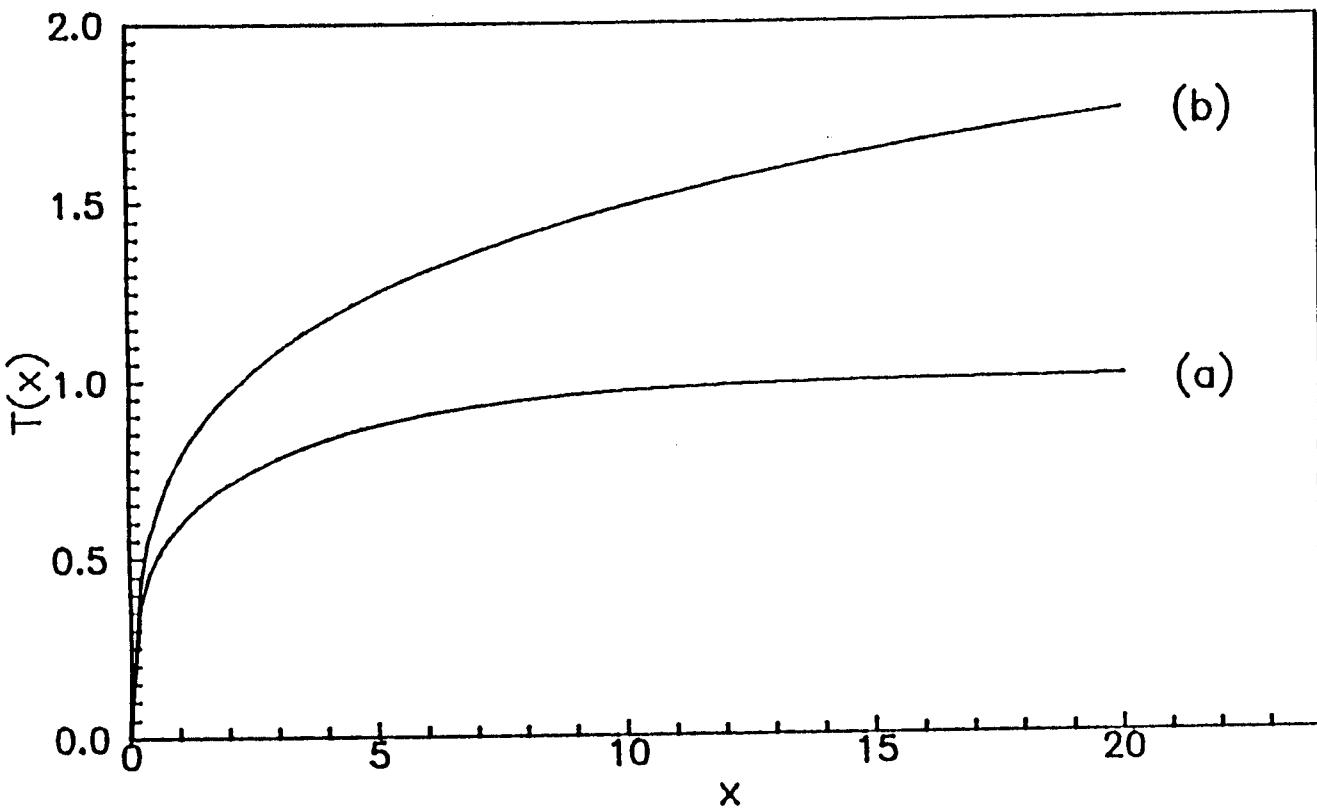


Figura V.4- Curvas de temperatura em função do tempo ($x = a^2t$) obtidas para a superfície do amido de milho de pipoca (a) e comum(b), através das expressões (V.8) e (V.9), respectivamente.

No centro do grão ($r = 0$), as expressões são obtidas da mesma forma que para a superfície, sendo dadas por:

$$T_p(0,t) = (2\phi_0 R/k).e^{\lambda+x}. \{1-[1- \exp(-4/\pi(x^{1/2}+ \lambda/2x^{1/2})^2)]^{1/2}\} \quad (V.10)$$

$$T_c(0,t) = (2\phi_0 R/k).e^{0.25(2\lambda+x)}. \{1-[1- \exp(-1/\pi(x^{1/2}+ \lambda/x^{1/2})^2)]^{1/2}\} \quad (V.11)$$

V.5-Discussão

Através da tabela V.1 podemos observar que o pericarpo do milho de pipoca tem uma difusividade e uma condutividade térmica de aproximadamente 2.9 e 2.0 vezes maior, respectivamente, que as mesmas para o pericarpo de milho comum. As altas difusividade e condutividade térmica do pericarpo do milho de pipoca em relação ao comum sugerem que o pericarpo do milho de pipoca seja menos amorfo (no sentido de estar mais organizado estruturalmente) que o pericarpo do milho comum. Uma comprovação está no resultado das medidas de rigidez mecânica, onde esta é cerca de 4.0 vezes maior para o pericarpo do milho de pipoca em relação ao do milho comum. Outra comprovação a respeito das diferenças estruturais, entre os pericarpos do milho comum e de pipoca, foi obtida com o auxílio da microscopia óptica de birrefringência, pelo Prof. Benedito C. Vidal, do Instituto de Biologia-UNICAMP. A birrefringência no pericarpo se deve ao arranjo cristalino da celulose. Na figura V.5 temos os resultados da microscopia de birrefringência para os pericarpos dos milhos comum e de pipoca. Estes resultados revelam um maior arranjo cristalino da celulose e um alto grau de empacotamento fibrilar no pericarpo do milho de pipoca, quando comparado com o milho comum, resultando portanto em uma estrutura mais rígida.

Considerando o modelo do vaso de pressão descrito na secção anterior, para relacionarmos as propriedades térmicas e mecânica do pericarpo com o mecanismo de estouro da pipoca, duas conclusões podem ser tiradas. A primeira, usando os dados térmicos, é que o coeficiente de transferência de calor, $h = k/l$ (k condutividade térmica e l espessura do pericarpo), é aproximadamente 1.9 vezes maior do que para o milho comum. Isto implica em uma maior eficiência na transferência de calor para o amido, tal que a temperatura interior aumenta rápida e fortemente, enquanto que a temperatura da capa permanece mais baixa que o pericarpo do milho comum. A temperatura baixa do pericarpo da pipoca minimiza o risco de combustão no momento

em que o amido atinge a temperatura para a sua máxima expansão. Já no caso do milho comum, na temperatura em que ocorre a máxima expansão do amido, o pericarpo queima-se. A segunda conclusão está ligada a rigidez mecânica do pericarpo do milho de pipoca que é maior que a do milho comum, significando que o pericarpo do milho de pipoca pode suportar maior pressão que o pericarpo do milho comum, logo o mecanismo de estouro é favorecido nas variedades de milho de pipoca.

O modelo do vaso de pressão pode ser comparado à uma panela de pressão sem válvula. Desta forma, quando o amido e a água no interior do grão de milho são aquecidos há a liberação de vapor, que não tem por onde sair, conseqüentemente a pressão no interior do grão aumenta, fazendo-o explodir, como aconteceria em uma panela de pressão sem válvula.

Dois experimentos de expansão do grão, "popping" e "puffing", foram realizados com o objetivo de verificar qual o papel do pericarpo e do amido no mecanismo de estouro da pipoca. O "popping" consiste em colocar os grãos de milho em óleo de milho a uma temperatura em torno de 180 °C (temperatura aproximada em que o milho estoura). Já no "puffing" os grãos de milho são colocados em uma câmara de pressão aquecida a 180 °C e levada a uma pressão de 135 psi. Quando a câmara atinge esta pressão a tampa é instantaneamente aberta e os grãos são expostos à pressão ambiente. Este experimento cria artificialmente um invólucro resistente para o grão simulando a ação do pericarpo durante o mecanismo de estouro.

Duas variedades de milho de pipoca, P61 e P62, e duas variedades de milho comum, C10 e C12, foram usadas para os experimentos de "popping" e "puffing", em grãos inteiros e em grãos sem o pericarpo. Na figura V.6 temos os resultados destes experimentos.

O dados do "popping" para o milho comum indicam que a retirada do pericarpo nada afeta na expansão. Ambos os grãos, sem e com o pericarpo, têm uma ~~grande capacidade de expansão, sendo a diferença entre as variedades de milho comum~~
Ao contrário, para o milho de pipoca a retirada do pericarpo reduz a expansão a 90.4%, confirmando a importância deste tecido no estouro.

O experimento do "puffing" mostra que os grãos de milho comum têm também uma grande capacidade de expansão, com valores próximos aos do milho de pipoca. Isto é obviamente atribuído à câmara de pressão, na qual sua capa age como uma camada resistente sobre o grão ao invés do fraco pericarpo dos grãos de milho comum.

Estes experimentos nos levam a concluir que o pericarpo do milho de pipoca, com suas altas difusividade térmica e rigidez, está mais apto a permitir uma maior expansão do amido que o milho comum.

O milho surgiu por volta de 7000 anos atrás, na América Central [6], de um capim selvagem chamado de teosinte. Os frutos do teosinte são muito menores que o tamanho médio dos grãos de milho e seu pericarpo é uma fina membrana. O teosinte foi domesticado e transformado em milho pelos maias e astecas. Esta seleção artificial feita pelos índios, e mais tarde pelos fazendeiros e produtores, deve ter aperfeiçoado o balanço entre o tamanho dos grãos, qualidade do amido e propriedades do pericarpo, dando origem as variedades de milho de pipoca e híbridos disponíveis hoje no mercado.

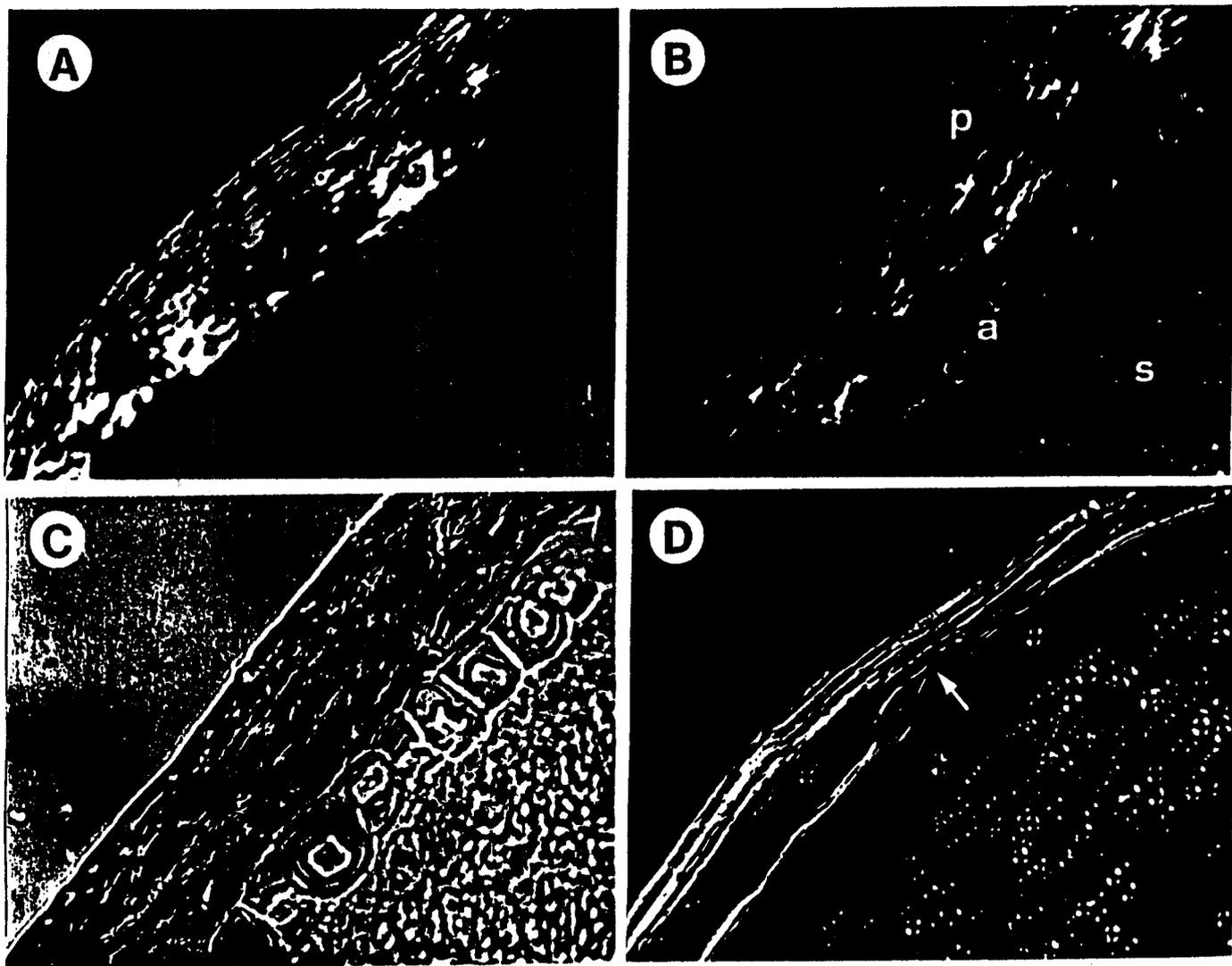


Figura V.5-(A-C)Resultados da microscopia de birrefringência em uma secção de $7\mu\text{m}$ de espessura de um grão de milho de pipoca, mostrando o pericarpo (p), aleurona (a) e subaleurona (s); (367 \times). **(D)**Resultado da microscopia de birrefringência em uma secção de $7\mu\text{m}$ de espessura de um grão de milho comum.

ITY

POPPED

PUFFED

WHOLE

HULLED

WHOLE

HULLED

10



2.00



1.83

1.88 c



16.60



18.97

17.78 c

12



1.83



1.93

1.92 c



13.47



18.23

15.85 d

61



33.22



2.77

18.00 a



27.90



25.60

26.75 a

62



30.33



3.33

16.80 b



27.10



23.20

25.15 b

16.85 a

2.47 b

21.50 a

21.27 a

Figura V.6-Experimentos de "popping" e "puffing" em grãos de milho inteiro e em grãos sem o pericarpo. Os números indicam a expansão após o estouro, ou seja, quantas vezes mais o volume do grão expandiu-se em relação ao grão original.

Referências

- [1] Doebley, J. F., Iltis, H. H., *Am. J. Bot.*, 67, 982 (1980).
- [2] Hosoney, R. C., Zelesnak, K., Abdelrahman, A., *J. Cereal Science*, 1, 43 (1983).
- [3] Silva, W. J., Vidal, B. C., Martins, M. E. Q., Vargas, H., Pereira, A. C., Zerbetto, M., Miranda, L. C. M., *Nature*, 362, abril (1993).
- [4] Strehlow, R. A., *Combustion Fundamentals*, Mc Graw-Hill, New York (1984).
- [5] Semenov, N. N., *Chemical Kinetics and Chain Reactions*, Oxford Univ. Press, Oxford (1935).
- [6] Iltis, H. H., *Science*, 222, 886 (1983).

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho aplicamos o efeito fotoacústico ao estudo de materiais biológicos, tanto para a obtenção de propriedades óptica e térmica, quanto para a observação "in vivo" e "in situ" da atividade fotossintética de uma planta.

Usando o "Método dos Dois Feixes" pudemos obter a difusividade térmica dos pericarpos das variedades de milho comum e de pipoca, onde encontramos uma diferença entre eles, ou seja, que a difusividade térmica de um milho de pipoca é cerca de 2.9 vezes maior que a de um milho comum. Com o auxílio da "Técnica de elevação da temperatura sob iluminação contínua" para a medida da condutividade térmica e das medidas de rigidez mecânica a diferença foi evidenciada. Unindo os dados obtidos das propriedades térmicas e mecânica, com os experimentos de "popping" e "puffing" e com a microscopia de birrefringência, pudemos concluir que o pericarpo do milho é o principal responsável pelo estouro da pipoca, bem como dizer quais as características principais que um pericarpo de milho deve possuir para um excelente estouro. Acreditamos que com este trabalho será possível agora caracterizarmos pericarpos de milho, obtidos através de melhoramento genético, e concluir se o milho dará ou não uma boa pipoca. Este trabalho pode ser desenvolvido para a caracterização de outros materiais biológicos.

Quanto às observações "in vivo" e "in situ", obtivemos os espectros de plantas albinas e verdes de milho, verificando a ausência de pigmentação nas partes albinas da folha, dado que no espectro os picos de absorção da clorofila não apareciam. Além disto, através da observação do efeito negativo, relacionado à produção de oxigênio da planta, pudemos concluir que o que detectamos é realmente o oxigênio modulado, dado que o efeito negativo não foi observado nas partes totalmente albinas da planta.

Vale ressaltar também o fato das medidas com plantas estarem sendo agora realizadas "in vivo" e "in situ", evitando o problema da desidratação da planta. Desta forma, agora é possível monitorar durante horas a atividade fotossintética de plantas quando submetidas à variações tanto nas condições ambientais, quanto em mudanças morfológicas através de envenenamento. Uma outra aplicação, agora possível, que vem sendo desenvolvida no nosso laboratório, é o monitoramento da adaptação da planta após passar algum tempo no escuro. Com isso, será possível correlacionar a atividade fotossintética de uma dada planta com a produtividade da mesma.