

JOSE WILSON NERI

"APLICAÇÃO DO EFEITO FOTOACÚSTICO A SISTEMAS BIOLÓGICOS"

Este resumo contém a
resumo geral da tese defendida
pelo autor José Wilson Neri e aprovado
pela comissão julgadora

7/05/86
Helion Vargas

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

Orientador: Prof. Helion Vargas

MAIO DE 1986

A meus pais,
irmãos e a
minha esposa.

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Helion Vargas, pela orientação eficiente, paciência e atenção dedicada a mim, durante todo o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos Profs. F.A.M. Reis, A.C. Gabrielli e L.C. Miranda pelas discussões e interpretações dos resultados.
- Ao pessoal do Laboratório: Prof. Curt, Prof. Edson, Dinah, Nélia, Gláucio, Bento, Norberto, Antonio, Valéria, Marcos, Osvaldo e Francisco, que pelo ótimo relacionamento, muito contribuíram para este trabalho.
- A meus pais, pelos ensinamentos e incentivos, a minha esposa que muito me apoiou, e aos meus irmãos, avós, tios e primos, meus agradecimentos por tudo que a mim fizeram.
- A todos os meus amigos, pelas horas de apoio, alegria e convivência.
- Ao Jeverson, pelas horas extras de datilografia.
- Ao CNPq e à FINEP, pelo apoio financeiro.
- Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira me auxiliaram neste trabalho.

RESUMO

Uma das áreas mais promissoras para o uso do método fotoacústico é no estudo de sistemas biológicos, pois estes, em sua maioria, encontram-se sob uma forma que os tornam difíceis, senão impossíveis de serem analisados por qualquer tipo de técnica ótica convencional.

Aplicou-se a técnica fotoacústica para o estudo qualitativo de transformações estruturais em certas espécies de tecidos biológicos, (folhas de café, soja, etc), em presença de agro-tóxicos.

Através da técnica fotoacústica, fez-se uma microscopia da amostra, e como consequência, uma avaliação dos danos causados pela influência de agentes químicos nos diversos constituintes puderam ser avaliados.

Abstract

Photoacoustic depth profiles of double-layer biological samples are studied using the two-signal phase-resolved method. It is shown that the spectra of each layer can be resolved at a single modulation frequency. The method is applied to the cases of green leaves. The use of the method for monitoring temporal changes occurring in leaves under the action of a herbicide is discussed.

ÍNDICE

CAP. I - INTRODUÇÃO	1
CAP. II - TEORIA DO EFEITO FOTOACÚSTICO	2
II-1 : Introdução histórica	2
II-2 : O Efeito Fotoacústico	3
II-3 : Vantagens da Espectroscopia Fotoacústica	3
II-4 : Absorção Ótica	4
II-5 : Desenvolvimento Teórico	8
II-5.1 : Condução de Calor	8
II-5.2 : Produção de Calor na Amostra	10
II-5.3 : Distribuição de Temperatura na Célula	11
II-5.4 : Condições de Contorno	13
II-5.5 : Equação Geral	14
II-5.6 : Produção do Sinal Acústico	14
II-5.7 : A Fase do Sinal Fotoacústico	17
II-5.8 : Casos Limites	18
CAP. III - MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS	20
III-1 : Montagem Experimental	20
III-2 : Análise de perfil de profundidade	22
III-2.1 : Variação da frequência angular	22
III-2.2 : Método das fases	25
III-2.3 : Vantagens das Medidas de Fase sobre as de Intensidade	27
CAP. IV - MORFOLOGIA DE FOLHAS E AÇÃO DE HERBICIDAS	29
IV-1 : Morfologia e Pigmentos de Folhas	29
IV-2 : Monitoração da Ação de Herbicidas	33
CAP. V - RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÕES	36
V-1 : Separação dos Constituintes das Folhas	36
V-2 : Resultados Experimentais	39
V-3 : Microscopia Ótica	43

CAP. VI - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

46

CAP. VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

47

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O presente trabalho tem por objetivo o estudo, através da Espectroscopia Fotoacústica, dos espectros de absorção de amostras biológicas compostas de duas camadas. Utilizar-se-ã aqui o método de separação de espectros na fase do sinal fotoacústico.

O uso do método para o monitoramento de variações temporais que ocorrem em cada um dos constituintes de folhas verdes, devido a ação de agentes químicos (herbicidas) constitui o tema central desta dissertação.

Além de apresentar a pesquisa realizada, procurou-se no presente trabalho, expor os fundamentos teóricos do efeito fotoacústico de maneira mais compreensível para o leitor. Assim, após um breve histórico, introduzem-se no Capítulo II os conceitos mais importantes do fenômeno, apresentando a equação geral que descreve o sinal fotoacústico e por fim apresentando os casos limites onde a teoria se simplifica.

No Capítulo III é descrita a parte experimental. Em particular é feita uma descrição do método das fases.

O Capítulo IV é destinado aos leitores não familiarizados com materiais biológicos. Descrevemos a morfologia e pigmentos de uma folha, bem como a ação de herbicidas sobre esta.

Os resultados da presente pesquisa são apresentados e discutidos no Capítulo V.

O Capítulo VI é constituído das conclusões e perspectivas deste trabalho.

As Referências e Bibliografias são apresentadas no Capítulo VII.

CAPÍTULO II

Teoria do Efeito Fotoacústico

II-1. Introdução histórico

O efeito fotoacústico foi descoberto em 1880 por Alexander Graham Bell (ref. 1), ao observar que um feixe de luz solar interrompido periodicamente, ao incidir em um sólido dentro de uma célula fechada, produzia um som audível por meio de um tubo ligado a célula. Nessa época também, Lord Rayleigh (ref. 2), Mercadier (ref. 3), Preece (ref. 4), trabalharam com o efeito fotoacústico, e hipóteses explicativas foram dadas, mas o fenômeno foi considerado apenas como uma curiosidade e nenhum valor científico ou funcional foi atribuído, e foi logo esquecido.

Cinquenta anos mais tarde, o efeito fotoacústico renasceu na Rússia, quando Veingerav (ref. 5) criou o chamado "Espectrofone" para o estudo de gases, servindo para analisar concentrações em misturas gasosas.

Com o desenvolvimento técnico de microfones sensíveis, surgimento de fontes de laser, Kreuser (ref. 6) usou métodos fotoacústicos para detectar traços poluentes em gases. No entanto, o efeito fotoacústico em sólidos só veio a ser investigado a partir de 1973, e Parker (ref. 7) mostrou que a vibração mecânica da amostra é em geral desprezível face ao efeito térmico. Rosencwaig e Gersho (ref. 8) apresentaram a mais ampla teoria, a qual assume que o sinal fotoacústico é gerado apenas pelo fluxo de calor da amostra para o gás em contato com este.

Desde então, a Espectroscopia Fotoacústica, tem sido método de estudo de propriedades térmicas e elásticas, de reações químicas, de processos radioativos, de eficiência quântica, de ressonância magnética, de superfície, de espessura de camadas e de microscopia, não só em todos os tipos de materiais inorgânicos, como também em materiais biológicos.

II-2. O Efeito Fotoacústico

O efeito fotoacústico consiste na produção de uma onda acústica dentro de uma célula fechada contendo um gás, que pode ser ar, em contato com uma amostra sólida ou semi-sólida, estando esta exposta a luz monocromática modulada. A luz modulada, ao incidir na amostra, aquece-a periodicamente, fazendo com que uma camada relativamente fina de gás adjacente a superfície da amostra, responda a variação térmica da amostra, expandindo-se e contraindo-se periodicamente. Essa expansão e contração do gás em contato com a amostra gera uma variação de pressão dentro da célula, a qual pode ser facilmente detectada como um sinal acústico por um microfone sensível. Essa camada de gás adjacente a amostra pode ser encarada como um pistão vibratório (ref. 9), criando o sinal acústico.

Desde que a grandeza da variação de pressão periódica na célula é proporcional a quantidade de calor emanada do sólido absorvedor, há uma próxima correspondência entre a intensidade do sinal acústico e quantidade de luz absorvida pela amostra.

II-3. Vantagens da Espectroscopia Fotoacústica

a) Permite-nos obter espectro similar ao espectro de absorção ótico para qualquer tipo de material, sólido ou semi-sólido, seja este cristalino, pó, amorfo, etc.

b) Como somente a luz absorvida é convertida em som, a luz espalhada (que é um sério problema, quando tratado com alguns materiais sólidos por técnicas espectroscópicas convencionais) não apresenta dificuldade em Espectroscopia Fotoacústica (ref. 10).

b) São necessários apenas algumas miligramas de amostra, não sendo necessário submetê-la a qualquer tratamento.

d) É possível obter o espectro de amostras óticamente opacas.

e) Permite-nos analisar o perfil de profundidade, e efetuar uma micros

copia de varredura..

f) Não sō a absorção ōtica, mas tambē as propriedades tērmicas, sō passíveis de estudo.

g) Aplica-se para uma larga faixa do espectro (luz visível, UV, IV, raio-X, microondas) sem necessidade de trocar o detetor.

h) Informaçō ũ oferecida nō sō pela intensidade do sinal, mas tambē por sua fase.

II-4. Absorção Ōtica

Quando um feixe luminoso incide numa amostra, pode ou nō ser absorvida totalmente na superfĭcie, e ũ medida que a radiaçō penetra no material, as molēculas deste vāo interagindo com os fōtons e absorvendo-os, fazendo com que a intensidade do feixe luminoso diminua exponencialmente. Mede-se macroscopicamente a absorção pela distancia que o feixe penetra atē sua intensidade inicial ser reduzida a $1/e$. Esta medida ũ dada pelo comprimento de absorção ōtica (μ_B), ver (fig. 1).

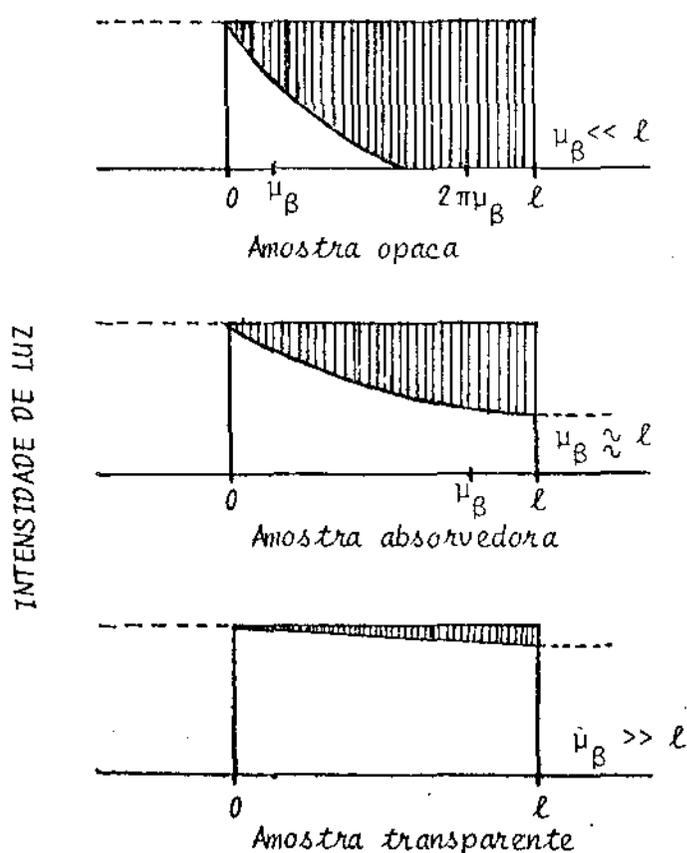


Fig. 1 - A absorção na amostra ũ determinada pela distāncia μ_B que a radiaçō luminosa penetra na amostra. Como a geraçō de calor em um ponto depende da luz ali incidente, mais calor serā gerado prōximo a superfĭcie da amostra.

A absorção da energia radiante pela amostra é seguida por uma conversão em energia cinética, e transferência de calor através da amostra para a interface sólido-gás, necessária para a produção do efeito fotoacústico. As características térmicas da amostra deve afetar a natureza do sinal observado; e em particular, a difusividade térmica da amostra (α), a qual mede a velocidade com que o calor se espalha numa amostra. Se um ponto for aquecido, seu calor difundirá para outros pontos da amostra, que sofrerão um aumento e diminuição de temperatura, semelhante a um pulso (fig. 2).

No efeito fotoacústico, todos os pontos da amostra dentro do comprimento de absorção ótica, geram calor de maneira periódica. A difusão a partir de um ponto, neste caso, se dará em ciclos correspondentes a frequência de modulação $f = \omega/2\pi$ da luz. A magnitude da oscilação térmica sentida em um ponto da amostra (por exemplo, na superfície em contato com o gás) dependerá não só da distância entre os pontos, mas também da frequência (fig. 3). Define-se assim o comprimento de difusão térmica μ , cuja magnitude da oscilação térmica se atenua a um valor $1/e$. Este parâmetro usado para analisar a transmissão periódica de calor, é expresso por $\mu = \sqrt{2\alpha/\omega}$, e indica a atenuação da oscilação térmica. A Tabela 1 fornece valores de α e de μ para alguns materiais.

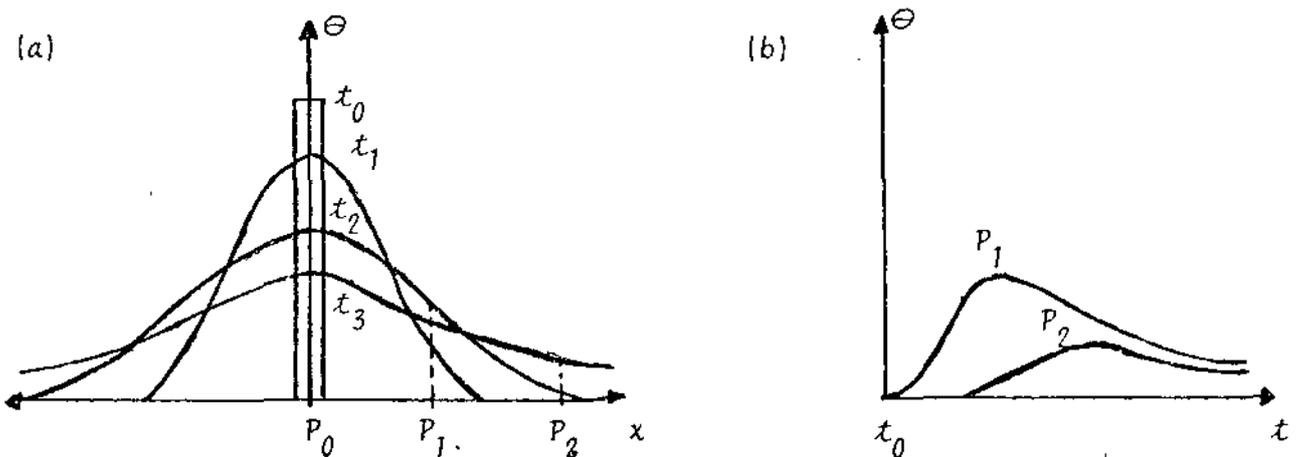


Fig. 2: Difusão térmica de um pulso:

- Distribuição espacial da temperatura (ou da densidade de calor), ao longo do tempo, devido a difusão térmica a partir de um pulso em P_0 .
- Variação da temperatura nos pontos P_1 e P_2 , mostrando que quanto mais longe de P_0 , mais dispersa e menos intensa é a variação da temperatura.

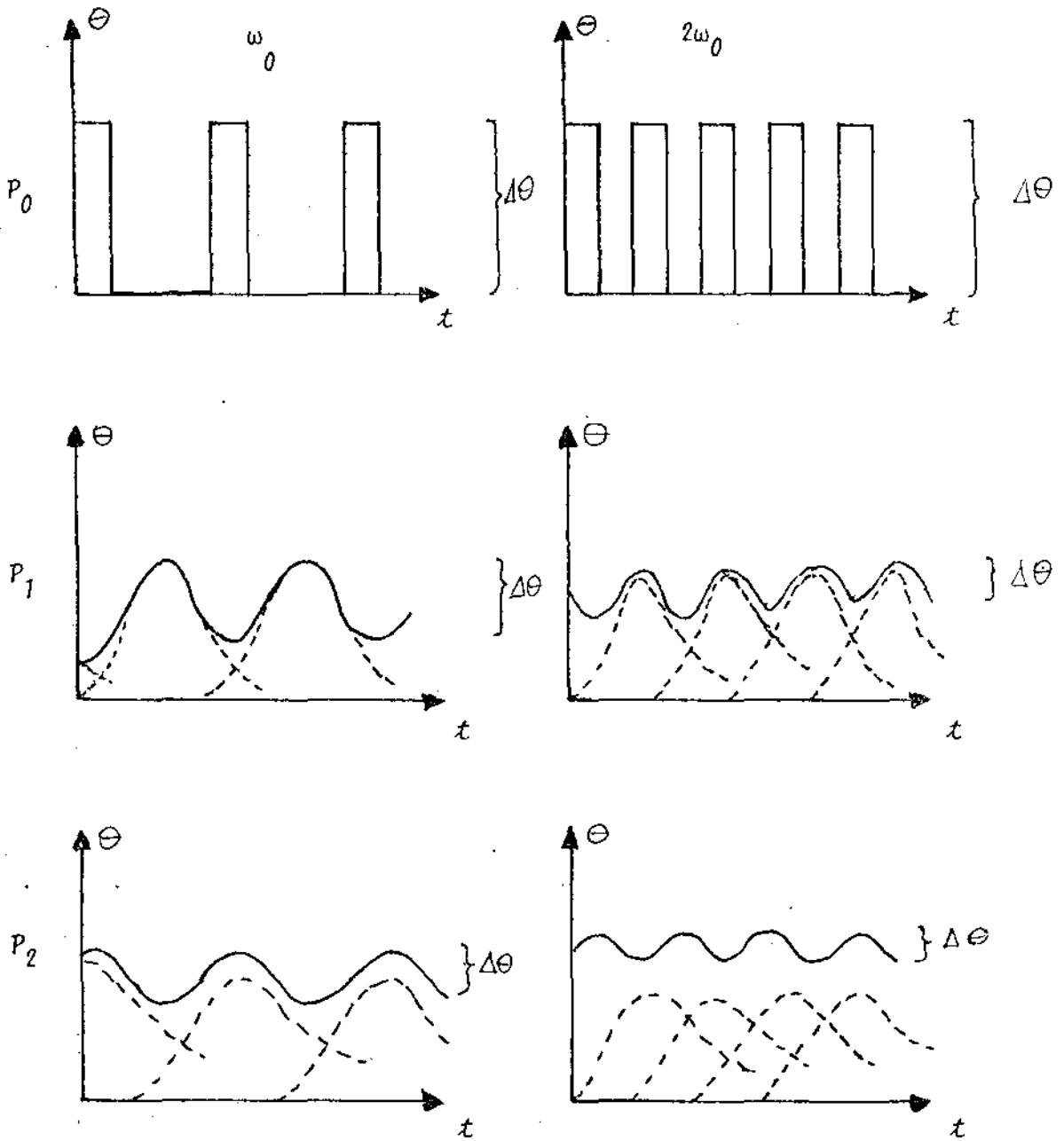


Fig. 3: DIFUSÃO TÉRMICA DE UMA SEQUÊNCIA DE PULSOS: Uma sequência de pulsos gerado em P_0 é sentida em P_1 e P_2 como uma sequência de oscilações do tipo mostrado na fig. 3b. Vê-se claramente que a amplitude de oscilação térmica $\Delta\Theta$ diminui com a distância, e diminui também com o aumento da frequência de modulação ω . Isso mostra que no efeito fotoacústico, há um comprimento de difusão térmica μ (medido em relação à superfície da amostra) acima do qual $\Delta\Theta$ é pequeno, e que μ diminui com o aumento de ω .

Tabela 1: Parâmetros Térmicos de Alguns Materiais

As medidas de difusividade térmica (α) são diretas (ref. 8), ou quando indicadas por *, derivados da condutividade térmica (ref. 9, Cap. 9). Os valores correspondentes do comprimento de difusão térmica (μ_s) são para uma frequência de modulação $f = 25$ Hz.

Material	α (cm/s ²)	μ_s (μ m) (25 Hz)
Alumínio	0,97	1110
Cobre	1,17	1220
Ferro	0,23	540
Mercúrio	0,044	240
Carvão amorfo	0,003	62
Diamante (tipo IIa)	12,7	4020
Borracha	0,0012	39
Polietileno	0,0013	41
Água	0,00146	43
Gelo (0°C)	0,014	134
Ar	0,23	540
Hélio *	1,52	1390
Álcool etílico *	0,0009	34
Quartzo	0,035	210
Vidro ("crown")	0,005	80
Carne Bovina	0,0012	39

II-5. Desenvolvimento teórico

Para se entender os processos que envolvem o efeito fotoacústico, temos que ter o conhecimento sobre mecanismos de produção e transmissão de calor da amostra para o sistema.

II-5.1 Condução de Calor

Alguma luz absorvida por um sólido é convertida, em parte ou num todo em calor, por processos de decaimento não radioativo dentro do sólido.

Considerando um fluxo de calor (ϕ) que atravessa um elemento de volume $dV = Sdx$ (fig. 4), onde ϕ é a quantidade de calor que atravessa por unidade de

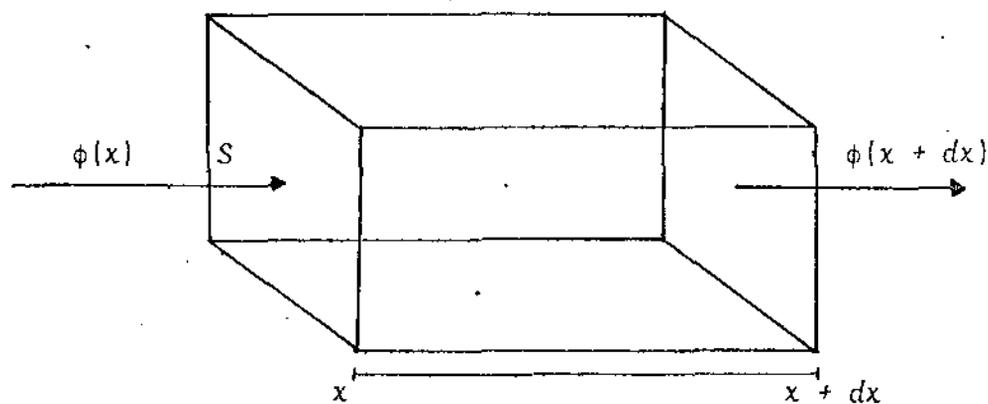


Fig. 4: Fluxo de calor sobre um elemento de volume dV

tempo, uma superfície unitária perpendicular ao fluxo, a quantidade de calor armazenada em dV , por unidade de tempo ($d\phi$), devido ao fluxo será:

$$d\phi = \{\phi(x) - \phi(x + dx)\} S$$

$$d\phi = - \left(\frac{\partial \phi}{\partial x} \right) S dx$$

(1)

onde ϕ está relacionado com a temperatura pela Lei de Fourier:

$$\phi = -K \left(\frac{\partial T}{\partial x} \right) \quad (2)$$

onde K é uma constante positiva chamada condutividade térmica,

$$[K] = [\text{energia}] / [\text{tempo} \times \text{distância} \times \text{temperatura}] .$$

O sinal negativo na equação (2) aparece porque o fluxo de calor se dá em sentido contrário ao do gradiente de temperatura; indo da mais alta para a mais baixa. De (1) e (2), temos:

$$d\phi = K \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \right) S dx \quad (3)$$

Por outro lado, a quantidade de calor armazenada no elemento de volume dV , no tempo δt , devido a variação de temperatura δT é dada por:

$$dQ = c \, dm \, \delta T \quad (4)$$

onde c é o calor específico do material.

Derivando (4), temos:

$$\begin{aligned} \frac{dQ}{dt} &= c \, dm \, \frac{dT}{dt} \\ d\phi &= c \, dm \, \frac{dT}{dt} \\ d\phi &= c \, \frac{dm}{dV} \, \frac{dT}{dt} \, dV \\ d\phi &= c \, \rho \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right) S dx \end{aligned} \quad (5)$$

Comparando (3) e (5), temos:

$$\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha} \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right) \quad (6)$$

onde $\alpha = \frac{K}{\rho c}$, é chamado de difusividade térmica, onde $[\alpha] = [\text{área}] / [\text{tempo}]$.

Devido a fontes de calor no elemento de volume dV , devemos introduzir na equação (3) um termo extra $f(x,t)$, -então:

$$d\phi = K \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \right) S dx + f(x,t) S dx \quad (7)$$

onde $f(x,t)$ é a densidade de calor gerada no elemento de volume dV considerado.

Obtém-se então uma expressão mais geral para a equação (6):

$$\left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \right) = \frac{1}{\alpha} \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right) - \frac{f(x,t)}{K} \quad (8)$$

II-5.2 Produção de Calor na Amostra

Assumimos uma fonte de luz monocromática com comprimento de onda λ incidente num sólido com intensidade:

$$I(t) = \frac{1}{2} I_0 (1 + \cos \omega t) \quad (9)$$

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

A amostra absorve a luz incidente segundo a lei:

$$I_a(x,t) = I(t) \exp(\beta x), \quad (x \leq 0) \quad (10)$$

onde β denota o coeficiente de absorção ótico da amostra (em cm^{-1}) para o comprimento de onda λ , e $I_a(x,t)$ a intensidade de luz absorvida.

Derivando (10), temos:

$$\frac{dI_a(x,t)}{dx} = \beta I(t) \exp(\beta x), \quad (x \leq 0) \quad (11)$$

mas $\frac{dI_a(x,t)}{dx}$ é a densidade de energia absorvida, portanto:

$$f(x,t) = \frac{\beta I_0}{2} \eta \exp(\beta x) (1 + \cos \omega t), \quad (x \leq 0)$$

então, na equação (8), temos:

$$\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha} \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right) - \frac{\beta \cdot I_0}{2K} \eta \exp(\beta x) (1 + \cos \omega t), \quad (x < 0) \quad (12)$$

onde T é a temperatura e η é a eficiência para qual a luz absorvida para um comprimento de onda λ é convertido em calor por processo de desexcitação não radioativo.

II-5.3 Distribuição de Temperatura na Célula

De acordo com o modelo unidimensional desenvolvido por Rosencwaig-Gersho (ref. 8), a situação experimental a ser analisada teoricamente consiste numa célula fotoacústica cilíndrica conforme mostra fig. 5. A amostra tem comprimento l , suporte l_b e a coluna de gás l_g . A luz incide pela esquerda e tem comprimento de onda λ , sendo modulada a uma frequência angular $\omega = 2\pi f$, onde f é o número de vezes por segundo que a pá giratória interrompe a luz.

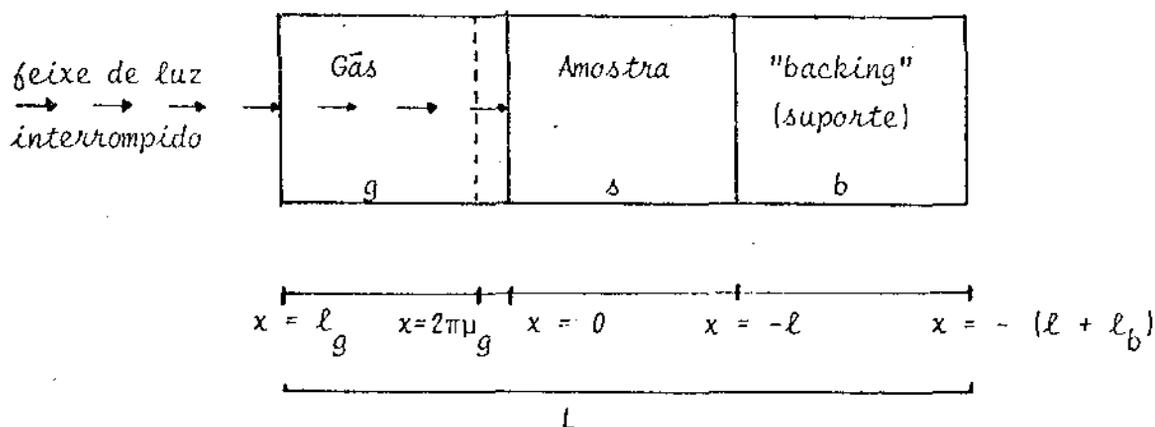


Fig. 5: Esquema de uma célula fotoacústica

Assume-se que o comprimento L é pequeno comparado ao comprimento de onda do sinal acústico. Supomos que nem o gás e nem o "backing" absorvam luz.

Definem-se, usando os símbolos usados na (ref. 8), para o material "i" ("g" é o gás, "s" a amostra, "b" o suporte):

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

ρ_i - densidade (g/cm 3)

C_i - calor específico a pressão constante (cal/g. $^{\circ}$ C)

$\alpha_i = K_i/\rho_i C_i$ - difusividade térmica (cm 2 /s)

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

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

$\mu_i = \frac{1}{a_i}$ - comprimento de difusão térmica (cm)

β_i - coeficiente de absorção ótica (cm $^{-1}$)

$\mu_\beta = \frac{1}{\beta}$ - comprimento de absorção ótica (cm)

As equações para cada região da fig. 5, são:

$$\frac{\partial^2 \psi_g(x,t)}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_g} \left(\frac{\partial \psi_g}{\partial t} \right) \quad [0 < x < \ell_g] \quad (13)$$

$$\frac{\partial^2 \psi_s(x,t)}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_s} \left(\frac{\partial \psi_s}{\partial t} \right) - \frac{\beta I_0}{2K_s} \eta \exp(\beta x) \{1 + \exp(i\omega t)\} \quad [-\ell < x < 0] \quad (14)$$

$$\frac{\partial^2 \psi_b(x,t)}{\partial x^2} = \frac{1}{\alpha_b} \left(\frac{\partial \psi_b}{\partial t} \right) \quad [-(\ell + \ell_b) < x < -\ell] \quad (15)$$

Como somente a parte real das soluções é de nosso interesse, e representa a temperatura na célula relativa a temperatura ambiente como uma função da posição e do tempo, isto é: (x,t) ; $\psi(x,t) = \text{Re } \theta(x,t) + \gamma_0$, onde γ_0 é a temperatura ambiente, podemos substituir em (12), $\cos \omega t$ por $\exp(i \omega t)$.

Interessa-nos apenas a parte periódica das soluções ψ_i , denotadas por θ_i ($i = g, s$ ou b), portanto:

$$\theta_g(x,t) = \theta \exp(-\sigma_g x + i\omega t) \quad (16)$$

$$\theta_s(x,t) = \{ U \exp(\sigma_s x) + V \exp(-\sigma_s x) - E \exp(\beta x) \} \exp(i\omega t) \quad (17)$$

$$\theta_b(x,t) = B \exp\{ \sigma_b(x + \ell) + i\omega t \} \quad (18)$$

$$\text{com } \sigma_i^2 = \frac{i\omega}{\alpha_i} \quad \sigma_i = (1+i)a_i = (1+i)(\omega/2\alpha_i)^{1/2}$$

$$E = \frac{A}{\beta^2 - \sigma_s^2} \quad \text{com.} \quad A = \frac{\beta I_0 \eta}{2K_s}$$

que satisfazem as equações (13, 14, 15).

II-5.4 Condições de Contorno

Falta agora estabelecer as condições de contorno para $x = 0$ e $x = -\ell$, e são geralmente usadas as de Rosencwaig-Gersho (ref. 8):

$$\theta_i = \theta_j$$

$$K_i \frac{\partial \theta_i}{\partial x} = K_j \frac{\partial \theta_j}{\partial x}, \quad \text{onde } i \text{ e } j \text{ são meios adjacentes.}$$

A primeira delas, que supõe não haver perda de calor numa interface, despreza a resistência térmica de contato entre superfícies, o que é válido no contato entre a amostra e um gás, mas não entre sólidos ou entre um sólido e um líquido (ref. 11, 12, 13).

Esta condição é muito restritiva, seu significado físico é que a transferência de calor na superfície de separação i e j , é instantâneo.

A segunda condição, é a de continuidade do fluxo de calor entre os dois meios, i e j .

II-5.5 Equação Geral

Com a aplicação das condições de contorno, Rosencwaig e Gersho (ref. 8), determinam os coeficientes U, V, B e Θ para as equações (16, 17, 18), obtendo assim, a distribuição de temperatura na célula em termos de parâmetros óticos, térmicos e geométricos do sistema. A solução explícita para $\Theta(x,t)$, a amplitude complexa da temperatura periódica para interface amostra-gás ($x = 0$), que é o que interessa no efeito fotoacústico, é dado por:

$$\Theta(0) = \frac{\beta I_0}{2K_s (\beta^2 - \sigma_s^2)} \left[\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s \ell} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s \ell} + 2(b-r)e^{-\beta \ell}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s \ell} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s \ell}} \right] \quad (19)$$

onde: $b = \frac{K_b a_b}{K_s a_s}$

$$g = \frac{K_g a_g}{K_s a_s}$$

$$r = (1 - i) \frac{\beta}{2a_s},$$

o termo g é em geral desprezível ($g \ll 1$), como pode-se ver pelos dados da Tabela 1.

A resolução geral para a componente especial $\Theta(x)$, sem especificar as condições de contorno ou a natureza da absorção ótica expressa por $f(x,t)$, pode ser feita aplicando-se o método das funções de Green (ref. 14).

II-5.6 Produção do Sinal Acústico

Como já foi dito anteriormente, temos que a principal fonte do sinal acústico surge do fluxo de calor do sólido para os arredores do gás. A temperatura no gás oscila no tempo e depende da distância \bar{a} interface amostra-gás, (eq. 16): $\Theta_g = \Theta \exp(-\sigma_g x + i\omega t)$.

Vemos que apenas uma pequena camada de gás responde termicamente a variação de temperatura na superfície da amostra. Esta camada limite de gás possui espessura $2\pi\mu_g$, (fig. 6), cuja camada superficial de gás funciona como pistão vibratório (ref. 8).

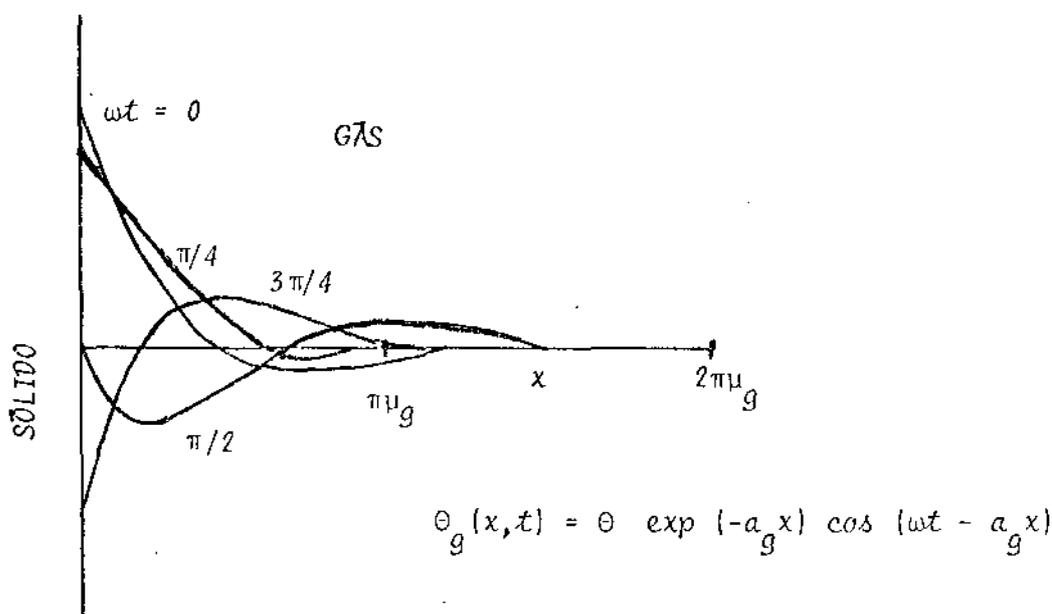


Fig. 6: Distribuição espacial da temperatura para vários ωt na camada de gás adjacente à superfície da amostra.

Nesta camada $2\pi\mu_g$, o gás é suposto ideal e a pressão constante, donde:

$$\frac{\delta V}{V_0} = \frac{\delta X}{X_0} = \frac{\delta T}{T_0} \quad (20)$$

$$\delta X(t) = 2\pi\mu_g \left\langle \frac{\Theta(t)}{T_0} \right\rangle \quad (21)$$

onde

$$\langle \Theta(t) \rangle = \frac{\Theta(0)}{2\sqrt{2}\pi} \exp \left[i \left(\omega t - \frac{\pi}{4} \right) \right]$$

e o restante do gás responde adiabaticamente, isto é, $PV^\gamma = \text{cte}$, com $\gamma = \frac{C_p}{C_v}$,

onde γ é a razão dos calores específicos, então temos:

$$(\delta P)V_0^\gamma + \gamma P_0 V_0^{\gamma-1} \delta V = 0$$

$$\delta P = \gamma \frac{P_0}{V_0} \delta V = \gamma P_0 \frac{\delta X}{\ell_g} \quad (22)$$

logo;

$$\delta P(t) = \text{Re} \left\{ \left(\frac{\gamma P_0 \mu_g}{\sqrt{2} T_0 \ell_g} \right) \Theta(0) \exp \left[i \left(\omega t - \frac{\pi}{4} \right) \right] \right\}$$

$$\delta P(t) = \text{Re} \left\{ Q \exp \left[i \left(\omega t - \frac{\pi}{4} \right) \right] \right\} \quad (23)$$

$$\text{onde } Q = \left(\frac{\gamma P_0 \mu_g}{\sqrt{2} T_0 \ell_g} \right) \Theta(0) \quad (24)$$

Nessa equação (24), P_0 é a pressão ambiente e T_0 a temperatura média na amostra.

Aamodt et al (ref. 15) consideraram o caso geral em que a coluna de gás não é termicamente grossa. Nesse caso ($\ell_g < 2\pi\mu_g$), a contribuição do gás na dependência do sinal com a frequência (de $\omega^{-1/2}$ no pistão vibratório) se altera, tornando-se aproximadamente nulo. O sinal é máximo para $\ell_g \sim \mu_g$. Além disso, a defasagem constante de $\pi/4$ introduzido pelo pistão vibratório diminui progressivamente com a diminuição do comprimento da coluna do gás, para $\ell_g < 2\pi\mu_g$.

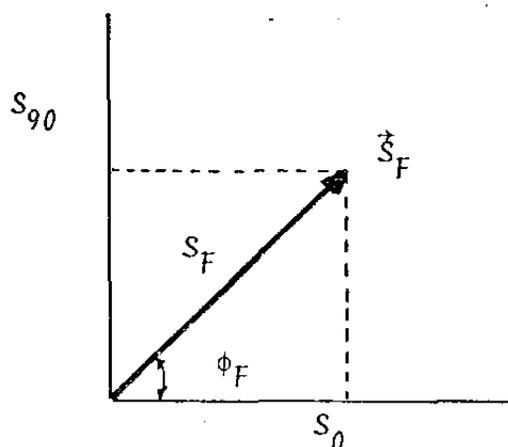
Dessa maneira, mostra-se que existe uma correspondência direta entre o sinal acústico e a intensidade de luz absorvida pela amostra. O sinal fotoacústico \vec{S}_F é tomado como sendo a componente não temporal da variação de pressão, contendo uma intensidade S_F e uma fase ϕ_F , podendo ser apresentada como um vetor no plano complexo (fig. 7).

$$\delta P(t) = \vec{S}_F e^{i\omega t} \quad (25)$$

$$\vec{S}_F = S_F e^{i\phi_F}$$

Fig. 7: Vetor do sinal fotoacústico

O sinal fotoacústico \vec{S}_F num dado comprimento de onda λ , pode ser representado por um vetor no plano complexo, de intensidade S_F e fase ϕ_F , sendo medido por dois amplificadores "lock-in" sintonizados em fase e em quadratura, S_0 e S_{90} .



II-5.7 A Fase do Sinal Fotoacústico

Tanto a intensidade como a fase do sinal fotoacústico dependem da profundidade na amostra x_0 , no ponto onde a luz é absorvida.

No caso de uma camada absorvedora fina, localizada a uma profundidade x_0 dentro de uma amostra transparente, termicamente grossa ($l \gg \mu_s$, $l \ll \mu_\beta$), a fase é simplesmente $\phi_F = -\frac{\pi}{2} - a_s x_0$. Calculando-se a fase a partir da eq. de R.G., para uma camada termicamente grossa, obtêm-se:

$$\phi_F = -\pi + \text{arc tg} (\beta\mu_s + 1) \quad (26)$$

Assim, pode-se representar, em termos da fase, a absorção de uma amostra pela absorção de uma camada fina à profundidade:

$$x_0 = \mu_s \left[\frac{\pi}{2} - \text{arc tg} \left(\frac{\mu_s}{\mu_\beta} + 1 \right) \right] \quad (27)$$

A fig. 8 mostra essa representação, e também um gráfico da eq. 27, onde se vê que $x_0 \rightarrow 0$ para $\mu_s \rightarrow 0$ ou $\mu_\beta \rightarrow 0$.

A fase do sinal fotoacústico é portanto, uma média ponderada da fase de todos os pontos dentro do comprimento de difusão térmico (μ_s). Se houver 2 camadas superpostas, existe uma fase ϕ_B na qual o sinal da camada inferior é detectada, e corresponde à média ponderada das fases de todos os pontos da camada inferior que

contribuem para o sinal fotoacústico. Como se vê na Fig. 8c, é possível representar a profundidade x_B de tal forma que $\phi_B = (a_{s_A} - a_{s_B}) \ell_A + a_{s_B} x_B$ (28)

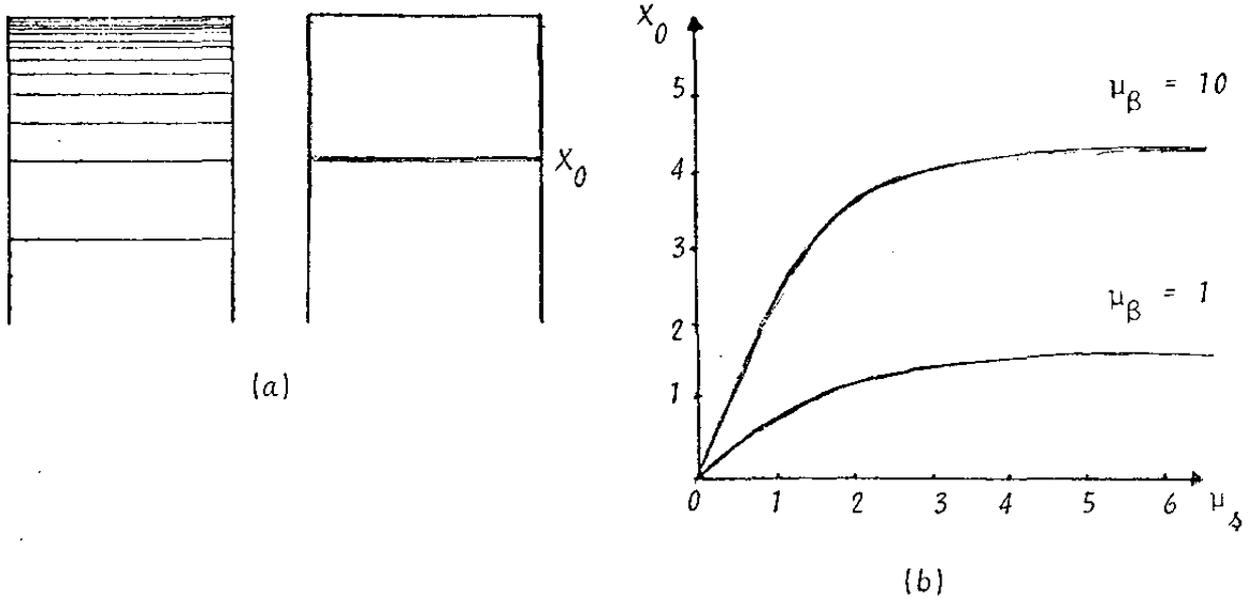


Fig. 8: Profundidade equivalente à fase Fotoacústica

- (a) - A profundidade x_0 equivale a distância na qual a absorção de uma camada fina possui a mesma fase que a absorção do caso em questão.
- (b) - Gráfico da profundidade equivalente x_0 em função de μ_δ e μ_β , (eq. 27).
- (c) - Numa amostra com duas camadas, o sinal de cada uma atinge a superfície com uma fase distinta, correspondendo à fase do sinal de uma camada absorvedora fina às profundidades x_A e x_B .

II-5.8 Casos Limites

A expressão completa para $\delta P(t)$, (eq. 23), é na maioria das vezes difícil de ser interpretada, por causa do fator Q , (eq. 24), ser representada por uma expressão complicada. No entanto, a compreensão física pode ser conseguida examinando-se casos especiais, onde a expressão para Q torna-se relativamente simples.

A Tabela 2, mostra estes casos especiais, de acordo com sua opacidade ótica para sólidos, estabelecendo uma relação entre o comprimento de absorção ótica, $\mu_B = \frac{1}{\beta}$, para a espessura l do sólido. Para cada categoria de opacidade ótica, nós consideramos três casos, de acordo com a magnitude relativa do comprimento de difusão térmica μ_s , comparando-o com o comprimento l e o comprimento de absorção ótica μ_B . Para todos os casos, supomos, $g < b$ e $b \sim 1$, isto é, $K_g a_g < K_b a_b$ e $K_b a_b \sim K_s a_s$.

Tabela 2: Casos Limites do Efeito Fotoacústico,

$$\gamma = \frac{\gamma P_0 \alpha_g}{\ell_g T_0}$$

Propriedades térmicas	Termicamente Grosso		Termicamente Fino			
	$l \gg \mu_s$		$l \ll \mu_s$			
\vec{S}_F	$\vec{S}_F = (\gamma \omega^{-1/2} e^{-i\pi/4}) \frac{\beta I_0 (r-1)}{2k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)(g+1)}$		$\vec{S}_F = (\gamma \omega^{-1/2} e^{-i\pi/4}) \frac{I_0}{(g+b)\sigma_s k_s} (e^{-\beta l} - 1)$			
Fase	$\phi_F = \arctan(\beta \mu_s + 1)$		$\phi_F = 90^\circ$			
Prop. Óticas	$\mu_B \gg \mu_s$	$\mu_B \ll \mu_s$	$\mu_B \gg l$	$\mu_B \ll l$		
\vec{S}_F	$\vec{S}_F = \frac{-\gamma I_0 \beta \mu_s^2}{4\sqrt{2} k_s \sqrt{\omega}} (1+i)$	$\vec{S}_F = \frac{-\gamma I_0 \mu_s \sqrt{2}}{4 k_s \sqrt{\omega}} i$	$\vec{S}_F = \frac{-\gamma I_0 \beta l \mu_B \sqrt{2}}{4\sqrt{\omega} k_b} i$	$\vec{S}_F = \frac{-\gamma I_0 \mu_B \sqrt{2}}{4\sqrt{\omega} k_b} i$		
Fase	$\phi_F = 45^\circ$	$\phi_F = 90^\circ$	$\phi_F = 90^\circ$	$\phi_F = 90^\circ$		
Dependência c/ frequência	$I_F \propto \omega^{-3/2}$	$I_F \propto \omega^{-1}$	$I_F \propto \omega^{-1}$	$I_F \propto \omega^{-1}$		
Definição do espectro	resolvido		saturado			
Propriedades Óticas	transp.	opaco	opaco	transp.	transp.	opaco
	$l \ll \mu_B$	$l \gg \mu_B$		$\mu_B \ll \mu_s$	$\mu_B \gg \mu_s$	
Representação Esquemática						

CAPÍTULO III

Materiais e Métodos Experimentais

III-1. Montagem Experimental

A montagem do espectrômetro fotoacústico utilizado neste trabalho está descrito na figura 9.

A fonte de luz consiste de uma lâmpada de 1000 Watts de arco de xenônio da Oriel Corp.. A luz gerada pela lâmpada passa então por um modulador ("chopper") da PAR, que consiste numa pã que gira de maneira estável. Uma fotocélula no "chopper" fornece ao amplificador sintonizado o sinal de referência da modulação, que consiste numa onda quadrada, em relação ao qual é estabelecida a fase do sinal fotoacústico.

A luz modulada é então difratada, e um certo comprimento de onda é selecionado em um monocromador de varredura, modelo Ebert, de 50cm, da Jarrel-Ash.Div. No monocromador há uma rede de difração com 1880 linhas por milímetro, e um "blazer" em 500 nm, o que permite varrer de 300 a 900 nm. A resolução da luz monocromática que obtivemos é de 12 nm, o que é satisfatório para a espectroscopia fotoacústica.

Para eliminar o aparecimento de ordens superiores de difração, usamos um filtro amarelo, da FUNBEC, que corta os picos de segunda ordem acima de 580 nm. O feixe que sai por uma fenda do monocromador é então colimado por meio de dois espelhos côncavos, obtidos da FUNBEC, colocados de forma que o feixe tenha incidência vertical na célula fotoacústica.

A célula fotoacústica (fig. 10) que utilizamos possui forma cilíndrica, com 6 mm de diâmetro e altura de 4 mm, onde repousa a amostra. A janela através da qual entra luz é de quartzo, pois é transparente inclusive no ultravioleta.

O microfone condensador, da Bruel e Kjaer, modelo BK 4166, é instalado no bloco metálico que contém a célula fotoacústica acoplada ao pré-amplificador.

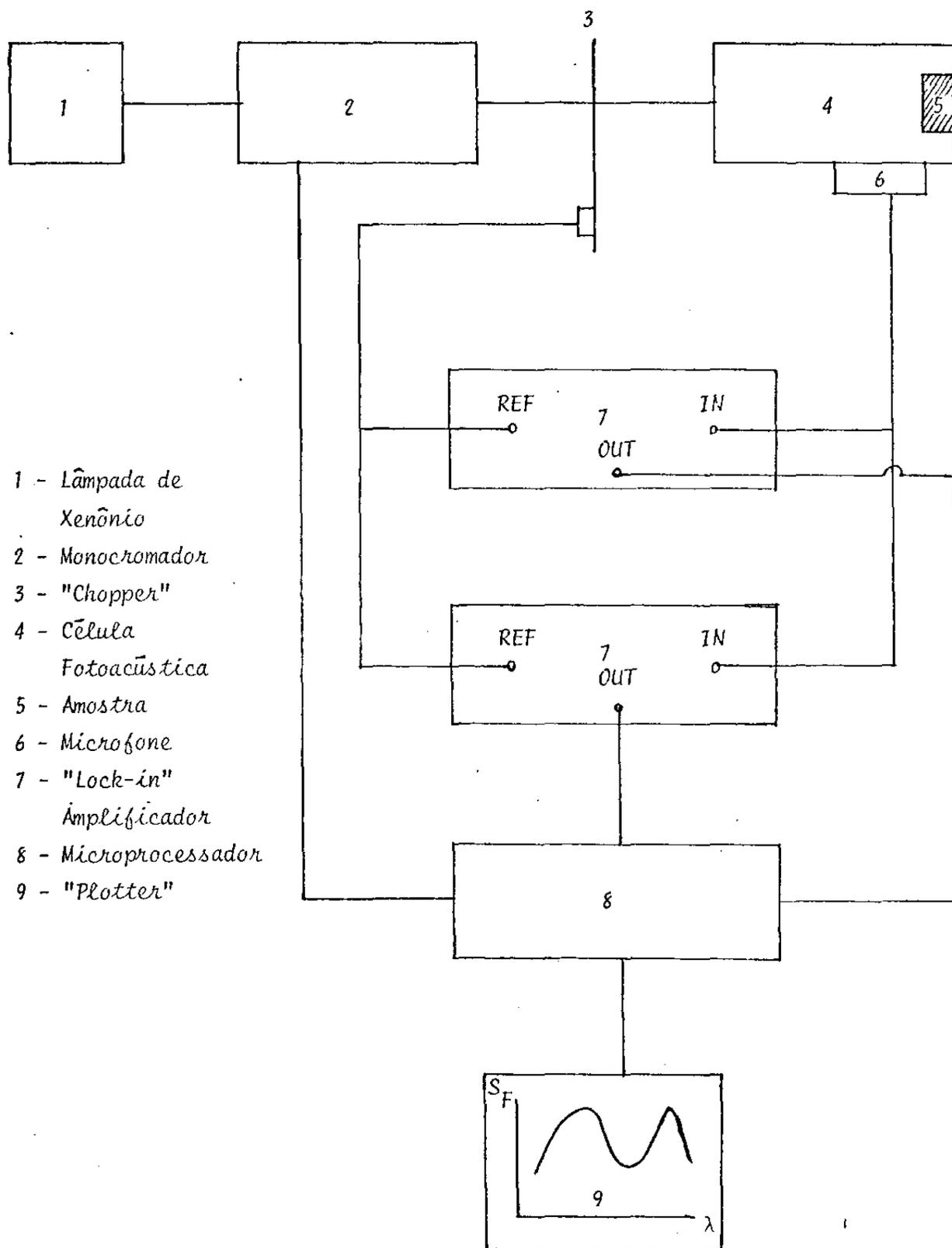


Fig. 9: Diagrama esquemático de um Espectrômetro Fotoacústico.

O sinal do microfone é levado ao amplificador sintonizado, ou "Lock-in". Esse instrumento mede a amplitude e a fase de sinais fracos que estão misturados com ruídos, recuperando o sinal fotoacústico. Utilizamos dois "lock-in", da Princeton Appl. Res., modelo 124 A, que mede sinais de alguns nanovolts até 2 KHz. Os dois "lock-in" são usados para obter sinais em quadratura, de maneira que se obtêm tanto a intensidade quanto a fase do sinal fotoacústico.

A variação do sinal fotoacústico com o comprimento de onda da luz é obtido por um sistema computacional, constituído de um microcomputador CBM 4032 (COMMODORE), uma unidade de disco flexível e um cassete. Um pulso eletrônico é gerado pelo monocromador a cada 10 Angstroms (1 nm) no comprimento de onda da luz, o qual faz com que esse sistema colete e armazene um dado (ref. 16).

O sinal é então normalizado pelo espectro do carvão, dividindo ponto por ponto pelo espectro de emissão da lâmpada (fig. 11).

Por fim, o espectro é então impresso por um "plotter", ajustado ao micro-computador, finalizando a coleta de dados.

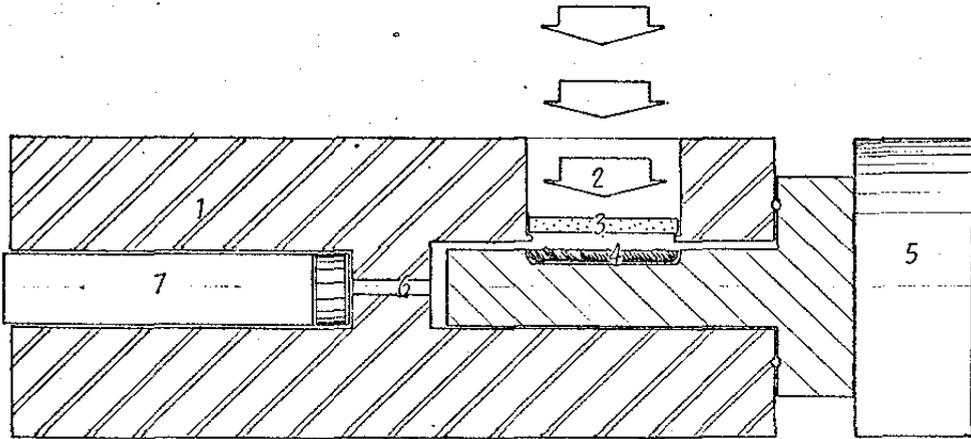
III-2. Análise de Perfil de Profundidade

Além de permitir a obtenção de espectros de absorção de maneira não destrutiva, a outra grande vantagem da espectroscopia fotoacústica é a possibilidade de fazer uma análise do perfil de profundidade da amostra, ou em outras palavras, uma microscopia da amostras, que pode ser feita de duas maneiras.

III-2.1 Variação da Frequência Angular

Faz-se uma microscopia, medindo-se o sinal fotoacústico em função da frequência angular de modulação (ω), ou seja, variando-se o comprimento de difusão térmica μ_s , onde:

$$\mu_s = \sqrt{\frac{2K_s}{\omega \rho_s c_s}} = \sqrt{\frac{2\alpha}{\omega}}$$



- | | |
|-----------------------|-------------------|
| 1 - Bloco metálico | 5 - Porta amostra |
| 2 - Luz modulada | 6 - Duto com ar |
| 3 - Janela de quartzo | 7 - Microfone |
| 4 - Amostra | |

Fig. 10: Esquema da célula fotoacústica usada.

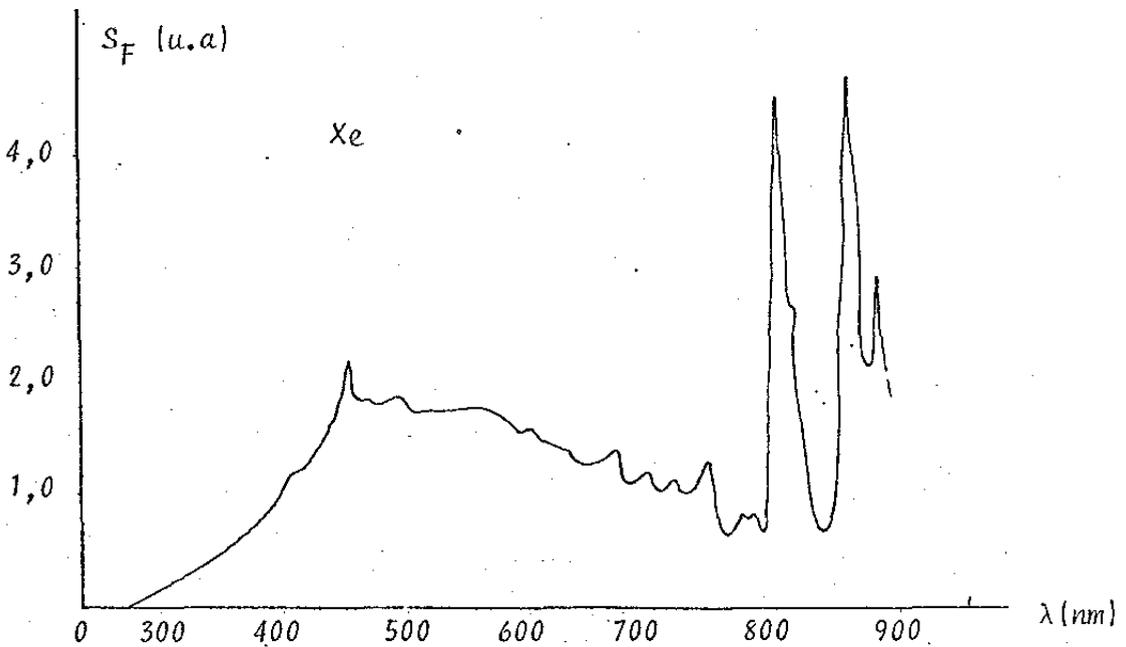


Fig. 11: Espectro de emissão da lâmpada de xenônio
Este é usado para normalizar os espectros
fotoacústicos experimentais.

Em frequências baixas, μ_s é maior, e conforme a amostra, pode-se penetrar em duas ou mais camadas do material (fig. 12). Aumentando-se a frequência, μ_s diminui e passa-se a obter o espectro apenas da camada superior (ref. 17). Com isso, pode-se medir a espessura da camada superficial da amostra.

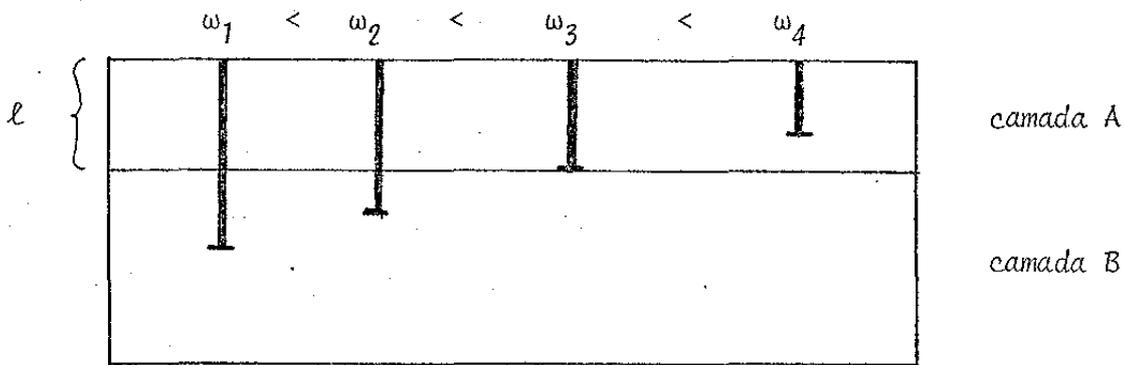


Fig. 12: Perfil da profundidade por variação da frequência. O aumento em ω diminui o comprimento de difusão térmica μ , selecionando progressivamente o sinal da camada A.

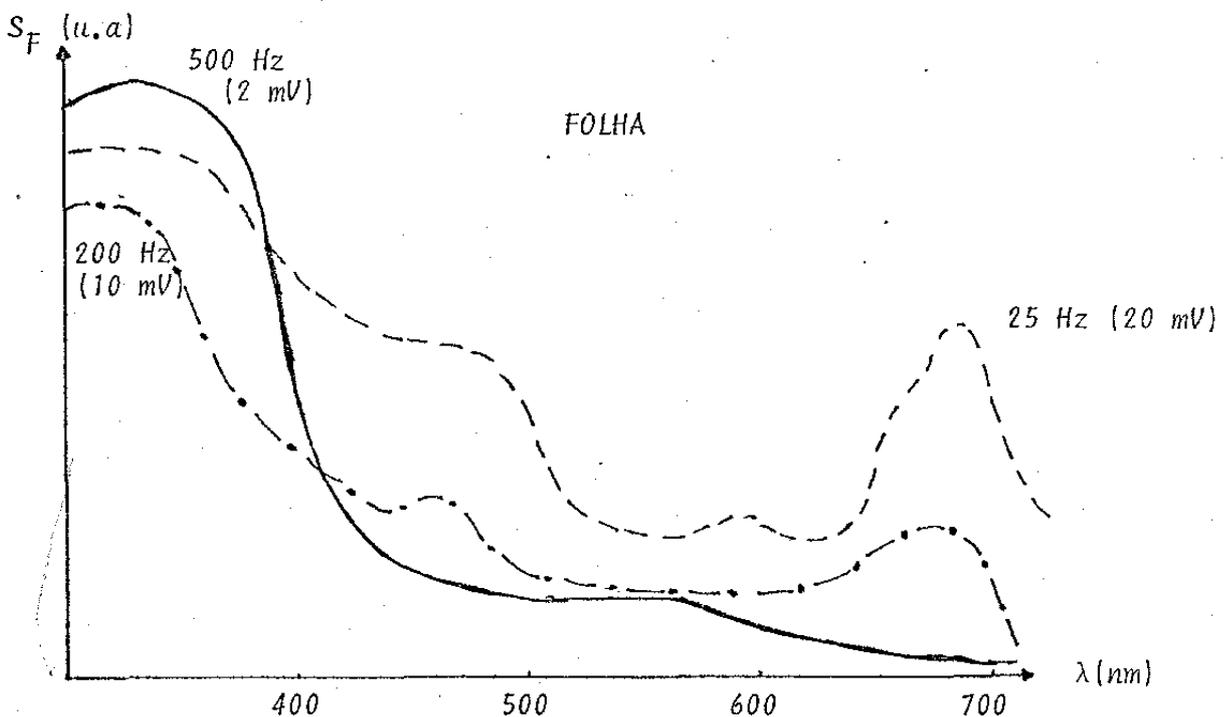


Fig. 13: Espectro fotoacústico de uma folha verde em três frequências de modulação, mostrando a separação do espectro da camada A (cutícula) a 500 Hz (ref. 17).

A limitação deste método, é que não se obtém o espectro da camada interna, (fig. 13), pois, ele não pode ser obtido tomando-se a diferença entre o espectro composto e o espectro da camada superficial, porque, não há como saber, em quanto os sinais de cada camada contribuem para o sinal composto. Não são os sinais de cada camada possuem intensidades diferentes (o interno tende a ser mais fraco), como as fases de cada um são diferentes, isso pode ser visualizado considerando que o sinal da camada interna demora mais tempo para atingir a interface gasosa.

III-2.2 Método das Fases

O método de separação de espectros na fase, analisa o perfil de profundidade de amostras com duas camadas, ou seja, separa os espectros de absorção de diferentes camadas, através da análise de qual é a fase dos sinais S_A e S_B de cada camada. Este método foi desenvolvido paralelamente por César e outros (ref. 18) aplicando à amostras sólidas, e por Anjo e outros à sistemas biológicos (ref. 19).

Para explicar este método, assumimos que uma amostra é feita de 2 camadas de materiais A e B, com o material A faceando o gás dentro da célula fotoacústica.

Para uma frequência de modulação fixa, o sinal acústico detectado pelo microfone é a resultante das contribuições geradas em ambos constituintes, A e B. Como a componente B está abaixo de A, existirá um intervalo de tempo entre os sinais surgindo de A e B devido a diferença nos correspondentes tempos de difusão térmica. Esta diferença no tempo para alcançar o gás, produz uma diferença de fase ψ entre os dois sinais. Então, o sinal observado realmente \vec{S}_F deve ser visto como a resultante de dois vetores (cujo comprimento S_A e S_B correspondem aos sinais de A e B, respectivamente) com um ângulo ψ entre eles (fig. 14).

O método das fases, parte da medição de um sinal S_0 e outro em quadratura S_{90} , utilizando dois amplificadores sintonizados, "lock-in".

Como visto na seção (II-5.6), o sinal fotoacústico \vec{S}_F pode ser representado por meio de um vetor $\vec{S}_F = S_F e^{i\phi_F}$ (fig. 7), e podemos escrever:

$$S_F^2 = S_0^2 + S_{90}^2 \quad \text{e} \quad \phi_F = \text{tg} \frac{S_{90}}{S_0} \quad (29)$$

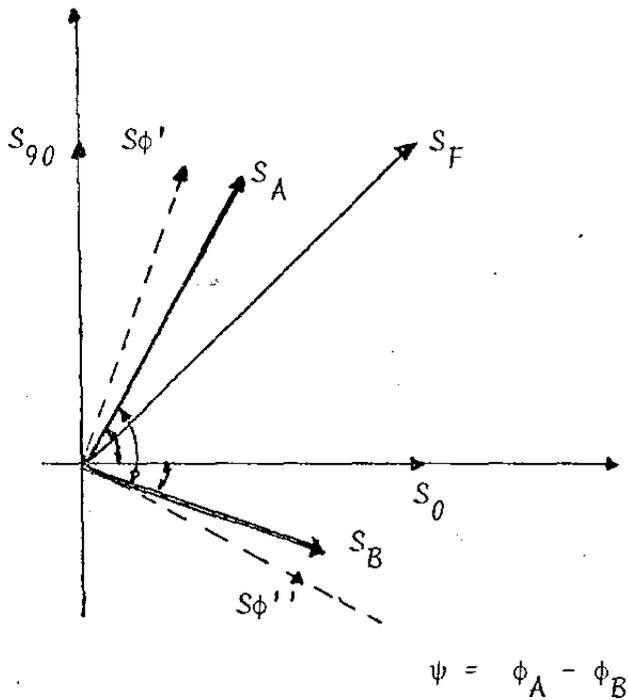
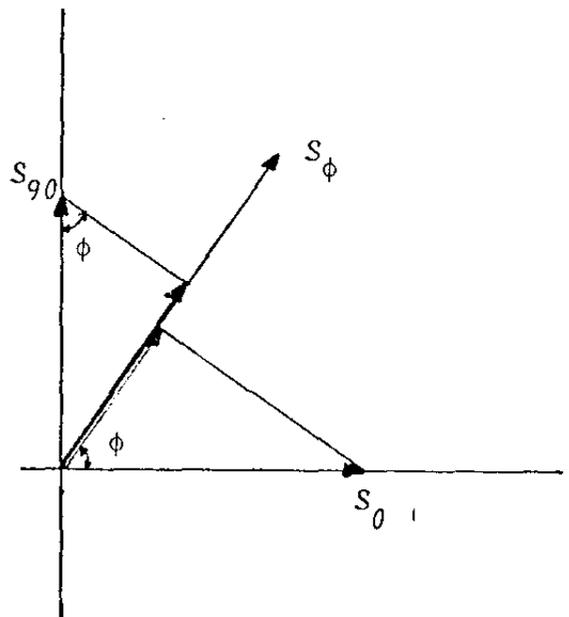


Fig. 14: OS SINAIS DAS CAMADAS E SUA SEPARAÇÃO. Mostram-se os sinais S_A e S_B de duas camadas diferentes, cuja adição fornece o sinal fotoacústico S_F medido. O método de separação nas fases identifica a fase ϕ_A em que está o sinal S_A , a partir da composição na fase ϕ'' , na qual todas as características espectrais de S_A desaparecem (e analogamente para o sinal S_B).

Fig. 15: COMPOSIÇÃO DO ESPECTRO EM VÁRIAS FASES. O método de separação nas fases parte da composição dos sinais em quadratura (S_0, S_{90}) em várias fases entre -90° e 90° . O espectro em uma fase ϕ arbitrária é composto de acordo com:

$$S_\phi = S_0 \cos \phi + S_{90} \sin \phi$$



Tendo em mãos os dois espectros (S_0 e S_{90}), efetua-se a composição de espectros por várias fases ϕ (fig. 15) a partir da relação:

$$S_{\phi} = S_0 \cos \phi + S_{90} \sin \phi \quad (30)$$

Pelo comportamento das curvas, é possível selecionar para quais fases ϕ_A e ϕ_B obtemos os espectros das camadas individuais. Se no ângulo ϕ' obtemos o espectro da camada A, sabemos então que o sinal S_B se encontra numa fase $\phi_B = \phi' \pm 90^\circ$. Analogamente, se no ângulo ϕ' obtemos o espectro da camada B sabemos que o sinal de S_A está em $\phi_A = \phi' \pm 90^\circ$. O método das fases permite encontrar as fases dos sinais de cada camada, e portanto a diferença de fase ψ entre os dois sinais, (ver seção V-1).

III-2.3 Vantagens das Medidas de Fase sobre as de Intensidade

- O método das fases utiliza apenas uma frequência (frequência fixa).
- Pelo método de variação das frequências (intensidade) não se obtém o espectro da camada interna (fig. 12).
- O espectro da fase mostra distintamente as diferentes absorções das camadas. Na figura 16 vê-se claramente que no espectro da intensidade, a absorção da fina camada superior (em 500 nm) é mascarada pela forte absorção da camada interna, mas no espectro da fase ambas as contribuições são visíveis (ref. 20).

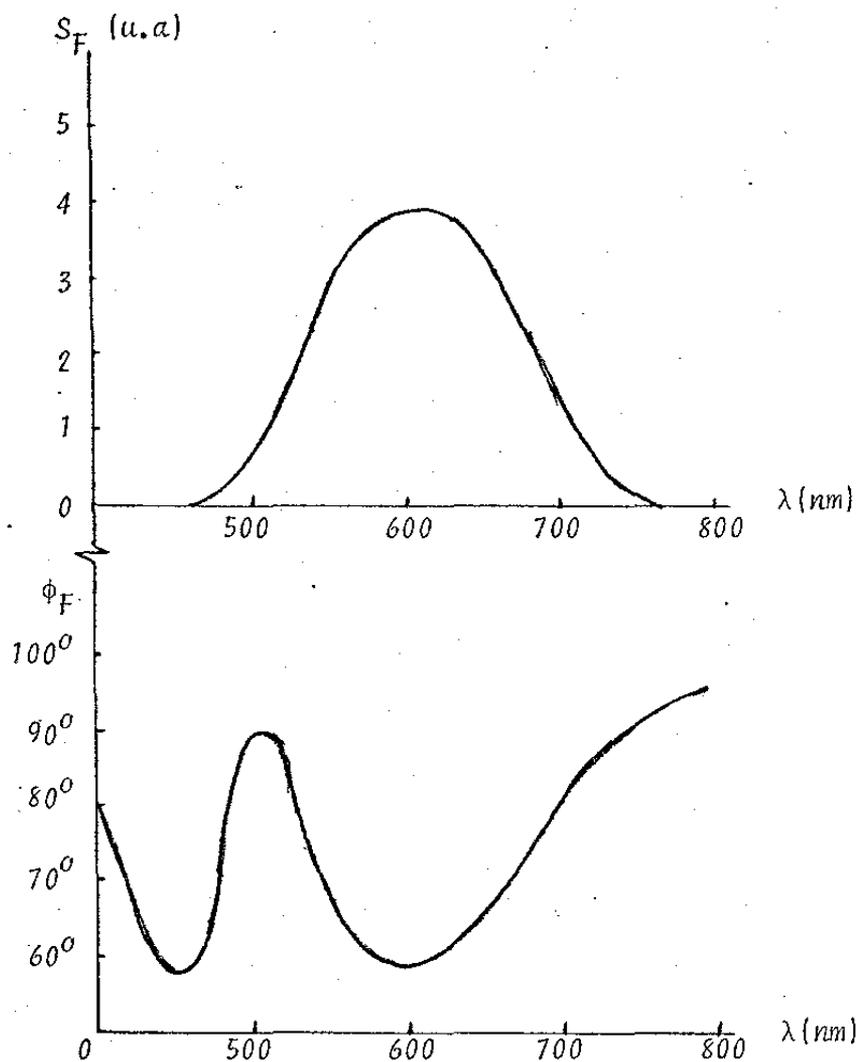


Fig. 16: Comparação entre a resposta de intensidade e de fase fotoacústicas para um sistema de duas camadas. Esta simulação supõe que as absorções são gaussianas, estando o pico da camada A em 500 nm e o da camada B em 600 nm.

CAPÍTULO IV

Morfologia de Folhas e Ação de Herbicidas

Antes de discutirmos nossos resultados experimentais, útil se torna uma descrição da morfologia e dos pigmentos das folhas em vegetais superiores (café, soja, etc). Após tal descrição, mostraremos como se processa a ação e danos que um herbicida provoca nas folhas.

IV-1. Morfologia e Pigmentos de Folhas

A folha é o órgão da planta responsável pela sua nutrição; é nela que se realiza a fotossíntese (ref. 21).

Cada folha possui diversas camadas de células que executam ativamente a fotossíntese. O conjunto dessas camadas recebe o nome de mesófilo; ver fig. 17.

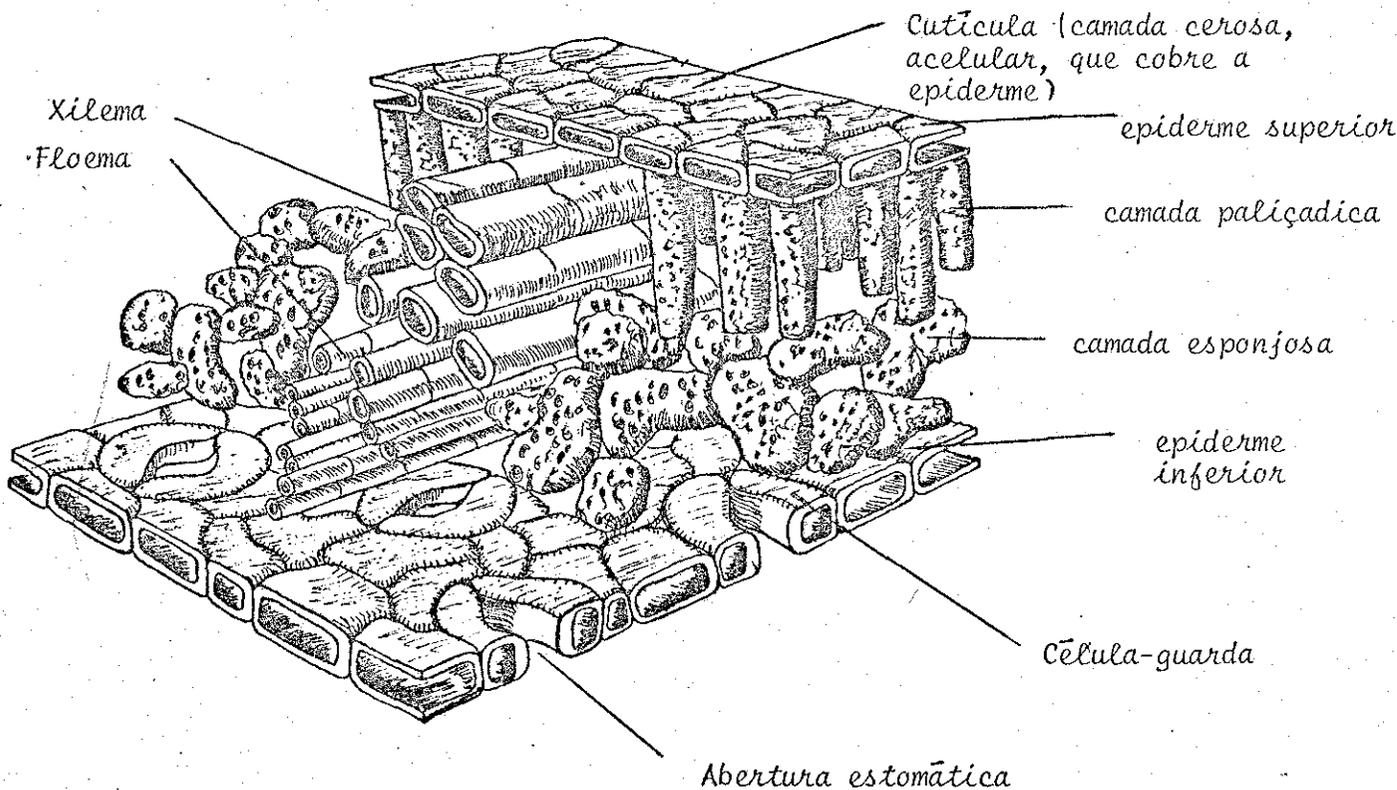


Fig. 17: Seção transversal de uma folha em diagrama.

A folha consiste numa camada protetora superior e outra inferior, as epidermes, entre as quais estão as células fotossinteticamente ativas. Em contato com a epiderme superior encontra-se a camada paliçádica e com a inferior, a camada esponjosa. As camadas epidérmicas são frequentemente perfuradas pelos poros estomáticos, cujo grau de abertura é controlado pela pressão de turgescência das células guardas que as limitam. Os espaços intercelulares servem como ductos para o intercâmbio gasoso de água, CO_2 e oxigênio. As pequenas nervuras, contendo elementos do floema e do xilema, servem para conduzir água e substâncias minerais para a folha e os açúcares aí sintetizados para fora dela. Uma cutícula cerosa, bastante impermeável à água, cobre as epidermes superior e inferior, esta possui uma espessura de 3 a 5 μm , e são responsáveis também para minimizar o dano na folha causado por fungos, insetos e agentes mecânicos além de filtrar o excesso de radiação UV do sol.

No mesófilo são encontrados os cloroplastos, que estão distribuídos ao longo das paredes das células, neles são encontrados os pigmentos responsáveis pelo armazenamento de energia luminosa, conseqüentemente a fotossíntese.

Para desempenhar seu papel na fotossíntese, a luz precisa ser "absorvida" por uma planta. Quando isso ocorre, numerosas reações químicas são desencadeadas. O primeiro elo na cadeia de reações é formado pelas moléculas dos pigmentos, dentre os quais a clorofila é o principal.

A clorofila participa nas reações de transferência de energia, ambos pelo transporte de elétrons (isto é, oxidação e redução, pelo ganho e perda de um elétron) e pela ressonância (uma transferência direta de energia).

A contribuição dos vários pigmentos no cloroplasto para a fotossíntese, é de grande interesse experimental. Com o desenvolvimento de métodos de espectroscopia modernos, tornou-se possível comparar o espectro de absorção de um organismo (isto é, o espectro de luz absorvida pelo organismo todo, a qual depende da presença e concentração de todos os pigmentos do organismo) com o espectro de ação da fotossíntese no organismo.

Fazendo-se incidir diferentes comprimentos de onda de luz, um por vez, sobre uma folha verde e medindo-se a taxa de fotossíntese, nota-se que a luz vermelha e azul causam as mais elevadas taxas de fotossíntese, e a luz verde a mais baixa, representando assim, o espectro de ação para fotossíntese de uma planta, (fig. 18)

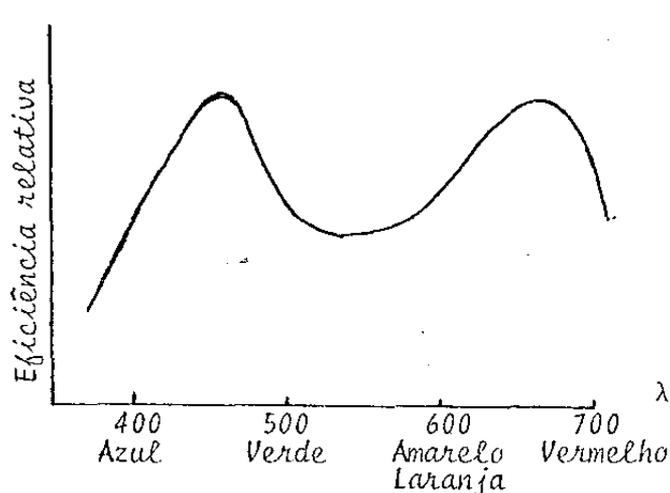


Fig. 18: Espectro de ação para a fotossíntese.

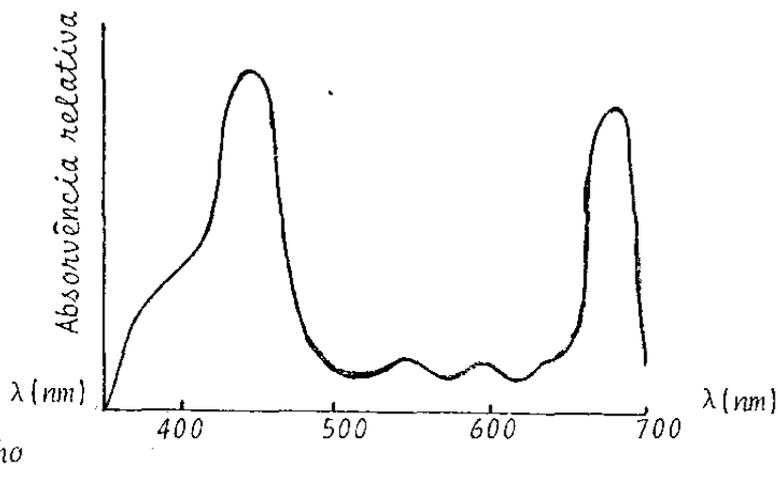


Fig. 19: Espectro de absorção da clorofila.

O espectro de ação mostra que embora o vermelho e o azul apareçam como sendo os mais eficientes, o amarelo parece também influenciar a taxa de fotossíntese. Acontece que os pigmentos carotenóides, amarelados, presentes em grande quantidade no cloroplasto, também absorvem luz, que é útil na fotossíntese. Como os carotenóides não podem atuar na fotossíntese se não houver clorofila, admite-se, geralmente, que a energia que os carotenóides adquirem pela absorção de luz é transferida para a clorofila.

Fazendo passar cada comprimento de onda da luz através de uma solução de clorofila, podemos produzir também um espectro de absorção, que mostra quais desses comprimentos de onda são mais eficientemente absorvidos pela clorofila. Comparando o espectro de absorção da clorofila (fig. 19) com o espectro de ação para fotossíntese (fig. 18), comprovamos que a clorofila é o principal pigmento na recepção de luz para a fotossíntese.

Uma lista dos pigmentos fotossintetizantes mais importantes, com algumas informações básicas sobre estes, está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Alguns pigmentos mais importantes da folha.

Pigmento	onde encontramos	luz absorvida
Clorofila a	todas as plantas verdes	vermelho e azul-violeta
Clorofila b	plantas verdes, menos algas vermelhas e azuis	vermelho e azul-violeta
Clorofila c	algas marrom	vermelho e azul-violeta
Clorofila d	algas vermelha	vermelho e azul-violeta
Ficocianina	algas vermelhas, azul-verde	laranja-vermelho
Ficoeritrina	algas vermelhas, azul-verde	verde
Carotenóides (caroteno, xantofilas)	maioria das plantas, bactérias	azul, azul-verde

A figura 20 mostra o espectro de absorção de alguns pigmentos fotossintetizantes (ref. 22).

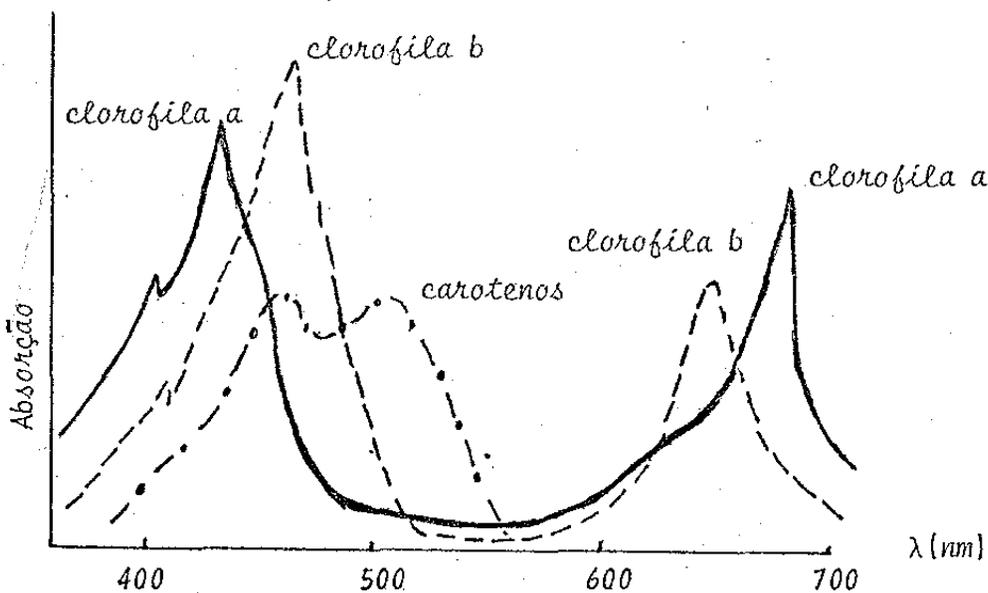


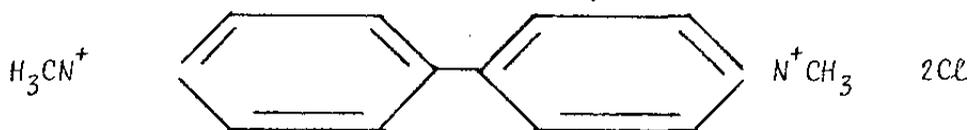
Fig. 21: Espectro de absorção dos principais pigmentos da folha, extraídos em solventes apropriados.

IV-2. Monitoração da ação de herbicidas

Quando um herbicida penetra numa folha e entra em contato com o protoplasma da folha, um grande número de reações bioquímicas ocorrem, dependendo do herbicida em particular, espécie da planta, fator de formulação, método de aplicação, temperatura, umidade, etc.

Geralmente os herbicidas são sais ou ácidos, levam as estruturas protoplasmáticas delicadas a uma rápida destruição em virtude de sua alta acidez, da concentração osmótica, e do poder precipitante de proteínas. Pouco se conhece sobre a natureza exata e sequência de reações químicas envolvidas (ref. 23).

Em particular, estudamos o herbicida PARAQUAT, que é um dos mais importantes herbicidas do grupo dos bipyridínicos, comercialmente vendido como sal (diclorato) (ref. 24).



Clorato de 1,1' - dimetil, 4,4' - bipyridínio

O PARAQUAT é um herbicida não seletivo, que atua rapidamente como disseccante, não residual pois é inativo ao entrar em contato com o solo, de grande importância na agricultura, por causa de seu amplo espectro de atividade contra gramas e ervas daninhas de folhas largas.

O PARAQUAT é um sal de amônio quaternário, não volátil, higroscópico e extremamente solúvel em água. Alguns trabalhos (ref. 29, 30) mostram que ele só atua numa planta desde que esta esteja na presença de luz solar, e uma vez tendo penetrado nessa, não é metabolicamente degradado, a rápida destruição dos tecidos da planta tratada com PARAQUAT assegura-nos isso.

Borrifado sobre uma folha verde, o PARAQUAT a destrói em questão de horas, desde que ela esteja sob a luz solar. Não ocorre penetração do herbicida na folha, salvo no escuro. Sua ação diminui no frio e aumenta com a umidade. Acredita-se que

sua penetração se dá através da cutícula, e não pelos estômatos.

A ação do PARAQUAT está intimamente ligada a fotossíntese. Ele provavelmente age capturando elétrons, no Fotossistema I, competindo com os receptores naturais do cloroplasto. Ele é portanto, reduzido para radical livre (potencial de - 450 mV) mas logo em seguida é reoxidado, o que produz peróxido de hidrogênio H_2O_2 , que é fitotóxico. A redução do PARAQUAT também ocorre no processo respiratório da planta, mas em grau muito menor.

Após a rápida penetração do PARAQUAT, há catalisação na produção de H_2O_2 , observa-se a quebra da membrana plasmática e a perda de água resultante da plasmólise, se acelera.

A fig. 21 mostra a produção do peróxido de hidrogênio pela rápida redução e oxidação do PARAQUAT no Fotossistema I.

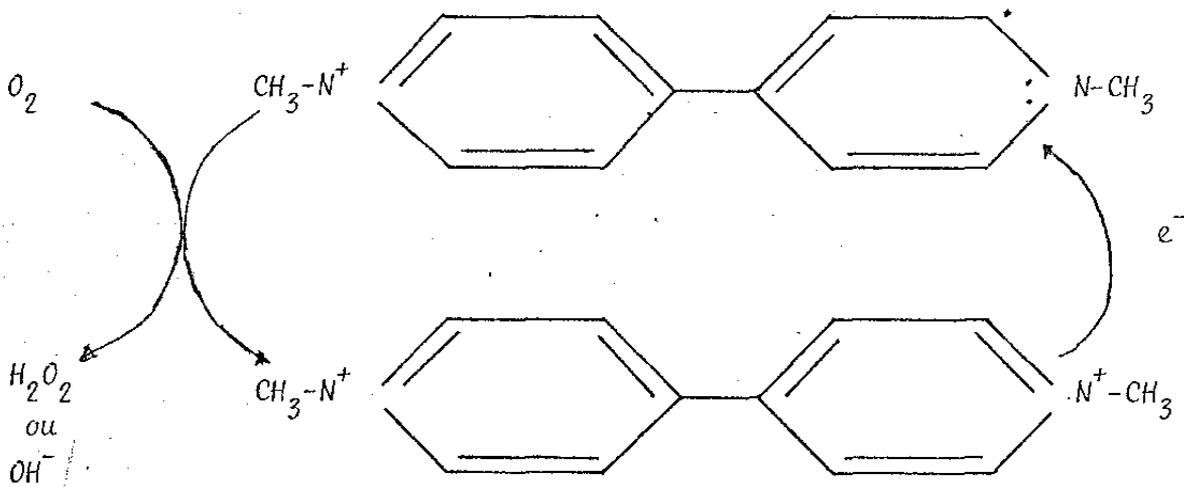
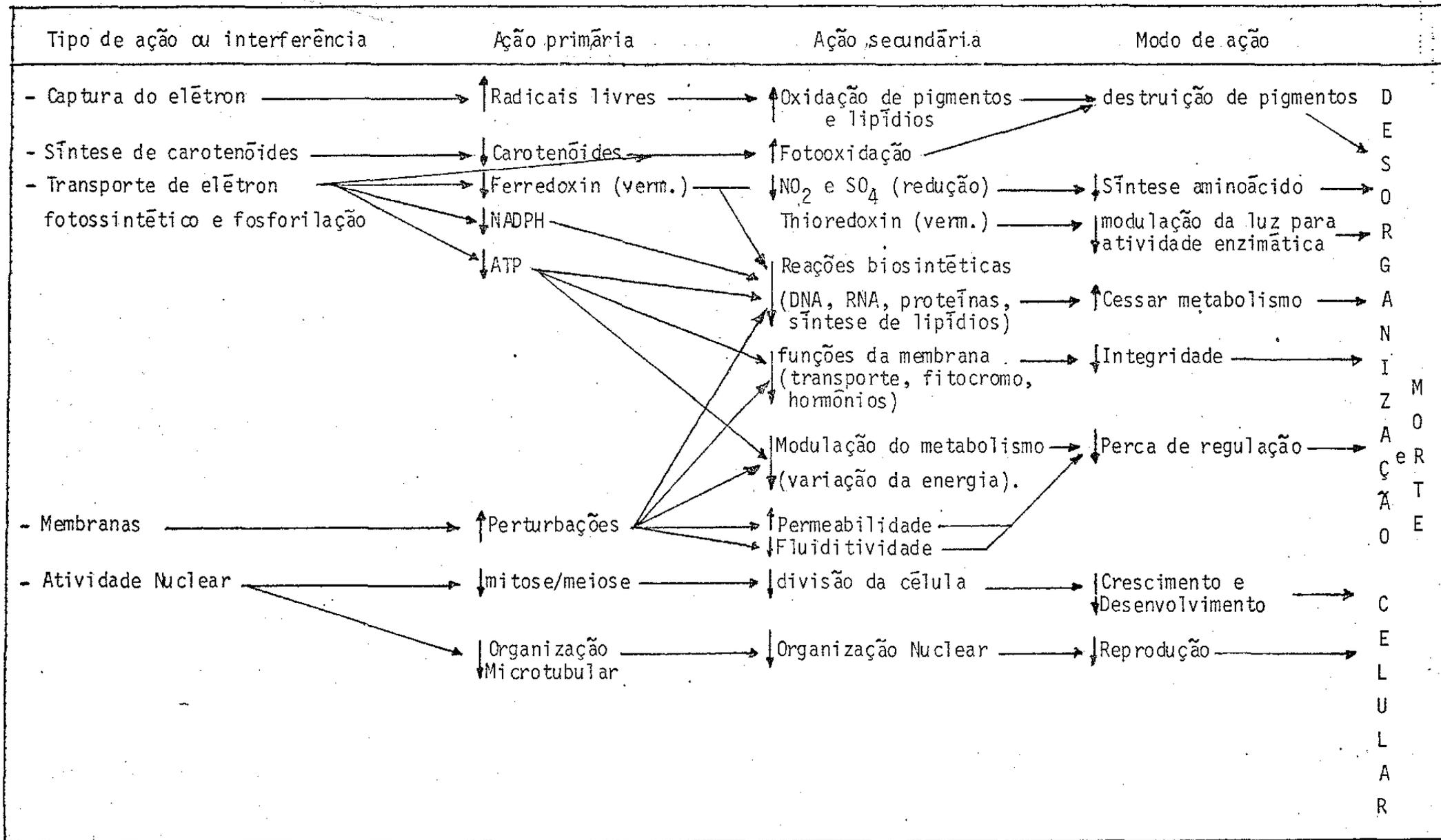


Fig. 21: Produção do peróxido de hidrogênio pela redução e oxidação do PARAQUAT no Fotossistema I.

A Tabela 4 mostra um resumo dos mecanismos de ação dos herbicidas em plantas (ref. 25).

Tabela 4: Mecanismos de ação de herbicidas em plantas



CAPÍTULO V

Resultados Experimentais e Discussão

V-1. Separação dos constituintes das folhas

A figura 22 mostra um espectro fotoacústico de uma folha verde intacta. Podemos observar claramente todas as características óticas de uma folha; a camada da cutícula (cera) situada numa banda de 300 a 400 nm, os carotenóides entre 400 a 580 nm e as clorofilas a e b numa banda entre 580 e 700 nm (ref. 26, 27, 28).

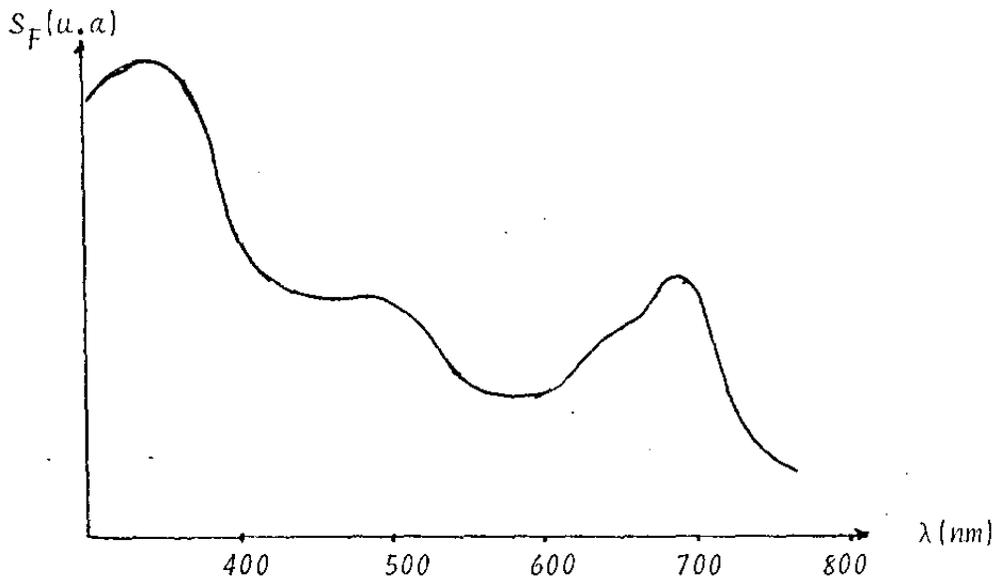


Fig. 22: Espectro fotoacústico de uma folha verde.

A análise do perfil de profundidade de folhas através da espectroscopia fotoacústica foi feita por Bulst e outros (ref. 17), pela variação da frequência de modulação. Conseguiram assim separar a contribuição da cutícula e da epiderme superior, mas não isolaram o espectro dos pigmentos (ver fig. 13).

A aplicação do método das fases para uma folha de café, soja, etc, pode ser feita sem problemas, pois a camada superficial de cera é óticamente transparente, mesmo no ultra violeta próximo e termicamente fina (usamos $f = 25$ Hz, para

o qual $\mu_s \approx 50 \mu\text{m}$, usando as propriedades térmicas da água).

Na figura 23 ilustra-se a aplicação desse método com uma simulação. A partir de um espectro composto de uma folha verde (soja) medida nas fases 0° e 90° , efetua-se no computador a composição em várias fases de 10 em 10 graus, segundo a equação 30, os espectros com valores negativos podem ser excluídos.

Foi possível separar o espectro da camada superior de cutícula, do espectro da camada inferior de pigmentos sem nada supor sobre a composição das camadas, mas apenas analisando os espectros para as várias fases (conforme explicado na seção II-2.2).

O espectro do extrato bruto de carotenóides e o da clorofila, extraída em acetona (fig. 24), substâncias fornecidas pelo Prof. William José da Silva, do Departamento de Genética da UNICAMP, indicam que o espectro que foi obtido na fase $\phi'' = -50^\circ$ (fig. 23) realmente contém esses pigmentos. O fato de não se poder separar na fase os espectros isolados destas substâncias, indica que elas estão juntas, à mesma profundidade (no caso, ambos se localizam no cloroplasto).

Como o espectro da cutícula foi isolado na fase $\phi' = 80^\circ$ (fig. 23), e a dos pigmentos na fase $\phi'' = -50^\circ$ (fig. 23), sabemos que o sinal da camada superior está a $\phi_A = 40^\circ$, e o da inferior em $\phi_B = -10^\circ$ (fig. 25). Os sinais estão assim defasados em $\psi = 50^\circ$.

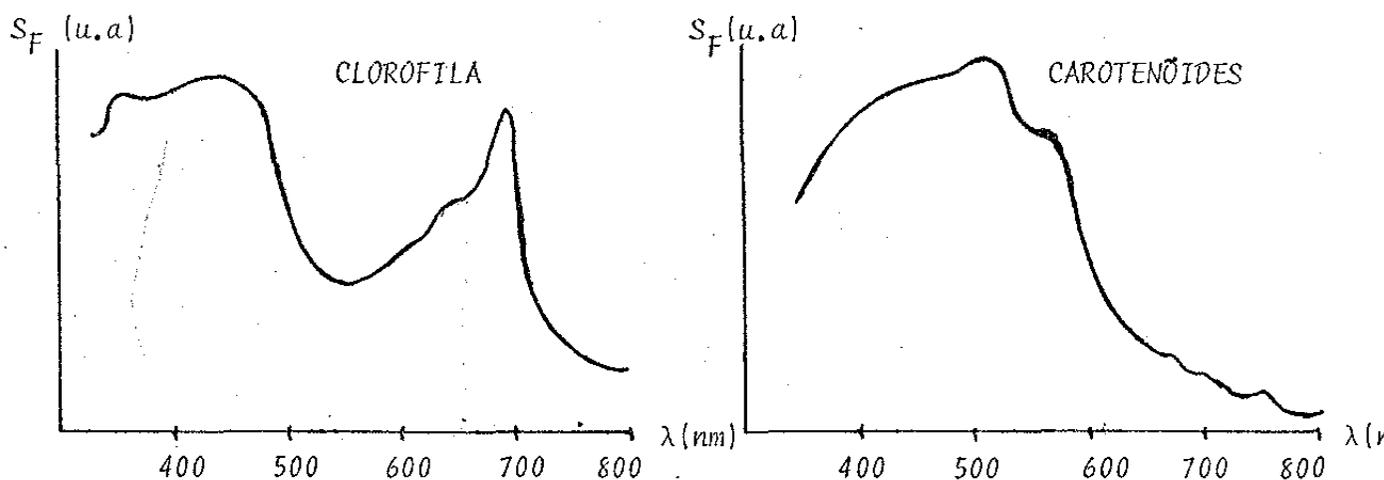


Fig. 24: Espectros de extrato bruto de clorofila e carotenóides, extraídos em acetona.

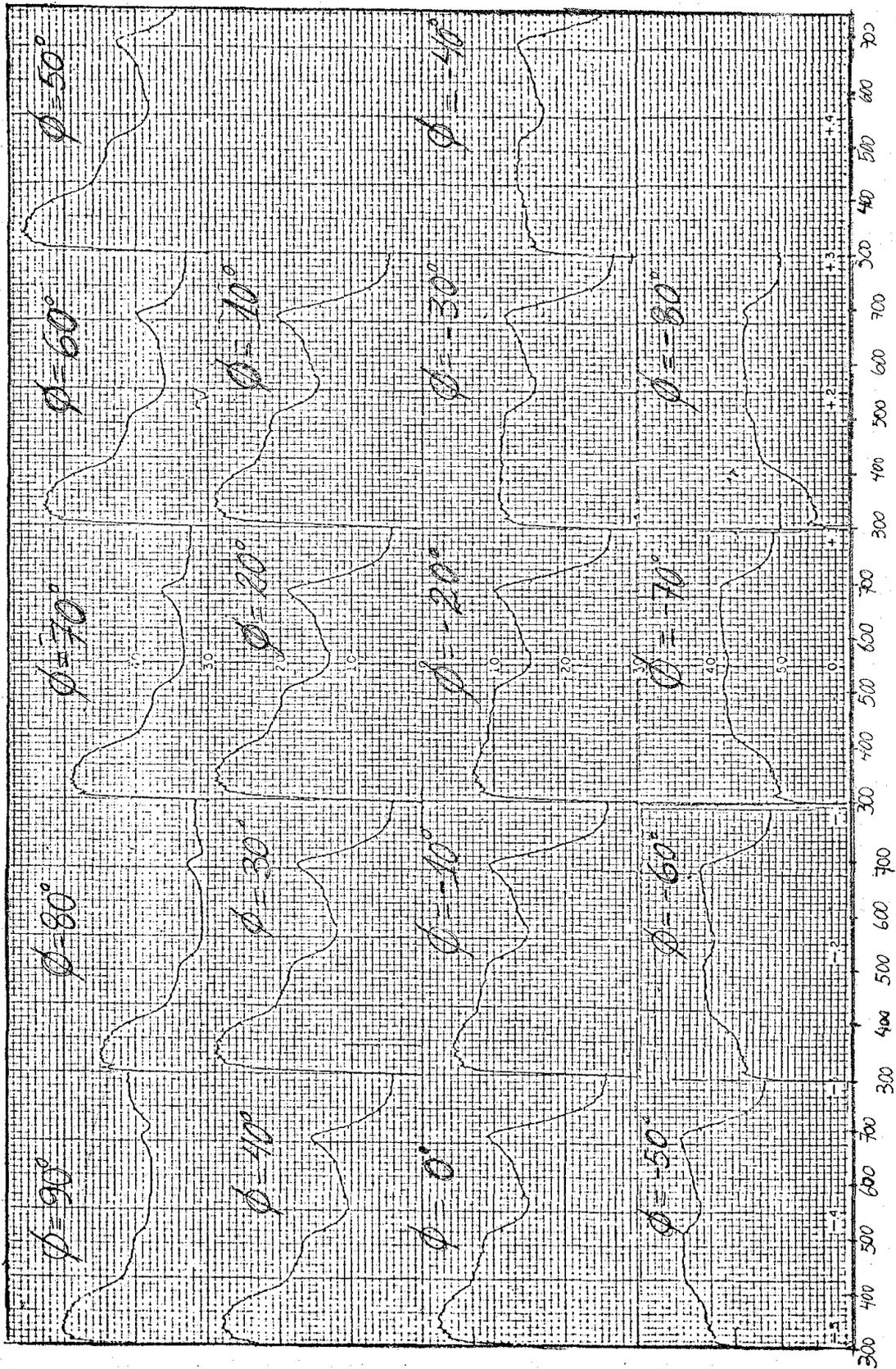


Fig. 23: Simulação do método de separação nas fases para uma folha verde.

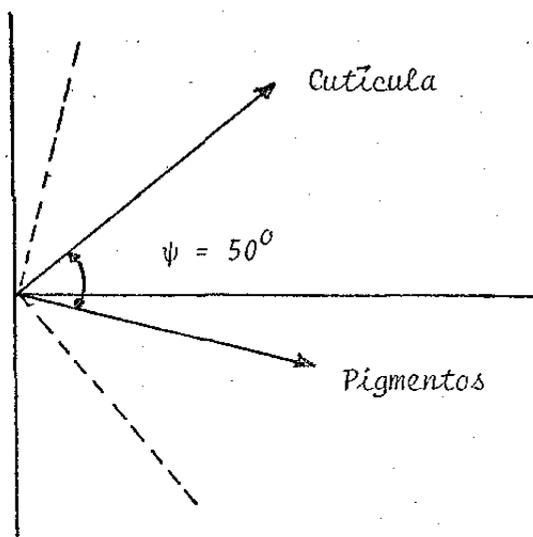


Fig. 25: Defasagem entre a camada de cutícula e os pigmentos de uma folha verde.

V-2. Resultados Experimentais

Foi realizado, portanto, um estudo não quantitativo da ação do herbicida PARAQUAT (ver Capítulo IV) em folhas de café, soja e datura. As amostras testadas foram borrifadas com uma solução aquosa contendo 5 % de PARAQUAT e deixadas ao sol durante um dia. As amostras tiradas das plantas foram cortadas na forma de um disco de 5 mm de diâmetro.

Procedendo da mesma maneira, como na simulação da fig. 23, determinamos o espectro fotoacústico de nossas amostras e medimos a diferença de fase $\psi = \phi_A - \phi_B$ entre a cutícula e a camada de pigmentos, antes da borrifação do PARAQUAT, 10 minutos, 2, 4 e 6 horas após a aplicação.

As figuras 25 e 26 mostram os espectros resolvidos na fase para as folhas de café (fig. 26) e soja (fig. 27) em função do tempo, após a aplicação do PARAQUAT. Nas Tabelas 5 e 6, tem-se as fases em que os sinais destas camadas se encontram, e as respectivas defasagens. Além do aparente decréscimo na quantidade de pigmentos com o tempo, a diferença de fase exibe um decréscimo progressivo. O espectro fotoacústico mostrou também que não há destruição da cutícula.

Note-se que o pico da cutícula em 300 nm permanece constante durante o experimento, pois, apesar de menos intenso com o passar do tempo, sua estrutura permanece intacta, coisa que não é observado com o pico dos pigmentos, pois como podemos ver, após 4 horas de aplicação o pico de absorção para a clorofila b (630nm)

não pode mais ser identificado, mostrando portanto que está havendo destruição de pigmentos.

Partindo da hipótese de que a folha sofra um processo de desidratação contínua, pode-se explicar a diferença de fase ψ observada.

Sabe-se que a diferença de fase para uma amostra termicamente grossa ϕ_A , é dada pelo produto do coeficiente de difusão térmica a_S pela sua espessura x_A , ou seja,

$$\phi_A = a_S x_A$$

Considerando-se a mesma difusividade térmica tanto para a cutícula, quanto para a camada de pigmentos, a qual é aproximadamente igual à da água e, denotando a espessura da camada de pigmentos por x_B , escreve-se a diferença de fase como:

$$\psi = a_S (x_A - x_B), \text{ onde } a_S = \sqrt{\frac{\pi f}{\alpha}}$$

Durante este processo de contínua desidratação da folha, onde a água é substituída pelo ar, ocorre um aumento da difusividade térmica α ($\alpha_{\text{água}} = 0,0015 \text{ cm}^2/\text{s}$, $\alpha_{\text{ar}} = 0,23 \text{ cm}^2/\text{s}$), fazendo decrescer a_S e conseqüentemente ψ .

Isto leva-nos a supor que a ação do PARAQUAT é provavelmente a de induzir uma rápida desidratação, ou plasmólise, na folha, como sugerido por vários autores (ref. 23).

A figura 28 mostra o decréscimo de massa ocasionada pela perda natural de água de uma folha verde intacta com o passar do tempo; 1, 2, 3 e 5 horas após a preparação da amostra. Pode ser observado também pelo gráfico, que a perda d'água é lenta quando não há ação de agentes químicos.

Um resultado semelhante foi observado nas folhas de datura, com uma plasmólise mais acentuada do que nas folhas de soja e café. Decorridos 2 horas da aplicação do PARAQUAT, sua estrutura já estava totalmente plasmolisada, onde pôde observar um decréscimo na diferença de fase.

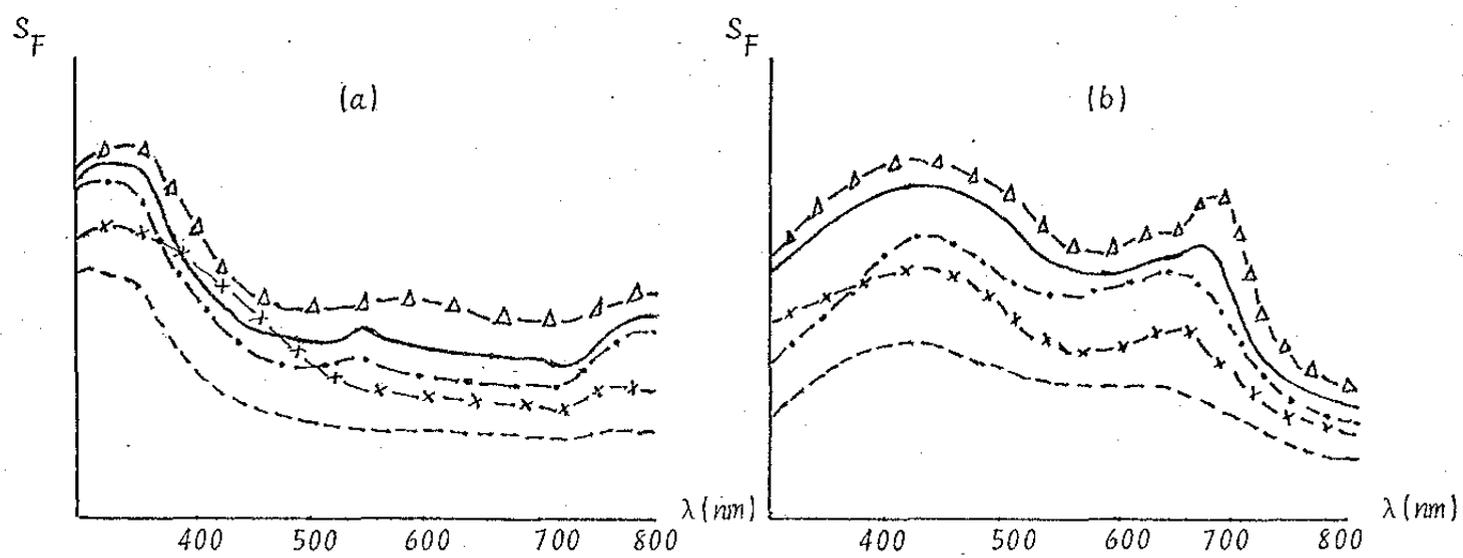


Fig. 26: Método de separação nas fases aplicado a uma folha de café. (a) mostrando o espectro da cutícula e (b) o espectro dos pigmentos; antes (-Δ-Δ-Δ), 10 minutos (—), 2 (-·-·-), 4 (-x-x-x) e 6 (- - - -) horas após tratamento com herbicida.

Tabela 5: Resultados para o método de separação nas fases para a ação do herbicida numa folha de café.

		Clorofila e Carotenóides	Cutícula	Defasagem
Sem Veneno	separa-se	- 50°	60°	70°
	encontra-se	- 30°	40°	
10 minutos após aplicação	separa-se	- 80°	20°	80°
	encontra-se	- 70°	10°	
2 horas após aplicação	separa-se	- 80°	30°	70°
	encontra-se	- 60°	10°	
4 horas após aplicação	separa-se	- 80°	60°	40°
	encontra-se	- 30°	10°	
6 horas após aplicação	separa-se	- 80°	80°	20°
	encontra-se	- 10°	10°	

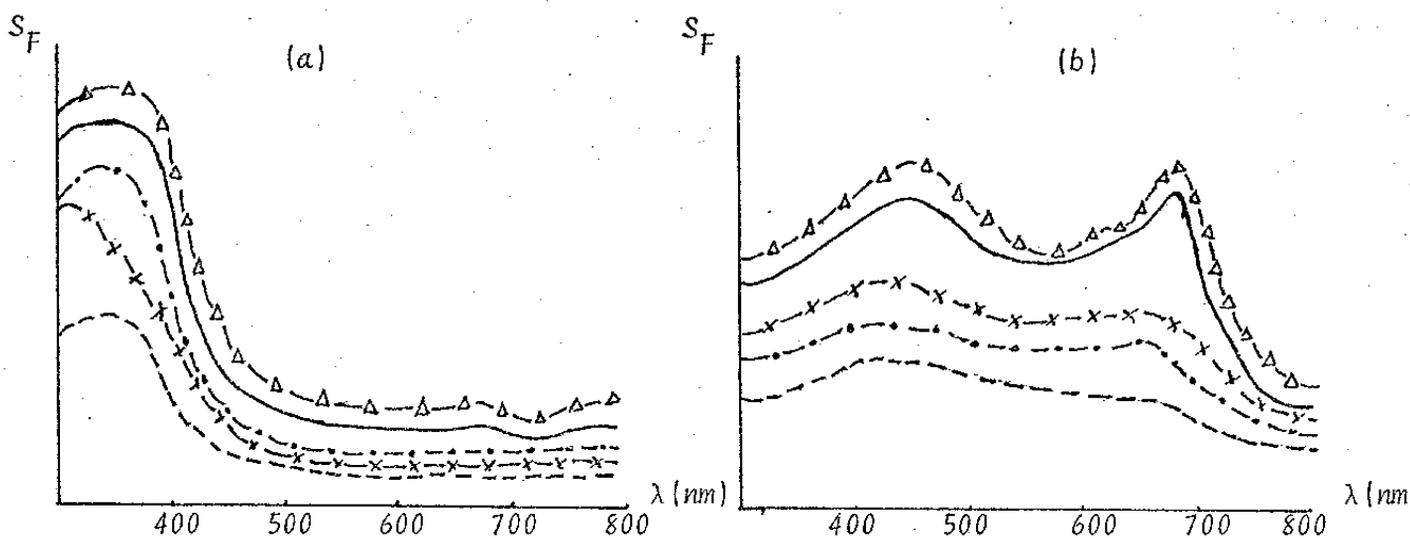


Fig. 27: Método de separação de fases aplicado a uma folha de soja; (a) mostrando o espectro da cutícula e (b) espectro dos pigmentos, antes (\triangle), 10 minutos (—), 2 (---), 4 (-x-x-) e 6 (- - -) horas após a aplicação do herbicida.

Tabela 6: Resultados para o método de separação de fases para a ação de herbicida numa folha de soja.

		Clorofila e Carotenóides	Cutícula	Defasagem
Sem Veneno	separa-se	-70°	$\rightarrow 60^{\circ}$	50°
	encontra-se	-30°	$\rightarrow 20^{\circ}$	
10 minutos após aplicação	separa-se	-50°	$\rightarrow 80^{\circ}$	50°
	encontra-se	-10°	$\rightarrow 40^{\circ}$	
2 horas após aplicação	separa-se	-60°	$\rightarrow 80^{\circ}$	40°
	encontra-se	-10°	$\rightarrow 30^{\circ}$	
4 horas após aplicação	separa-se	-70°	$\rightarrow 80^{\circ}$	30°
	encontra-se	-10°	$\rightarrow 20^{\circ}$	
6 horas após aplicação	separa-se	-80°	$\rightarrow 80^{\circ}$	20°
	encontra-se	-10°	$\rightarrow 10^{\circ}$	

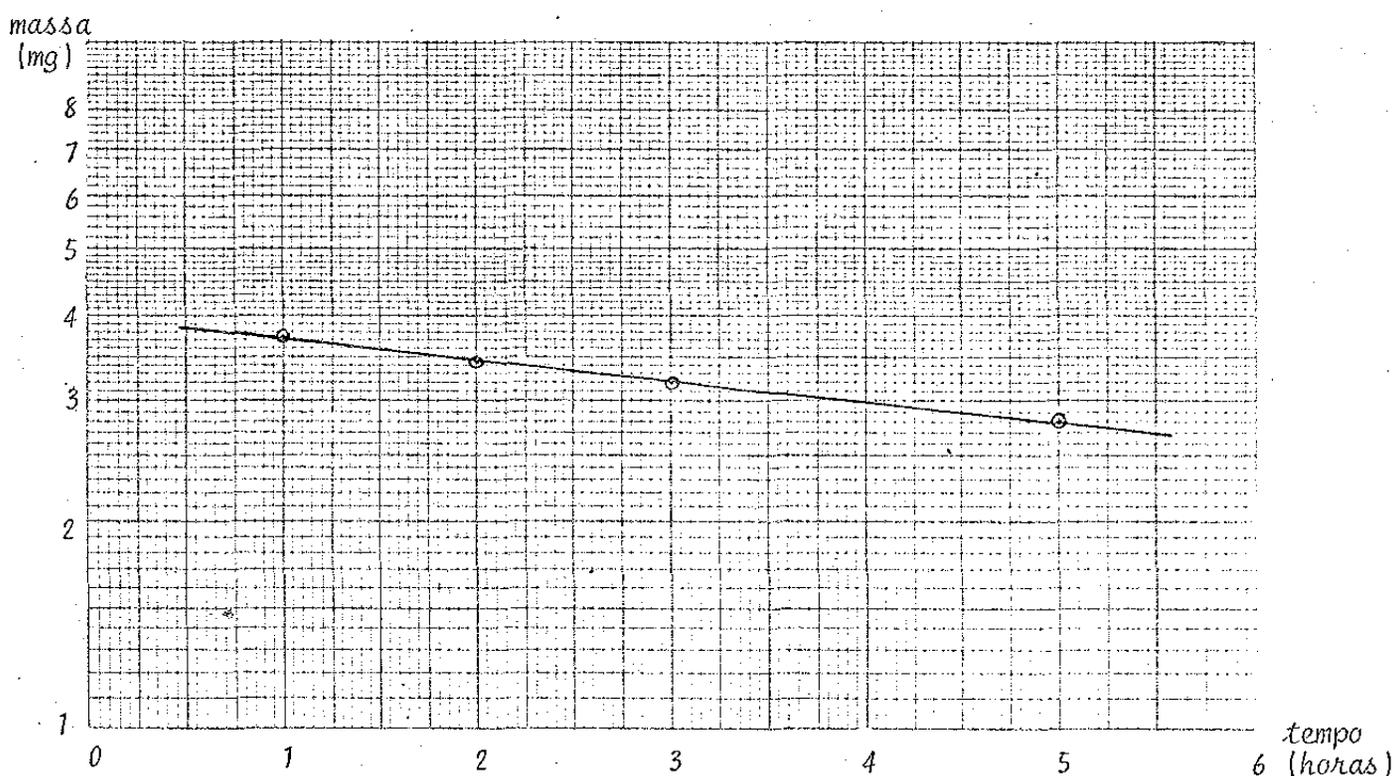


Fig. 28: Gráfico da variação de massa para uma folha verde com o passar do tempo.

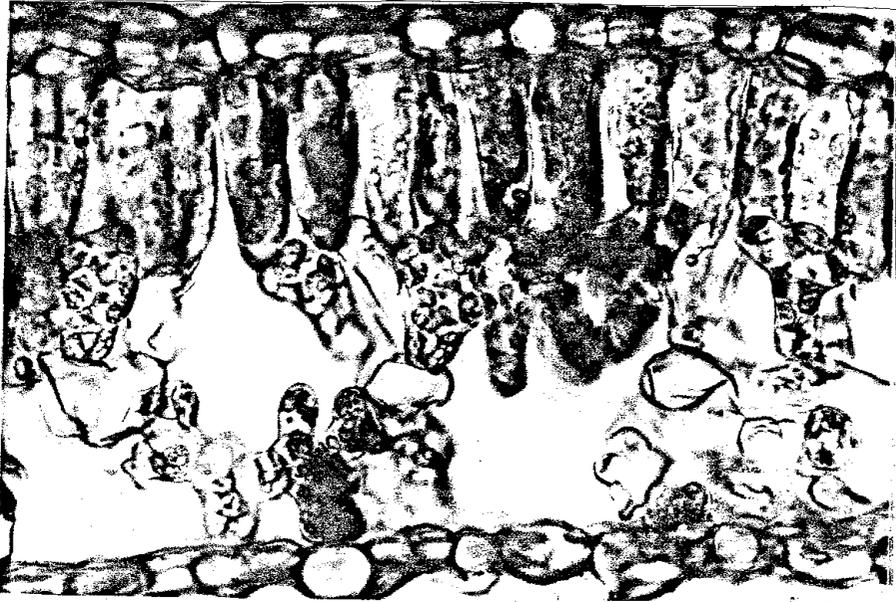
V-3. Microscopia Ótica

Para comprovar as observações feitas pela espectroscopia fotoacústica, após cada medida, a amostra era estudada usando-se um microscópio ótico (60 vezes amplificado).

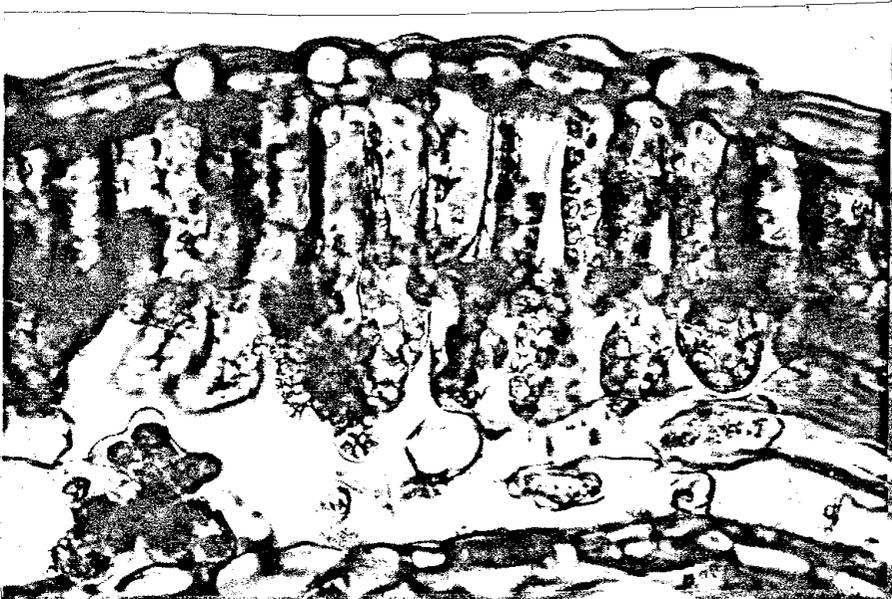
A microscopia ótica (fig. 30), mostra que está havendo uma plasmólise na folha com o passar do tempo, após a aplicação do herbicida, e que nenhuma alteração na cutícula é observada.

Estes resultados concordam com as observações experimentais através da espectroscopia fotoacústica.

Fig. 29: Microscopia ótica de uma folha de soja.

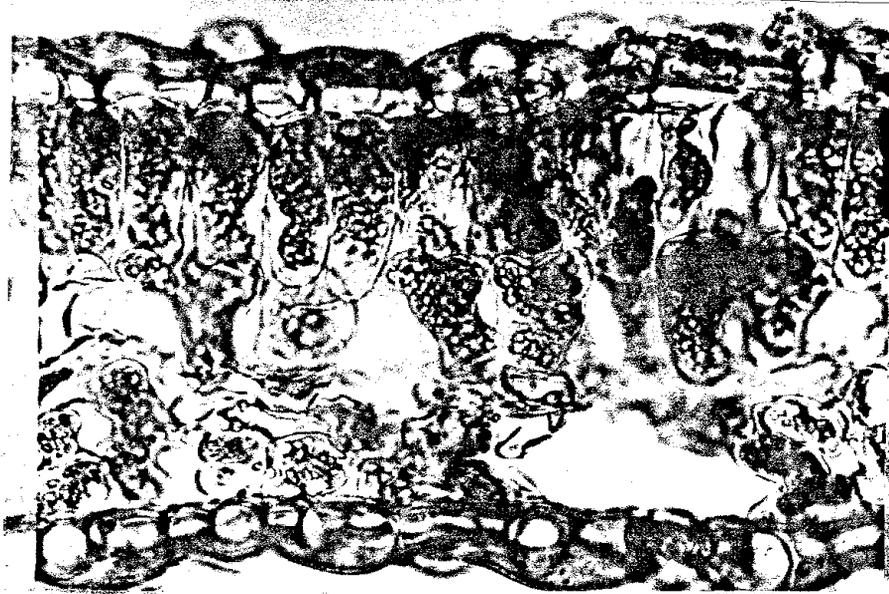


a) Microscopia ótica de uma folha de soja intacta.



b) Microscopia ótica de uma folha de soja 2 horas após a aplicação do herbicida.

- Nota-se um início de desorganização, com os cloroplastos aglomerados próximos a parede da célula.



c) Microscopia ótica de uma folha de soja 4 horas após a aplicação do herbicida.

- Nota-se situação semelhante à anterior com a plasmólise mais evidente. Há porém, áreas do paliçadico com as células bastante danificadas.



d) Microscopia ótica de uma folha de soja 6 horas após a aplicação do herbicida.

- Nota-se que a cutícula está praticamente intacta, enquanto que as células estão totalmente plasmolizadas.

CAPÍTULO VI

Conclusões e Perspectivas

O presente trabalho evidenciou a potencialidade das medidas de fase do efeito fotoacústico para analisar os constituintes de amostras biológicas compostas de duas camadas. A técnica foi experimentalmente testada para o estudo da ação de um herbicida nos diversos componentes de folhas de café, soja e datura.

Foi observado que o herbicida (PARAQUAT), quando aplicado numa folha atua de duas maneiras. De um lado, este agente químico induz uma rápida desidratação da folha, evidenciado experimentalmente pelo decréscimo na diferença de fase entre a cutícula e a camada dos pigmentos. Paralelamente ao processo de desidratação o PARAQUAT produz um aumento da fitotoxicidade através da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta observação é verificada pelo gradual decréscimo na intensidade das bandas de absorção dos pigmentos. Medidas através da microscopia ótica, nos mesmos sistemas, confirmaram qualitativamente a compatibilidade e a interpretação de nossas observações.

O método das fases mostrou-se particularmente importante para o estudo de sistemas biológicos. Estes, em sua maioria, encontram-se sob uma forma que as torna difíceis, senão impossíveis de serem analisadas por qualquer tipo de técnica ótica convencional de transmissão ou de reflexão. Além de permitir a obtenção de espectros de uma maneira não destrutiva, o método poderá se tornar uma ferramenta útil para fisiologistas de plantas, em particular voltados para o importante estudo da interação entre agentes químicos e sistemas biológicos.

CAPÍTULO VII

Referências Bibliográficas

- 1 - Bell, A.G. - "On the Production and Reproduction of Sound by Light", em "American Journal of Science", 120, 1880, 305-324.
- 2 - Rayleigh Lord (1881). Nature (London) 23.274.
- 3 - Mercadier, M.E. (1881). C.R. Acad. Sci. 92.409.
- 4 - Preece, W.A. (1881) Proc. R. Soc. London 31.506
- 5 - Veingerov, M.L. - Dokl. Akad. Nauk. SSSR 19, 687 (1938).
- 6 - Kreuzer, L.B.; J. Appl. Phys. 42, 2934 (1971).
- 7 - Parken, J.G. - "Optical absorption in Glass Investigation using an Acoustic Technique", in "Applied Optics", 12(12), 2974 - 2977 (1973).
- 8 - Rosencwaig, A.; Gersho, A. - "Theory of Photoacoustic Effect with Solids", in "J. Appl. Phys.", 47 (1), 64-69 (1976).
- 9 - Rosencwaig, A. - "Photoacoustic and Photoacoustic Spectroscopy", J.Wiley, New York, (309 pgs.) 1980.
- 10 - Yasa, Z.A.; Jackson, W.B.; Amer, N.M. - "Photoacoustic thermal spectroscopy of scattering media", in "Appl. Opt.", 21(1), 21-31 (1982).
- 11 - Cesar, C.L.; Vargas, H.; Meyer, J.A.; Miranda, L.C.M. - "Photoacoustic Effects in Solids", in "Physical Review Letters", 42(3), 1570-3 (1979).
- 12 - Quimby, R.S.; Yen, W.M. - "Effect of Thermal Contact Resistance on the Photoacoustic Signal", in "J. Appl. Phys.", 52(1), 500-2 (1981).
- 13 - Moncholin, J.P.; Parpal, J.L.; Bertrand, L.; Gagné, J.M. - "Thermal Contact Probing by Photoacoustic Effect", in "Appl. Phys. Lett.", 39(5), 391-3 (1981).
- 14 - Butkov, E. - "Física Matemática", ed. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, pgs. 502-13 (1978).
- 15 - Hamodt, L.C.; Murphy, J.C.; Parker, J.G. - "Size Considerations in the Design of Cells for Photoacoustic Spectroscopy", in "J. Appl. Phys.", 48(3), 927-33 (1977).

- 16 - Cavalheiro, F.R.F. - "Automação, Desenvolvimento e Performance de um Espectrômetro Fotoacústico", Tese de Mestrado apresentada no Depto. de Engenharia Elétrica, FEC-UNICAMP em 1985.
- 17 - Bults, G.; Horwitz, B.A.; Malkin, S.; Cahen, D. - "Leaf Physiology and Anatomy by Photoacoustic", in "Topical Meeting on Photoacoustic Spectroscopy", Ames 1979, paper TuB 28.
- 18 - César, C.L.; Vargas, H.; Pelzl, J.; Miranda, L.C.M. - "Phase Resolved Photoacoustic Microscopy Application to Ferromagnetic Resonance", in "J. Appl. Phys.", 55(10), 3460-4 (1984).
- 19 - Anjo, D.M. and Moore, T.A. - "A photoacoustic depth profile of β -carotene in skin", in "Photochemistry and Photobiology", 39(5): 635-640.
- 20 - Mandelis, A.; Teng, Y.C.; Royce, B.S.H. - "Phase Measurements in the Frequency Domain Photoacoustic Spectroscopy", in "J. Appl. Phys.", 50(11), 7138-46 (1979).
- 21 - Arthur, W.G. - "A planta verde, Fundamentos de Biologia", pág. 29-35.
- 22 - Bidwell, R.G.S. - "Plant Physiology", pág. 143-147.
- 23 - Moreland, D.E. - "Mechanism of Action of Herbicides", Ann. Rev. Plant Physiology, 31: 597-638 (1980).
- 24 - Calderbank, A. and P., Slade - "Diquat and Paraquat", in Kearney, P.C.; Kaufman, D.D. - "Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action", vol. 2, Marcel Dekker Inc., New York, 502-539.
- 25 - Moreland, D.E. - Ann. Rev. Plant Physiology, pág. 626 (1980).
- 26 - Pessoa, O.F. - Tese de Mestrado, "Aplicação de Medidas de Fase do Efeito Fotoacústico", 1985 - IFGW.
- 27 - César, C.L.; Vargas, H.; Miranda, L.C. - "Photoacoustic Microscopy of Layered Samples: Phase-Detection Technique", in J. Phys. D: Appl. Phys., 18, 599-608 (1985).
- 28 - Pessoa Jr., O.; César, C.L.; Vargas, H.; Reis, F.A.M.; Miranda, L.C. - "Phase-Resolved Photoacoustic Microscopy: Application to Biological Layered Samples", Can. J. Phys. (in press), 1985.

- 29 - Minshall, W.H. - "Influence of light on the effect of 3-p-(chlorophenyl)-1,1-dimethylurea on plants"; Weeds 5: 29-33 (1957).
- 30 - Moreland, D.E.; Gentner, W.A.; Hilton, J.L. and Hill, K.L. - "Studies on the mechanism of herbicidal action of 2-chloro-4,6-bis (ethylamino)-3-triazine"; Plant. Physiol. 34: 432-435 (1959).