

CARLOS ALBERTO VINHA

*Este é um trabalho conceitual  
de natureza física da Tese de física  
de Carlos Alberto Vinha e o professor  
Helion Vargas*

*21/12/1988  
Helion Vargas*

APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA  
E RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA  
A MATERIAIS BIOLÓGICOS

Orientador:

Prof. Helion Vargas

Tese apresentada no Instituto de Física Gleb Wataghin da UNICAMP como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Física

Setembro de 1988

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

**a meus amigos:**

**Sérgio**

**Rosana**

**Anderson**

Hã um outro mundo a ser descoberto!  
E atẽ mais de um!  
Avante, para vossos barcos, õ Filõsofos!

Friedrich Nietzsche  
Em *A Gaia Ciẽncia*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Helion Vargas, pela orientação, pelo entusiasmo e pela manifesta disposição em continuar apoiando o desenvolvimento de minha carreira científica.

Aos professores Francisco de A.M.Reis e Luis C.M.Miranda pelas importantes sugestões.

Ao professor Edson Correã da Silva pelas contribuições no trabalho das bebidas de café.

Ao professor A.C.Gabrielli e ã Odeti do IB pela extrema colaboração nos trabalhos de microscopia ótica.

Ao professor Curt Egon Hennies pela colaboração, por ocasião dos primeiros contatos com medidas espectrométricas.

Aos professores William José da Silva, Carlos A.S.Lima, Wladimir Guimarães e Carlos Alberto Ferrari, pelos gestos de incentivo.

Ao Guilherme, Sr. Camarguinho e Ângela do IBC-Núcleo Técnico de Campinas, pelo fornecimento e auxílio na preparação das amostras de café.

Ao professor Sodek do IB pelo fornecimento das plantas de soja.

Ao Carlos Burga e Timothy da Monsanto pelo auxílio na preparação das plantas e aplicação dos herbicidas do grupo Difenil-éter.

Ao Salvador e aos provadores Benedito e Carlos da FEMECAP pela contribuição ao trabalho das bebidas de café.

À Angélica e à Raquel do IQ, e à Laudenir do IB pela ajuda no trabalho de extrações em folhas.

Aos colegas de grupo de Fotoacústica e RPE, Bento, Mauro, Osvaldo, Francisco, Nélia, Valéria, Antonio Neto pelo real espírito de grupo, e em especial a:

Norberto, pela ajuda em todas as fases do trabalho;

Marco, pelo auxílio nas medidas de RPE em café;

José Neri, pela interação no trabalho de herbicidas;

Dinah, pela ajuda na preparação das amostras de café;

Antonio Manzanares, pela orientação no trato com computadores.

Aos colegas Gibson, José, Valder, Ana e Zé por terem compartilhado horas de intenso trabalho que antecederam nosso EQD.

Aos colegas de sala, Facin, Lílian, Ossamu, Carlos Raimundo, e outros transitórios, pela convivência cordial e amigável.

Ao Shingo do CCET-UFMS pelo esmero na preparação dos desenhos.

À Marli e à Sônia pelo trabalho datilográfico.

Aos colegas do Departamento de Física da UFMS pela disposição em assumir minha carga horária durante o afastamento.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela concessão do afastamento e pelo suporte financeiro.

À CAPES pela concessão da bolsa do programa PICD.

## I N D I C E

Apresentação	1
- Referências Bibliográficas	4
Capítulo I	
Fundamentos teóricos e Generalidades das Técnicas Utilizadas	
I.1. Efeito Fotoacústico e Espectroscopia Fotoacústica	5
I.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica	14
1.2.1. Abordagem Clássica do Fenômeno	14
1.2.2. Abordagem Quântica do Fenômeno	20
- Referências Bibliográficas	23
Capítulo II	
Aplicação da Espectroscopia Fotoacústica na Determinação de Adulterantes do Café em Pó	
- Introdução	29
II.1. Determinação de Adulterantes do Café Torrado e Moido, utilizando a Espectroscopia Fotoacústica no Infra-vermelho Próximo	33
II.1.1. Descrição do Experimento	33
- Aparelhagem utilizada	33
- Preparação e Manipulação das Amostras	36
II.1.2. Resultados e Discussão	39
- Análise Qualitativa dos Espectros	39
- Análise Quantitativa dos Espectros	42
II.1.3. Conclusões	55
- Referências Bibliográficas	57

## Capítulo III

### Identificação da Qualidade da Bebida do Café Utilizando-se Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Espectroscopia Fotoacústica

- Introdução	59
III.1. A Prova de Degustação do Café ou Prova de Xícara	60
- Histórico	60
- O Método	63
III.2. Aplicação da Ressonância Paramagnética Eletrônica na Identificação das Bebidas de Café	66
III.2.1. A Ocorrência de Radicais Livres no Café	66
III.2.2. Descrição do Experimento	70
- Amostras Utilizadas	70
- Aparelhagem Utilizada	70
- Preparação e Manipulação das Amostras	72
III.2.3. Resultados e Discussão	77
III.3. Aplicações da Espectroscopia Fotoacústica na Identificação das Bebidas de Café	88
III.3.1. A Absorção Fotoacústica do Café no Infra-vermelho Próximo	88
III.3.2. Descrição do Experimento	88
- Amostras Utilizadas	88
- Aparelhagem Utilizada	90
- Preparação e Manipulação das Amostras	90
III.3.3. Resultados e Discussão	90
III.4. Conclusões	93
- Amostras de Safras Anteriores a 85	93
- Amostras da Safra 87	94
- Conclusões Gerais	94
- Referências Bibliográficas	96

## Capítulo IV

### Aplicação da Espectroscopia Fotoacústica na Monitoração de Efeitos de Herbicidas em Folhas

- Introdução	98
IV.1. A Anatomia de Uma Folha	99
IV.2. Espectros Fotoacústicos Exibidos por Folhas e seus Constituintes	102
IV.3. Separação ou Resolução de Espectros Utilizando-se a Espectroscopia Fotoacústica	104
IV.3.1. O Método de Separação de Espectros por Variação da Frequência de Modulação	106
IV.3.2. O Método de Separação de Espectros na Fase ( $MS\phi$ )	108
IV.4. Mecanismos de Ação de Herbicidas	116
IV.4.1. A Fotossíntese	116
IV.4.2. O Herbicida Paraquat	121
- Principais Usos	121
- Características	123
- Modo de Ação	123
IV.4.3. Herbicidas do Grupo Difenil éter	124
- Principal Uso	124
- Características	124
- Modo de Ação	127
IV.4.4. Efeitos do Herbicida Paraquat Observados pelo $MS\phi$	128
- Descrição do Experimento	128
- Aparelhagem Utilizada	128
- Resultados e Discussão	132

IV.4.5. Efeitos dos Herbicidas do Grupo Difenil éter Observados pelo MSφ	145
- Descrição do Experimento	145
- Resultados e Discussão	146
IV.4.6. Conclusões	150
- Referências Bibliográficas	152
Capítulo V	
Conclusões Finais e Perspectivas de Estudos	155
Resumo	158
Abstract	160

## APRESENTAÇÃO

Presentemente, a gama de trabalhos multidisciplinares que a literatura especializada registra tem aumentado, mas é no nosso entender ainda reduzida. É reconhecido que vários fatores dificultam a condução desse tipo de trabalho, entre os quais poderíamos citar diferenças na linguagem de pesquisadores de diferentes áreas, diversidade de objetivos, divergências no enfoque dado aos resultados, etc.

No caso da interação entre Biólogos e Físicos é compreensível a ocorrência desse tipo de problema. Os físicos, acostumados ao trato com sistemas idealizados ou de estrutura simples, como por exemplo, monocristais puros, gases nobres, etc., costumam produzir e controlar a inclusão de defeitos, impurezas, etc..., afastando o sistema da situação ideal e obtendo em cada caso informações de natureza microscópica, que são no estágio atual da Física as informações de maior interesse. A Biologia que trata com sistemas de maior complexidade<sup>(1,2)</sup>, tais como células, ultra-estruturas celulares, tecidos, que são constituídos de um número elevado e diferenciado de átomos e moléculas, busca informações sobre o comportamento global desses arranjos complexos de substâncias. De um ponto de vista operacional pode-se afirmar que a Biologia está geralmente mais interessada em aspectos fenomenológicos dos eventos, ao passo que a Física concentra maior atenção nos aspectos microscópicos.

A dificuldade em se obter essas informações microscópicas ou

estruturais, quando se estuda os sistemas complexos, que compõe o campo de estudo da Biologia, torna algo frustrante para o Físico comum o elenco de resultados obtidos na aplicação de técnicas físicas ao estudo de sistemas biológicos, não obstante esses resultados possam inferir informações de elevada importância para o biólogo.

Outro fator adverso a um maior envolvimento de Físicos em trabalhos multidisciplinares é a pouca valorização a estes atribuída por uma parcela da comunidade de físicos, que considera esse tipo de trabalho uma descaracterização na formação do pesquisador em Física. Esquecem-se os defensores dessa opinião que os trabalhos pioneiros que ora estão sendo desenvolvidos nesse sentido podem constituir-se no futuro em um elemento importante na consecução de conhecimentos mais profundos sobre a unicidade da natureza, os quais podem atingir metas arrojadas, como por exemplo, o estabelecimento da Física dos fenômenos intra-celulares.

O trabalho apresentado na presente dissertação tem como tema central estudos envolvendo algumas aplicações da Espectroscopia Fotoacústica a sistemas biológicos e tem como amostras em observação o café em forma de pó e folhas de soja. Como técnicas complementares foram também utilizadas a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e a Microscopia Ótica.

Além de apresentar a pesquisa realizada, procuramos expor a teoria do efeito fotoacústico de maneira condensada, mas compreensível ao leitor não familiarizado. Em particular, ênfase é dada nas grandezas mensuráveis pela técnica. A literatura sobre o efeito fotoacústico tem se expandido de uma maneira tão rápida, que é impossível ser atualizada na presente dissertação. Assim, a literatura citada em cada capítulo reflete apenas o nosso interesse no campo. Para um estudo complementar, o leitor interessado poderá consultar os livros de Rosencwaig<sup>(3)</sup>, Pao<sup>(4)</sup>, e os artigos de revisão de Patel e Tam<sup>(5)</sup>, Kinney e Staley<sup>(6)</sup>, Kirkbright e Castleden<sup>(7)</sup> e de Vargas e Miranda<sup>(8)</sup>.

A dissertação está organizada da seguinte maneira:

No Capítulo I a técnica fotoacústica é introduzida. Em particular, é apresentada a teoria atualmente aceita, elaborada por Rosencwaig e Gersho<sup>(9)</sup> para a descrição do efeito. No mesmo capítulo são também descritos de uma forma sucinta os fundamentos da Ressonância Paramagnética Eletrônica.

No Capítulo II são abordadas aplicações da Espectroscopia Fotoacústica na região do infra-vermelho próximo para a determinação de adulterantes comumente encontrados no café torrado e moído. Após uma descrição da aparelhagem utilizada, da preparação e manipulação das amostras, dois métodos para a análise quantitativa são demonstrados e discutidos.

O Capítulo III centra-se no importante problema de determinação da qualidade da bebida do café. Após um breve histórico sobre o método comumente utilizado - o método da degustação do café ou prova de xícara - os resultados são apresentados. É demonstrada uma correlação entre as intensidades dos sinais dos radicais livres (RPE) e intensidades do sinal fotoacústico, para uma mesma amostra. É discutida a validade dos métodos propostos.

No Capítulo IV é inicialmente explicado o método da separação de espectros fotoacústicos na fase. O método é então aplicado para a monitoração de um agente químico (Paraquat) em folhas de soja. É realizada uma comparação dos danos ocasionados em folhas e detectados pelo método, com aqueles observados através da microscopia ótica. O mesmo método é aplicado ao monitoramento de efeitos de três herbicidas do grupo difenil éter nas plantas *Amaranthus* e *Euphorbia*.

Um resumo dos resultados, conclusões e as perspectivas para o prosseguimento da pesquisa constitui o Capítulo V.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIOLOGICAL SCIENCES CURRICULUM STUDY. *Biologia*. Brasília, Editora da Universidade de Brasília, 1965. Caps. 7 e 8.
2. FERMI, G. Three-dimensional Fourier Synthesis of Human Deoxyhaemoglobin at 2.5 Å Resolution: Refinement of the Atomic Model. *J. Mol. Biol.*, 97: 237, 1975.
3. ROSENCWAIG, A. *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*. New York, John Wiley & Sons, 1980.
4. PAO, Y.H. *Opto-acoustic Spectroscopy and Detection*. New York, Academic Press, 1977.
5. PATEL, C.K. & TAM, A.C. Pulsed Optoacoustic Spectroscopy of Condensed Matter. *Rev. Mod. Phys.*, 53: 517, 1981.
6. KINNEY, J.B. & STALEY, R.H. Applications of Photoacoustic Spectroscopy. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 12: 295, 1982.
7. KIRKBRIGHT, G.F. & CASTLEDEN, S.L. Photoacoustic Spectroscopy: New Applications. *Chem. Br.*, 16: 661, 1980.
8. VARGAS, H. & MIRANDA, L.C.M. Photoacoustic and Related Photothermal Techniques. *Physics Reports*, (em publicação).
9. ROSENCWAIG, A. & GERSHO, A. Theory of the Photoacoustic Effect with Solids. *J. Appl. Phys.*, 47: 64, 1976.

## CAPÍTULO I

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS E GENERALIDADES DAS TÉCNICAS UTILIZADAS

#### I.1. EFEITO FOTOACÚSTICO E ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

O efeito fotoacústico é um fenômeno pertencente a um grupo de fenômenos denominados fenômenos fototérmicos e foi descoberto em 1880 por Graham Bell<sup>(1)</sup>. Bell percebeu que quando a luz solar intermitente incidia sobre um sólido colocado em uma câmara, era criado dentro da câmara um som que podia ser ouvido através de um tubo ligado à câmara.

Embora alguns estudiosos da época tenham voltado sua atenção ao fenômeno, atribuindo-lhe diferentes interpretações, o fenômeno caiu no esquecimento só retornando ao panorama científico na década de 30 em estudos de absorção de luz por gases<sup>(2)</sup>. Entretanto seu uso em espectroscopia e sua aplicação a estudos de propriedades de sólidos só veio a incrementar-se na década de 70 com o estabelecimento de bases teóricas e experimentais<sup>(3-10)</sup>.

Presentemente a espectroscopia fotoacústica é alvo de uma enorme gama de aplicações que abrangem não só a física, mas a Química, Biologia, Medicina e Engenharia<sup>(11)</sup>. Análises destrutivas e não-destrutivas de materiais biológicos, que são para nós de particular interesse, tem sido objeto de um aumento gradativo no número de trabalhos publicados<sup>(12-29)</sup>. A1

gumas justificativas do grande interesse despertado pela técnica são a sua versatilidade, a possibilidade da realização de espectroscopia em uma ampla faixa do espectro eletromagnético sem mudança do detetor, a necessidade de um mínimo de preparação das amostras e a possibilidade de estudos de perfil de profundidade da amostra, bem como microscopia superficial.

O modelo atualmente aceito na descrição quantitativa do sinal fotoacústico, elaborado por Rosencwaig e Gersho<sup>(4-7)</sup> baseia-se no esquema da Fig. 1-1, onde a amostra de comprimento  $\ell_s$  é colocada em contato com um suporte de comprimento  $\ell_b$  e com uma camada gasosa (geralmente ar) de comprimento  $\ell_g$ , a qual é selada por uma janela de quartzo, através da qual luz modulada pode incidir na amostra. O gás é mantido em contato com um microfone sensível que pode detectar variações de pressão no gás.

A luz modulada incidente pode ser descrita por uma equação do tipo

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

onde  $I_0$  é a amplitude da luz incidente e  $\omega = 2\pi f$  é a frequência angular de modulação.

Uma série de decaimentos radioativos e não radioativos podem ter origem quando a luz é absorvida pela amostra, produzindo sua excitação óptica. Entre os eventos radioativos que podem ocorrer na desexcitação da amostra podemos citar a fluorescência, luminescência, reações fotoquímicas, etc. O restante da energia absorvida da radiação é convertida em calor no processo conhecido por relaxação térmica. No modelo de Rosencwaig-Gersho é suposta a inexistência de outros eventos que não a relaxação térmica.

O modelo de Rosencwaig-Gersho decorre da aplicação das equações de difusão do calor aos três meios representados na Fig. 1-1 e de

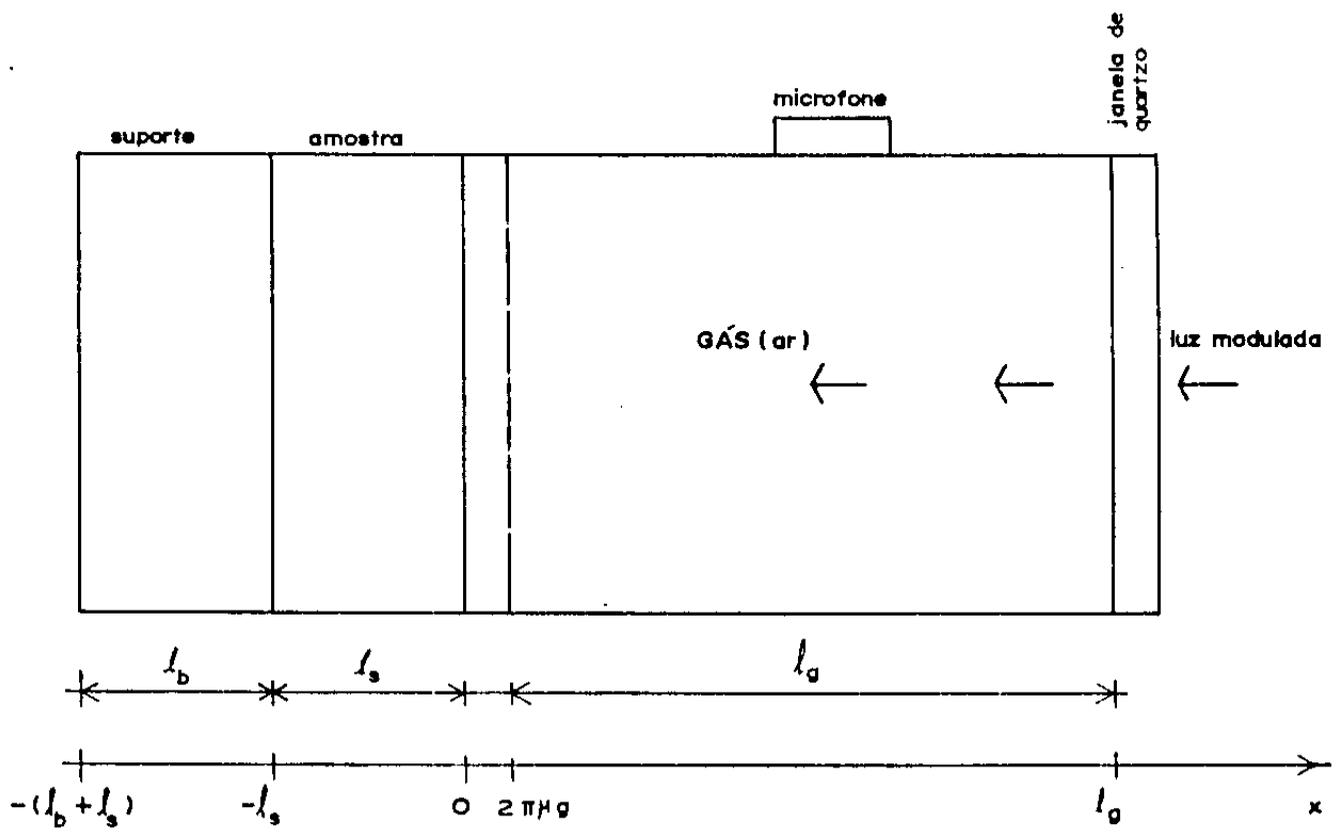


FIG. 1-1

Representação esquemática de uma célula fotoacústica, indicando os parâmetros geométricos da Teoria de Rosenzweig-Gersho.

condições de contorno que supõe a continuidade do fluxo de calor e da temperatura nas superfícies de separação entre dois meios adjacentes. Feitas essas hipóteses a solução obtida para a flutuação de temperatura no gás é dada por

$$T_g = \theta e^{-\sigma_g x} e^{j\omega t} \quad (1-2)$$

onde

$$\theta = \frac{\beta I_0}{2k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \left[ \frac{(r-1)(b+1) e^{\ell_s \sigma_s} - (r+1)(b-1) e^{-\ell_s \sigma_s} + 2(b-r) e^{-\beta \ell_s}}{(g+1)(b+1) e^{\ell_s \sigma_s} - (g-1)(b-1) e^{-\ell_s \sigma_s}} \right] \quad (1-3)$$

é a temperatura na interface amostra-gás. Definiremos agora uma série de parâmetros que comparecem na Eq. (1-3) ou que estejam com os mesmos relacionados. No que se segue, o índice  $i$  representará:  $i=g$  (gás),  $i=s$  (amostra),  $i=b$  (suporte)

coeficiente complexo de difusão térmica:	$\sigma_i = (1+j) a_i$	(cm <sup>-1</sup> )
coeficiente de difusão térmica:	$a_i = \sqrt{\frac{\omega}{2 \alpha_i}}$	(cm <sup>-1</sup> )
comprimento de difusão térmica:	$\mu_i = \frac{1}{a_i}$	(cm)
difusividade térmica:	$\alpha_i = \frac{k_i}{\rho_i C_i}$	(cm <sup>2</sup> /s)
condutividade térmica:	$k_i$	(cal/cm.s. <sup>0</sup> C)
densidade volumétrica:	$\rho_i$	(g/cm <sup>3</sup> )
calor específico:	$C_i$	(cal/g. <sup>0</sup> C)
coeficiente de absorção óptica da amostra:	$\beta$	(cm <sup>-1</sup> )

$$r = \frac{\beta}{\sigma_s} \quad , \quad g = \frac{k_g \sigma_g}{k_s \sigma_s} \quad , \quad b = \frac{k_b \sigma_b}{k_s \sigma_s}$$

O decaimento exponencial na Eq.(1-2) revela que as flutuações de temperatura no gás tendem a zero para pontos afastados da superfície da amostra, de tal forma que a uma distância  $2\pi\mu_g$  a flutuação de temperatura já é muito pequena. Rosencwaig e Gersho propõe, então, que somente uma camada gasosa de comprimento  $2\pi\mu_g$  adjacente à superfície da amostra é capaz de responder termicamente à flutuação de temperatura na superfície da amostra, exercendo o papel de um pistão acústico sobre o restante da coluna de gás. Supondo que essa coluna de gás responda adiabaticamente à ação desse pistão, a pressão acústica na célula é dada por

$$\delta P = \frac{\gamma P_0 \theta}{\ell_g \sigma_g T_0} e^{j\omega t} \quad (1-4)$$

sendo  $P_0$  a pressão,  $T_0$  a temperatura absoluta na coluna de gás e  $\gamma$  o quociente entre o calor específico à pressão constante e calor específico a volume constante do gás.

A eq. (1-4) para o sinal fotoacústico, embora complicada, geralmente não é usada na íntegra. Dependendo das propriedades ópticas, térmicas e geométricas da amostra ela é substancialmente simplificada. São mostrados na Tab.1-1 os resultados da consideração de alguns casos particulares à amplitude do sinal fotoacústico. Para uma amostra opticamente fina, por exemplo, temos  $\beta\ell_s \ll 1$ , enquanto para uma amostra opticamente grossa  $\beta\ell_s \gg 1$ . Para uma amostra termicamente fina  $\ell_s a_s \ll 1$  e para uma amostra termicamente grossa  $\ell_s a_s \gg 1$ . Os dados constantes na Tab.1-1 são resultado de algumas manipulações matemáticas realizadas na Eq. (1-4) a fim de realçar a dependência do sinal fotoacústico com a frequência de modulação. Observa-se que o sinal fotoacústico é sempre inversamente proporcional a alguma potência da frequência de modulação. Essa dependência com o inverso de frequência de modulação também ocorre com o comprimento de difusão térmica  $\mu_s = (\alpha_s/\pi f)^{1/2}$ , o que conduz à possibilidade de se realizar uma análise

de perfil de profundidade da amostra variando a frequência de modulação. Essa é uma característica exclusiva da técnica fotoacústica. Nota-se ainda na Tab. 1-1 em vários casos o comprometimento do sinal fotoacústico com parâmetros ópticos e térmicos da amostra, e que portanto podem ser determinados em experimentos utilizando a técnica fotoacústica.

Tabela 1-1. Dependência do sinal fotoacústico com as propriedades ópticas e térmicas conforme previsto pelo modelo de Rosencwaig-Gersho em alguns casos limites.

CASO	AMPLITUDE APROXIMADA DO SINAL FOTOACÚSTICO
$\beta l_s \ll 1; l_s \ll \mu_s$	$\frac{\beta l_s (\alpha_g \alpha_b)^{1/2}}{k_b f}$
$\beta l_s \ll 1; l_s \ll \mu_s$	$\frac{\beta \alpha_s \alpha_g^{1/2}}{k_s f^{3/2}}$
$\beta l_s \ll 1; l_s \ll \mu_s; \beta \mu_s \gg 1$	$\frac{(\alpha_b \alpha_g)^{1/2}}{k_b f}$
$\beta l_s \gg 1; l_s > \mu_s; \beta \mu_s > 1$	$\frac{(\alpha_s \alpha_g)^{1/2}}{k_s f}$
$\beta l_s \gg 1; l_s \gg \mu_s; \beta \mu_s < 1$	$\frac{\beta (\alpha_s \alpha_g)^{1/2}}{k_s f^{3/2}}$

Devemos ainda considerar a existência de uma defasagem entre a incidência da radiação luminosa e a variação da pressão acústica na célula. Essa defasagem é denominada fase do sinal fotoacústico e é dada para o caso de amostras termicamente grossas por  $\phi = \arctg(\beta/a_s + 1)$ . A rigor a

fase do sinal fotoacústico é definida como sendo a média ponderada das fases de todos os pontos da amostra dentro do comprimento de difusão térmica. Portanto, incluindo a fase fotoacústica, a Eq.(1-4) fica

$$\delta P = \frac{\gamma P_0 \theta}{\ell_g \sigma_g T_0} e^{j(\omega t + \phi)} = \frac{\gamma P_0 \theta}{\ell_g \sigma_g T_0} e^{j\phi} e^{j\omega t} \quad (1-5)$$

A oscilação temporal da variação de pressão na célula permite sua representação instantânea por meio de um vetor ou fasor girante no plano complexo, conforme mostrado na Fig. 1-2. Segundo essa representação podemos escrever

$$\vec{\delta P} = \vec{S}_F e^{j\omega t}, \quad (1-6)$$

$$\text{onde } \vec{S}_F = S_F e^{j\phi} \quad \text{e} \quad S_F = \frac{\gamma P_0 \theta}{\ell_g \sigma_g T_0},$$

ou seja, o sinal fotoacústico pode ser definido como sendo a componente não temporal da variação de pressão na célula, contendo uma intensidade  $S_F$  e uma fase  $\phi$ .

As grandezas tensão e corrente alternadas possuem perfeita analogia com o sinal fotoacústico e recebem na eletricidade semelhante representação (30). Portanto o sinal fotoacústico pode ser expresso por

$$\vec{S}_F = S_F \cos \phi + j S_F \sin \phi \quad (1-7)$$

onde  $j$  é a unidade complexa imaginária. É válido também que

$$S_F = \sqrt{S_F^2 \cos^2 \phi + S_F^2 \sin^2 \phi} \quad (1-8)$$

A teoria para o sinal fotoacústico aqui apresentada foi amplamente testada para amostras sólidas e líquidas numa grande faixa de frequências de modulação e potências de radiação incidente. Para situações não previstas no modelo de Rosencwaig-Gersho a literatura registra a existência

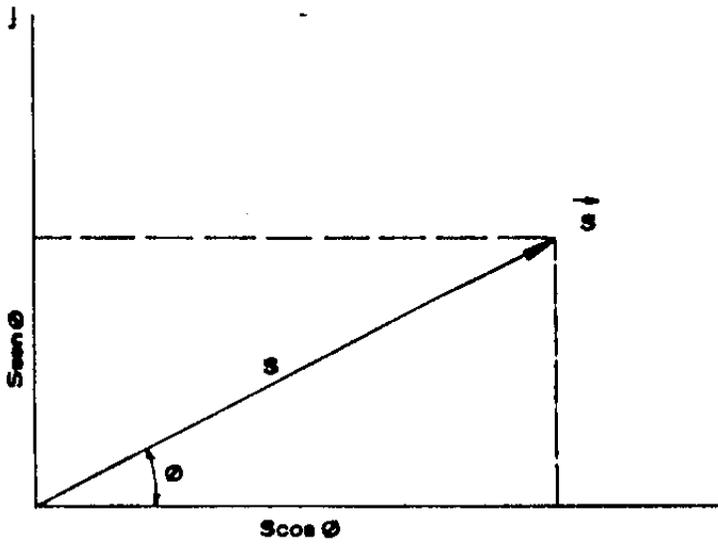


FIG. 1-2

Representação fasorial ou vetorial do sinal fotoacústico.

de modelos extendidos<sup>(31-37)</sup> que introduzem refinamentos na teoria com o intuito de torná-la mais completa ou de adaptá-la a situações experimentais menos comuns.

Os conceitos aqui abordados serão utilizados no Cap. II na quantificação dos adulterantes do café torrado em pó, no Cap. III na identificação da qualidade da bebida do café e no Cap. IV na monitoração de efeitos de herbicidas em folhas.

Para finalizar, ressaltamos que a técnica fotoacústica foi introduzida pioneiramente no Brasil em 1977 no IFGW da Unicamp, tendo desde então gerado um grande e variado número de trabalhos, quer de responsabilidade única do grupo, quer através da interação com outros grupos de pesquisa engajados na área<sup>(38-46)</sup>. O envolvimento de estudantes de pós-graduação em trabalhos desenvolvidos pelo grupo também deu origem a várias teses de mestrado e doutorado<sup>(47-53)</sup>, caso em que nos incluimos.

## I.2. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

### I.2.1. Abordagem Clássica do Fenômeno

Os princípios da RPE que são os mesmos da RMN foram estabelecidos em 1946 por F. Bloch<sup>(54)</sup> com base em argumentos clássicos.

Sabe-se do Eletromagnetismo clássico que um dipolo magnético  $\vec{\mu}$  colocado em um campo magnético estático  $\vec{H}_0$  sofrerá a ação de um torque dado por

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{H}_0 \quad (1-9)$$

Este torque tenderá a produzir o alinhamento do dipolo com o campo, implicando em alteração do ângulo  $\theta$  representado na Fig. 1-3.

A alteração do ângulo  $\theta$  por sua vez implicará em variação na energia potencial magnética do sistema dipolo-campo, que é dada por

$$E = - \vec{\mu} \cdot \vec{H}_0 = -\mu H_0 \cos \theta \quad (1-10)$$

Por outro lado, se o sistema físico dipolo magnético possuir também um momento angular  $\vec{\ell}$ , a existência do torque acarretará na variação em direção do vetor momento angular, que passará a precessionar em torno da direção do campo  $\vec{H}_0$ , com frequência angular que denominaremos  $\omega_0$ . Essa precessão é semelhante à conhecida precessão de um pião em torno da direção vertical e ambas são conhecidas como precessões de Larmor. A frequência de precessão de Larmor é dada neste caso por

$$\omega_0 = \gamma H_0$$

sendo  $\gamma$  denominada de constante giromagnética, que é também a constante de proporcionalidade entre os vetores  $\vec{\mu}$  e  $\vec{\ell}$ . Ocorrendo a precessão, a componente do vetor na direção do campo  $H_0$  não sofrerá alteração, ao passo que as componentes em um sistema de eixos perpendiculares à direção de  $\vec{H}_0$  assu

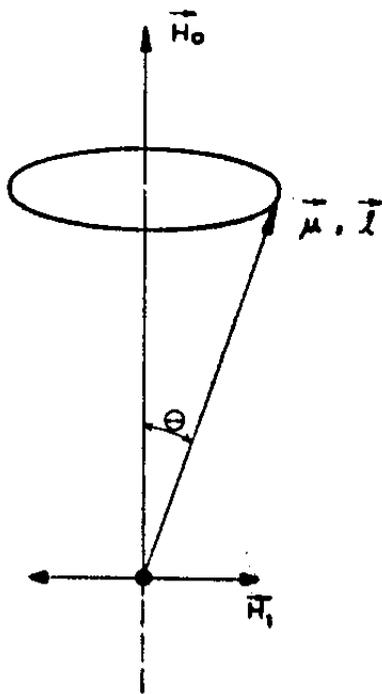


FIG. 1-3

Representação esquemática da processão de um spin em torno do campo estático  $\vec{H}_0$ . A aplicação de um campo oscilante  $\vec{H}_1$  perpendicular a  $\vec{H}_0$  pode produzir a ressonância.

mirão valores oscilatórios.

Se agora aplicarmos um campo magnético  $\vec{H}_1$  oscilante, com direção perpendicular a  $\vec{H}_0$ , o dipolo magnético absorverá energia, ocorrendo variação no ângulo  $\theta$ . Essa absorção de energia será máxima quando a frequência de oscilação do campo  $\vec{H}_1$  coincidir com a frequência de precessão do dipolo, sendo esta condição denominada de condição de ressonância.

Bloch considerou um sistema de dipolos magnéticos (spins) ao qual associou um vetor magnetização  $\vec{M}$  (momento de dipolo magnético por unidade de volume) e aplicou a equação do movimento

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \times \vec{H} \quad (1-11)$$

onde  $\vec{H}$  é o campo instantâneo resultante da composição vetor entre  $\vec{H}_0$  e  $\vec{H}_1$ . Resolvendo a Eq. (1-11) Bloch obteve a expressão para a susceptibilidade magnética  $\chi$ , a qual no caso estático é dada simplesmente por

$$\vec{M}_0 = \chi_0 \vec{H}_0 \quad (1-12)$$

o resultado obtido por Bloch é dado por

$$\chi = \chi' + i \chi'' \quad (1-13)$$

sendo  $\chi'$  a componente dispersiva da susceptibilidade e  $\chi''$  a componente absorptiva. Nos estudos realizados no presente trabalho somente a componente absorptiva exercerá papel importante, sendo dada explicitamente por

$$\chi'' = \frac{1}{2} \frac{\chi_0 \omega_0 T_2}{1 + (\omega_1 - \omega_0)^2 T_2^2 + \gamma_1^2 H_1 T_1 T_2} \quad (1-14)$$

onde  $\omega_1$  e  $H_1$  são respectivamente a frequência de oscilação e a amplitude do campo oscilante  $\vec{H}_1$ ,  $T_1$  é definido como tempo de relaxação spin-rede e  $T_2$  é denominado tempo de relaxação spin-spin.

É mostrada na Fig. I-4 a curva representativa de  $\chi''$ . Essa cur

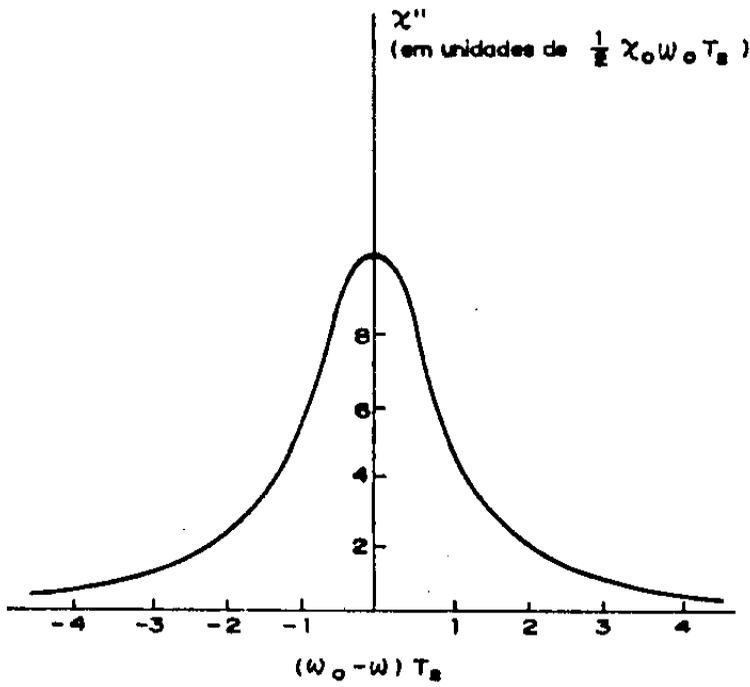


FIG. 1-4

Curva representativa da componente ab sortiva da susceptibilidade magnética.

va acompanha o comportamento da absorção de energia por parte do sistema de spins e deveria ser a curva obtida em nossos experimentos de RPE. Entretanto o arranjo experimental frequentemente utilizado para estudo desse fenômeno é construído de modo a manter fixa a frequência  $\omega_1$ , permitindo a variação no módulo de  $\vec{H}_0$ , até que seja atingida uma situação em que a relação

$$H_0 = \frac{\omega_1}{\gamma}$$

seja satisfeita por  $H_0$ , conforme mostra a Fig. 1-5a.

Além disso, por razões de melhoria na qualidade da detecção, o sistema experimental é construído de modo que sejam impostas pequenas variações oscilatórias na intensidade do campo  $H_0$ , ou seja o campo  $H_0$  é modulado por um campo alternado  $H_m$ . Conseqüentemente, a detecção da ressonância é realizada através da derivada da componente absorptiva da susceptibilidade, que é representada pela curva mostrada na Fig. 1-5b.

Uma integração da curva de absorção (área sob a curva) ou duas integrações consecutivas da derivada da absorção fornecem um resultado que é proporcional à energia absorvida pelo sistema de spins e portanto proporcional ao número de spins presentes e ao módulo do momento de dipolo magnético a eles associado.

Pode-se mostrar<sup>(55)</sup> que o cálculo dessas integrações resulta num valor que é proporcional ao produto da intensidade "pico a pico" da curva obtida em RPE pelo quadrado da largura de linha medida de "pico a pico", ou seja:

$$A \propto y_m \Delta H_{pp}^2 \quad (1-15)$$

A largura de linha  $\Delta H_{pp}$  possui estreita relação com o tempo de relaxação spin-spin, ou seja com a interação spin-spin. Por isso, a largura de linha pode servir como elemento diferenciador de sistemas de spins

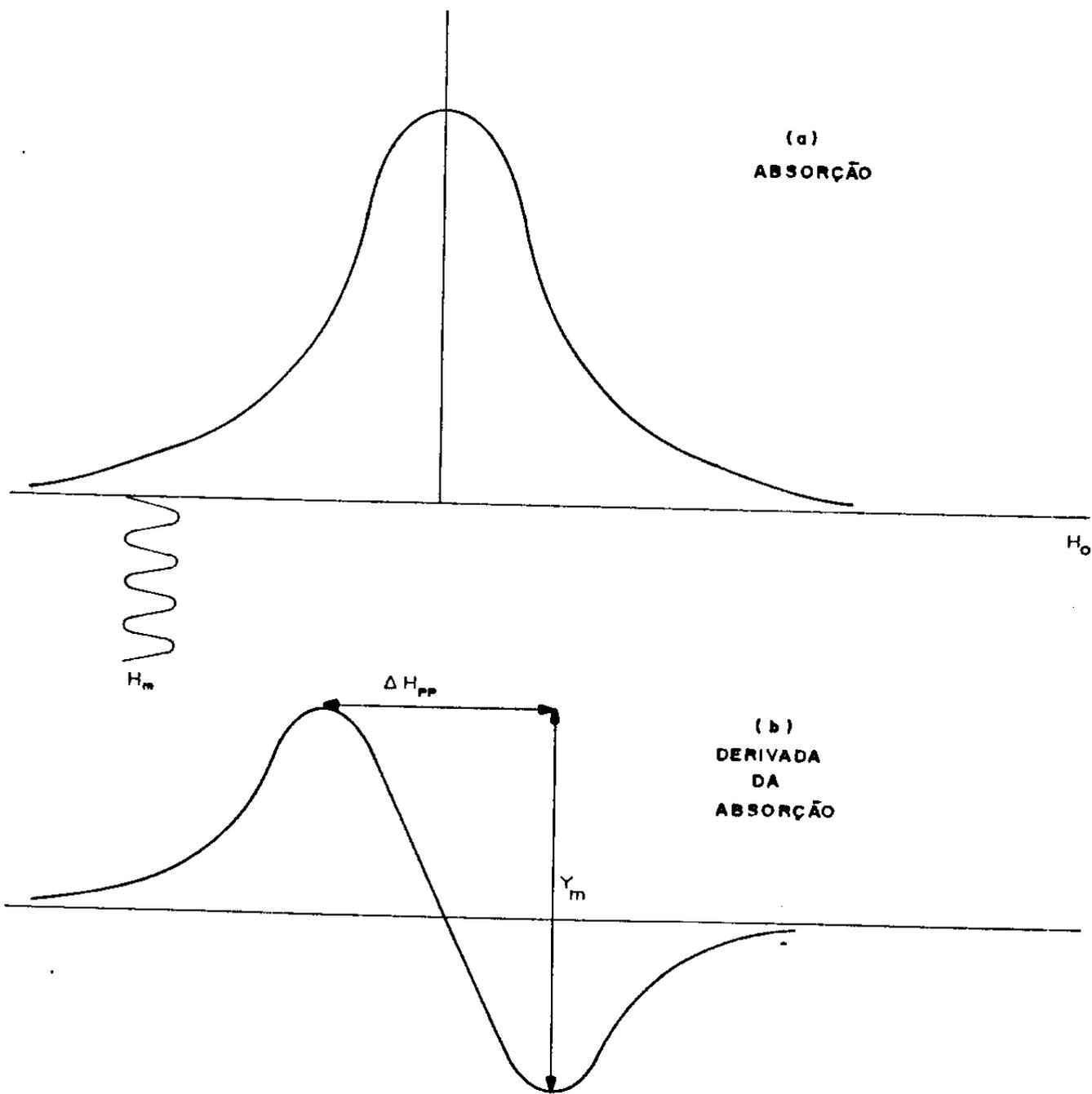


FIG. 1-5

(a) curva representativa da componente absorptiva da susceptibilidade magnética em função do campo estático  $H_0$ , para  $\omega_1$  fixo; (b) a derivada da absorção, curva que geralmente é obtida no fenômeno da ressonância magnética.

distintos. Notamos também que a amplitude "pico a pico" da curva é proporcional à energia absorvida pelo sistema de spins. Portanto, essa amplitude pode também servir como elemento diferenciador de sistemas de spins. Por fim a razão giromagnética  $\gamma = \omega_0 / H_0$  é também um elemento diferenciador de sistemas de spins. Na prática, porém, é mais utilizado o fator g de Landé que lhe é proporcional e que será mencionado no item 1.2.2.

### 1.2.2. Abordagem Quântica do Fenômeno

Do ponto de vista quântico, é considerado que os dipolos magnéticos ou spins ao absorver energia não podem assumir variações contínuas na sua orientação (ângulo  $\theta$ ), sendo finito o número de orientações possíveis. Para uma partícula de spin S existem  $2S+1$  orientações possíveis, que são designadas por um número quântico magnético que pode assumir os valores  $M_S = S, S-1, S-2, \dots, -S+1, -S$ .

A energia do sistema spin-campo magnético no caso de nosso interesse provém do termo de Zeeman da Hamiltoniana total do sistema e é dada por

$$E = - g\beta H_0 M_S \quad (1-16)$$

onde g é denominado fator de Landé, o qual no caso de elétron livre assume o valor 2,00... . A constante  $\beta$  é denominada de Magneton de Bohr, assumindo o valor  $9,2732 \times 10^{-21}$  erg/G para o elétron.

Para sistemas onde  $S = 1/2$ , que é o caso de nosso interesse, a equação (1-16) mostra que a energia só pode assumir dois valores, dependendo de  $M_S$  assumir o valor  $+1/2$  ou  $-1/2$ , o que por sua vez implica em duas orientações possíveis para o spin: no sentido de  $H_0$  ou no sentido contrário ao de  $H_0$ . São vistas na Fig. 1-6 a representação esquemática das possíveis orientações do spin e a variação da energia de cada nível do sistema spin-

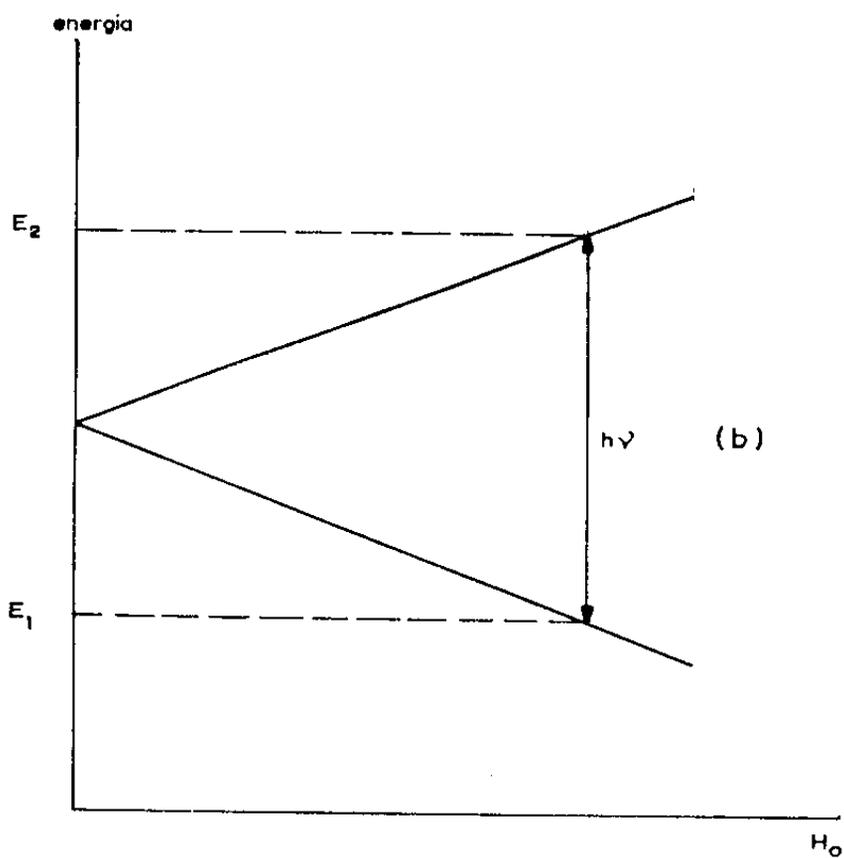
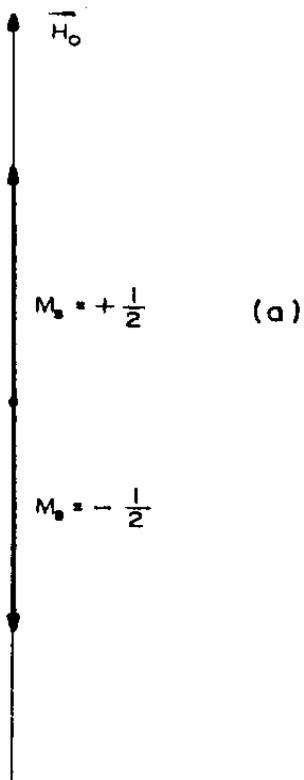


FIG. 1-6

(a) possíveis orientações que um spin com  $S = 1/2$  pode assumir; (b) variação da energia magnética desse spin em função de  $H_0$ , para cada orientação.

campo, correspondente a cada orientação.

A diferença entre os dois níveis de energia para um valor arbitrário de  $H_0$  é dada por

$$\Delta E = E_2 - E_1 = g\beta H_0 \quad (1-17)$$

Se no sistema de spins incidir um fóton (onda eletromagnética) de energia  $h\nu_0$ , onde  $h$  é a constante de Planck e  $\nu_0$  a frequência do fóton, de tal forma que essa energia seja igual a  $\Delta E$ , promoveremos transições do nível de menor para o de maior energia, sendo essa a condição de ressonância do ponto de vista quântico. Nessa condição temos

$$h\nu_0 = g\beta H_0 \rightarrow h \frac{\omega_0}{2\pi} = g\beta H_0 \rightarrow \hbar \omega_0 = g\beta H_0, \omega_0 = \frac{g\beta H_0}{\hbar} \quad (1-18)$$

A equação (1-18) fornece a frequência de ressonância no caso quântico e define a relação de proporcionalidade entre o fator  $g$  e a constante giromagnética para o elétron.

Nas experiências de RPE os fótons incidentes são produzidos por uma fonte de micro-ondas.

O paralelo entre a abordagem clássica e a abordagem quântica fundamenta-se no fato da onda eletromagnética incidente ser constituída de campos elétricos e magnéticos oscilantes e mutuamente perpendiculares, sendo que o campo magnético associado a essa onda equivale ao campo oscilante  $\vec{H}_1$  considerado na abordagem clássica.

Na presente dissertação a técnica RPE será utilizada no Cap. III na identificação das diversas bebidas originadas pelo café produzido no Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELL, A.G. On the Production and Reproduction of Sound by Light. *Am. J. Sci.*, 120: 305, 1880.
2. VIENGEROV, M.L. *Dokl. Akad Nauk SSSR*, 19: 687, 1938.
3. KREUZER, L.B. Ultralow Gas Concentration Infrared Absorption Spectroscopy. *J. Appl. Phys.*, 42(7): 2934, 1971.
4. ROSENCWAIG, A. Photoacoustic Spectroscopy of Solids. *Optics Commun.*, 7(4): 305, 1973.
5. ROSENCWAIG, A. Photoacoustic Spectroscopy of Solids. *Physics Today*, p.23, setembro, 1975.
6. ROSENCWAIG, A. & GERSHO, A. Photoacoustic Effect with Solids: A Theoretical Treatment. *Science*, 190: 556, 1975.
7. ROSENCWAIG, A. & GERSHO, A. Theory of the Photoacoustic Effect with Solids. *J. Appl. Phys.*, 47(1): 64, 1976.
8. ADAMS, M.J.; KING, A.A. & KIRKBRIGHT, G.F. Analytical Optoacoustic Spectroscopy, Part I: Instrument Assembly and Performance Characteristics. *Analyst*, 101: 73, 1976.
9. ADAMS, M.J.; BEADLE, B.C.; KING, A.A. & KIRKBRIGHT, G.F. Analytical Optoacoustic Spectroscopy, Part II: Ultraviolet and Visible Optoacoustic Spectra of Some Inorganic, Biochemical and Phytochemical Samples. *Analyst*, 101: 553, 1976.
10. ADAMS, M.J. & KIRKBRIGHT, G.F. Analytical Optoacoustic Spectroscopy, Part III: The Optoacoustic Effect and Thermal Diffusivity. *Analyst*, 102: 281, 1977.
11. ROSENCWAIG, A. *Photoacoustics & Photoacoustic Spectroscopy*. New York, John Wiley & Sons, 1980.

12. ROSENCWAIG, A. Photoacoustic Spectroscopy of Biological Materials. *Science*, 181: 657, 1973.
13. MACKENTHUN, M.L.; TOM, R.D. & MOORE, T.A. Lobster Shell Carotenoprotein Organisation *in situ* Studied by Photoacoustic Spectroscopy. *Nature*, 279: 265, 1979.
14. CAMPBELL, S.D.; YEE, S.S. & AFROMOWITZ, M.A. Applications of Photoacoustic Spectroscopy to Problems in Dermatology Research. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, BME 26(4): 220, 1979.
15. VEJUX, A.M. & BAE, P. Photoacoustic Spectrometry of Macroporous Hemoglobin Particles. *J. Opt. Soc. Am.*, 70(5): 560, 1980.
16. ROCKLEY, M.G.; DAVIS, D.M. & RICHARDSON, H.H. Fourier-Transformed Infrared Photoacoustic Spectroscopy of Biological Materials. *Science*, 210: 918, 1980.
17. BUSCHMANN, C. & PREHN, H. *In Vivo* Studies of Radiative and Non-Radiative De-Excitation Processes of Pigments in *Raphanus* Seedlings by Photoacoustic Spectroscopy. *Photobiochem. and Photobiophys.*, 2: 209, 1981.
18. LIMA, C.A.S.; MATTOS, J.C.V.; MIRANDA, L.C.M.; PENNA, A.F.S.; BÜLOW, J. F.W. & GHIZONI, C.C. Photoacoustic Assessment of Prospective Plant Productivity. *J. Photoac.*, 1(1): 61, 1982.
19. GOULD, J.M. Characterization of Lignin *in situ* by Photoacoustic Spectroscopy. *Plant Physiol.*, 70: 1521, 1982.
20. BULTS, G.; HORWITZ, B.A.; MALKIN, S. & CAHEN, D. Photoacoustic Measurements of Photosynthetic Activities in Whole Leaves: Photochemistry and Gas Exchange. *Bioch. Biophys. Acta*, 679: 452, 1982.
21. POULET, P.; CAHEN, D. & MALKIN, S. Photoacoustic Detection of Photosynthetic Oxygen Evolution from Leaves: Quantitative Analysis by Phase and Amplitude Measurements. *Bioch. Biophys. Acta*, 724: 433, 1983.

22. O'HARA, E.P.; TOM, R.D. & MOORE, T.A. Determination of the *in vivo* Absorption and Photosynthetic Properties of the Lichen *Acarospora Scheleicheri* Using Photoacoustic Spectroscopy. *Photoch. Photobiol.*, 38 (6): 709, 1983.
23. ALTER, G.M. Comparison of Solution and Crystalline State Protein Structures: Photoacoustic Study of Horse and Human Hemoglobins. *J. Biol. Chem.*, 258 (24): 14966, 1983.
24. BÜCHNER, B.; KORPIUN, P.; LÜSCHER, E. & SCHÖNHERR, J. Influence of the Transport of Water in Plant Cuticles on the Photoacoustic Signal. *J. Phys.*, 44: 125, 1983.
25. PANDEY, G.C. Photoacoustic Spectroscopy in the Study of Metal Toxicity. *J. Phys.*, 44: 379, 1983.
26. ANJO, D.M. & MOORE, T.A. A Photoacoustic Depth Profile of  $\beta$ -Carotene in Skin. *Photoch. Photobiol.*, 39 (5): 635, 1984.
27. HAVAUX, M.; CANAANI, O. & MALKIN, S. Photosynthetic Responses of Leaves to Water Stress, Expressed by Photoacoustics and Related Methods: Probing the Photoacoustic Method as an Indicator for Water Stress *in vivo*. *Plant Physiol.*, 82: 827, 1986.
28. HAVAUX, M.; CANAANI, O. & MALKIN, S. Photosynthetic Responses of Leaves to Water Stress, Expressed by Photoacoustics and Related Methods: The Effect of Rapid Drought on the Electron Transport and the Relative Activities of the Two Photosystems. *Plant Physiol.*, 82: 834, 1986.
29. NERY, J.W.; PESSOA Jr., O.; VARGAS, H.; REIS, F.A.M.; GABRIELLI, A.C.; MIRANDA, L.C.M. & VINHA, C.A. Photoacoustic Spectroscopy for Depth-Profile Analysis and Herbicide Monitoring in Leaves. *Analyst*, 112: 1487, 1987.
30. EDMINISTER, J.A. *Circuitos elétricos*. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1985. Cap.VI.

31. AAMODT, L.C.; MURPHY, J.C. & PARKER, J.G. Size Considerations in the Design of Cells for Photoacoustic Spectroscopy. *J. Appl. Phys.*, 48 (3): 927, 1977.
32. AFROMOVITZ, M.A.; YEH, P. & YEE, S. Photoacoustic Measurements of Spatially Varying Optical Absorption in Solids: A Theoretical Treatment. *J. Appl. Phys.*, 48 (1): 209, 1977.
33. McDONALD, F.A. & WETSEL Jr., G.C. Generalized Theory of the Photoacoustic Effect. *J. Appl. Phys.*, 49 (4): 2313, 1978.
34. McDONALD, F.A. Photoacoustic Determination of Small Optical Absorption Coefficients: Extended Theory. *Appl. Optics*, 18 (9): 1363, 1979.
35. BENNETT, H.S. & FORMAN, R.A. Frequency Dependence of Photoacoustic Spectroscopy: Surface-and Bulk-Absorption Coefficients. *J. Appl. Phys.*, 48(4): 1432, 1977.
36. CESAR, C.L.; VARGAS, H.; MEYER, J.A. & MIRANDA, L.C.M. Photoacoustic Effect in Solids. *Phys. Rev. Lett.*, 42(23): 1570, 1979.
37. QUIMBY, R.S. & YEN, W.M. Photoacoustic Theory Including Energy Migration. *J. Appl. Phys.*, 51 (9): 4985, 1980.
38. SIQUEIRA, M.A.A.; GHIZONI, C.C.; VARGAS, J.I.; MENEZES, E.A.; VARGAS, H. & MIRANDA, L.C.M. On the Use of the Photoacoustic Effect for Investigating Phase-transitions in Solids. *J. Appl. Phys.*, 51(3): 1403, 1980.
39. CESAR, C.L.; VARGAS, H.; MENDES FILHO, J. & MIRANDA, L.C.M. Photoacoustic Determination of Thermal Diffusivity of Solids: Application to CdS. *Appl. Phys. Lett.*, 43 (6): 555, 1983.
40. CESAR, C.L.; VARGAS, H.; PELZL, J. & MIRANDA, L.C.M. Phase-resolved Photoacoustic Microscopy: Application to Ferromagnetic Layered Samples. *J. Appl. Phys.*, 55(10): 3460, 1984.
41. NETZELMANN, U.; PELZL, J.; VARGAS, H.; CESAR, C.L. & MIRANDA, L.C.M. Photoacoustic Detection of FMR Depth Profiles. *IEEE Trans. on Magn.*, MAG-20 (5): 1252, 1984.

42. CESAR, C.L.; LIMA, C.A.S.; LEITE, N.F.; VARGAS, H.; RUBIRA, A.F. & GALEMBECK, F. Optical Absorption Measurements in a New Composite Material by Combined Photoacoustic and Beam Transmission Techniques. *J. Appl. Phys.*, 57 (9): 4431, 1985.
43. PESSOA Jr., O.; CESAR, C.L.; PATEL, N.A.; VARGAS, H.; GHIZONI, C.C. & MIRANDA, L.C.M. Two-beam Photoacoustic Phase Measurement of the Thermal Diffusivity of Solids. *J. Appl. Phys.*, 59(4): 1316, 1986.
44. FARIA Jr., I.F.; GHIZONI, C.C.; MIRANDA, L.C.M. & VARGAS, H. Photopyroelectric Versus Photoacoustic Characterization of Photovoltaic Cells. *J. Appl. Phys.*, 59(9): 3294, 1986.
45. MELLO, S.M.N.; GHIZONI, C.C.; MIRANDA, L.C.M. & VARGAS, H. Photoacoustic Characterization of Photovoltaic Cells. *J. Appl. Phys.*, 61 (11): 5176, 1987.
46. BENTO, A.C.; VARGAS, H.; AGUIAR, M.M.F. & MIRANDA, L.C.M. Photoacoustic Characterization of Quartz: Thermal Diffusivity. *Phys. Chem. of Glasses*, 28(3): 127, 1987.
47. CESAR, C.L. *Aplicações do Efeito Fotoacústico*. Tese de Doutorado apresentada no IFGW-Unicamp em 1985.
48. PESSOA Jr., O. *Aplicações de Medidas de Fase do Efeito Fotoacústico*. Tese de Mestrado apresentada no IFGW-Unicamp em 1985.
49. NERI, J.W. *Aplicação do Efeito Fotoacústico a Sistemas Biológicos*. Tese de Mestrado apresentada no IFGW-Unicamp em 1986.
50. CELLA, N. *Contribuição por Espectroscopia Fotoacústica ao Estudo de Propriedades Térmicas dos Polímeros*. Tese de Mestrado apresentada no IFGW-Unicamp em 1987.
51. BENTO, A.C. *Aplicações da Espectroscopia Fotoacústica em Materiais Transparentes*. Tese de Mestrado apresentada no IFGW-Unicamp em 1987.

52. LEITE, N.F. *Contribuição por Ressonância Paramagnética Eletrônica e Espectroscopia Fotoacústica ao Estudo de Materiais Catalíticos Suportados em Polímeros Inertes*. Tese de Doutorado apresentada no IFGW-Unicamp em 1987.
53. LIMA, G.A.R. *Aplicação da Espectroscopia Fotoacústica em Vidros Dopados com Ions Metálicos*. Tese de Mestrado apresentada no IFGW-Unicamp em 1987.
54. BLOCH, F. Nuclear Induction. *Phys. Rev.*, 70(7,8): 460, 1946.
55. POOLE, C.P. *Electron Spin Resonance*. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, 1983. p.483.

## CAPÍTULO II

### APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA NA DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES DO CAFÉ EM PÓ

#### Introdução

O número de adulterações do café torrado e moído comercializado no Brasil tem experimentado um aumento progressivo, conforme mostrado na Tab. II-1. Além disso, o teor de adulterantes também tem atingido valores muitos altos, como é mostrado na Tabela II-2.

Essas constatações impõem que métodos que reünam ao mesmo tempo precisão e rapidez de análise sejam aplicados à determinação desses adulterantes, viabilizando a eficiência na fiscalização e no controle de qualidade do produto.

Atualmente a determinação de adulterantes do café é realizada no Brasil aplicando-se o método desenvolvido por F.C. Lopes<sup>(1,2)</sup> no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo e é realizada pelo IBC. O método consiste das seguintes etapas:

a) a amostra de café a ser analisada, numa quantidade de 200 g, é inicialmente homogeneizada sobre uma cartolina ou plástico, utilizando-se uma pá, do tipo de pedreiro.

Tabela 2-1. Análises de adulterantes no café torrado e moído

ANO	AMOSTRAS ANALISADAS		
	Isentas de Impurezas	Com adulteração	Total
1969	3309 (99,8)	7 (0,2)	3316
1970	2311 (96,9)	74 (3,1)	2385
1971	3987 (98,0)	85 (2,0)	4072
1972	3102 (96,3)	120 (3,7)	3222
1973	2680 (87,9)	368 (12,1)	3048
1985	354 (62,0)	222 (38,0)	576
1986	291 (57,0)	219 (43,0)	510

Obs: os valores entre parênteses referem-se aos respectivos percentuais.

Fontes: Instituto Adolfo Lutz (1969 a 1973)

IBC - Núcleo Técnico de Campinas (1985 e 1986)

Tabela 2-2. Teor de adulterantes em amostras de café analisadas em 1986

Nº DA AMOSTRA	PORCENTUAL DE ADULTERANTE(S)	ADULTERANTE(S)
287	27,7	cevada
326	24,0	casca e paus
462	27,5 14,0	milho casca e paus
480	83,0 2,1	milho sedimentos (areia e terra)
492	81,0	milho

Fonte: IBC-Núcleo Técnico de Campinas-SP.

- b) Feita a homogeneização, uma quantidade de 2 g é colocada em recipiente que contem 60 ml de clorofórmio e é mexida vagarosamente com um bastão de vidro. Caso existam sólidos não solúveis, tais como terra, areia, etc. estes precipitarão ao fundo do recipiente.
- c) Os sedimentos são coletados em recipientes à parte e pesados após a evaporação do clorofórmio.
- d) O café, ainda em presença do clorofórmio, é agitado mais bruscamente e demoradamente com o bastão. Após permanecer em contato durante 20 minutos com o clorofórmio, tempo suficiente para que o conteúdo graxo existente seja dissolvido, o pó é coletado e levado a secar em estufa a  $50^{\circ}\text{C}$ , sendo evaporado o clorofórmio restante.
- e) O café e demais adulterantes presentes, agora secos e livres dos conteūdos graxos que conferiam às partículas grande agregação, são peneirados em peneira tamis nº 80 (malha de 0,177 mm) para eliminação do pó fino.
- f) Do pó que não atravessa a peneira são coletados 0,2 g que são colocados sob observação em um microscópio com aumento de 20 X, o que permite ao analista experimentado identificar quais os adulterantes presentes. Nessa etapa da análise o analista deliberará se deve ou não prosseguir com a análise. Caso o número de partículas seja muito pequeno, ou seja, o teor total de adulterantes aparente ser inferior a 1%, a amostra é considerada como dentro dos padrões permitidos de impurezas. Caso contrãrio, a análise prosseguirá.

g) Feita a identificação dos adulterantes, são dispensados tratamento distintos aos adulterantes que dão origem a extrato aquoso (milho e cevada) dos que não apresentam essa característica (casca, pergaminho e paus). As cascas, pergaminhos e paus são separados do café tomando-se partícula por partícula com um estilete umedecido, tendo-se o pó sob observação microscópica. Os adulterantes são depois pesados, podendo-se calcular o porcentual de adulteração.

Para a determinação quantitativa dos adulterantes que produzem extrato aquoso, toma-se novamente 2 g do café homogeneizado e mistura-se o pó com 180 ml de água destilada, deixando-se ferver a mistura durante uma hora. O extrato aquoso é obtido por filtração e é pesado após a evaporação da água. Curvas de calibração, obtidas previamente através da pesagem do extrato aquoso originado por misturas conhecidas de café + adulterantes, são utilizadas para determinar o teor desses adulterantes. Sabe-se que o extrato aquoso do café varia entre 23 e 33%, dependendo da espécie, variedade e grau de torração, apresentando o valor mais comum em torno de 30%. Já para a cevada situa-se ao redor de 68% e para o milho em torno de 71%.

A determinação do teor de soja também é feita por separação sob observação ao microscópio. Para o cálculo final do teor de soja são feitas ainda hipóteses que levam em conta as diferenças entre o café e a soja no tocante à passagem pela peneira, quando da extração do pó fino, conforme mencionado no item e). Considera-se que no caso da mistura café-soja, o pó fino que passa pela peneira representa 50% do total e é constituído quase que exclusivamente de café, o que nos parece uma aproximação algo grosseira, considerando-se a grande deversificação de moagens dispensadas ao café comercializado no Brasil.

Como se observa o método é lento, além de estar baseado em

hipóteses que nem sempre espelham a realidade prática. Consequentemente , pode estar sujeito a consideráveis imprecisões.

## II.1. DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES DO CAFÉ TORRADO E MOIDO, UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA NO INFRA-VERMELHO PRÓXIMO

No que segue, aplicaremos a espectroscopia fotoacústica no estudo de adulterantes do café, utilizando a região do infra-vermelho próximo. Nessa região a técnica tem se revelado muito útil para análises quantitativas<sup>(3-6)</sup>, especialmente no caso de misturas de materiais ou compostos orgânicos.

A absorção nessa região do espectro eletromagnético (0,8-3,0  $\mu\text{m}$ ) é atribuída a transições eletrônicas de baixa energia e a overtões e combinações de vibrações de estiramento e dobramento de ligações hidrogênicas, geralmente grupos CH, NH e OH. Uma vez que grande parte dos compostos orgânicos possui em sua estrutura esses grupos hidrogênicos, percebe-se a limitação dessa região do espectro na identificação de compostos associados aos materiais analisados, ou seja, na análise qualitativa. Entretanto, geralmente a concentração desses grupos difere de composto para compostos e de material para material, o que viabiliza enormemente a utilização do infra-vermelho próximo na análise quantitativa.

### II.1.1. Descrição do Experimento

#### Aparelhagem utilizada

Os espectros do café em pó foram obtidos na região entre 1,0 e 2,4  $\mu\text{m}$ , utilizando-se um espectrômetro fotoacústico modelo OAS 400 fabricado pela EDT Research-Londres. Na Fig.2-1 é mostrado um diagrama de blocos do aparelho. Esse instrumento utiliza como fonte de radiação uma lâmpa

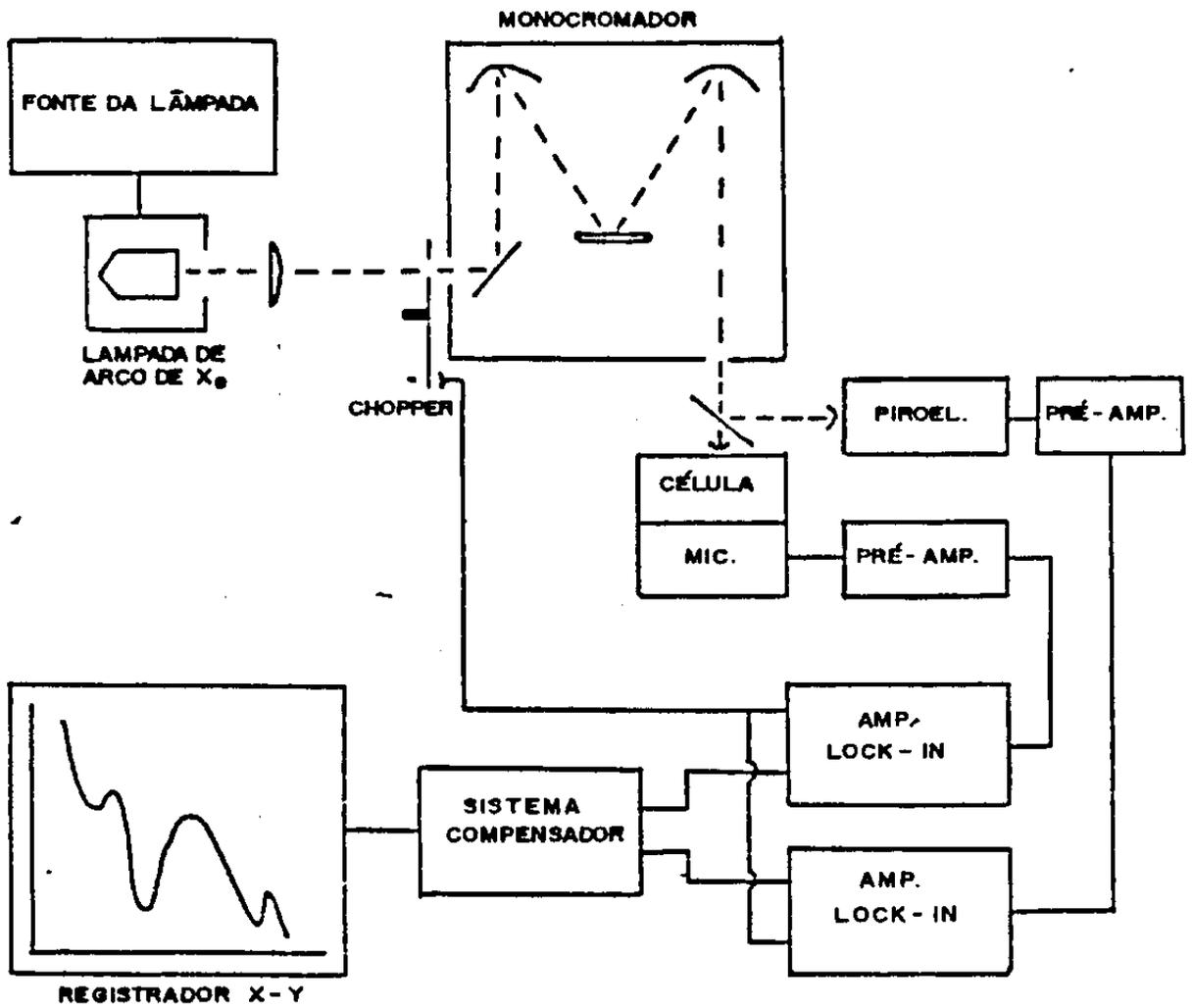


FIG. 2-1

Diagrama de blocos do espectrômetro fotoacústico utilizado no estudo dos adulterantes do café.

da de arco de Xenônio de 300 W de potência. A radiação é modulada por um chopper, cuja pã interruptora de luz pode ter a frequência variada entre 10 e 240 Hz. A radiação modulada atinge um monocromador que possui duas grades de difração que podem ser selecionadas, sendo que uma permite trabalhar no UV-visível e a outra no IV próximo. Filtros especiais que são acionados automaticamente evitam a superposição de mais de uma ordem da radiação utilizada. À saída do monocromador existe um divisor de feixe que direciona uma parte da radiação para um detetor piroelétrico, cujo sinal é pré-amplificado e injetado em um amplificador lock-in. A detecção síncrona dos sinais fotoacústicos e piroelétrico ocorre no amplificador lock-in, utilizando o sinal de referência proveniente do motor do chopper. Os dois sinais são então comparados em um ratiômetro, a fim de compensar as variações na intensidade da radiação, que depende do comprimento de onda. A amplitude do sinal compensado é proporcional à quantidade de energia absorvida pela amostra. É também possível ajustar a fase do sinal fotoacústico. O sinal fotoacústico compensado é finalmente injetado no eixo y de um registrador gráfico, cujo eixo x é sincronizado com o comprimento de onda selecionado. É ainda possível a seleção de fendas que limitam a largura de banda passante em torno do comprimento de onda selecionado. Pode-se também escolher a velocidade de varredura do espectro e a constante de tempo. Em nosso estudo, as condições experimentais foram: frequência de modulação 10 Hz, banda passante,  $0,032\mu\text{m}$ , constante de tempo 1 s, velocidade de varredura  $0,2\ \mu\text{m}/\text{min}$ . sensibilidade 10 mV ou 30 mV.

Na fig. 2-2 é representada esquematicamente a célula fotoacústica utilizada. A luz modulada que incide verticalmente atravessa a janela de quartzo e atinge a amostra. A câmara onde se localiza a amostra contém ar, e um duto cilíndrico propicia que variações de pressão na câmara sejam comunicadas a um microfone, que faz então a detecção

do sinal fotoacústico. Na Fig. 2-3 é esquematizado o porta-amostra da célula, que consiste de uma cavidade de extremidades arredondadas possuindo 20mm de comprimento, 5mm de largura e 1mm de profundidade, e é posicionado horizontalmente, permitindo a colocação de materiais sólidos, pastosos, líquidos, pós, etc.

Para a torração das amostras foi utilizado um forno elétrico Probat-Werke, esquematizado na Fig. 2-4, que permite a variação de temperatura entre ambiente e 300<sup>o</sup>C e possui capacidade para até 300 g de café a cada torração.

A moagem das amostras foi feita utilizando-se um moinho de marca Manesco e Ranieri Ltda. A amostra é colocada dentro de um recipiente cilíndrico que possui as partes superior e inferior de forma esférica e é de aço inoxidável. A amostra é colocada dentro desse recipiente, junto a uma esfera maciça de aço inoxidável e de diâmetro menor que as partes esféricas do recipiente. Um sistema mecânico acionado por um motor elétrico produz rápidas oscilações verticais do recipiente, ocasionando choques entre a esfera e a amostra e realizando a sua moagem. Mostramos na Fig. 2-5 um esquema do recipiente onde se processa a moagem.

A pesagem das amostras foi realizada com uma balança analítica Sartorius Mod. 2474 com leitura até centésimos de miligramas.

### Preparação e Manipulação das Amostras

Em nosso experimento foram utilizados como adulterantes o milho, cevada, soja, casca (epicarpo, mesocarpo), pergaminho (endocarpo) e paus (galhos de cafeeiro), que são bastante comuns na adulteração do café no Brasil. Cerca de 20 g de café e quantidade igual de cada um dos referidos adulterantes foram submetidos a um grau de torração semelhante ao utilizado em torrações do café para fins comerciais.

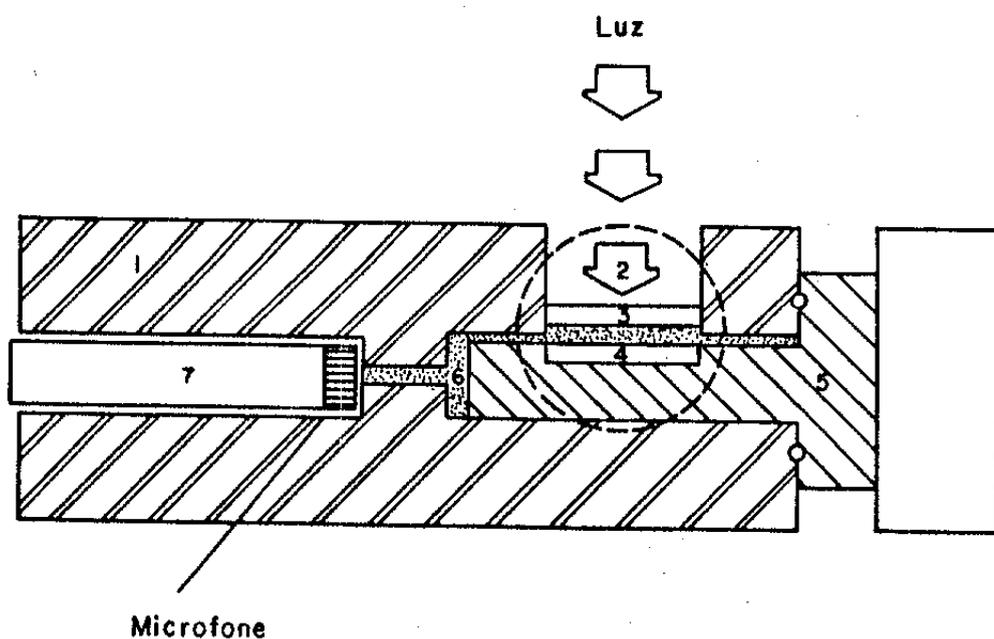


FIG. 2-2

Representação esquemática da célula fotoacústica utilizada no estudo dos adulterantes do café:

(1) Bloco de alumínio; (2) luz modulada incidente; (3) janela de quartzo; (4) amostra; (5) bloco porta-amostra; (6) ar existente na câmara; (7) microfone.

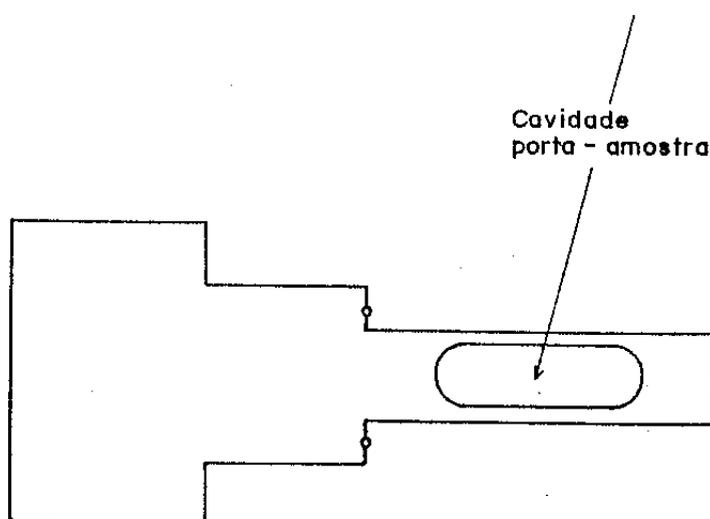


FIG. 2-3

Vista superior do bloco porta-amostra, mostrando a geometria da cavidade em que é colocada a amostra.

# TORRADOR

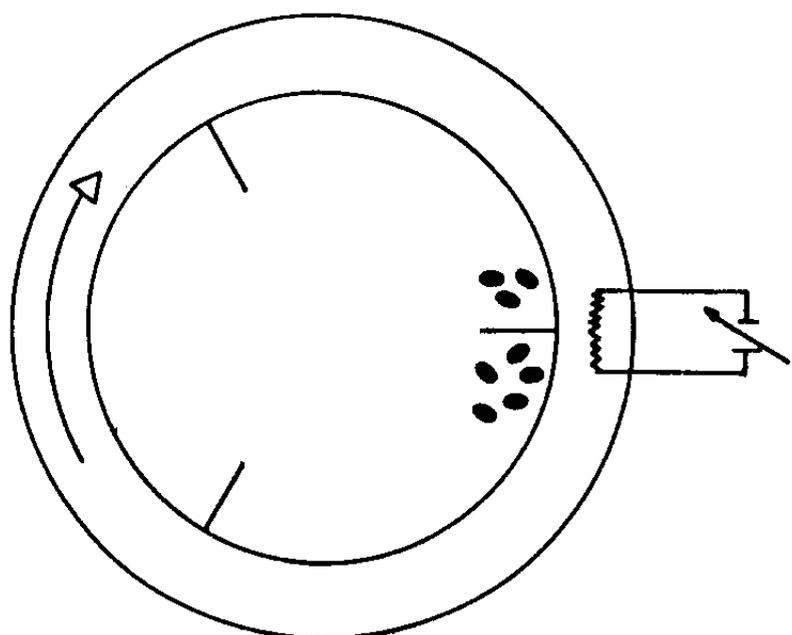


FIG. 2-4

Esquema ilustrativo do torrador de café e adulterantes utilizados.

# MOINHO

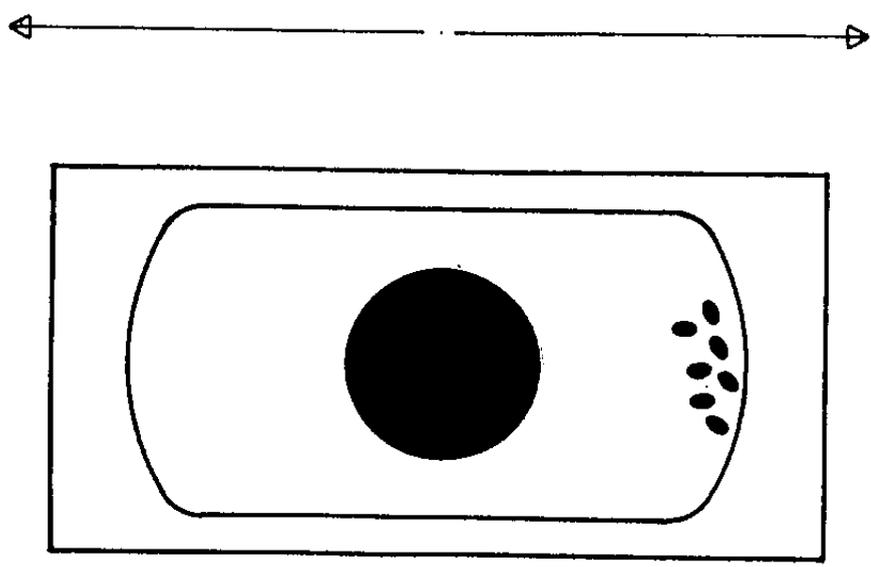


FIG. 2-5

Esquema ilustrativo do sistema utilizado na moagem do café e dos adulterantes.

Em seguida, os materiais torrados foram moidos e passados em peneira tamis nº 80 (malha de 0,177mm) a fim de manter constante a granulação. Diferentes granulações influem consideravelmente nas medidas de intensidade do sinal fotoacústico. Em geral, o sinal fotoacústico é inversamente proporcional ao tamanho das partículas. Isto pode ser observado na Fig. 2-6. Mantendo-se a mesma granulação para a matriz (café) e diferentes adulterantes, foram preparadas misturas de café com cada adulterante, nas seguintes concentrações percentuais em peso de adulterante: 0 (café puro); 2.5; 5; 25; 75; 100 (adulterante puro).

Para a obtenção dos espectros fotoacústicos, procuramos preencher totalmente o porta-amostra da célula fotoacústica, tentando submeter todas as amostras às mesmas condições de compactação, a qual também influenciou nas intensidades dos picos. Por outro lado, deixamos de manter controle sobre a massa da amostra, uma vez que a intensidade fotoacústica é independente deste parâmetro, desde que se preencha completamente a cavidade porta amostra.

## II.1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise Qualitativa dos Espectros

Foram observadas pequenas diferenças entre os espectros do café puro e demais adulterantes, conforme é mostrado na Fig. 2-7. Os espectros diferem principalmente na intensidade dos picos, revelando que o café e os adulterantes de modo geral possuem semelhanças em suas composições moleculares.

As atribuições dos picos espectrais foi feita utilizando-se a literatura usual (7-10). As bandas centradas em 1,18  $\mu\text{m}$ , 1,71  $\mu\text{m}$  e 2,30  $\mu\text{m}$  são respectivamente segundo overtone, primeiro overtone e banda de combinação da vibração fundamental de estiramento do grupo C-H que no infra-vermelho longínquo se situa em torno de 3,0-3,8  $\mu\text{m}$ .

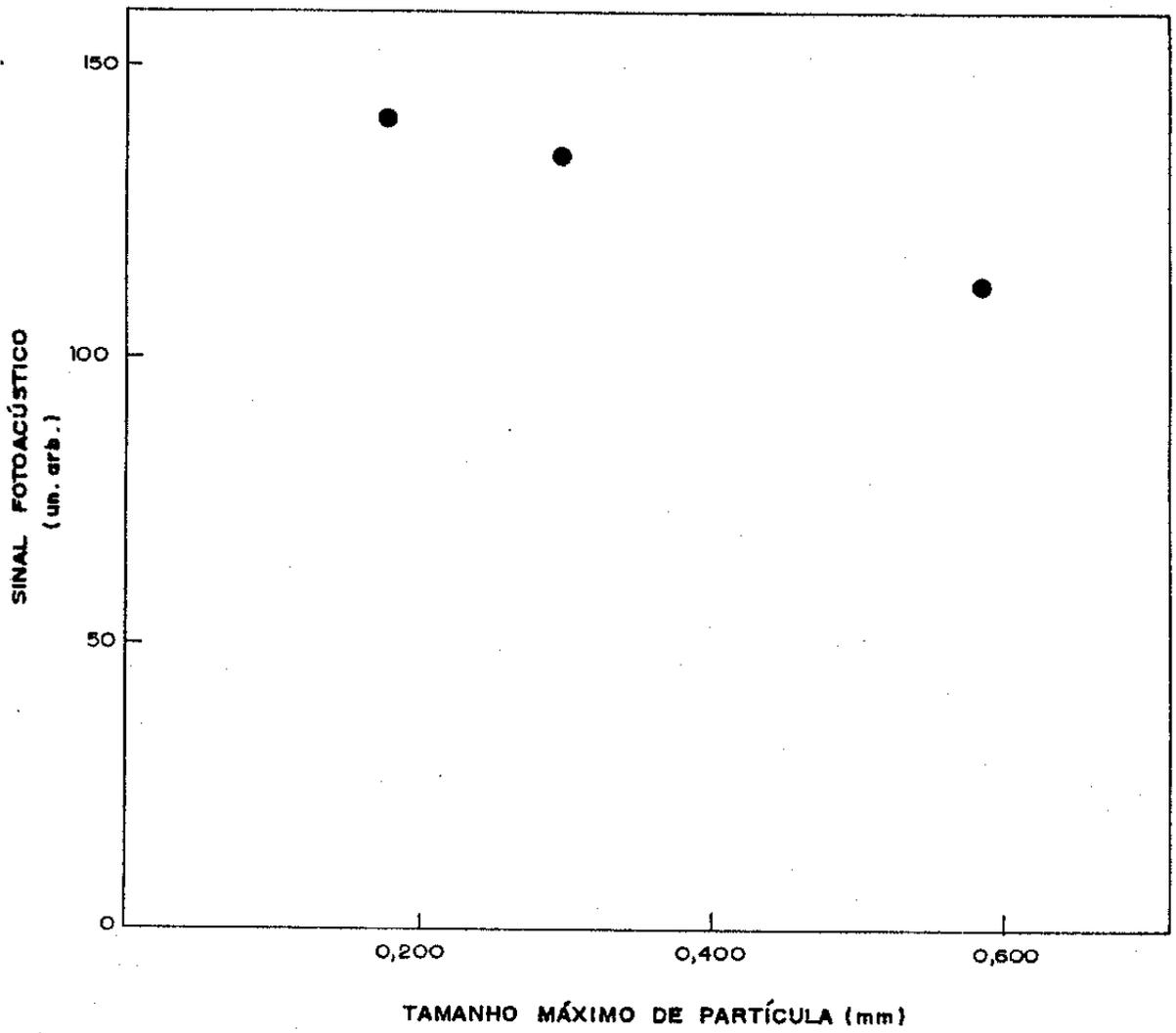


FIG. 2-6

Dependência do sinal fotoacústico com a granulação da amostra (café).

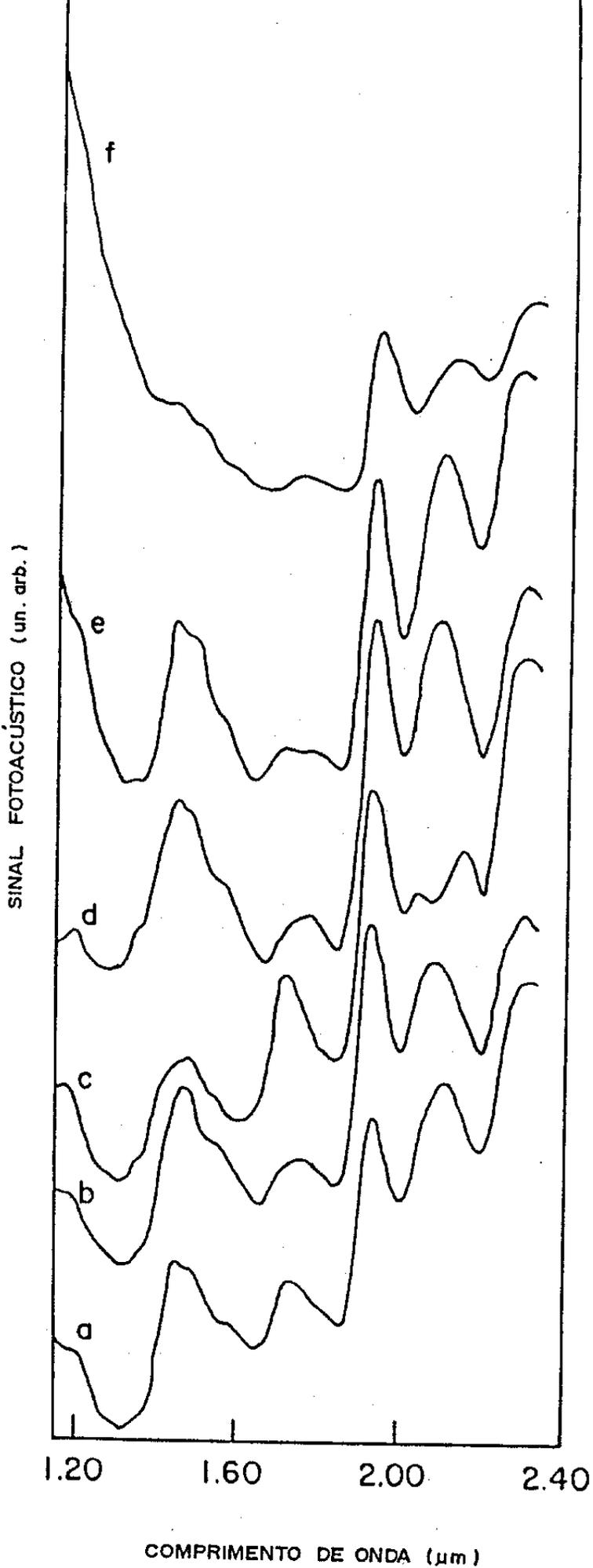


FIG.2-7. Espectros fotoacústicos obtidos no infra-vermelho próximo pelo café e alguns de seus adulterantes (a) café; (b) cevada; (c) Soja; (d) milho; (e) pergaminho; (f) casca. Os espectros foram deslocados verticalmente para evitar sua superposição e possibilitar melhor visualização. Nota-se que, com exceção da soja, os espectros diferem fundamentalmente nas intensidades dos picos.

A região entre 2,0  $\mu\text{m}$  e 2,2  $\mu\text{m}$  apresenta picos que podem ser atribuídos a absorções de grupos C-H, inclusive C-H aldeídico e carbonilas. Notamos ainda que a soja pode ser nitidamente diferenciada do café e dos outros adulterantes (vide Fig. 2-7c). O sinal fotoacústico de soja mostra duas absorções de N-H proteínicos bem resolvidos em 2,04  $\mu\text{m}$  e 2,14  $\mu\text{m}$ , ao passo que todas as outras amostras possuem um pico largo com um máximo centrado em 2,10  $\mu\text{m}$ , correspondente a C-H de amidos. A absorção em 1,44  $\mu\text{m}$  é atribuída ao primeiro overtone de N-H e a O-H aquoso. Em 1,93  $\mu\text{m}$  pode-se notar uma forte absorção em todas as amostras. Esta banda é atribuída a O-H aquoso e banda de combinação de N-H. Isso pode ser demonstrado obtendo-se espectros fotoacústicos de amostras com diferentes graus de umidade, conforme mostrado na Fig. 2-8. A Fig. 2-8a é o espectro do café torrado e moído, parcialmente desidratado em estufa a 60<sup>o</sup>C durante 24 horas. Já a Fig. 2-8b representa o mesmo café após reidratação, por exposição ao ar ambiente durante 24 horas. Portanto os picos em 1,44  $\mu\text{m}$  e 1,93  $\mu\text{m}$  não devem ser utilizados em trabalhos de análise quantitativa, tal como o realizado no presente capítulo, a fim de se evitar a influência de flutuações na intensidade de picos, associadas a variações aleatórias na umidade das amostras.

### Análise Quantitativa dos Espectros

A determinação do teor de adulterantes em café utilizando a espectroscopia fotoacústica pode ser feita a partir de curvas de calibração, que são construídas através de medidas de intensidade de picos exibidos por misturas conhecidas de café e adulterantes. Na Fig. 2-9 é mostrada a sequência de espectros obtidos no caso de misturas café/cascas, que foi um dos casos por nós considerado. Para a construção das curvas de calibração utilizamos dois métodos distintos.

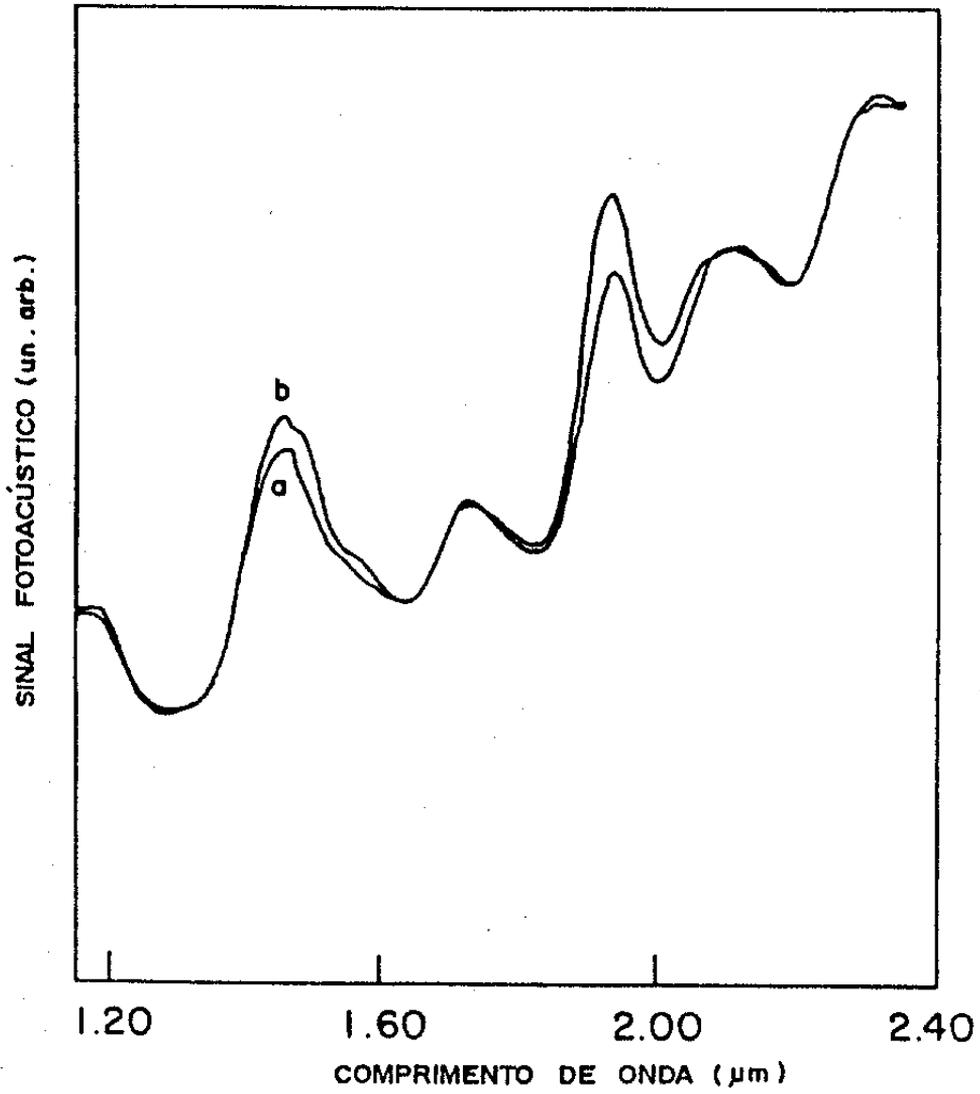


FIG. 2-8

Espectros fotoacústicos exibidos pelo café torrado em pó (a) parcialmente desidratado em estufa a  $60^{\circ}$  durante 24 horas e (b) reidratado por contato com o ar ambiente durante 24 horas.

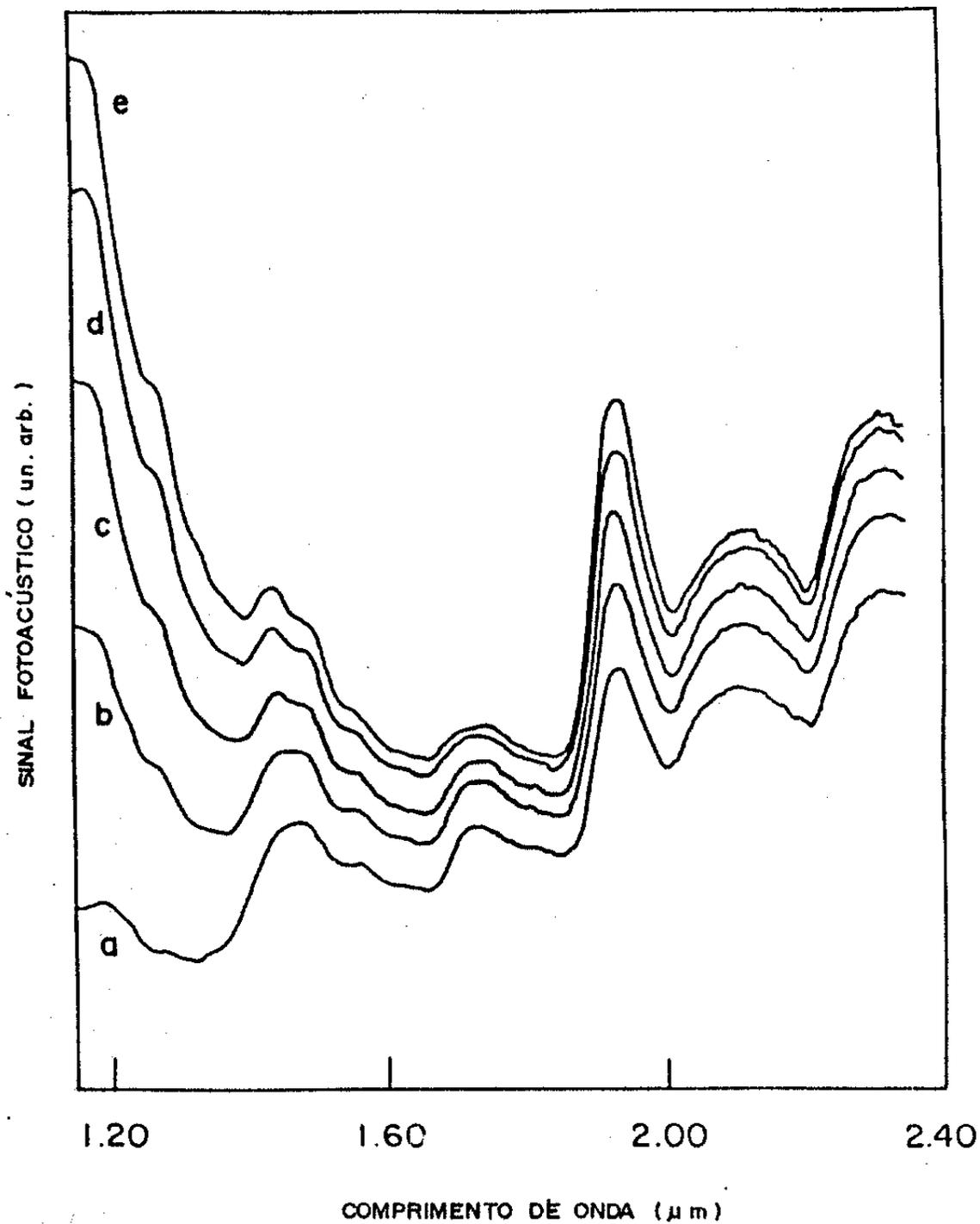


FIG. 2-9

Espectros fotoacústicos de misturas café/casca u tilizados na construção de curvas de calibração: (a) café puro; (b) 75% café/25% casca; (c) 50% café/50% casca; (d) 25% café/75% casca; (e) casca pura.

O primeiro método, desenvolvido em nosso laboratório, e que denominaremos método do pico único, é descrito detalhadamente por César et al.<sup>(11)</sup>. O método parte do princípio de que o sinal fotoacústico é dado por

$$S = A \frac{\beta(\lambda)}{(k \rho C)^{1/2}} \quad (2-1)$$

onde  $\beta(\lambda)$  é coeficiente de absorção óptica para o comprimento de onda  $\lambda$ ,  $k$  é a condutividade térmica do material,  $\rho$  sua densidade e  $C$  o calor específico. Todos os outros parâmetros, tais como propriedades térmicas do gás, frequência de modulação, etc. foram juntados na constante  $A$ .

Para uma mistura de dois materiais denominados 1 e 2 o sinal fotoacústico  $S$  pode ser representado por

$$S = cS_1 + (1-c)S_2 = S_2 + (S_1 - S_2) c \quad (2-2)$$

onde  $c$  é a concentração do material 1 na mistura e  $S_1$  e  $S_2$  são os sinais fotoacústicos exibidos pelos materiais 1 e 2 isoladamente, os quais dependem do coeficiente entre as propriedades ópticas e térmicas, conforme a eq (2-1). A equação (2-2), realça a dependência linear do sinal fotoacústico com a concentração de adulterante. Pode-se também observar que, dependendo das propriedades ópticas e térmicas dos componentes das misturas, ou seja da diferença  $(S_1 - S_2)$  a curvatura da curva de calibração em dado comprimento de onda pode ser positiva ou negativa.

A Fig. 2-10 mostra as curvas de calibração obtidas para misturas de café com os adulterantes (a) milho, (b) soja, (c) cevada, (d) pergamino, (e) paus, (f) cascas, para o comprimento de onda  $1,18 \mu\text{m}$ . A abscissa representa a concentração porcentual de adulterantes e a ordenada repre

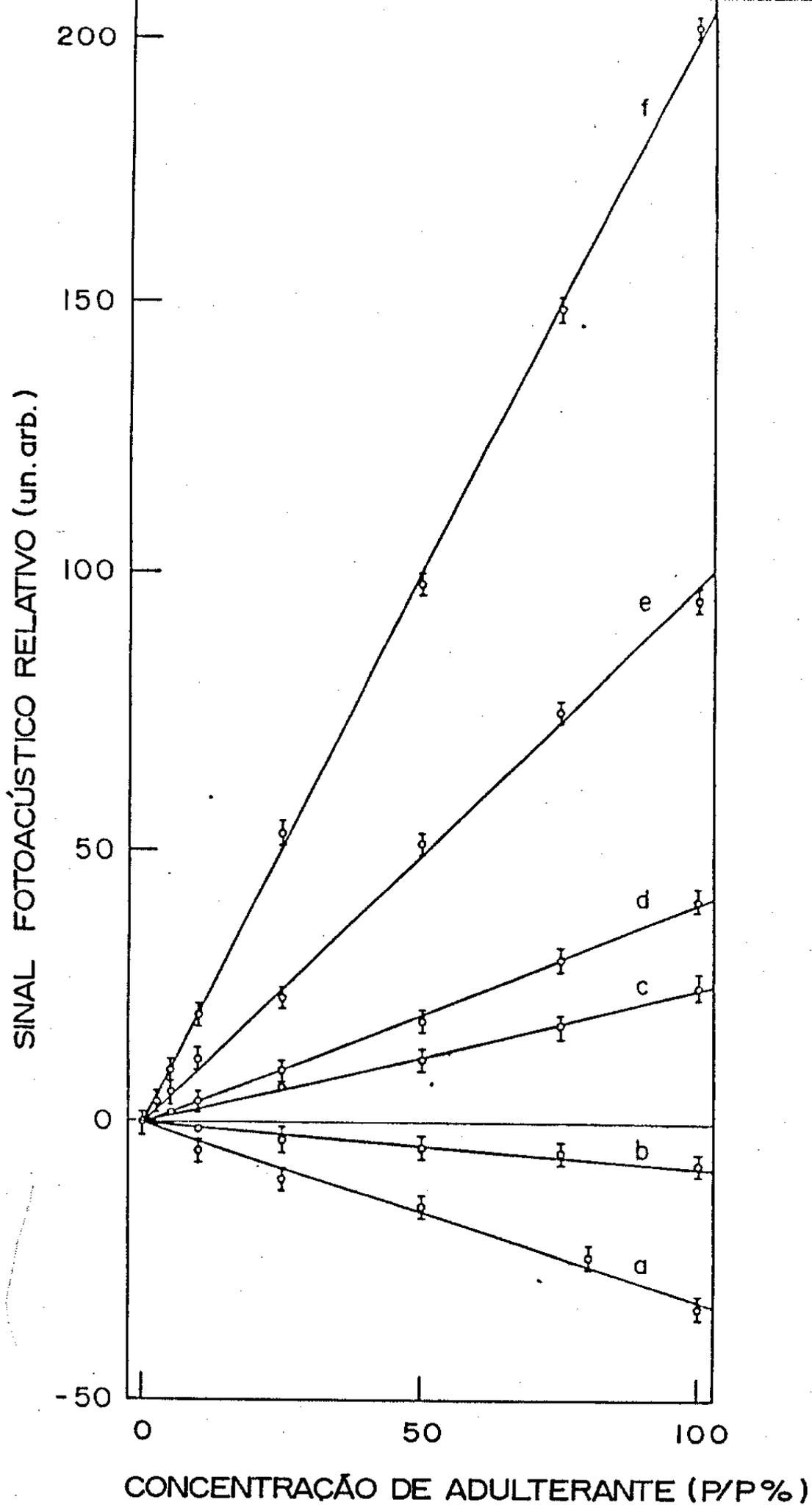


FIG.2-10. Curvas de calibração obtidas com a aplicação do método fotoacústico do pico único às misturas de café com (a) milho; (b) soja; (c) cevada; (d) pergaminho; (e) paus; (f) cascas. Foi utilizado o pico centrado em  $1,18\mu\text{m}$ .

senta a intensidade relativa do pico, expressa por  $S - S(0\%)$ , onde  $S$  é a intensidade fotoacústica absoluta para cada mistura e  $S(0\%)$  é a intensidade absoluta para o café puro. O mínimo de cada espectro é subtraído de cada medida de intensidade para eliminar efeitos de back-ground.

São mostrados na Tab. 2-3 os coeficientes de regressão linear para cada uma das curvas da Fig. 2-10. A dependência linear foi observada para todas as misturas café/adulterante por nós consideradas. Pode-se afirmar que a curvatura no comprimento de onda considerado é característica própria de cada adulterante, exercendo o papel de verdadeiras impressões digitais desse adulterante, possibilitando por isso sua quantificação.

Tabela 2-3. Coeficientes de regressão linear das curvas de calibração para misturas café/adulterante - Método do Pico Único

Adulterante	r
Casca	0,9997
Paus	0,9998
Pergaminho	0,9994
Cevada	0,9987
Soja	0,9817
Milho	0,9965

Essas curvas poderão ser utilizadas para a determinação do teor de adulterantes em misturas binárias de café adulterado. Para tal, é suficiente a realização prévia de uma avaliação qualitativa (ótica) do adulterante presente na mistura, para que se possa deliberar qual a curva a ser empregada. O passo seguinte consiste em obter-se o espectro da amostra de café adulte

rado nas mesmas condições experimentais em que as curvas de calibração foram construídas. Trabalhando-se com as intensidades fotoacústicas exibidas por essa amostra, obtém-se rápida e precisamente o teor desconhecido de adulterante por interpolação gráfica.

O segundo método por nós empregado é descrito por Ashwort et al. (5) e utiliza dois picos espectrais, nos comprimentos de onda  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ , razão pela qual o denominaremos método dos dois picos. Em nosso experimento escolhemos  $\lambda_1 = 1,18 \mu\text{m}$  e  $\lambda_2 = 2,10 \mu\text{m}$ , com exceção para o caso da mistura café/soja para a qual escolhemos  $\lambda_1 = 2,14 \mu\text{m}$ .

Nesse método também consideramos que as contribuições para a intensidade de cada pico são aditivas e portanto podemos escrever para cada mistura café/adulterante.

$$S(\lambda_1) = A + xC \quad (2-3)$$

$$S(\lambda_2) = yA + C \quad (2-4)$$

- onde: -  $S(\lambda_1)$  e  $S(\lambda_2)$  são as intensidades fotoacústicas nos comprimentos de onda  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$
- A é a contribuição do adulterante isoladamente para a intensidade fotoacústica em  $\lambda_1$ ;
  - C é a contribuição do café isoladamente à intensidade fotoacústica em  $\lambda_2$
  - x é o quociente entre as intensidades fotoacústicas em  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$  para 100% de café;
  - y é o quociente entre as intensidades fotoacústicas em  $\lambda_2$  e  $\lambda_1$  para 100% de adulterante.

A intensidade mínima para cada espectro é subtraída de todas as medidas de intensidade feitas nesse espectro para compensar o background.

Os valores de  $S(\lambda_1)$ ,  $S(\lambda_2)$ ,  $x$  e  $y$  podem ser determinados a partir de dados experimentais, ou seja por leitura direta nos espectros. Portanto, empregando as equações (2-3) e (2-4), os valores de  $A$  e  $C$  podem ser determinados para cada mistura, sendo então possível a construção das curvas de calibração. Essas curvas são mostradas nas Figs. 2-11 e 2-12 para as misturas café/casca. Na Fig. 2-11 é representada a dependência linear do parâmetro  $A$  em função da concentração de adulterante e a dependência linear do parâmetro  $C$  com a concentração de café. A Fig. 2-12 representa a dependência linear do quociente  $A/C$  entre esses parâmetros com o quociente concentração de adulterante/concentração de café.

A Tab. 2-4 reúne os coeficientes de regressão linear para cada uma dessas curvas e também para as outras misturas café/adulterante por nós estudadas. Os valores desses coeficientes de regressão demonstram a boa linearidade dos pontos e dão bom suporte para a validade da utilização dessas curvas na quantificação de teores desconhecidos de adulterantes. Também no caso desse segundo método, a determinação do teor de adulterante existente em uma amostra adulterada pode ser determinado por interpolação gráfica.

Tabela 2-4. Valores de coeficientes de regressão linear das curvas de calibração para misturas café/adulterante. Método dos dois picos.

	parâmetro da curva de calibração		
	A	C	A/C
Casca	0,9997	0,9987	0,9999
Páus	0,9997	0,9989	0,9993
Pergaminho	0,9995	0,9998	0,9998
Cevada	0,9990	0,9987	0,9997
Soja	0,9997	0,9995	0,9994
Milho	0,9995	0,9995	0,9998

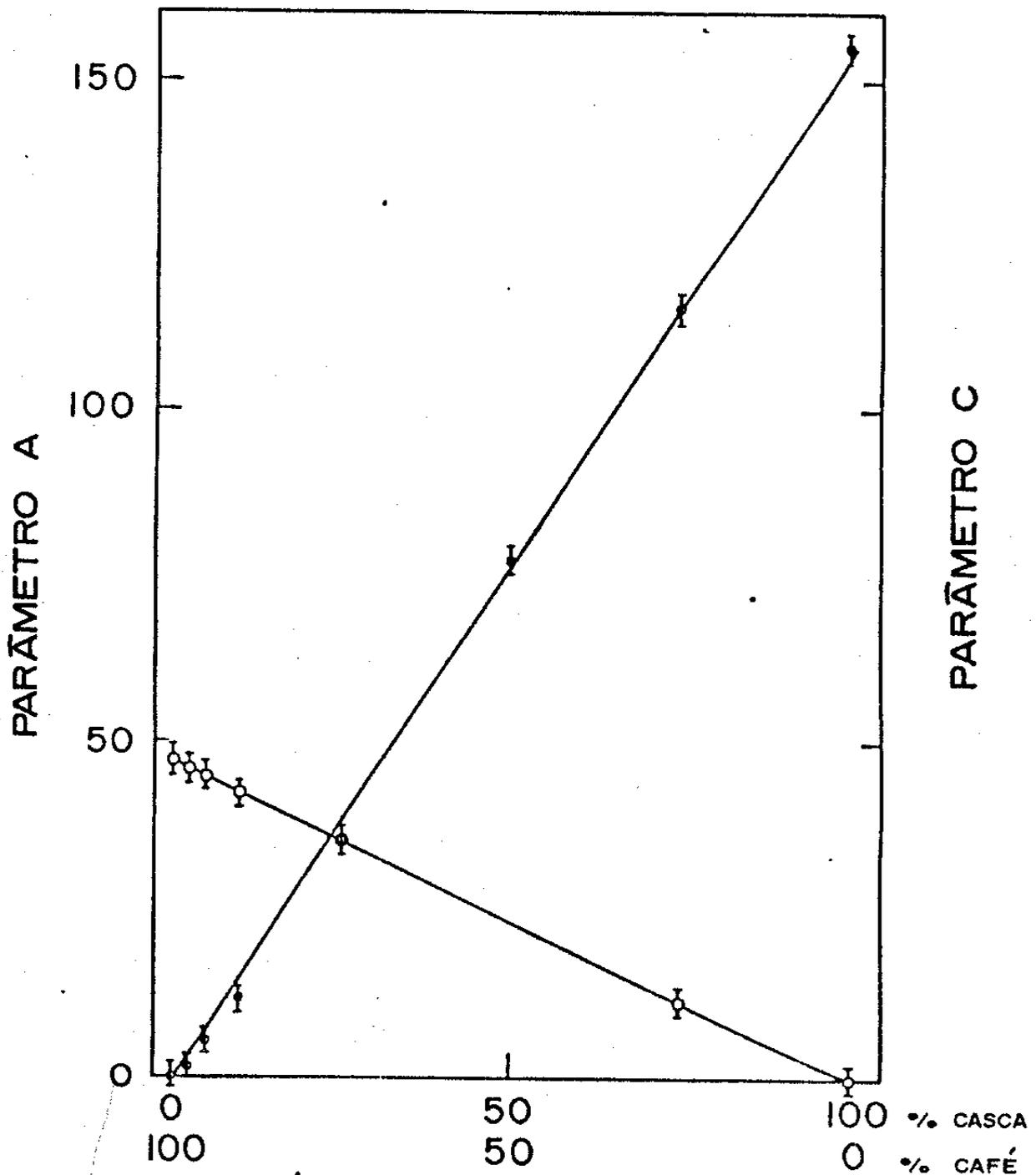


FIG. 2-11

Curvas de calibração obtidas com a aplicação do método fotoacústico dos dois picos a misturas café/casca. Foram utilizados os picos centrados em  $1,18 \mu\text{m}$  e  $2,10 \mu\text{m}$ . O parâmetro A é diretamente proporcional à concentração de adulterante e o parâmetro C à concentração de café.

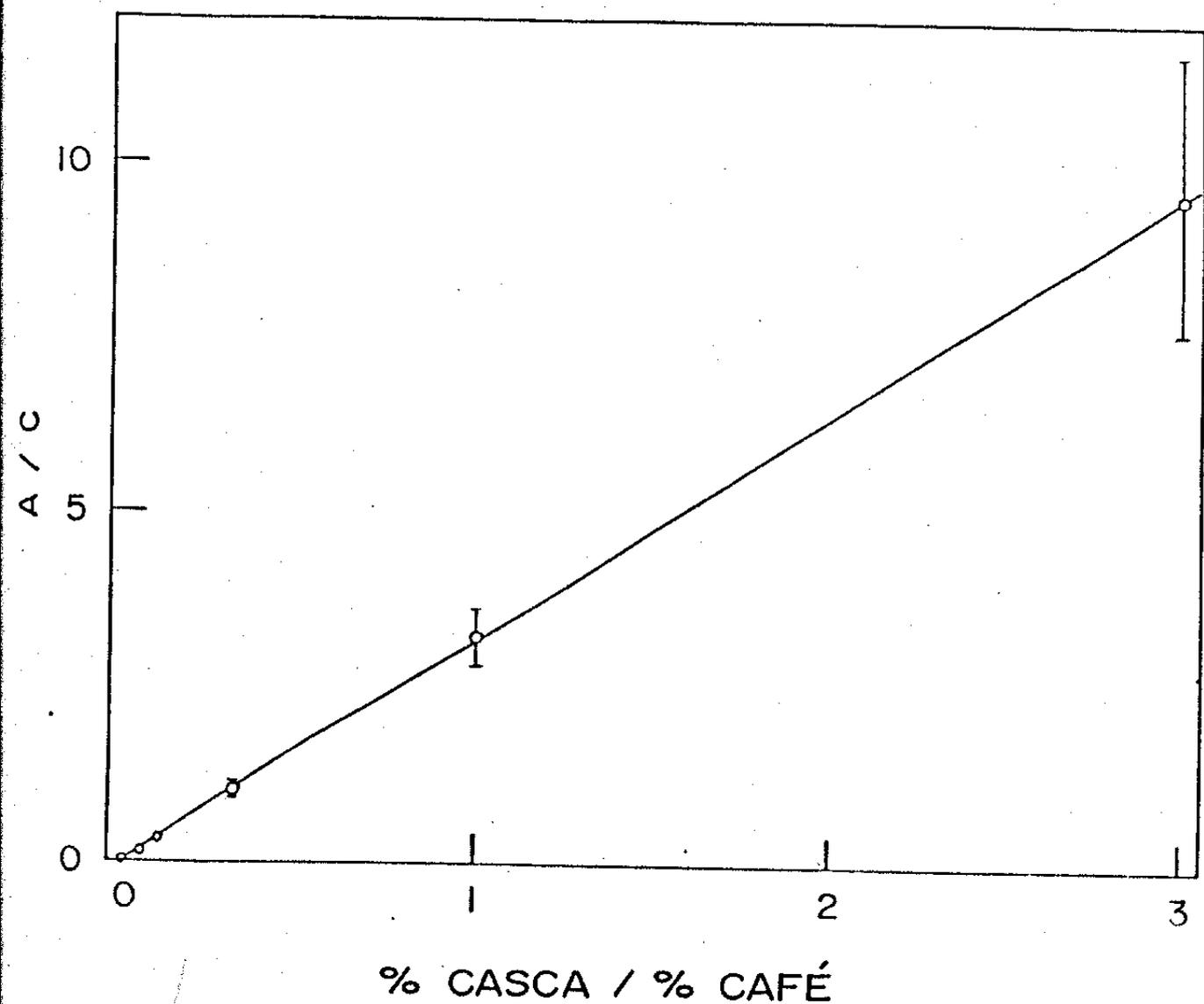


FIG. 2-12

Outra curva de calibração obtida com a aplicação do método fotoacústico dos dois picos a misturas café/cascas.

Uma das adulterações mais comuns realizadas no Brasil consiste de uma mistura ternária de café com casca e pergaminho. Esses materiais são produzidos quando do descascamento do fruto seco. A adulteração é feita adicionando-se ao café uma certa quantidade dessa mistura de adulterantes, antes da torração. Portanto a relação entre as massas de casca e pergaminho é constante e é a mesma com que esses materiais comparecem no fruto seco. Essa composição de dois adulterantes pode então ser tratada como um adulterante único e a mistura ternária café/casca+pergaminho pode ser tratada como uma mistura binária, sendo aplicáveis os dois métodos por nós considerados.

A Tab. 2-5 mostra os resultados obtidos na determinação de teores desconhecidos desses adulterantes, aplicando-se a curva de calibração por nós obtida pelo método do pico único, bem como as concentrações desses adulterantes previamente determinadas pelo IBC-Núcleo Técnico de Campinas. Existe excelente concordância entre os resultados, mesmo no caso de baixa concentração de adulterantes.

Tabela 2-5. Comparação entre os teores de adulterantes determinados pelo IBC e pela aplicação do método fotoacústico do pico único.

Amostra	Concentração de Adulterante (%)	
	I B C	Fotoacústica
A	1	0
B	5	5
C	8	7
D	50	47

Os resultados da Tab. 2-5 constituem-se numa prova incontestada

vel da validade do método fotoacústico na determinação do teor de adulterante, uma vez que o método revela sua boa precisão, ao lado da rapidez com que os resultados são obtidos.

Os dois métodos fotoacústicos por nós propostos possuem contudo certas limitações. Uma dessas limitações é proveniente do aumento da intensidade dos picos com o grau de torração. A Fig. 2-13 mostra os espectros do café torrado a 220°C durante 4 minutos (torração muito clara), 8 minutos (torração média) e 12 minutos (torração muito escura). As torrações muito clara e muito escura fogem completamente aos padrões normais das torrações comerciais. Para torrações comerciais as intensidades dos picos não se afastariam muito da linha correspondente à torração média. Por isso, é pequena a imprecisão que se comete quando existe diferença entre o grau de torração utilizado na construção da curva de calibração e o grau em que foi torrado a amostra adulterada. Essa imprecisão na determinação do teor de adulterante, embora pequena, pode ser evitada, por exemplo como o estabelecimento de três ou quatro curvas de calibração obtidas a partir de torrações distintas, levando a cafés torrados de colorações um pouco diferentes. Através de uma avaliação visual, o analista deliberaria qual curva deveria ser utilizada na determinação quantitativa do adulterante. Convém salientar que a influência do grau de torração não afeta unicamente o método fotoacústico, mas traduz-se também em imprecisão no método atualmente utilizado pelo IBC, uma vez que diferentes torrações implicam em diferentes extratos aquosos.

Outra limitação dos métodos fotoacústicos é a necessidade de previamente determinar qualitativamente o adulterante presente no café, a fim de escolher a curva de calibração correspondente. Todavia, essa é também uma limitação do método atualmente empregado pelo IBC.

Por outro lado, os métodos fotoacústicos apresentam a vanta

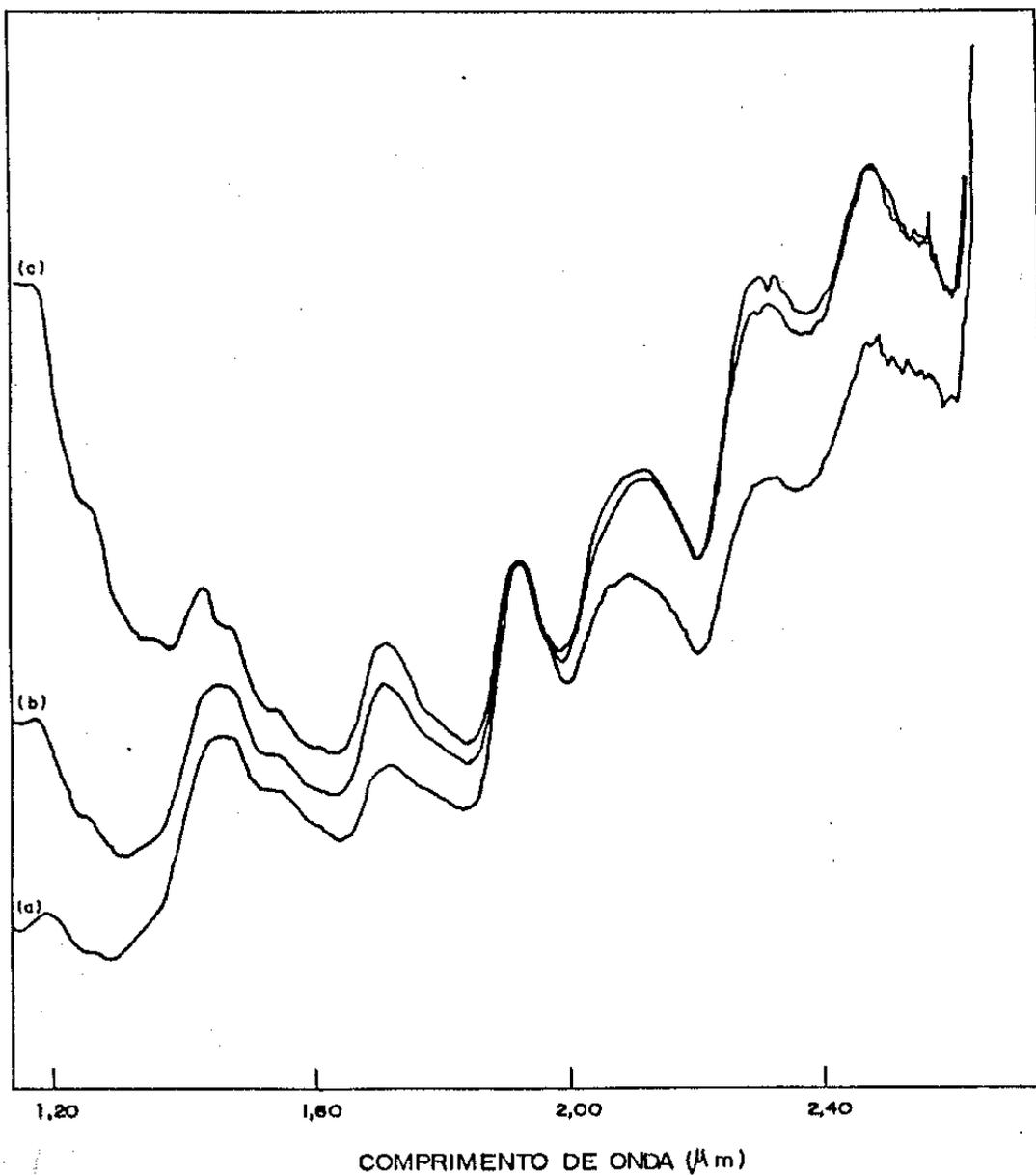


FIG. 2-13

Espectros fotoacústicos exibidos pelo café torrado a 220°C durante (a) 4 minutos; (b) 8 minutos e (c) 12 minutos. A curva (b) corresponde a uma torração semelhante às torrações comerciais utilizadas no Brasil.

gem de não utilizar a prática de seleção de partículas maiores por peneiramento, que é utilizada no método do IBC, previamente à separação manual de partículas de adulterantes. Parece-nos imprópria e imprecisa essa prática, uma vez que os resultados são obtidos a partir de análises quantitativas realizadas sobre uma parte do pó, que pode diferir do pó homogeneizado, não somente no tocante ao tamanho médio das partículas, mas também na concentração de partículas de adulterantes.

Ao encerrar nossa discussão, não podemos deixar de destacar outros pontos que reputamos como vantagem da utilização dos métodos fotoacústicos por nós propostos. Atentemos para o fato de que nossos métodos permitem evitar-se as trabalhosas práticas mencionadas na introdução deste capítulo, tais como a coleta de partículas de adulterantes uma a uma, a obtenção de extratos aquosos e sua subsequente desidratação, a utilização e recuperação de solventes. Além disso nossos métodos possibilitam a utilização sistemática não diferenciada para todos os adulterantes.

### II.1.3. Conclusões

Neste capítulo demonstramos a utilidade da espectroscopia fotoacústica no infra-vermelho próximo, na análise de adulterantes do café. Foram apresentados dois diferentes procedimentos baseados na medida de intensidade de picos de absorção de misturas café-adulterante. Comparados com os métodos convencionais, os métodos por nós propostos mostram-se rápidos, requerem um mínimo de preparação da amostra e possuem boa precisão, especialmente para conteúdo de adulterantes superior a 2%.

No Brasil, a maior parte de adulterações do café consiste de misturas binárias e isso torna úteis os métodos por nós propostos. Entretanto é necessária a identificação visual do adulterante presente para a utilização da curva de calibração correspondente. Os métodos são ainda as

sim válidos porque permitem determinar a concentração de adulterantes, sem a utilização da tediosa prática de coletar cada partícula de adulterante, ou de recorrer à extração, isolamento e pesagem de extratos aquosos.

Pudemos constatar que em alguns casos, misturas ternárias podem ser tratadas como binárias, viabilizando a aplicação dos métodos fotoacústicos. Exemplo típico é a adulteração do café com cascas e pergaminhos, que utilizamos para testar a validade do método, com excelentes resultados.

Outra vantagem da utilização da espectroscopia fotoacústica é a possibilidade da construção de um aparelho fotoacústico simplificado e que trabalhe em apenas um ou dois comprimentos de onda de interesse, os quais seriam selecionados por filtros. As medidas de intensidade poderiam ser feitas diretamente no display de um mili-voltímetro digital, sem necessidade do traçado do espectro. Isso poderia reduzir o tempo necessário à quantificação do adulterante a uns poucos minutos.

Por fim, mostramos que o espectro da soja apresenta dois picos característicos. Esses picos podem constituir-se num elemento importante para estudos semelhantes aos que foram por nós descritos neste capítulo, visando ao invés, a determinação de adulterações com a adição de soja ao Leite, salsichas, pão e outros produtos comestíveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LOPEZ, F.C. Determinação do Sedimento, Cascas e Paus no Café Torrado e Moido. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34:29, 1974.
2. LOPEZ, F.C. Determinação Quantitativa das Principais Substâncias Utilizadas para Fraudar o Café Torrado e Moido. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43(1/2):3, 1983.
3. KIRKBRIGHT, G.F. & MENON, K.R. The Determination of Combined Vinyl Acetate in Polyvinyl Chloride/Polyvinyl Acetate Copolymer by Near Infrared Photo-Acoustic Spectrometry and Diffuse Reflectance Spectrometry, *Analytica Chimica*, 136:373, 1982.
4. BELTON, P.S. & TANNER, S.F. Determination of the Moisture Content of Starch Using Near Infrared Photoacoustic Spectroscopy. *Analyst*, 108:591, 1983.
5. ASHWORTH, C.M.; KIRKBRIGHT, G.F. & SPILLANE, D.E.M. Quantitative Examination of Polyester-Cotton by Near-Infrared Photoacoustic Spectroscopy, *Analyst*, 108:1481, 1983.
6. CASTLEDEN, S.L.; KIRKBRIGHT, G.F. & MENON, K.R. Determination of Moisture in Single-Cell Protein Utilising Photoacoustic Spectroscopy in the Near-Infrared Region. *Analyst*, 105:1076, 1980.
7. WHEELER, O.H. Near Infrared Spectra of Organic Compounds. *Chem. Rev.*, 59:629, 1959.
8. GODDU, R.F. & DELKER, D.A. Spectra-Structure Correlations for the Near-Infrared Region. *Analytical Chemistry*, 32(1)140, 1960.

9. NATALE, M. & LEWIS, L.N. Application of PAS for the Investigation of Overtones and Combinations in the Near IR. *Applied Spectroscopy* , 36(4):410, 1982.
10. SADLER, A.J.; HORSCH, J.G.; LAWSON, E.Q.; HARMATZ, D.; BRANDAU, D.T. & MIDDAGH, C.R. Near-Infrared Photoacoustic Spectroscopy of Proteins. *Analytical Biochemistry*, 138:44, 1984.
11. CESAR, C.L.; VARGAS, H.; LIMA, C.A.S.; MENDES FILHO, J. & MIRANDA, L.C.M. On the Use of Photoacoustic Spectroscopy for Investigating adulterated or Altered Powdered Coffee Samples, *J. Agric. Food Chem.* 32:1355, 1984.

## CAPÍTULO III

### IDENTIFICAÇÃO DA QUALIDADE DA BEBIDA DO CAFÉ UTILIZANDO-SE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE) E ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

#### Introdução

As transações com bens de consumo são reguladas por diversos fatores, entre os quais se destacam a quantidade e a qualidade. As necessidades do consumidor e o seu poder aquisitivo determinam as qualidades comerciáveis desses bens. Quando a produção se apresenta em maior volume que a necessidade do mercado, surge a competição entre os vendedores, podendo prevalecer então a qualidade.

Na classificação comercial do café brasileiro, a determinação da qualidade compreende duas fases distintas: a classificação por tipo ou defeitos e a classificação pela qualidade ou características da bebida. A determinação da bebida, é sem dúvida, o fator mais importante na classificação comercial do café.

Embora a maior parte do café produzido no Brasil seja de variedade Arábica, influências regionais, tais como umidade do ar, tipo de solo, incidência de radiação solar, temperatura média, etc., bem como técnicas de colheita e secagem, conduzem à obtenção de diferentes bebidas com diferentes valorizações comerciais.

As denominações que recebem essas bebidas são em ordem crescente de qualidade: Rio Zona (ou Rio Macaco), Rio, Riado, Duro, Apenas Mo

le, Mole, Mole Encorpado (ou Estritamente Mole). Algumas regiões, como por exemplo o Sul de Minas Gerais, são conhecidas como produtoras de café de boa qualidade, sendo conhecidas também as regiões que tradicionalmente produzem café de qualidade inferior.

Atualmente, a identificação de qualidade da bebida do café é feita pela prova de degustação ou prova de xícara, efetuada por provadores profissionais. Para um diferencial de preço de até US\$ 7,00 a saca, em uma produção média brasileira em torno de 25 milhões de sacas, pode-se aquilatar a importância de tal jugamento.

Neste capítulo nosso objetivo é tentar a obtenção de uma identificação sistemática dessas bebidas, com a utilização da RPE e da Espectroscopia Fotoacústica.

### III.1. A PROVA DE DEGUSTAÇÃO DO CAFÉ OU PROVA DE XÍCARA

#### Histórico

É notável a capacidade de que são dotados os nossos sentidos. Se um frasco de uma substância volátil (amoníaco, p.e.) é aberto em um canto da sala, dentro de poucos segundos é possível perceber pelo olfato no canto oposto, a presença dessa substância, mesmo que a sua concentração no ar não passe de alguns p.p.m. ou menos. Nossos olhos são capazes de observar estrelas distantes e de baixa luminosidade que só seriam reveladas por um filme fotográfico após longa exposição. O sentido do tato é igualmente privilegiado, uma vez que propicia aos cegos a capacidade de ler. É provável que os sentidos da audição e paladar também sejam dotados de grande sensibilidade. Entretanto, nossos sentidos são passíveis de sofrer

rem alterações na sua acuidade. Se levamos à boca uma colherada de mel e em seguida experimentamos uma bebida doce, essa sensação de doce não se manifesta, revelando a limitação e subjetividade do nosso paladar. É nesse aspecto que acreditamos centralizar-se a conveniência de obter um método científico de classificar as bebidas de café e que possa garantir a ausência da subjetividade da prova de degustação.

A prova de xícara surgiu no Brasil no início do Século XX. Sua adoção, porém, só ocorreu em 1917 na Bolsa Oficial do Café e Mercadorias de Santos (Instalada em 1914), quando foi pela primeira vez considerada para fins de valorização do café. Desde então, diversos autores tem se referido à prova de xícara, ora atribuindo-lhe grande importância, ora dirigindo-lhe críticas geralmente fundamentadas na sua subjetividade.

Ferreira<sup>(1)</sup> afirma ser a prova de xícara a "prova dos nove" nos negócios de café.

Para Costa<sup>(2)</sup> o gosto do café é impressão subjetiva difícil de ser medida. Esse autor descreve também as tentativas de se correlacionar o gosto do café com determinados produtos químicos existentes na semente, com resultados pouco satisfatórios. Por isso reconhece a importância da prova de xícara na classificação do café, apesar de sua subjetividade.

Antunes Filho<sup>(3)</sup> afirma que o método de avaliar a qualidade da bebida de café através do gosto tem sido tão satisfatório, como no caso de vinhos.

Calle V.<sup>(4)</sup> fala sobre a subjetividade da prova de xícara e considera ser ela limitada pela aptidão do provador, a qual pode ser formada e não é susceptível de ser medida.

Mônaco<sup>(5)</sup> discorre sobre a subjetividade da prova de xícara



co, sem as limitações daquela, esbarrou na dificuldade de que os métodos utilizados não eram capazes de correlacionar a qualidade da bebida com a composição química ou com propriedades físicas do café. Dois caminhos foram sugeridos para resolver o problema do gosto e do aroma do café: análise do aroma por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometro de massas, auxiliada pela análise na região do Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear, ou pela análise de precursores do gosto e do aroma do café verde, partindo-se de cafés conhecidos organolepticamente. Tanto em um como em outro caminho, foram obtidos resultados bastante conclusivos. Mas a grande complexibilidade de tais análises impediu que a prova de xícara ou o elemento humano fossem substituídos, permanecendo em vigor, nos limiares do século XXI, uma técnica comercial desenvolvida no início do século XX.

### O Método

Para a prova de xícara são tomadas amostras com 100 g de sementes de cada café a ser provado. A torração é um passo importante e é executada por uma única pessoa, para cada lote de amostras, com o intuito de evitar-se diferenças substanciais no grau de torração entre amostras de um mesmo lote. O sistema torrador é constituído de uma série de cilindros giratórios aquecidos por fornalhas a gás ou elétricas. A amostra é colocada no cilindro previamente aquecido e é nele mantida até atingir uma coloração achocolatada clara, denominada "torração americana", porque acredita-se que uma torração muito intensa não permita ao degustador avaliar com eficiência o aroma e sabor do café.

A amostra é então retirada e, após esfriar, é moída de forma a atingir uma granulação denominada média, em que o tamanho das par

tículas é maior do que o obtido em torrações comerciais. Procedese a limpeza dos moinhos após a moagem de cada amostra para evitar-se misturas de amostras diferentes.

A preparação da bebida é feita tomando-se 10 g. de amostra para cada xícara de água quente de primeira fervura. A água é previamente filtrada, podendo também ser utilizada água mineral engarrafada. Para cada amostra de café a ser provado são preparadas em geral 5 xícaras.

As bebidas separadas por amostra são colocadas em uma mesa giratória em torno da qual sentam-se os degustadores em número de dois ou três. Cada mesa de prova pode conter até cerca de dez amostras, ou seja, 50 xícaras. Os provadores, que não se comunicam verbalmente durante a prova, fazem um giro completo da mesa e cheiram cada xícara a fim de identificar bebidas de baixa qualidade, as quais devido à repugnância de seu sabor podem perturbar as degustações seguintes e por isso são deixadas para o final da prova.

Após o depósito do pó no fundo da xícara e da retirada da espuma que se forma na superfície da solução, aguarda-se que esta se apresente morna e é iniciada a prova. O provador com uma colher em forma de concha retira um volume de bebida e leva-a à boca com um forte chupão de forma a nebulizá-la e permitir que esta atinja simultaneamente a língua e o palatino, após o que cospe-a em uma cuspeira. Feita a prova das várias xícaras de cada amostra, o resultado é marcado em uma ficha colocada sobre a mesa, adjacentemente à amostra e que traz o seu código.

As sensações experimentadas pelos provadores para a classificação das principais bebidas são expressas verbalmente por frases do tipo<sup>(10)</sup>

MOLE: gosto suave, adocicado, agradável ao paladar.

DURO: gosto acentuadamente áspero, desagradável.

RIO: gosto forte, característico, lembrando iodofórmio ou ácido fênico.

Existe consenso entre os especialistas de que a classificação do café por bebida é uma tarefa difícil, que exige experiência e paladar apurado. O resultado está sujeito à influência pessoal do degustador, produzida por exemplo pelos alimentos ingeridos no dia, uso de fumo e álcool, e até mesmo pelo excesso de classificações realizadas num curto espaço de tempo.

Para finalizar nossa exposição sobre a prova de xícara e para dar uma idéia do grau de subjetividade a ela associado, fornecemos na Tab. 3-1 os resultados de classificações de cafês utilizando esse método e realizadas por dois grupos diferentes de provadores. O primeiro grupo pertencia ao IBC, que nos forneceu as amostras. O segundo grupo pertencia ao Departamento de Café da Federação Meridional de Cooperativas Agropecuárias Ltda (Femecap).

Tabela 3-1. Classificação de amostras de café da safra 87 utilizando a prova de xícara

Classificação IBC	M	RY	R	D
Classificação Femecap	RY	RY	RY	D

A Tab. 3-1 é uma prova eloqüente de que a prova da degustação está sujeita a grandes discrepâncias. Observa-se que das quatro bebidas analisadas, em dois casos existe discordância de classificação, sendo que em um dos casos a diferença representa uma variação considerável na qualidade da bebida (de MOLE para RIADO). Nota-se também que as discrepâncias são completamente aleatórias, uma vez que em um dos casos a classificação da Femecap implica em piora na qualidade da Bebida em relação à classificação do IBC (M para RY) e no outro caso, uma melhora na qualidade (R para RY).

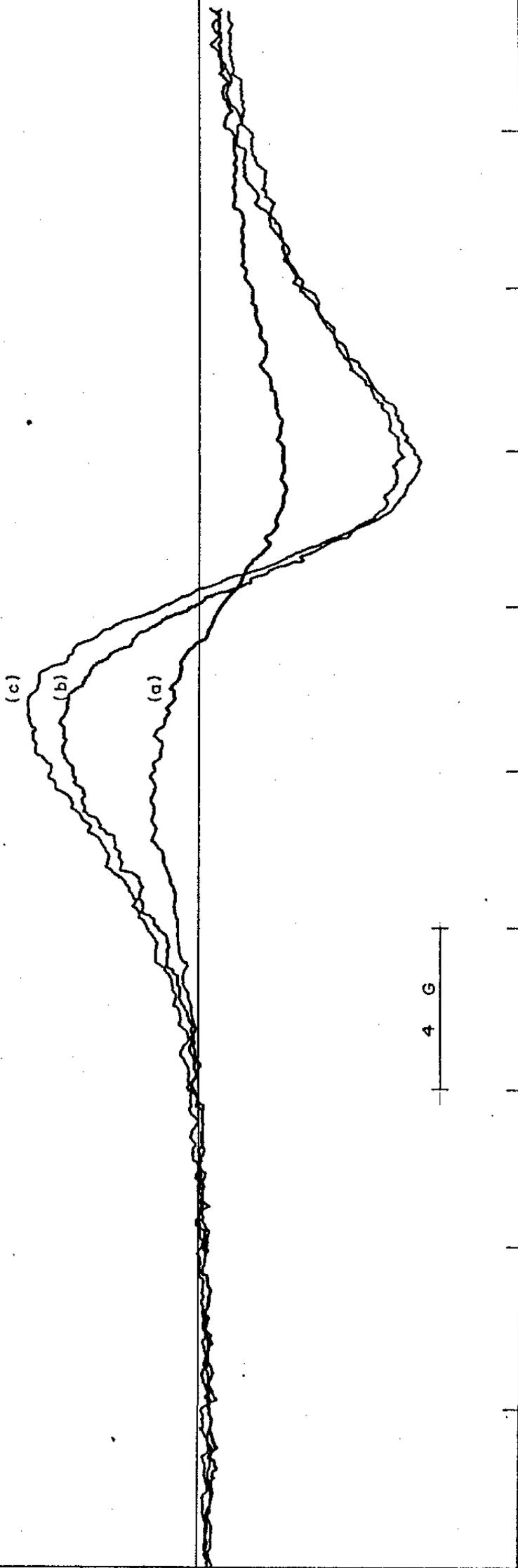
Essas observações tornam encorajadoras as tentativas de obter uma classificação sistemática da bebida do café, trabalho que ora nos propomos a iniciar.

### III.2. APLICAÇÃO DA RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA NA IDENTIFICAÇÃO DAS BEBIDAS DE CAFÉ

#### III.2.1 A Ocorrência de Radicais Livres no Café

Durante a torração do café, a concentração de radicais livres é substancialmente aumentada. Esse fato foi observado por Omehara et al.<sup>(11)</sup>, tendo também sido objeto de consideração por Hernandez et al.<sup>(12)</sup>, trabalhando com café colombiano. É vista na Fig. 3-1 a curva de RPE obtida para o café MOLE submetido a três graus de torração diferentes. A temperatura de torração utilizada foi de 215°C e os tempos de torração foram (a) 6,5 minutos, (b) 7 minutos e (c) 8 minutos.

Essas linhas apresentam uma largura de cerca de 7 gauss e fator g de Landé aproximadamente igual a 2,003. O campo central uti



3395

CAMPO MAGNÉTICO (Gauss)

FIG. 3-1

Linhas de RPE do pó de café Mole torrado a 215°C durante (a) 6,5 minutos, (b) 7 minutos e (c) 8 minutos. Observa-se que a concentração de radicais livres aumenta com o aumento do grau de torração.

zado foi cerca de 3400 gauss. Valores típicos da concentração de radicais livres em café torrado são da ordem de  $10^{17}$  spins/grama, o que equivale aproximadamente a algumas partes por mil, em termos de spins por moléculas presentes.

As transições de spin associadas a essas linhas envolvem energias dadas aproximadamente por

$$E = g\beta H = 2 \times 9,3 \times 10^{-24} \frac{\text{J}}{\text{T}} \times 3,4 \times 10^{-1} \text{ T} = 6,3 \times 10^{-24} \text{ J} \\ \cong 3,9 \times 10^{-5} \text{ eV}$$

Aparentemente, a formação de radicais com a torração é fato comum a um grande número de materiais biológicos. Bennett et al.<sup>(14)</sup> observaram fenômeno semelhante na produção de carvão vegetal e associaram a formação de radicais livres a uma quebra de ligações em cadeias carbônicas condensadas.

Fato interessante é que a concentração de radicais varia com o transcorrer do tempo, após cessada a torração, diminuindo com o envelhecimento da amostra. Existe, porém, em alguns casos, um período "exotérmico" em que a concentração de radicais pode aumentar. Essas características são bastante discutidas por Hernandez et al.<sup>(12)</sup> e por Miyahara<sup>(13)</sup> e são mostradas nas Fig. 3-2 e 3-3 para cafés das qualidades Rio, Rio Zona, Riado e Mole. Observa-se na Fig. 3-3 a existência de um período de envelhecimento em que a diminuição na concentração de radicais livres aproxima-se do comportamento exponencial. É conhecido também que a taxa de redução na concentração de radicais possui estreita dependência com propriedades do meio que envolve a amostra. Estudos de Miyahara<sup>(13)</sup> focalizaram a influência de atmosferas constituídas de Nitrogênio, Oxigênio e de vapor d'água sobre a concentração de radicais livres no café.

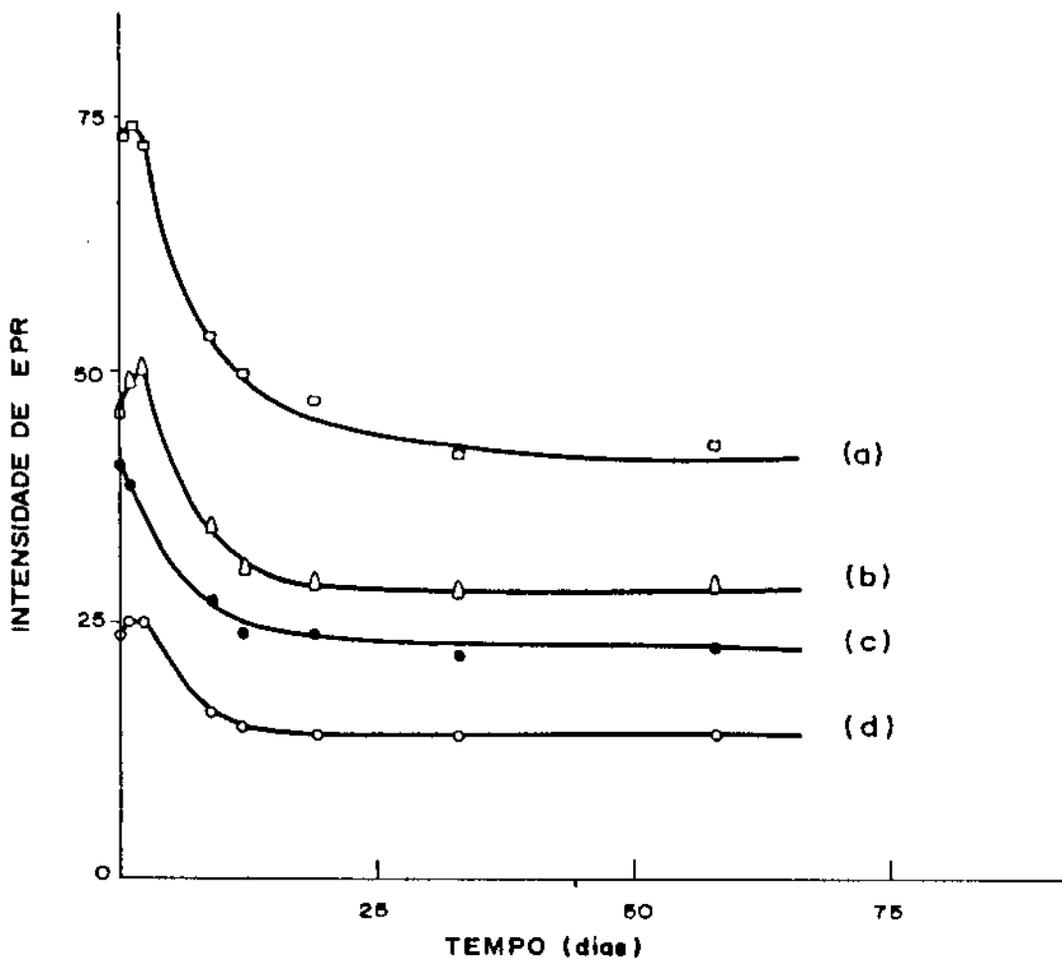


FIG. 3-2

Curvas representativas do envelhecimento do café (a) Rio, (b) Rio Zona, (c) Riado e (d) Mole. Nota-se que a concentração de radicais livres tende a diminuir com o tempo, existindo porém em alguns casos um período  $\bar{T}$  inicial exotérmico em que a concentração de radicais aumenta com o tempo.

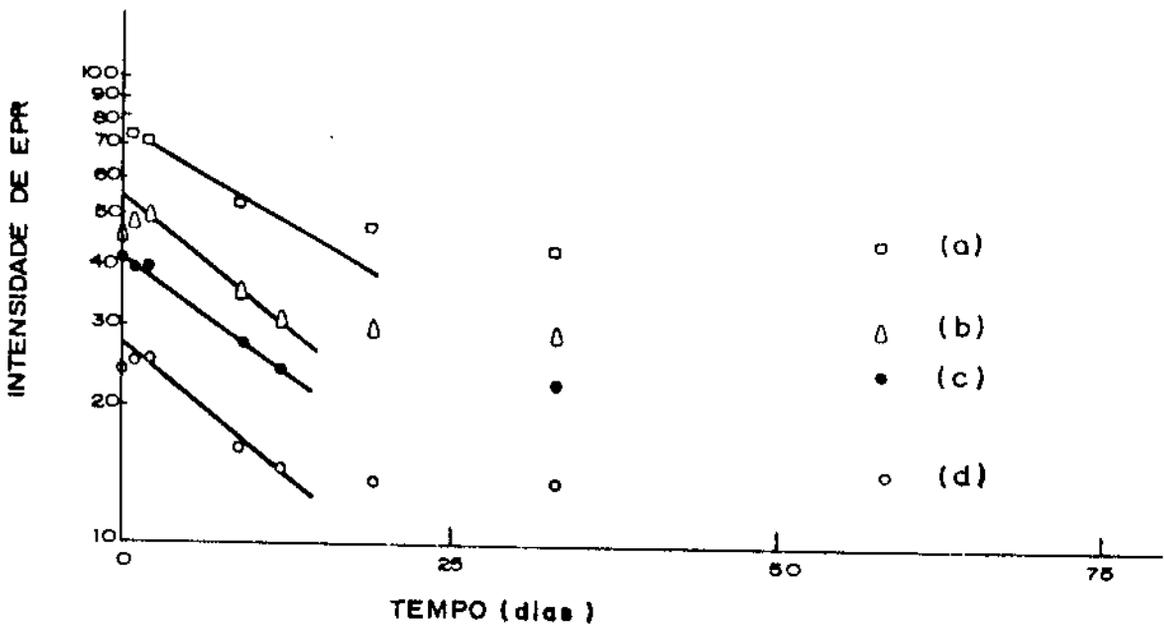


FIG. 3-3

Curvas representativas em papel mono-log do envelhecimento do café (a) Rio, (b) Rio Zona, (c) Riado e (d) Mole. Nota-se a existência de um período do envelhecimento em que o comportamento é exponencial.

### III.2.2. Descrição do Experimento

#### Amostras Utilizadas

Para o experimento foram utilizados dois lotes de amostras. O primeiro lote fornecido pela Fundação IBC, continha sementes dos cafés RIO ZONA, RIO, RIADO, DURO e MOLE, conforme a classificação prévia por provadores do IBC realizada por ocasião da safra do café. Convém salientar que essas amostras eram de safras anteriores a 85 e portanto com pelo menos dois anos de acondicionamento em latas com capacidade para 1 Kg. O segundo lote foi-nos fornecido pelo Departamento de Café da Federação Meridional de Cooperativas Agropecuárias Ltda.(Femecap) e também continha as amostras RZ, R, RY, D e M previamente classificadas por provadores daquela instituição, mas eram amostras da safra de 87, portanto com apenas alguns meses de armazenagem. Todas as amostras eram da espécie *Coffea Arabica*.

#### Aparelhagem Utilizada

Medidas de RPE em banda X foram efetuadas num espectrometro Varian E-12, que é mostrado esquematicamente na Fig. 3-4. A amostra, acondicionada numa cavidade de ressonância recebe a energia gerada pela Klystron da ponte de microondas. A cavidade utilizada é do tipo retangular de modo de operação  $TE_{102}$  e fator Q de qualidade mínima igual a 2000.

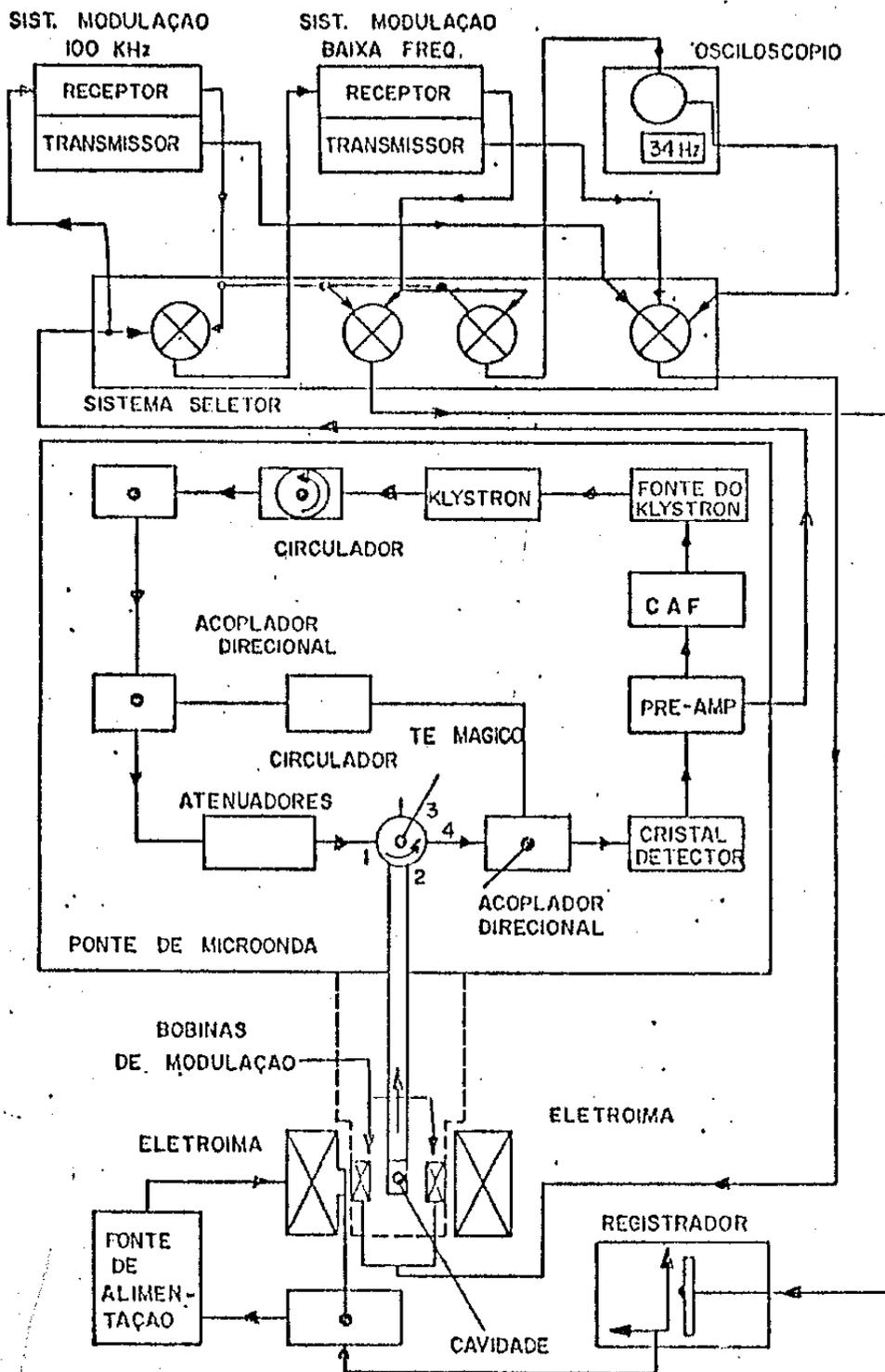


FIG. 3-4

Diagrama de blocos do espectrômetro de RPE utilizado nas medi-  
das da concentração de radicais livres de café.

O sistema seletor permite a modulação do campo magnético em alta (100 KHz) ou em baixa (10 KHz, 1 KHz, 270 Hz ou 35 Hz) frequência.

O campo magnético pode ser variado em módulo. Ao atingir um valor adequado, a RPE pode ser induzida na amostra, ocorrendo então a mudança na proporção entre energia enviada à cavidade e a energia refletida pela cavidade. Um cristal detector recebe a energia refletida (modulada na frequência do campo de modulação) através do circulador na ponte.

Numa das unidades de modulação, o sinal (modulado a baixa ou alta frequência) contendo a informação RPE, após passar pelo Cristal, é amplificado e aplicado a uma seção receptora.

Um registrador cujo eixo X indica a variação do campo magnético controlado por um sensor Hall, recebe no eixo Y, após detecção em fase, o sinal amplificado.

Para a torração, moagem e pesagem das amostras, foram utilizados os mesmos equipamentos descritos no ítem II.1.1 no estudo de adulterantes do café.

### Preparação e Manipulação das Amostras

Como vimos, o grau de torração possui grande influência na formação de radicais livres no café. Desta forma, qualquer comparação para fins de distinção de diferentes cafês através da concentração de radicais livres, deve pressupor um mesmo grau de torração para os diferentes cafês em consideração. Por isso idealizamos um sistema visando torrar mais de uma qualidade de café simultaneamente. O sistema é

constituído de caixinhas cúbicas de aproximadamente 2,5 cm de aresta, feitas em tela metálica de aproximadamente 2 mm de malha. Essas caixinhas podem ser colocadas em número de nove, adjacientemente à parede interna do forno torrador, ficando presas por argolas de arame a uma cinta metálica, que as pressiona contra a parede do forno impedindo que sejam soltas. O número de nove caixinhas foi imposto, primeiro pela estrutura interna do forno que continha três pás agitadoras, entre as quais as caixinhas seriam encaixadas, e segundo pela nossa intenção inicial de torrar sete qualidades de café simultaneamente.

A Fig. 3-5 ilustra uma torração de café utilizando esse sistema. Cada caixinha pode conter cerca de 2g de amostra e ainda, permitir as necessárias agitação e liberação de voláteis durante a torração. Nas primeiras tentativas de torrar as sete qualidades de café simultaneamente, logo de início revelaram a ineficácia desse procedimento, que conduzia a uma baixa reprodutividade de resultados, principalmente devido à heterogeneidade nas sementes das amostras por nós utilizadas e à pequena quantidade de sementes acondicionadas em cada caixa.

Por outro lado, foi-nos adiantado pelo IBC ser pouco confiável a marcação de temperatura existente no forno. Além disso, as medidas seriam feitas em dias diferentes, partindo-se de uma situação inicial de temperatura ambiente variável. Esses dois fatos implicariam em dificuldades em se manter constante o grau de torração para diferentes amostras. Por isso, optamos por efetuar medidas comparativas, utilizando o café RIO, como normalizador das medidas. Seguindo esse procedimento, colocamos a cada torração 5 caixinhas preenchidas com café classificado como RIO e 4 caixinhas com café de outra qualidade. Essa sistemática garantiria ainda a utilização de uma quantidade maior de amostra, amenizando o inconveniente da heterogeneidade das sementes.

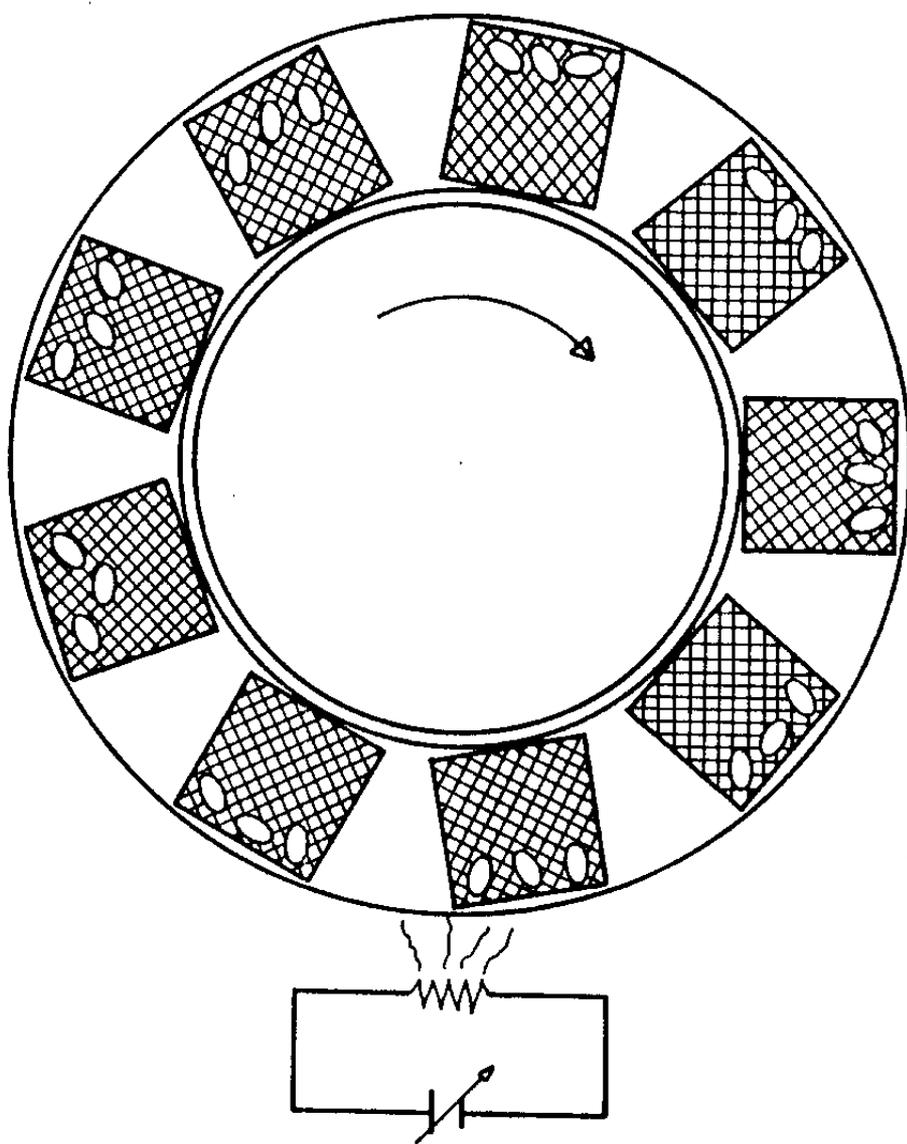


FIG. 3-5

Ilustração do sistema utilizado na torração de café para fins de classificação das bebidas. Cada caixa que é construída em tela de arame de aço pode conter cerca de 2g de sementes.

A Fig. 3-6 fornece os resultados de uma torração típica por nós utilizada. Todas as torrações foram finalizadas quando percebemos o denominado "ponto de pipoca", que é caracterizado pelo despreendimento da película externa que envolve o grão, sendo emitido um ruído característico.

Finalizada a torração, as nove amostras eram rapidamente retiradas do forno e após o esfriamento, moídas separadamente. Após a moagem, cada amostra era passada em uma peneira de malha 0,297 mm, que propiciava melhor uniformização no tamanho de partícula e maior homogeneidade do pó, já que cada caixinha continha cerca de 15 sementes. As amostras eram então colocadas em tubos de ensaio e levadas ao aparelho de medidas, na Unicamp. Para evitar-se a influência do envelhecimento sobre a concentração de radicais, as amostras de café torrado em pó eram, tão logo quanto possível pesadas, tomando-se 40 mg, acondicionadas em pequenos tubos de ensaio de quartzo, sendo imediatamente após obtido o seu espectro de RPE. Normalmente as torrações eram feitas no período da manhã e as medidas de RPE no período da tarde, mas nunca em dias diferentes.

Para as medidas de RPE, foram tomados cuidados especiais de manter iguais os comprimentos das colunas das amostras nos tubos de mesmo diâmetro, bem como do posicionamento da amostra no centro da cavidade. Os controles dos instrumentos utilizados nas medidas também foram mantidos nas mesmas posições para todas as medidas. Quando eventualmente alguma linha apresentava intensidade muito abaixo da média para o conjunto, a medida era repetida.

Procuramos, enfim, trabalhar em condições as mais favoráveis possíveis, uma vez que nossos resultados dependeriam de medidas de intensidade, as quais são muito susceptíveis a imprecisões oriundas de fatores experimentais.

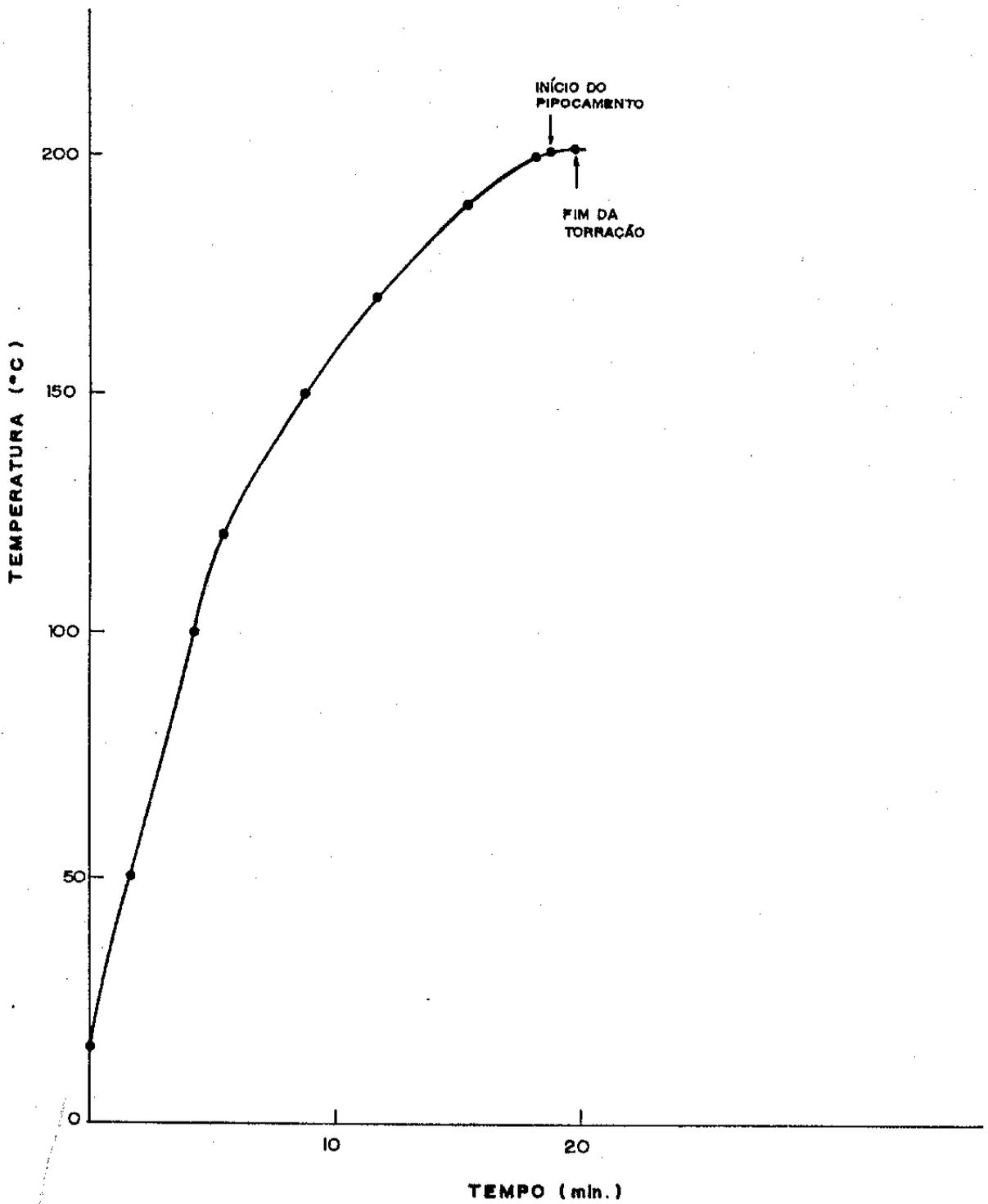


FIG. 3-6  
Curva representativa de uma torração típica utilizada para fins de  
classificação das bebidas de café.

### III.2.3. Resultados e Discussão

É mostrada na Fig. 3-7 uma sequência de linhas de RPE por nós utilizada para a diferenciação da qualidade da bebida do café. As cinco primeiras linhas referem-se a café RIO e as quatro restantes a café MOLE, segundo classificação pela prova de xícara realizada na Femecap.

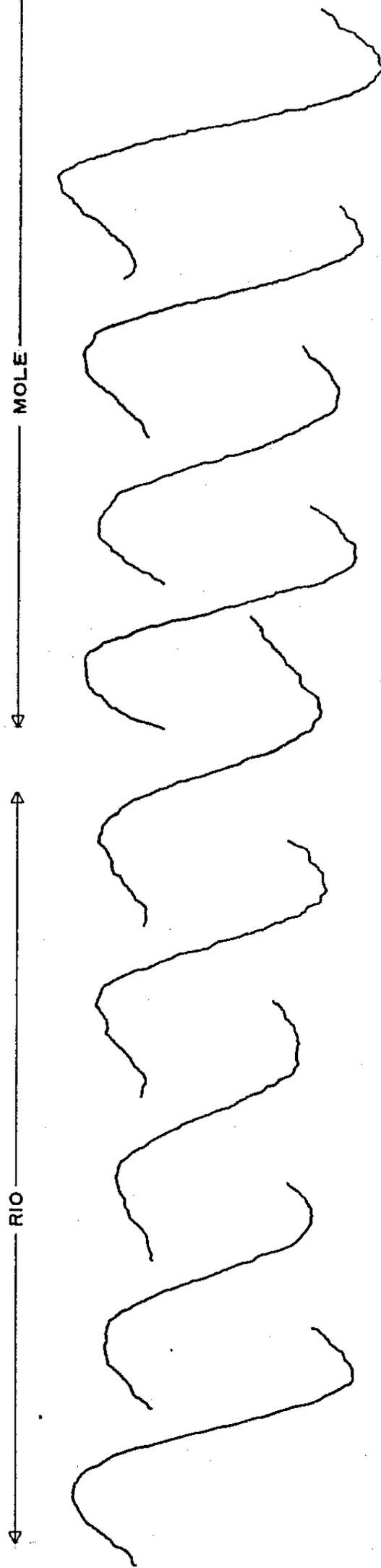
Nossas tentativas de distinguir as diferentes bebidas de café concentraram-se na monitoração dos seguintes parâmetros das linhas de RPE: largura de linha, fator  $g$  de Landé e intensidade da linha.

A largura de linha não revelou-se capaz de servir como elemento diferenciador dessas bebidas, conforme mostra a Tab. 3-2, que apresenta os resultados das medidas realizadas nas nove linhas apresentadas na Fig. 3-7.

Tabela 3-2. Larguras de Linha de RPE de cafês torrados simultaneamente (em  $\rho_0$ )

RIO					MOLE			
7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	8,0	7,5	7,0
(Gauss)					(Gauss)			

Todos os valores estão afetados por um desvio de 0,5 Gauss.



## CAMPO MAGNÉTICO

FIG. 3-7

Linhas de RPE exibidas por amostras de uma mesma torração. As cinco primeiras linhas referem-se ao café Rio que foi utilizado como normalizador das intensidades. As quatro linhas restantes referem-se a café Mole. As diferenças nas intensidades dentro de uma mesma bebida são atribuídas à heterogeneidade das amostras.

O fator  $g$  de Landé, como é sabido, assume um valor característico para radicais livres e por isso mostrou-se inadequado para a distinção das diferentes bebidas de café. Tal parâmetro, calculado para as amostras DURO, RIADO, RIO, e RIO ZONA, cujo envelhecimento foi por nós acompanhado, assumiu valores que oscilaram entre 1,998 e 2,004, mesmo durante 34 dias de envelhecimento. Optamos então por utilizar as intensidades médias das linhas como parâmetro de distinção das bebidas.

A Tab. 3-3 mostra as classificações realizadas pelo IBC e pela Femecap para as amostras de safras anteriores a 85 e sua correlação com as intensidades das linhas de RPE.

Os altos valores dos desvios são ocasionados pela variabilidade nas intensidades das linhas obtidas para uma mesma bebida, em consequência da heterogeneidade das sementes. Em trabalhos preliminares analisamos essa heterogeneidade e as sementes, dentro de uma mesma bebida, podiam ser separadas em 3 tipos em função da cor (claras, escuras, intermediárias), e em dois tipos em função do tamanho, além de ser possível a identificação de sementes quebradas, carunchadas, ôcas, etc. A cor possui relação com o envelhecimento da semente, ou seja, as sementes tendem a clarear com o envelhecimento. As medidas de RPE revelaram que sementes mais claras apresentam em geral maior intensidade.

Considerando que cada caixinha utilizada na torração continha cerca de 15 sementes, o procedimento de tomar essas sementes ao acaso para a torração pode ter envolvido acidentes que favoreceram a predominância de um outro tipo de sementes.

Além disso, uma saca de café pode conter sementes oriundas de vários pés de café, tendo por isso sido submetidas a diferentes condições de insolação, vento, contato com o solo, secagem, etc., que são fatores considerados determinantes do sabor da bebida. Portanto acredita

Tabela 3-3. Classificação de cafés de safras anteriores a 85 e sua correlação com as intensidades das linhas de RPE exibidas por amostras do mesmo lote

Classificação IBC <sup>(*)</sup>	M	RY	R	RZ	D
Classificação FEMECAP <sup>(*)</sup>	D	RY	R	R	D
	(fundo RY)	(uma xícara R)			
Intensidade de RPE <sup>(***)</sup>	107±13	100±18	100±14	100±14	94±9

(\*) classificação realizada no ano da safra

(\*\*) classificação realizada em 1987

(\*\*\*) normalizadas, atribuindo-se valor 100 à intensidade da bebida R

mos que esses desvios poderiam ser substancialmente reduzidos se pudéssemos torrar maior massa de amostra, que conseqüentemente seria mais representativa da partida de café que a originou. De passagem, lembremos a esse respeito que os provadores utilizam amostragens de 100g de sementes para a prova de xícara.

Com referência às intensidades médias de RPE indicadas na Tab. 3-3, observamos que estas revelaram-se iguais para as bebidas RY, R, RZ, assim denominadas segundo a classificação do IBC, realizada no ano da safra. Por outro lado, considerando a classificação realizada pela Femecap, observamos que essas três intensidades correspondem a duas bebidas R e uma RY, que entretanto, apresentou uma xícara de bebida R, havendo então boa concordância com os resultados de RPE. Aproveitamos para novamente enfatizar o problema da heterogeneidade das sementes de café, que se fez presente mesmo neste caso, em que cada xícara de café continha cerca de 10g de sementes. Quer nos parecer então que o envelhecimento dessas sementes levou a uma uniformização das bebidas, com tendência da bebida RY evoluir para R e o que é mais surpreendente, a bebida de pior qualidade, RZ, evoluir para R. Esses resultados concordam apenas em parte com a opinião de alguns provadores que afirmam ser possível a alteração da qualidade do café com o passar do tempo, sendo que cafés de boa qualidade tendem a melhorar a qualidade e os de má qualidade tendem a sofrer piora na qualidade. Uma outra parte de provadores acredita que o sabor da bebida não é alterado com o passar do tempo.

Outro fato revelado pela Tab. 3-3 é que a bebida M, segundo a classificação do IBC, que apresentou maior intensidade de RPE, recebeu da Femecap a classificação de D com fundo RY, o que significa uma bebida D progredindo para RY, apresentando por isso um sabor intermediário

rio.

Assim, constatamos novamente uma incoerência com a noção de que cafês de boa qualidade tendem a evoluir para uma melhora com o passar do tempo.

Para finalizar nossas considerações sobre a Tab.3-3, cabe-nos inferir sobre a possibilidade de que as diferenças observadas entre as classificações realizadas pelo IBC e pela Femecap não sejam realmente explicáveis pelos argumentos por nós utilizados até agora, mas, ao contrário, sejam fruto de discrepâncias próprias da subjetividade da prova de xi cara . Essa hipótese é ainda reforçada se considerarmos que os resultados obtidos pela RPE estão em boa concordância com a classificação do IBC, isto é, a bebida de melhor qualidade (M) está correlacionada com a maior intensidade de RPE. O grupo de bebidas de pior qualidade (RY, R, RZ) possui correlação com intensidade intermediária de RPE e a bebida de qualidade intermediária (D) assume a intensidade mais baixa. Por outro lado, o fato da bebida D ter apresentado a menor intensidade de RPE da série é um resultado inesperado. Intuitivamente esperaríamos que as intensidades apresentassem valores crescentes ou decrescentes com a melhora da qualidade do café.

Consideremos agora os resultados apresentados na Tab. 3-4, referentes a amostras de safra recente. Verificamos, neste caso, que as intensidades médias diferenciam mais nitidamente as várias amostras. Além disso, pode-se notar que as amostras de pior qualidade RY, R e RZ diferenciam-se mais da amostra de melhor qualidade M do que entre si.

Tabela 3-4 Classificação de cafês da safra 87 e sua correlação com as intensidades das linhas de RPE exibidas por amostras do mesmo lote.

Classificação Femecap	M	RY	R	RZ	D
Intensidade de RPE <sup>(*)</sup>	124+14	108+15	100+9	94+4	89+9

(\*) normalizadas, atribuindo-se valor 100 à intensidade da bebida R

Observamos que também para este caso a bebida D apresentou a menor intensidade de todo o lote, contrariando a tendência de diminuição da intensidade com a piora na qualidade da bebida. Esses resultados nos levam a concluir que as substâncias associadas à formação de radicais livres no café podem ser diversas e os mecanismos variados. Portanto, a correlação dos sabores das bebidas com a formação de radicais livres não deve ser inferida, a priori, como algo direto.

Entrar no âmbito de identificar exatamente as substâncias que podem contribuir para a formação de radicais livres e sua eventual ligação com o sabor da bebida nos parece um trabalho complicado. Análises químicas realizadas por Rhoades<sup>(15)</sup> em voláteis do café revelaram a presença de 16 substâncias, estando entre as mais abundantes o álcool metílico e a acetona. É bem provável que o número total de substâncias presentes no café torrado atinja a casa das centenas ou milhares. Estudos realizados por Streuli<sup>(16)</sup> podem dar uma idéia dessa complexibilidade composicional do café. À guisa de ilustração, fornecemos na Tab. 3-5 a composição química do café cru, na Tab. 3-6 a composição química do café torrado e na Tab. 3-7 a composição

química de extratos aquosos do café torrado, obtidas no trabalho de Streuli.

Existem substâncias, cuja concentração no café aumenta durante a torração, como é o caso dos hidrocarbonetos policíclicos, que, diga-se de passagem são compostos cancerígenos<sup>(16)</sup>. Por outro lado, conforme estudos de W. Baltes<sup>(17)</sup> parte das substâncias presentes no café, tais como alguns ácidos orgânicos, sofrem uma diminuição em sua concentração durante a torração.

Um trabalho mais dirigido à relação entre composição química e qualidade da bebida de café foi realizado por H.V. Amorim<sup>(18)</sup>, que trabalhando com café verde observou que cafés M apresentam valores inferiores de ácido clorogênico em relação ao D, RY e R, podendo este ser um dos fatores que conduzem a uma melhor bebida. Realizando a eletroforese de proteínas, observou a ocorrência de atividade da enzima poliferol oxidase sobre compostos fenólicos ligados às proteínas. A atividade destas enzimas revelou-se maior nos cafés de melhor qualidade. Por sua vez, uma maior atividade dessa enzima implica em maior probabilidade de compostos fenólicos oxidados formarem complexos com essas proteínas, alterando-lhes a carga elétrica. Esse conjunto de reações poderia estar relacionado com a formação de radicais e confirmaria nossa observação de que a taxa de formação de radicais é maior no café M.

Tabela 3-5. Composição Química do Café Crú (Arábica)

Componentes	Conteúdo(*)
CARBOHIDRATOS	59
Glucose, Frutose	Traços
Sacarose	6
Polisacarídeos	53
LIPÍDEOS	16
Triglicerídeos	
Fosfatídeos	
Cêras	
5-Hidroxiptamídeos	0,1
Terpenóides, Esteróides	
Hidrocarboretos	
PROTEINA	11
ÁCIDOS ORGÂNICOS	7,5
Ácidos Clorogênicos-Compostos relacionados	6,5
Ácidos Cítrico, Máfico, Oxálico	1
PURINAS	1,3
Cafeína	1,2
Teobromina, Teofilina e outros	Traços
MINERAIS (CÁTIONS)	2,0
K	1,6
Mg, Ca, Na, Rb, Fe	0,4
TRIGONELINA	1,0
TOTAL	~ 98,0

(\*) conteúdo porcentual obtido com base em material seco.

Tabela 3-6. Composição Química do Café Torrado (Arábica)

Componente	Conteúdo (*)
CARBOHIDRATOS	45
Mono e Oligosacarídeos	Traços
Polisacarídeos	45
Mio-Inositol	
LIPÍDEOS	17
ÁCIDOS ORGÂNICOS	4
Ácidos Clorogênicos	3
Ácidos Cítrico e Máfico	0,5
Ácidos voláteis	0,4
MINERAIS (CÁTIONS)	2,2
CAFEINA	1,3
TRIGONELINA	0,5
PROTEINA APARENTE	13
TOTAL	83

(\*) conteúdo porcentual obtido com base em material seco

Tabela 3-7. Composição Química de Extratos Aquosos de Café submetido a torção Média

COMPONENTES	CAFÉ COMUM	CAFÉ SOLÚVEL
<b>ÁCIDOS ORGÂNICOS</b>		
Ácidos Clorogênicos	10	8
Ácidos voláteis	2	1
Outros ácidos	13	11
<b>MINERAIS</b>	9	6
<b>CAFEINA</b>	6	4
<b>TRIGONELINA</b>	3	2
<b>CARBOHIDRATOS</b>		
Mono e Oligosacarídeos	Traços	1
Polisacarídeos		
<b>GORDURA</b>	0,1	0,1
<b>SUB - TOTAL</b>		
(Substâncias Quimicamente Definidas)	43	33
<b>CARBOHIDRATOS APARENTES</b>	23	26
<b>PROTEINAS APARENTES</b>	10	10
<b>MATÉRIA COLORIDA (*)</b>	15	
<b>TOTAL</b>	<b>91</b>	<b>69</b>

(\*) substâncias precipitáveis solúveis em acetona (proteínas, carboidratos, ácidos clorogênicos)

### III.3. APLICAÇÕES DA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA NA IDENTIFICAÇÃO DAS BEBIDAS DE CAFÉ

#### III.3.1. A Absorção Fotoacústica do Café no Infravermelho Próximo

São mostrados na Fig. 3-8 espectros do café M crū e desse café submetido aos mesmos graus de torração referidos no ítem III.2.1, no estudo de RPE. Notamos que o pico que melhor diferencia esses espectros é centrado em 0,88  $\mu\text{m}$ , situando-se numa região do espectro que abrange os limites entre o visível e o infravermelho próximo, a qual, diga-se de passagem, é uma região pouco utilizada em análise espectroscópica.

As energias envolvidas nessas absorções de radiação são dadas por

$$\Delta E = \frac{h c}{\lambda} = \frac{6,6 \times 10^{-34} \text{ J.S.} \times 3 \times 10^8 \text{ m/s}}{9,4 \times 10^{-7} \text{ m}} = 2,1 \times 10^{-19} \text{ J} \approx 1,3 \text{ eV}$$

Podemos observar também que a absorção característica do café torrado que ocorre em 0,88  $\mu\text{m}$  não comparece no café crū. Portanto, os sistemas químicos responsáveis por essa absorção possuem na fotoacústica o mesmo papel que os radicais livres na RPE.

#### III.3.2. Descrição do Experimento

##### Amostras Utilizadas

Para as análises através da fotoacústica utilizamos o lote de amostras M, RY, R e RZ da safra de 87, fornecido pela Feme

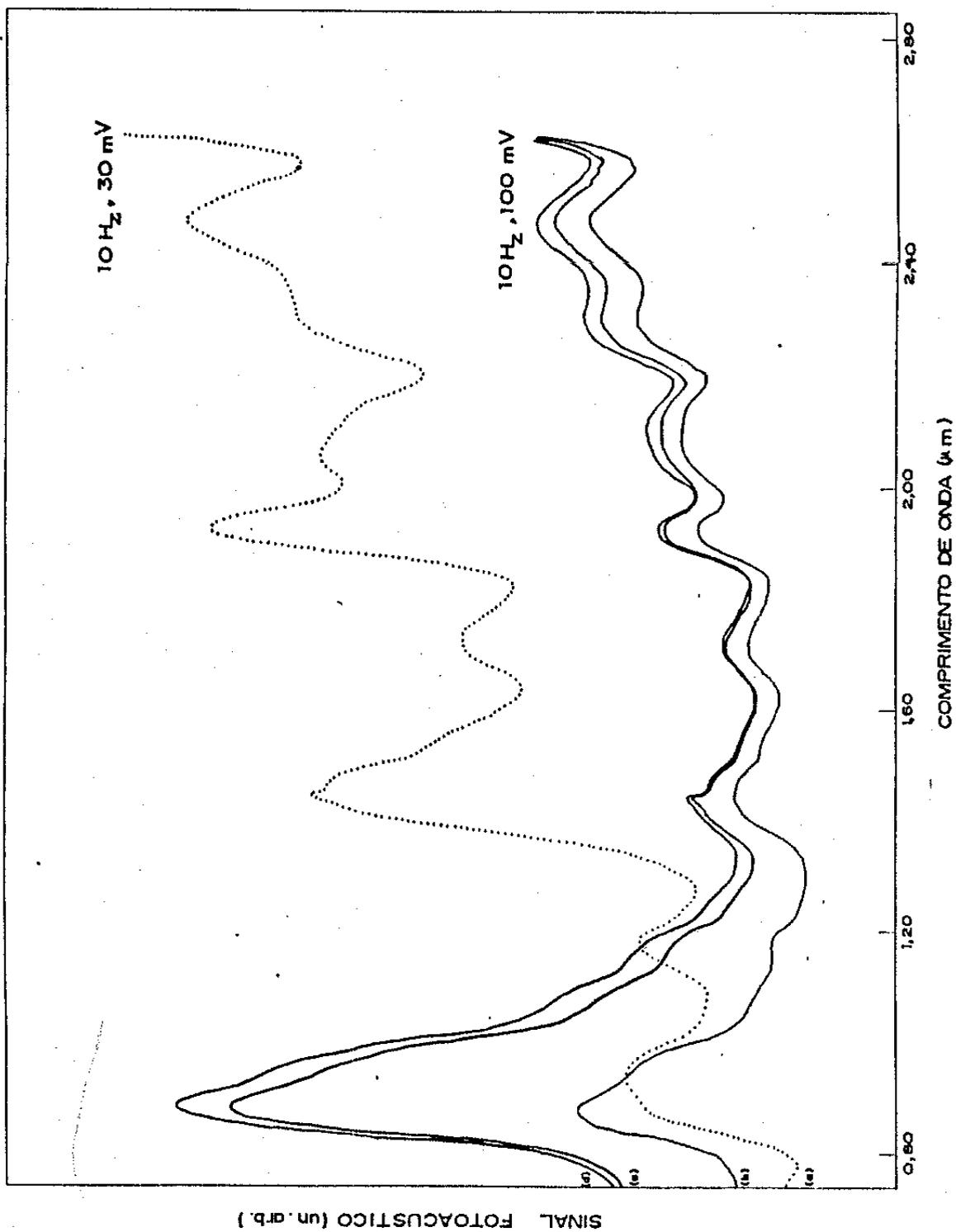


FIG. 3-8

Espectros fotoacústicos no infra-vermelho próximo exibidos pelo café Mole (a) cru, e torrado a uma temperatura de 215°C durante (b) 6,5 minutos, (c) 7 minutos, (d) 8 minutos. O pico centrado em 0,88 μm é o que melhor distingue as diferentes torrações.

cap e que já havia sido analisado por RPE. Dentro desse lote, escolhemos apenas uma amostra para cada qualidade de café. O critério de escolha foi tomar uma amostra cujo valor de intensidade de RPE se aproximasse da intensidade média obtida no grupo de amostras da mesma qualidade de café.

### Aparelhagem Utilizada

A aparelhagem utilizada é a mesma descrita no ítem II.1.1. do Cap. II. As condições experimentais foram: frequência de modulação 10 Hz, largura de banda 64 nm, velocidade de varredura 0,2  $\mu\text{m}/\text{min}$ , sensibilidade 300 mV.

### Preparação e Manipulação das Amostras

O tratamento dispensado às amostras seguiu a mesma sistemática utilizada nas medidas de RPE, a qual foi descrita no ítem III.2.2. Salientamos entretanto que para as medidas em fotoacústica deixamos de realizar a pesagem do café que seria colocado na cavidade porta-amostra, já que o resultado é praticamente independente da massa. Tomamos apenas o cuidado de preencher completamente a cavidade e manter tanto quanto possível a mesma compactação para todas as amostras.

### III.3.3. Resultados e Discussão

A Fig. 3-9 mostra os espectros fotoacústicos exibidos pelas amostras de cafês M e R. Espectros semelhantes diferindo na intensidade

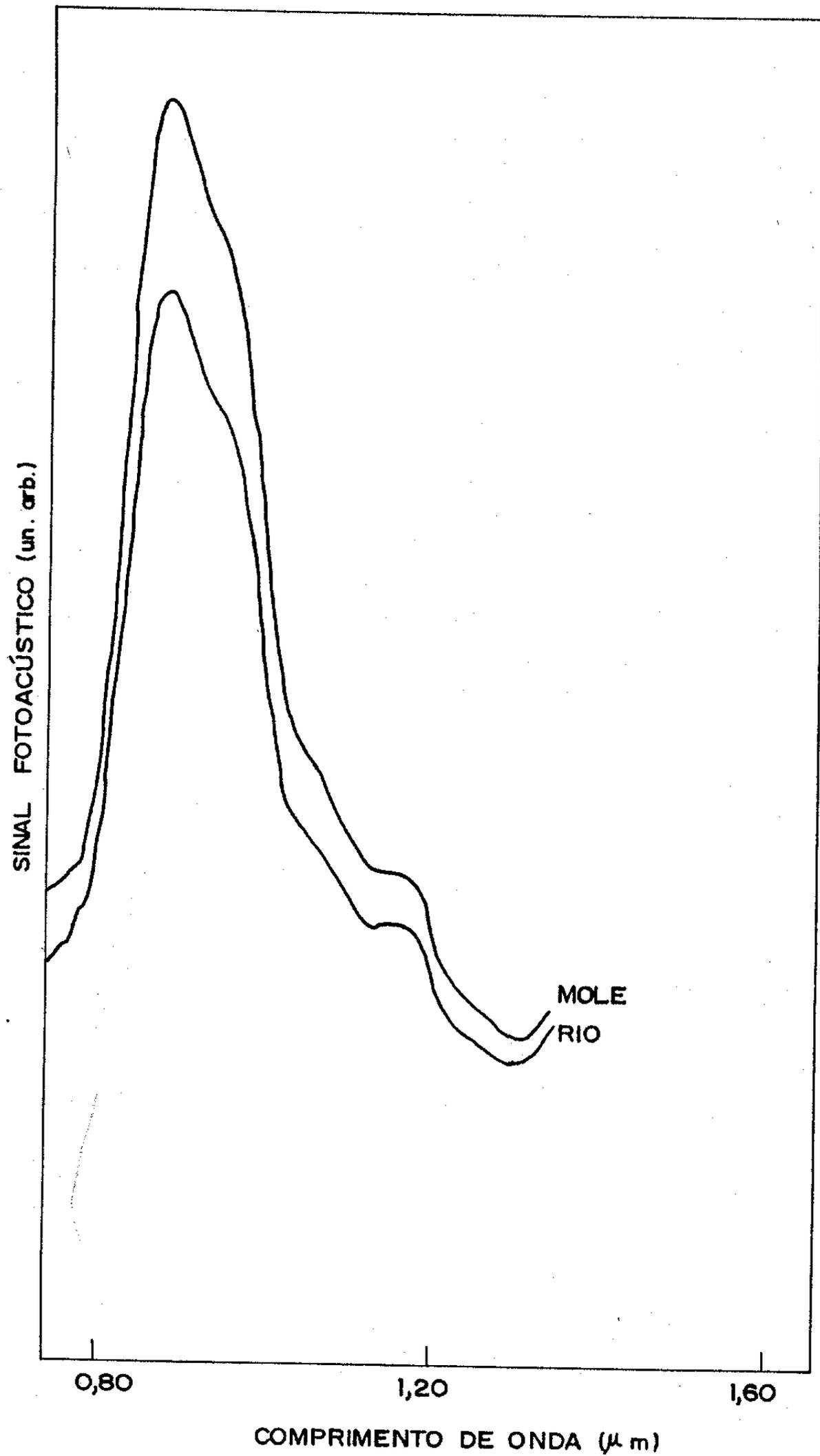


FIG. 3-9  
Espectros fotoacústicos dos cafês Rio e Mole submetidos a um mesmo grau de torração.

dos picos foram obtidos para os pares restantes de amostras, RY e R, RZ e R, que foram torrados simultaneamente, visando a normalização em relação à bebida R.

A Tab. 3-8 reúne a classificação dos provadores, as intensidades obtidas na fotoacústica em  $0,88 \mu\text{m}$ , as intensidades obtidas em RPE para as mesmas amostras e ainda as médias calculadas nas medidas de RPE. As amostras utilizadas são da safra 87.

Tabela 3-8. Classificação de cafês da safra 87 e sua correlação com as intensidades fotoacústicas, intensidades de RPE para as mesmas amostras e intensidades médias de RPE.

Classificação Femecap	M	RY	R	RZ
Intensidades Fotoacústicas	118	115	100	85
Intensidades de RPE	125	117	100	89
Intensidades Médias de RPE	124	108	100	94

obs: todas as intensidades estão normalizadas em relação à bebida R, à qual foi atribuído o valor 100

Os dados revelaram que as intensidades dos espectros obtidos em fotoacústica seguiram a mesma ordem das intensidades medidas em RPE, ou seja, em ambos os casos as intensidades crescem com a qualidade da bebida. Existe, portanto, uma correlação entre os resultados obtidos

em EPR e fotoacústica.

As diferenças entre os resultados da Fotoacústica e EPR para as mesmas bebidas podem ser atribuídas principalmente à natureza das transições associadas às intensidades. No caso da RPE são transições de radicais magnéticos e no caso da fotoacústica transições entre níveis moleculares. Todavia eventuais diferenças na compactação das amostras, no caso da fotoacústica, podem ser responsáveis por parte das diferenças observadas. Deve-se considerar também que, tanto no caso da fotoacústica quanto no de RPE, a quantidade de amostra analisada é muito pequena, sendo possível a ocorrência de diferenças entre amostras, devido a uma eventual heterogeneidade no café torrado e moído.

Faz-se presente também aqui a dificuldade em se identificar os sistemas químicos que responderiam pela absorção fotoacústica em  $0,88 \mu\text{m}$ . Contribui para essa dificuldade a complexibilidade da composição química do café, já referida no item III.2.3.

#### III.4. Conclusões

##### Amostra de Safras anteriores a 85

Para esse grupo de amostras, vimos que as intensidades médias das linhas de RPE apresentaram pequenas diferenças para diferentes bebidas de café, revelando que a taxa de formação de radicais livres tende a variar com a qualidade do café, o que pode tornar a técnica RPE um instrumento útil na determinação da qualidade da bebida.

Observamos também que a qualidade do café pode sofrer alterações com o transcorrer do tempo, o que foi constatado pela RPE e pela prova de xícara e consubstancia ser a classificação do café de válida

de temporária, impondo que a comercialização de cafês de boa qualidade seja realizada sem longa armazenagem. Constatamos ainda a ocorrência de melhoria na qualidade do café com o passar do tempo, para café de qualidade inferior. Esses dois resultados sugerem estudos adicionais, os quais deveriam ser empreendidos utilizando-se a RPE, bem como a participação de provadores profissionais.

### Amostras da safra 87

A diferenciação das bebidas revelou-se mais eficaz para esse grupo de amostras, especialmente considerando-se as intensidades médias de RPE. Pôde-se notar a separação dos diferentes cafês, sendo que o café M apresentou a maior intensidade do grupo. Os cafês RY, R e RZ (nesta ordem) apresentaram intensidades intermediárias e a bebida D colocou-se no outro extremo do grupo, apresentando a menor intensidade.

Foi também observada a existência de uma correlação entre os valores de intensidades de RPE e intensidades fotoacústicas, para algumas amostras tomadas aleatoriamente, o que torna válida também a técnica fotoacústica para fins de diferenciação de bebidas de café.

### Conclusões Gerais

O efeito da heterogeneidade das sementes de café é um problema que deverá ser evitado em estudos posteriores, uma vez que traduz-se em grandes flutuações nas intensidades das linhas, levando por isso a grandes desvios que afetam as intensidades médias. Esse proble

ma poderá ser amenizado utilizando-se um sistema torrador de café que propicie a torração de uma maior quantidade de amostra, por isso mais representativa da partida de café que a gerou. Um controle preciso de temperatura do forno e que garanta o estabelecimento de um mesmo grau de torração para todas as amostras será de grande conveniência, uma vez que poderá evitar a necessidade da torração simultânea do café tomado como padrão. O sistema torrador deverá ainda possibilitar a colocação e retirada das amostras, às temperaturas típicas de torração, evitando-se assim torrar as amostras partindo da temperatura ambiente, como fizemos em nosso experimento.

Estudos mais profundos realizados com a participação de químicos poderiam visar a identificação das substâncias responsáveis pela qualidade da bebida e sua eventual ligação com a concentração de radicais e com a absorção fotoacústica. Posteriormente, um estudo mais completo poderia monitorar a influência dos vários fatores ambientais, aos quais se atribui efeitos sobre a qualidade da bebida, visando assim identificar que cuidados poderiam evitar a deterioração da bebida.

Por fim, constatamos a ocorrência de discrepâncias na determinação da qualidade da bebida de café realizada por provadores do IBC, de um lado, e da Femecap, de outro. As diferenças constatadas justificam o aprofundamento de estudos, objetivando tornar possível a aplicação de técnicas sistemáticas, tais como a RPE e a Fotoacústica, ainda que como técnicas complementares para a classificação das bebidas de café. No caso particular da fotoacústica, é digno de nota a possibilidade da construção de um aparelho simplificado e que trabalhe apenas nos comprimentos de onda de interesse. As medidas de intensidade poderiam ser feitas diretamente no display de um milivoltímetro digital, sem necessidade de traçado do espectro, tornando rápida a classificação da bebida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERREIRA, R.C. O valor da Prova de Xícara nos Negócios de Café. *Revista do Instituto do Café*, São Paulo, Novembro: 33, 1931.
2. COSTA.,A.S. Modernos Conhecimentos Sobre o Gosto do Café. *A Fazenda* , Nova York, Novembro: 42, 1946.
3. ANTUNES FILHO,H. A Genética e a Qualidade do Café. *Suplemento Agrícola de O Estado de São Paulo*, São Paulo. 36:3, 1955.
4. CALLE.,V.H. Bom ou Mau Café? *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café*, São Paulo. 354:51, 1956.
5. MÔNACO,L.C. Qualidade da Bebida. *Suplemento Agrícola de O Estado de São Paulo*, São Paulo, 176:5, 1958.
6. CARVALHO,A. Prova de Xícara. *Suplemento Agrícola de O Estado de São Paulo*, São Paulo, 227:5, 1959.
7. BARBOSA,L.F; TEIXEIRA,A.A; PARREIRA,P. & CASTILHO,A. Estudos Preliminares sobre a Prova de Xícara do Café. Secretaria da Agricultura, S.F.C.C -1, 38pp., 1962.
8. TEIXEIRA,A.A. A Técnica Experimental da Degustação do Café. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura Luis de Queiróz-U.S.P. para obtenção do título de Doutor em Agornomia, 1972.
9. MENCHU,J.F.E. La Determination de la Calidas del Cafe. *Asociación Nacional del Cafe*. Guatemala, Boletim nº8, 55pp, 1966.
10. OLIVEIRA,J.G.R. Benefício,Rebenefício, Classificação e Comercialização do Café. IBC. Publicação avulsa, 31pp., 1973.

11. O'MEARA, J.P.; TRUBY, F.K. & SHAW, T.M. Free Radicals in Roasted Coffee. *Food Research*, 22:96, 1957.
12. HERNANDEZ P., L.C.; RODRIGUEZ L., J.; ALBIS G., E. & FRITSCH, G. Influência del Modo de Preparacion de Muestras de Cafê Tostado Colombiano Sobre la Concentration de Radicales Livres Determinado por el Metodo E.S.R. ASIC, 6e Colloque, Bogota, p. 163, 1973.
13. MIYAHARA, R. Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear e Ressonância Paramagética Eletrônica ao Estudo de Alguns Efeitos da Água no Cafê Arábica. Tese apresentada no Instituto de Física Gleb Wataghin-UNICAMP para a obtenção do título de Mestre em Ciências, 1984.
14. BENNETT, J.E.; INGRAN, D.J.E. & TAPLEY, J.G. Paramagnetic Resonance from Broken Carbon Bonds, *J. Chem. Phys.*, 23:215, 1955.
15. RHOADES, J.W. Sampling Method for Analysis of Coffee Volatiles by Gas Chromatography. The Coffee Brewing Institute, Inc. New York, Pub. n<sup>o</sup> 34, 8 pg., Julho de 1958.
16. STREULI, H. Der Heutige Stand der Kaffeechemie. ASSIC, 6e Colloque, Bogota, 61, 1973.
17. BALTES, W. Rösteffekte auf die Kaffeezusammensetzung. ASIC, 8e Colloque, Abidjan, 85, 1977.
18. AMORIM, H.V. Relação entre alguns Compostos Orgânicos do Grão do Cafê Verde com a Qualidade da Bebida. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura Luis de Queirõz-USP para obtenção do título de Doutor em Agronomia, 1972.

## CAPITULO IV

### APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA NA MONITORAÇÃO DE EFEITOS DE HERBICIDAS EM FOLHAS

#### INTRODUÇÃO

A espectroscopia fotoacústica tem se revelado uma técnica altamente relevante no estudo de fenômenos químico-fisiológicos de vegetais, especialmente aqueles que ocorrem ao nível da folha, tais como reações ligadas ao mecanismo da fotossíntese<sup>(1)</sup>, transporte de água<sup>(2)</sup>, toxicidade de compostos existentes no solo<sup>(3)</sup>, etc.

Este capítulo tem como objetivo o uso da técnica no estudo de efeitos de herbicidas em folhas, tendo sido utilizado o método da separação de espectros na fase.

Antes da apresentação e discussão dos resultados, apresentamos uma breve exposição sobre a anatomia de uma folha, espectroscopia de folhas na região do visível, bem como uma descrição do método utilizado. Decidimos também fornecer uma explanação sucinta sobre o mecanismo da Fotossíntese, uma vez que a ação de herbicidas geralmente produz efeitos sobre esse fenômeno.

#### IV.1. A ANATOMIA DE UMA FOLHA

É mostrado esquematicamente na Fig.4-1 um corte longitudinal realizado em uma folha. O sistema foliar, se analisado de cima para baixo, apresenta uma cutícula que é uma incrustação graxa constituída de camadas<sup>(4)</sup> que são mostradas na Fig. 4-2. A superfície superior é constituída de cêra. Abaixo desta existe uma outra camada de cutina misturada em cêra, vindo em seguida uma outra camada contendo cutina, cêra e polímeros carboidratos, havendo também possibilidade de ocorrência de proteína em pequena quantidade. Por fim, em contato com a parede da epiderme encontramos uma camada de pectina. As funções primordiais da cutícula são evitar a excessiva perda d'água pela folha e limitar a intensidade da radiação ultra-violeta incidente, já que os elementos que a constituem são em geral bons absorvedores de radiação nessa faixa do espectro eletromagnético.

Abaixo da cutícula existe a epiderme superior, uma camada de células alongadas segundo o plano da cutícula.

Observamos ainda a ocorrência de uma camada de células com alongamento disposto perpendicularmente à epiderme. São as células do Parênquima Paliçádico. Essas células desempenham o importante papel de incorporar os cloroplastos, responsáveis pela fotossíntese e que na Fig. 4-1 são os corpúsculos dispostos adjacentemente à membrana das células do parênquima paliçádico. É vista na Fig. 4-3 uma representação esquemática de um cloroplasto, cujas dimensões podem variar entre 1  $\mu\text{m}$ , e 10 $\mu\text{m}$ , mostrando seus principais constituintes. É digno de nota o fato de que os pigmentos fotossintéticos dos cloroplastos, bem como os enzimas necessários às reações da fotossíntese encontram-se nas lamelas intergrana e nas membranas dos tilacoides<sup>(5)</sup>.

Imediatamente abaixo do parênquima paliçádico encontra-se o parênquima esponjoso, que possui células irregulares com grandes espaços

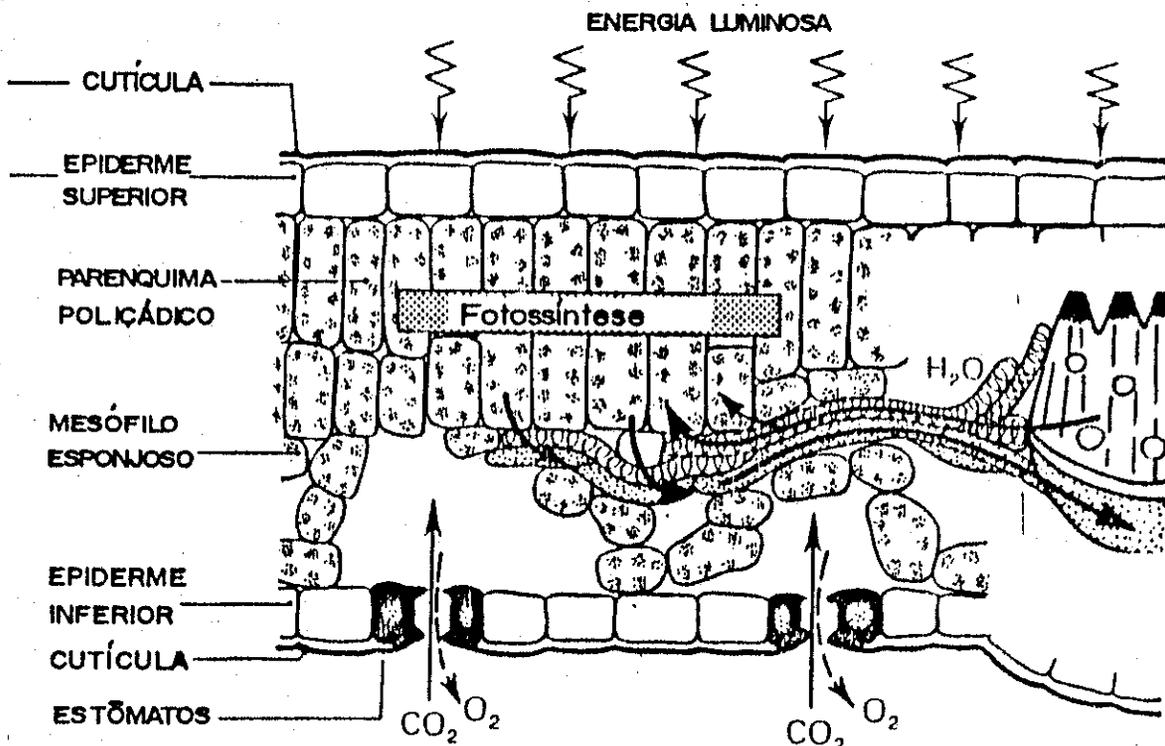


FIG. 4-1

Representação esquemática de um corte longitudinal em folha, indicando seus principais constituintes.

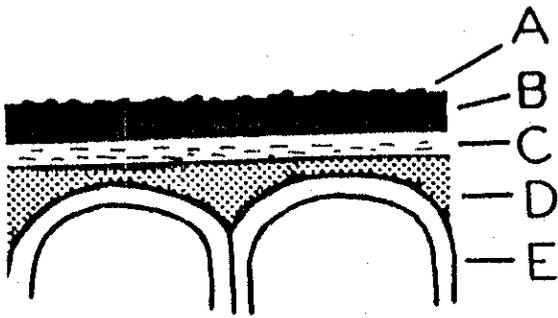


FIG. 4-2

Representação esquemática da cutícula de uma folha. (A) cera superficial; (B) cutina misturada em cera; (C) região contendo cutina, cera e polímeros carboidratos e ainda pequenas quantidades de proteína; (D) pectina; (E) parede das células da epiderme.

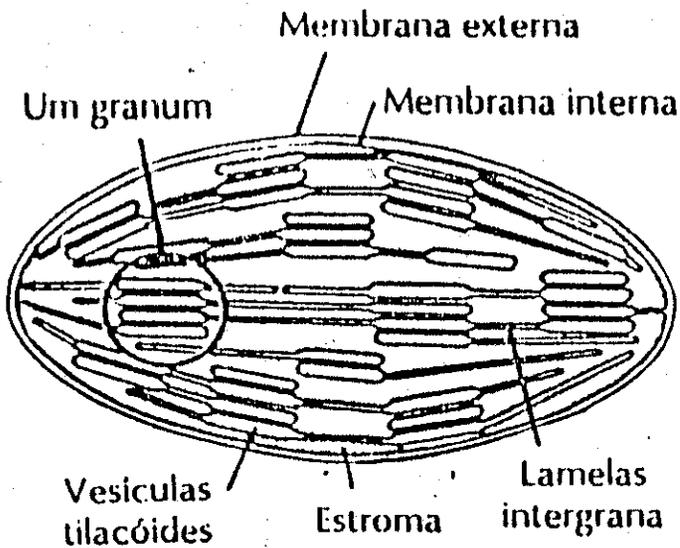


FIG. 4-3

Desenho esquemático de um cloroplasto.

contendo ar entre elas. O conjunto formado pelo parênquima paliçádico e parênquima esponjoso recebe o nome de mesófilo.

No mesmo nível do mesófilo situa-se o sistema vascular, constituído pelas veias ou nervuras da folha e que possui a função de suprir os vários elementos da folha de nutrientes existentes na seiva e ainda de absorver os produtos da fotossíntese e nutrição foliar, possibilitando seu transporte para o restante da planta.

Finalmente, na parte inferior da Fig. 4-1 encontramos a epiderme inferior que apresenta os pares de estômatos, entre os quais encontram-se os poros que permitem as trocas gasosas de entrada de  $CO_2$  e saída de  $O_2$ . Como no caso da epiderme superior, também a epiderme inferior é revestida de uma cutícula.

#### IV.2. ESPECTROS FOTOACÚSTICOS EXIBIDOS POR FOLHAS E SEUS CONSTITUINTES

Conforme já mencionamos, a técnica fotoacústica permite realizar a espectroscopia de muitos sistemas biológicos em sua forma e composição naturais. Um caso típico é o de uma folha verde (de soja) cujo espectro fotoacústico na região do visível mostramos na Fig. 4-4. São facilmente identificáveis no espectro três picos: o pico centrado em 350 nm é associado à cutícula que absorve predominantemente luz ultra-violeta. O pico seguinte centrado em 480 nm é atribuído aos carotenóides e a clorofila  $\alpha$  possui um pico centrado em 680 nm.

Extrações realizadas em folhas, utilizando solventes apropriados, permitem isolar essas substâncias e avaliar a correção nas atribuições desses picos. Entretanto, a presença de solventes e a ausência de outros compostos celulares, aos quais essas substâncias podem estar de alguma forma ligadas (caso típico é a ligação clorofila-proteína) podem alterar ligeira

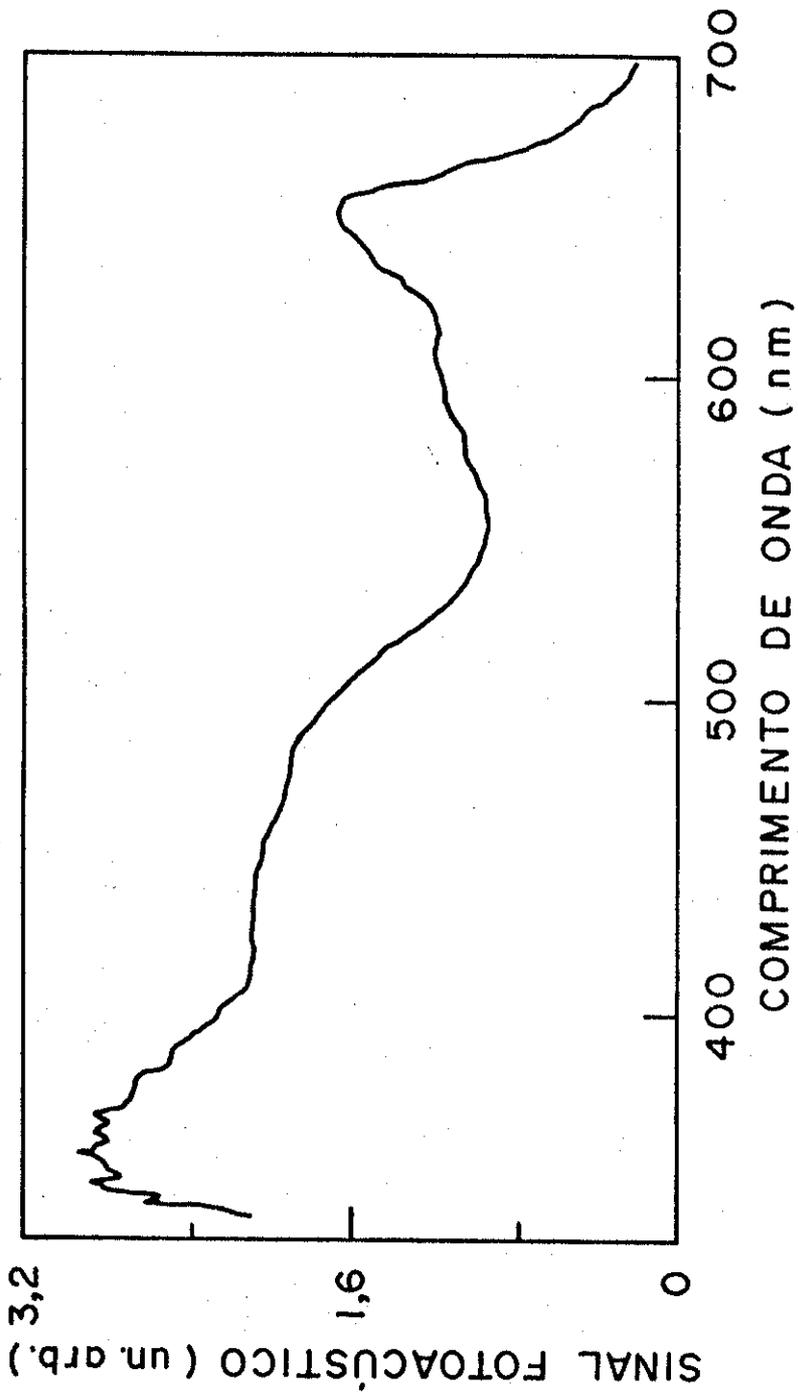


FIG: 4-4

Espectro fotoacústico de uma folha verde; Ocorrem três picos principais que são associados a: 350 nm-cutícula, 480 nm-ca rotenóides e 680 nm-clorofila.

mente os comprimentos de onda em que ocorrem os picos. A Fig.4-5 apresenta os espectros dos pigmentos foliares Clorofila  $\alpha$ , Clorofila  $b$ ,  $\beta$ Caroteno e Luteína na presença de solventes. O espectro da Clorofila  $\alpha$  "in situ" apresenta picos nos comprimentos de onda 672 nm, 683 nm, que não aparecem no espectro da Fig. 4-4 em razão da resolução imposta pelas condições experimentais em que o espectro foi obtido. Entretanto na Fig.4-5 a Clorofila  $\alpha$  (em éter) apresenta um único pico centrado em 660 nm (6).

Conforme mencionamos no Cap. I, o efeito fotoacústico é relacionado diretamente com a taxa de conversão em calor da energia radiante absorvida, caracterizando-se desta forma como um espectro de absorção. No caso de pigmentos fotossintéticos, é pouco relevante a ocorrência de fenômenos de decaimentos radioativos, tais como fluorescência e fosforescência. Além disso, a taxa de consumo de radiação para a fotossíntese não ultrapassa alguns por cento. Existe portanto forte predominância da relaxação térmica e o efeito fotoacústico nesse caso é com boa aproximação uma medida da absorção de luz. Por outro lado, admitiremos que o sinal fotoacústico é proporcional à quantidade de substância absorvedora, uma vez que trabalharemos com potências luminosas capazes de excitar todas as moléculas absorvedoras presentes.

#### IV.3. SEPARAÇÃO OU RESOLUÇÃO DE ESPECTROS UTILIZANDO-SE A ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

A espectroscopia é um processo bastante utilizado para a caracterização de materiais. Se de alguma forma for possível a separação dos espectros exibidos pelas substâncias constituintes de um material sua caracterização é bastante facilitada. Se, em particular, essas substâncias encontram-se dispostas em camadas diferentes, a espectroscopia fotoacústica propicia a utilização de dois métodos diferentes, visando essa caracterização: O

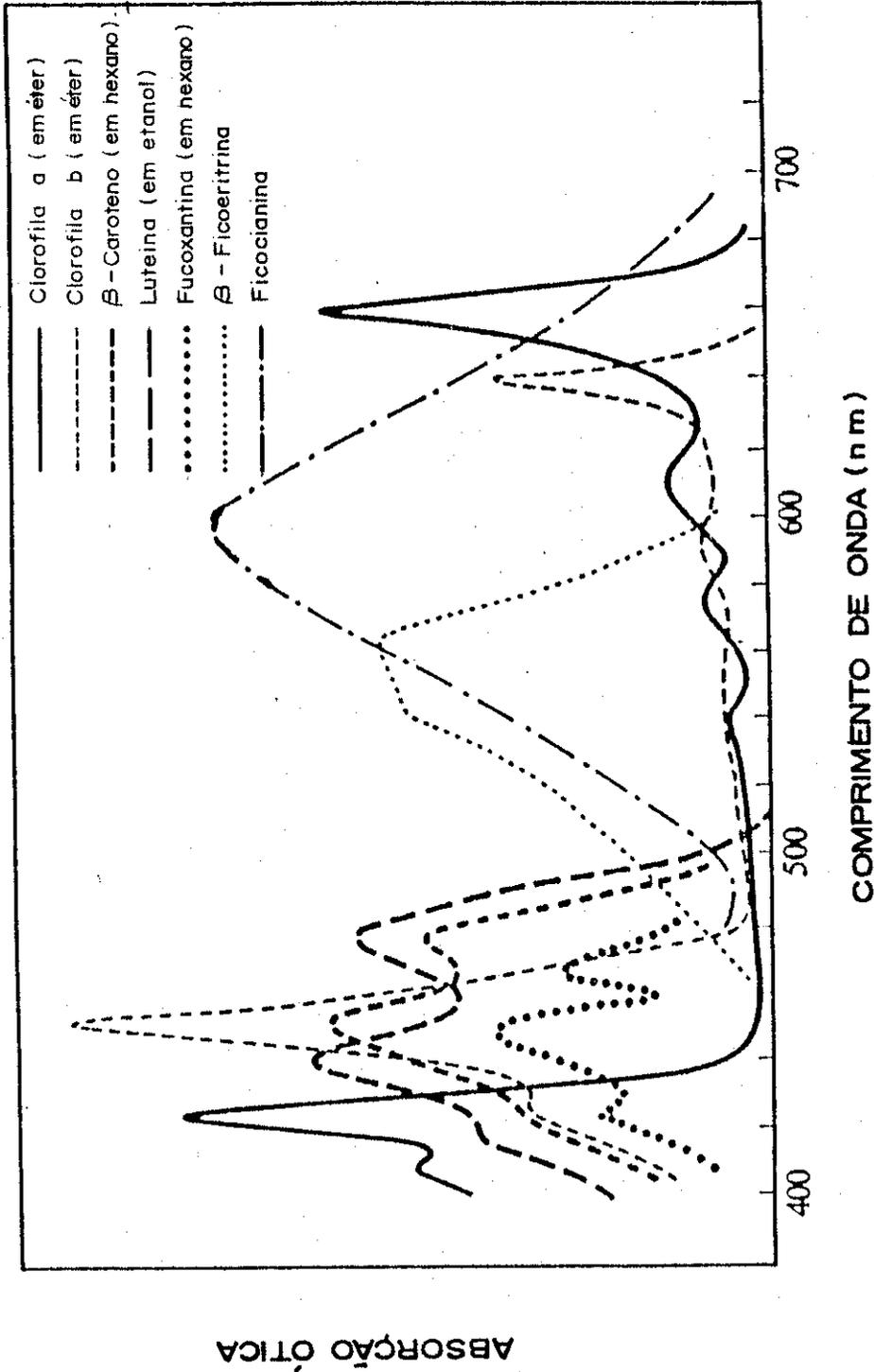


FIG. 4-5

Espectro de absorção de alguns membros dos três grupos de pigmentos fotossintéticos: as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas.

Método de Separação em Frequência de Modulação e o Método de Separação em Fase ( $MS\phi$ ).

#### IV.3.1. O Método de Separação de Espectros por Variação da Frequência de Modulação,

Vimos no Cap. I que o comprimento de difusão térmica de um material depende da frequência de modulação e essa dependência é expressa por  $\mu = \sqrt{2\alpha/\omega}$ . Assim, é possível através da variação da frequência de modulação variar a extensão da amostra que traz contribuição ao efeito fotoacústico e portanto ao espectro exibido pela amostra. Um aumento na frequência de modulação implica em uma diminuição no comprimento de difusão térmica. Portanto, considerando o sistema de duas camadas representado na Fig.4-6, se selecionarmos frequências cada vez maiores, podemos atingir uma situação em que somente a camada superior venha a exibir seu espectro característico.

No caso de uma folha foi obtida a separação do espectro da cutícula dos seus demais componentes. Mostramos na Fig.4-7 a evolução do espectro da folha com o aumento da frequência de modulação. Em frequências baixas o espectro exibido pela folha é o mesmo por nós apresentado na Fig.4-4, ou seja, é o espectro de todos os componentes da folha (cêra + pigmentos) e que estão dispostos em camadas diferentes. Para frequências elevadas, somente a camada correspondente à cutícula responde a excitação óptica, exibindo seu espectro característico.

Devemos acrescentar que o método de separação em frequências possui a desvantagem de separar o espectro da camada superior, mas não o da inferior, uma vez que para frequências baixas também a camada superior contribui para o efeito fotoacústico. Além disso, a necessidade de utilizar-se frequências elevadas para a separação da camada superior leva muitas vezes a condições experimentais que exigem alta sensibilidade na medida do sinal fo

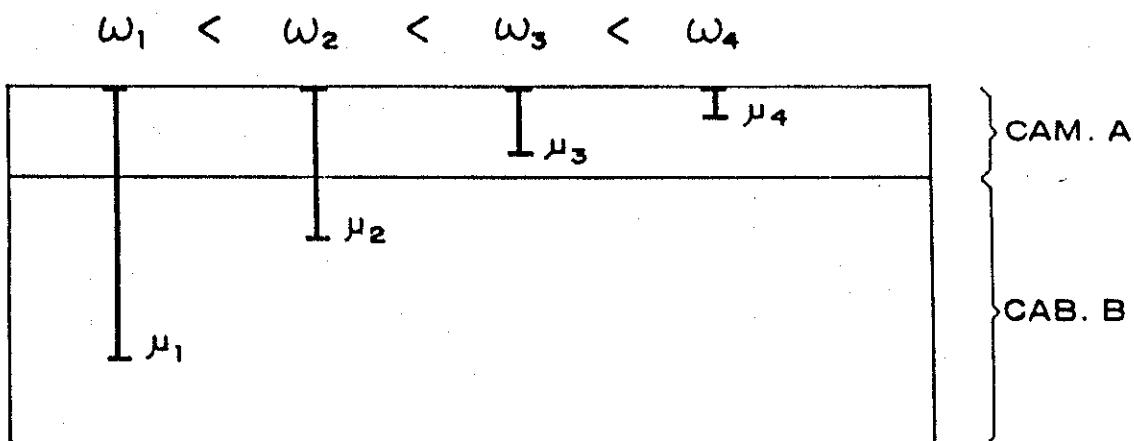


FIG. 4-6

Representação esquemática de um sistema de duas camadas, mostrando a variação do comprimento de difusão térmica com a frequência de modulação e a viabilidade de se isolar o espectro da camada superior.

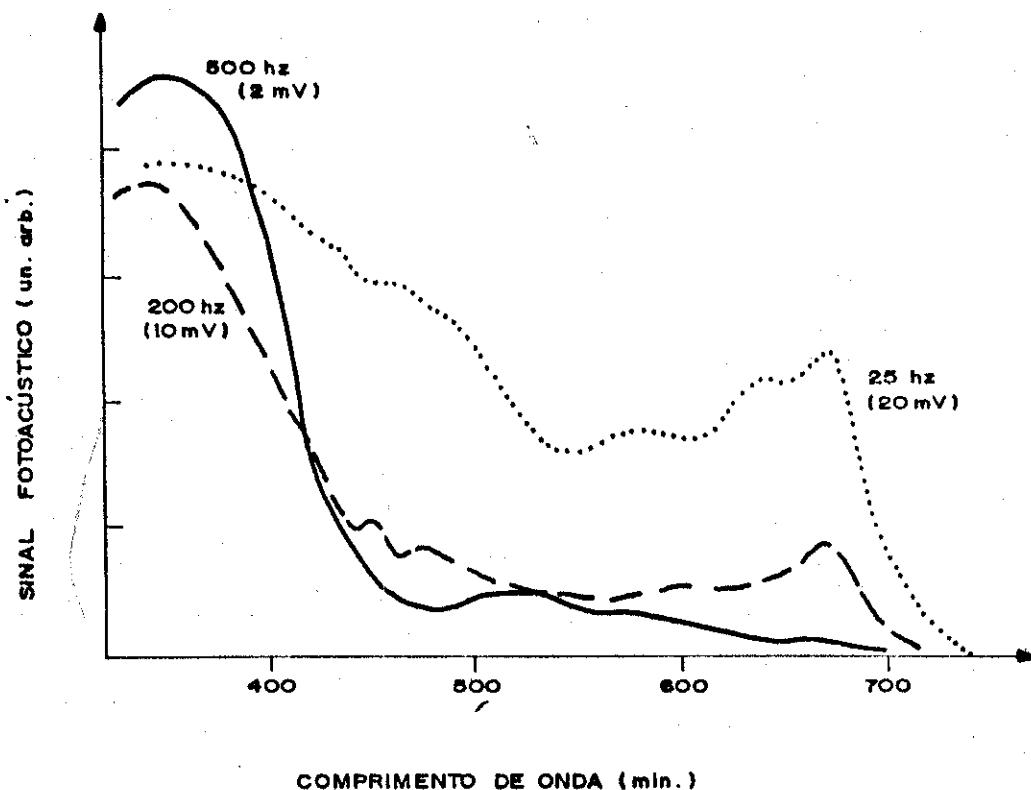


FIG. 4-7

Espectros fotoacústicos de uma folha obtidos em três frequências de modulação; em 500 Hz obtem-se o espectro da cutícula isolada.

toacustico, o que implica em baixas relações sinal/ruído, especialmente no caso de camadas superiores muito finas e constituídas de materiais de baixa absorção óptica ou baixa difusividade térmica.

#### IV.3.2. O Método de Separação de Espectros na Fase (MS $\phi$ )

Os inconvenientes por nós assinalados, com respeito ao método de separação em frequência, são evitados quando é utilizado o Método de Separação de Espectros na Fase (MS $\phi$ ).

Vimos no Cap. I que a equação para o sinal fotoacústico gerado por uma amostra é constituído essencialmente de uma amplitude e de uma fase. Esse sinal é bem representado por funções transcendentes do tipo seno-cosseno. Essas características do sinal fotoacústico implicam em que sua detecção é adequadamente realizada por um amplificador síncrono ou "lock-in". Para um determinado comprimento de onda, o sinal fotoacústico pode ser expresso por

$$S(\lambda) = \sqrt{S^2(\lambda) \cos^2 \phi + S^2(\lambda) \sin^2 \phi} \quad (4-1)$$

onde  $S$  é a amplitude do sinal fotoacústico medida no lock-in,  $\phi$  é a fase adequadamente ajustada para a medida do sinal, a qual pode variar entre  $0^\circ$  e  $360^\circ$ . Normalmente a fase é ajustada de modo que a indicação do "lock-in" seja nula para o sinal detectado. Obtida essa situação, se o ajuste de fase do lock-in for deslocado de  $90^\circ$  a indicação de intensidade pelo lock-in será máxima e é nesta situação que as medidas serão efetuadas. Assim sendo, se dois amplificadores "lock-in" forem conectados, um com o ajuste de fase correto e outro defasado de  $90^\circ$  em relação ao primeiro, teremos indicação máxima possível para o primeiro e nula para o segundo. A situação é vista na Fig.4-8 onde escolhemos o eixo horizontal como a indicação do primeiro lock-in e o eixo vertical como a indicação do segundo lock-in. Por conveniência denominamos de  $S_0$  a indicação de intensidade medida pelo primeiro lock-in e

$S_{90}$  a intensidade medida pelo 2º lock-in (que neste caso é nula). Obviamente a intensidade do sinal fotoacústico pode ser representada por

$$S = \sqrt{S_0^2 + S_{90}^2} \quad (4-2)$$

Se agora deslocarmos o ajuste de fase de ambos os lock-in de um mesmo ângulo  $\delta$  mantendo portanto a diferença de fase de  $90^\circ$  entre eles, as indicações de ambos os lock-in mudarão, equivalendo a uma rotação de  $\delta$  no sistema de eixos. Entretanto a amplitude do sinal fotoacústico continuará sendo dada pela equação (4-2). Esta rotação é mostrada na Fig. 4-9.

Consideremos agora o caso mais geral em que o sinal fotoacústico seja gerado por um sistema de duas camadas, cujo caso típico e de nosso interesse é a folha por nós considerada anteriormente. Uma das camadas é a cutícula que contém cêra e a outra o mesófilo que contém os pigmentos. Para um determinado comprimento de onda, o sinal fotoacústico  $\vec{S}(\lambda)$  será dado pela soma vetorial do sinal fotoacústico oriundo da cêra, que denominaremos  $\vec{S}_c(\lambda)$ , com o sinal fotoacústico oriundo dos pigmentos denominado  $\vec{S}_p(\lambda)$ . É claro que este nosso exemplo é pictórico, uma vez que essas camadas da folha absorvem em comprimentos de onda diferentes. Entretanto as considerações feitas aqui são de caráter geral. Devido ao fato desses componentes da folha estarem dispostos a diferentes distâncias da camada gasosa que tangencia a folha e que funciona como pistão fotoacústico, os sinais  $\vec{S}_c$  e  $\vec{S}_p$  possuirão ângulos de fase diferentes  $\phi_c$  e  $\phi_p$ , existindo entre eles uma diferença de fase  $\Delta\phi$ , conforme representado na Fig. 4-10, onde denominamos  $\phi$  o ângulo de fase do sinal fotoacústico resultante.

O método da separação dos espectros na fase se baseia no fato de que a amplitude do sinal fotoacústico resultante é para um dado comprimento de onda também expressa por

$$S(\lambda) = S_0(\lambda)\cos\phi + S_{90}(\lambda)\sin\phi \quad (4-3)$$

fato facilmente dedutível a partir da Fig. 4-11.

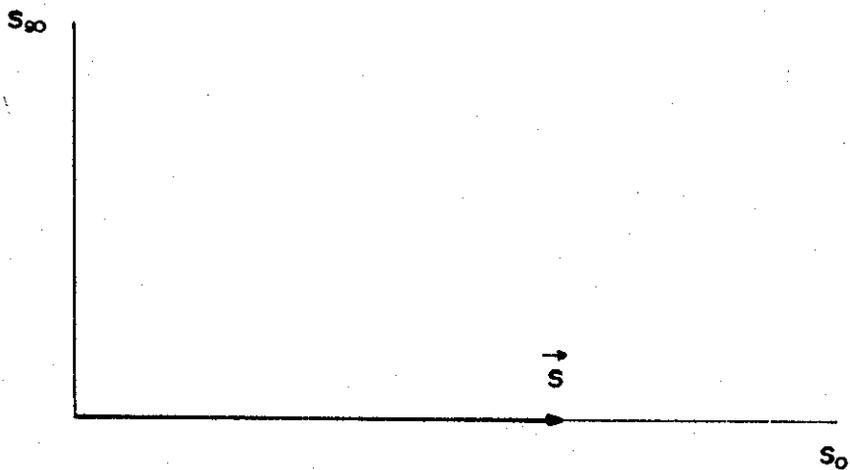


FIG. 4-8

Simulação da detecção de um sinal fotoacústico por dois lock-in em quadratura um em relação ao outro. Um deles está adequadamente ajustado para realização da medida e detecta o sinal ( $S_0$ ). É nula a indicação do outro lock-in.

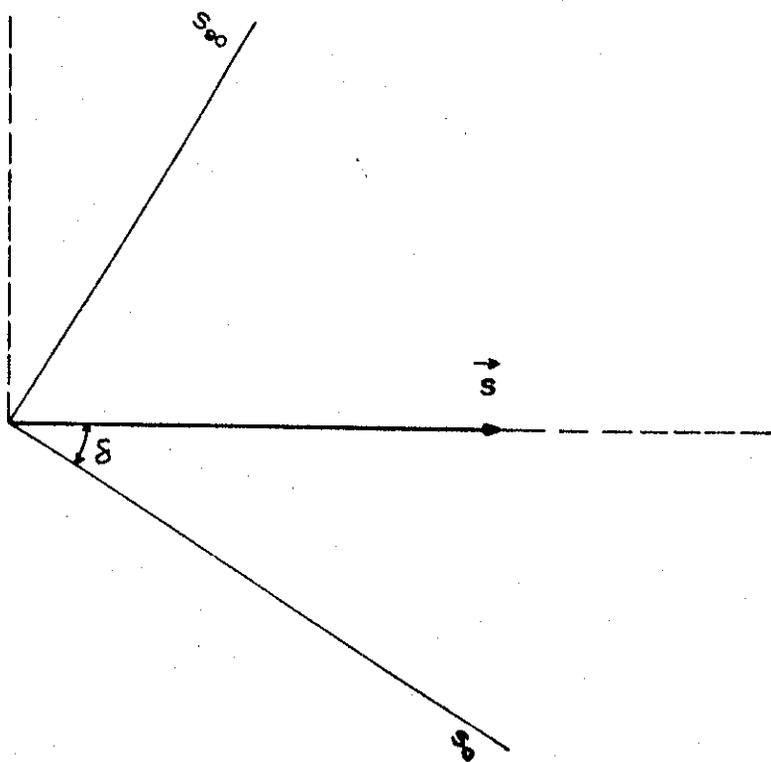


FIG. 4-9

O mesmo sinal fotoacústico referido na Fig. 4-8 detectado pelos mesmos lock-in em quadratura. Ambos os lock-in foram defasados de um ângulo  $\delta$  em relação à situação mostrada na fig. 4-8.

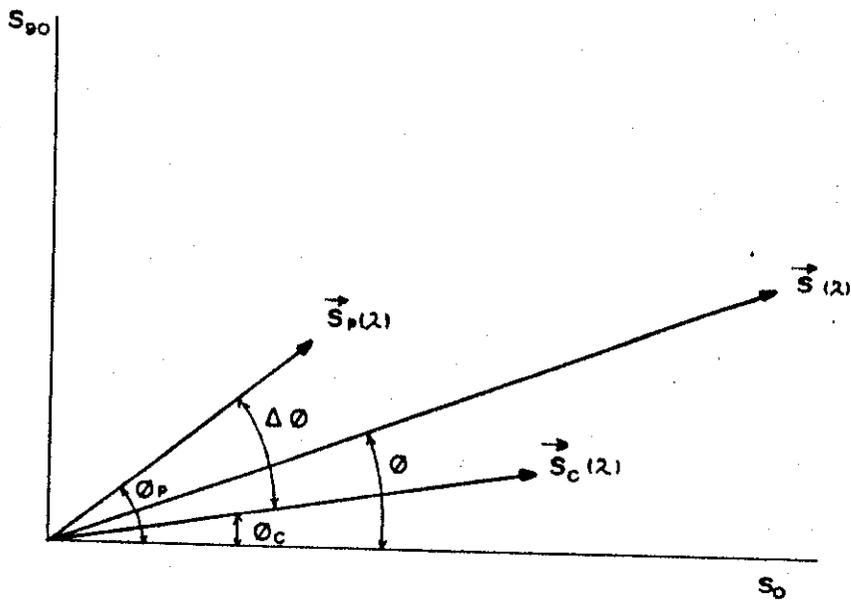


FIG. 4-10

O sinal fotoacústico  $\vec{S}(\lambda)$  neste caso é resultante da soma vetorial de dois sinais fotoacústicos  $\vec{S}_p(\lambda)$  e  $\vec{S}_c(\lambda)$  produzidos por camadas diferentes da amostra. É mostrada a diferença de fase  $\Delta\phi$  entre esses sinais.

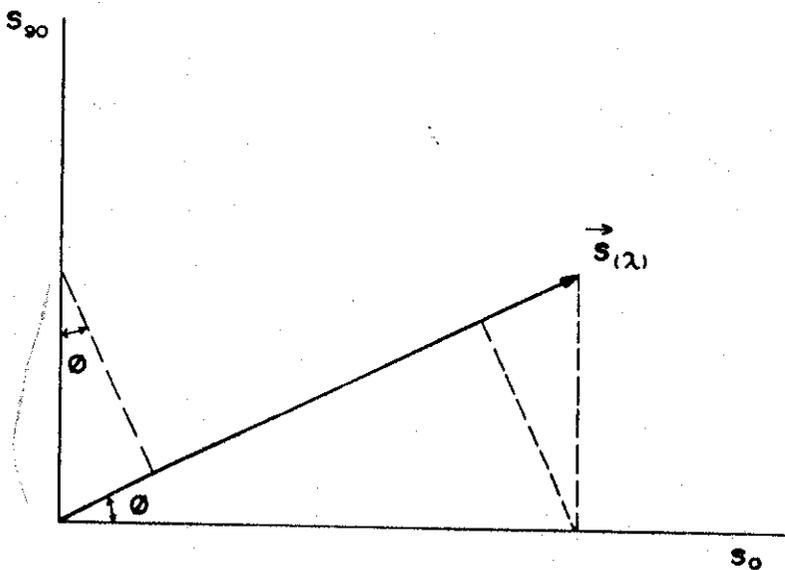


FIG. 4-11

Representação geométrica do sinal fotoacústico detetado pelos dois lock-in em quadratura, mostrando que o sinal fotoacústico pode ser expresso por  $S = S_0(\lambda)\cos\phi + S_{90}(\lambda)\sin\phi$ .

A sequência de procedimentos em que se fundamenta o  $MS\phi$  pode ser dividida em três etapas:

1. Em algum ponto do espectro, geralmente em um comprimento de onda correspondente a um pico intenso da lâmpada utilizada como fonte de radiação, efetuamos o ajuste de fase em ambos os lock-in; em seguida defasamos um dos lock-in de  $90^0$ , situação em que obteremos intensidade máxima em um dos lock-in ( $S_0$ ) e nula no outro ( $S_{90}$ ).
2. Utilizando um sistema computacional interfaciado com o espectrômetro, adquirimos e gravamos para cada comprimento de onda, através das leituras em cada lock-in, as intensidades  $S_0$  e  $S_{90}$  já normalizadas.
3. Após a aquisição dos dados, podemos, utilizando o mesmo sistema computacional e a equação (4-3), variar continuamente o ângulo de fase  $\phi$  e obter uma situação em que a equação (4-3), para um dado ângulo de fase, e aplicada a cada comprimento de onda, reproduzirá o espectro do constituinte de apenas uma das camadas anulando o espectro da outra. Desta forma os espectros estarão resolvidos ou separados. Normalmente partimos de uma variação em  $\phi$  de 10 em 10 graus, traçando para cada ângulo de fase o espectro correspondente. Quando atingimos uma situação próxima da separação de um dos espectros procedemos a variações menores.

No caso da folha, determinamos o ângulo  $\phi'$  tal que a aplicação da equação (4-3) reproduz o espectro da cutícula  $S_C(\lambda)$ , anulando ou reduzindo a um mínimo o espectro dos pigmentos. Determinado  $\phi'$ , sabemos que o sinal fotoacústico  $S_p(\lambda)$  dos pigmentos deve estar a  $90^0$  de  $\phi'$ , uma vez que ele não contribui em  $\phi'$  para o sinal resultante  $S(\lambda)$ . Desta forma, o sinal da camada de pigmentos deverá estar associado à fase  $\phi_p = \phi' \pm 90^0$ . Procedendo da mesma forma em relação ao espectro da camada de pigmentos, determinamos o ângulo  $\phi''$  que isola o espectro característico dos pigmentos, e em seguida o ângulo  $\phi_c = \phi'' \pm 90^0$  que é a fase característica da camada da cutícula. Finalmente é possível obter a diferença de fase entre os sinais fo

toacústicos das duas camadas, que é simplesmente dado por  $\Delta\phi = \phi_p - \phi_c$  e que, como veremos, é um dado importante no estudo dos mecanismos de ação de herbicidas.

Na Fig. 4-12 é mostrada toda a sequência de variação de  $\phi$  no caso de uma folha de *Amaranthus*. Observamos na sequência de espectros apresentados que em  $\phi' = -90^\circ$  não comparece o espectro característico dos pigmentos. Logo, o sinal fotoacústico dos pigmentos deverá estar a  $90^\circ$  de  $\phi'$  ou seja em  $\phi_p = \phi' + 90^\circ = 0^\circ$ . Por outro lado, notamos que em  $\phi'' = 50^\circ$  é nula a contribuição da cera ao espectro composto. Assim, o sinal fotoacústico associado à cera deverá estar em  $\phi_c = \phi'' - 90^\circ = -40^\circ$ . De posse desses resultados podemos facilmente determinar a diferença de fase entre os sinais fotoacústicos da cutícula e dos pigmentos que é  $\Delta\phi = \phi_p - \phi_c = 0^\circ - (-40^\circ) = 40^\circ$ . É mostrada na Fig. 4-13 a representação gráfica de  $S_c$  e  $S_p$ . As intensidades dos sinais fotoacústicos  $S_c$  e  $S_p$  são medidas diretamente sobre os espectros na situação de separação.

O MS $\phi$  foi desenvolvido independentemente por Cesar et al. (8,9) enfocando trabalhos em sólidos e por Anjo et al. (10) e O'Hara et al. (11) trabalhando com materiais biológicos.

Embora tenhamos suposto em toda a nossa consideração sobre o MS $\phi$  que o sistema estudado era constituído de duas camadas distintas, cumpre ressaltar que nem sempre essa restrição é necessária. Lima et al. (12) expandiram a potencialidade do método demonstrando a sua validade para uma mistura homogênea de dois compostos diluídos em um vidro. Os espectros também puderam ser separados em virtude dos compostos possuírem tempos de relaxação térmicas diferentes.

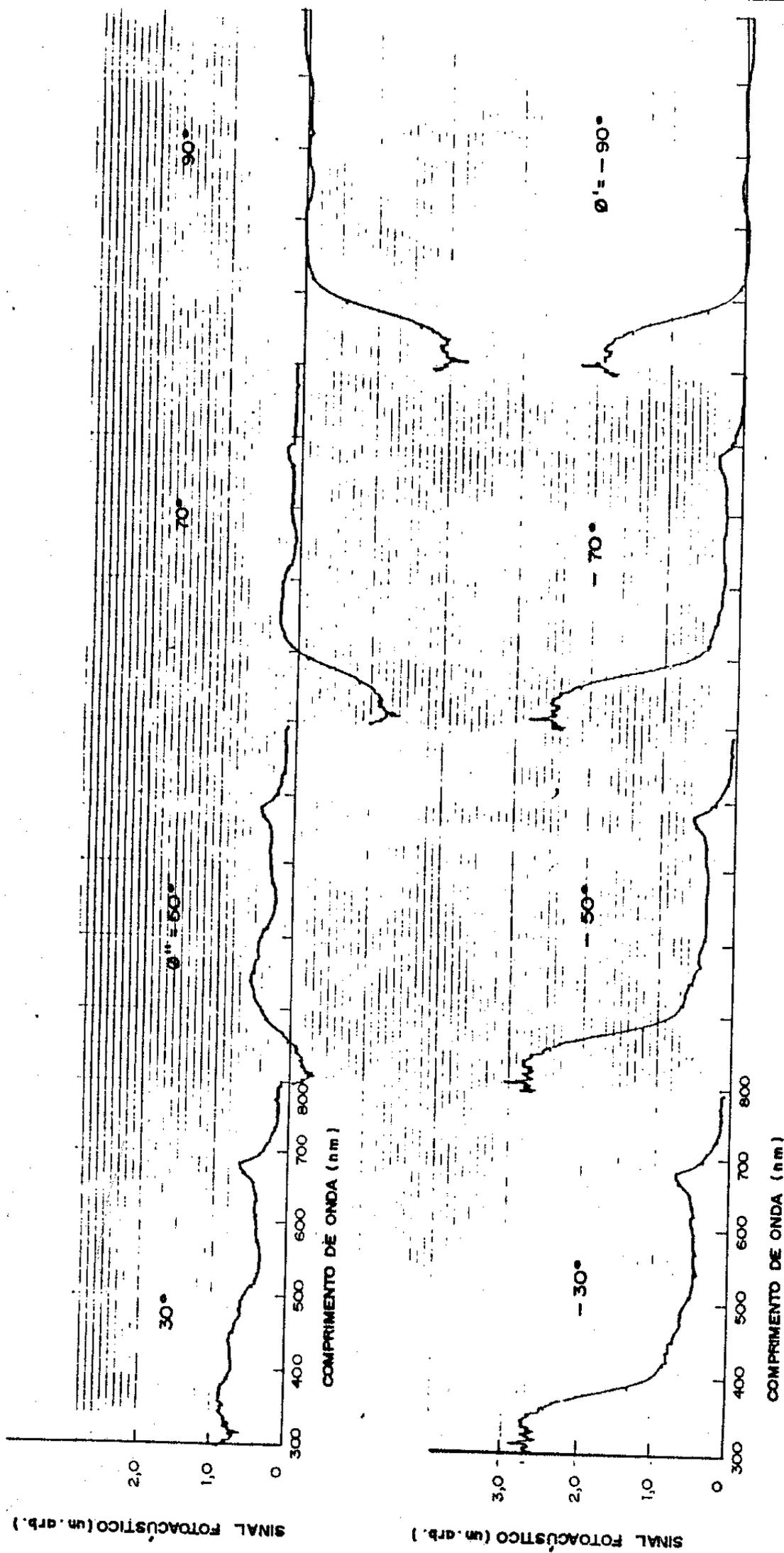


FIG. 4-12 - Aplicação do MS $\phi$  a uma folha de *Amaranthus*. Nota-se que em  $\phi=50^\circ$  é nula a contribuição da cera ao espectro e que em  $\phi=-90^\circ$  é nula a contribuição dos pigmentos ao espectro. Esses dois ângulos de fase correspondem a os ângulos  $\phi''$  e  $\phi'$  utilizados na separação dos espectros.

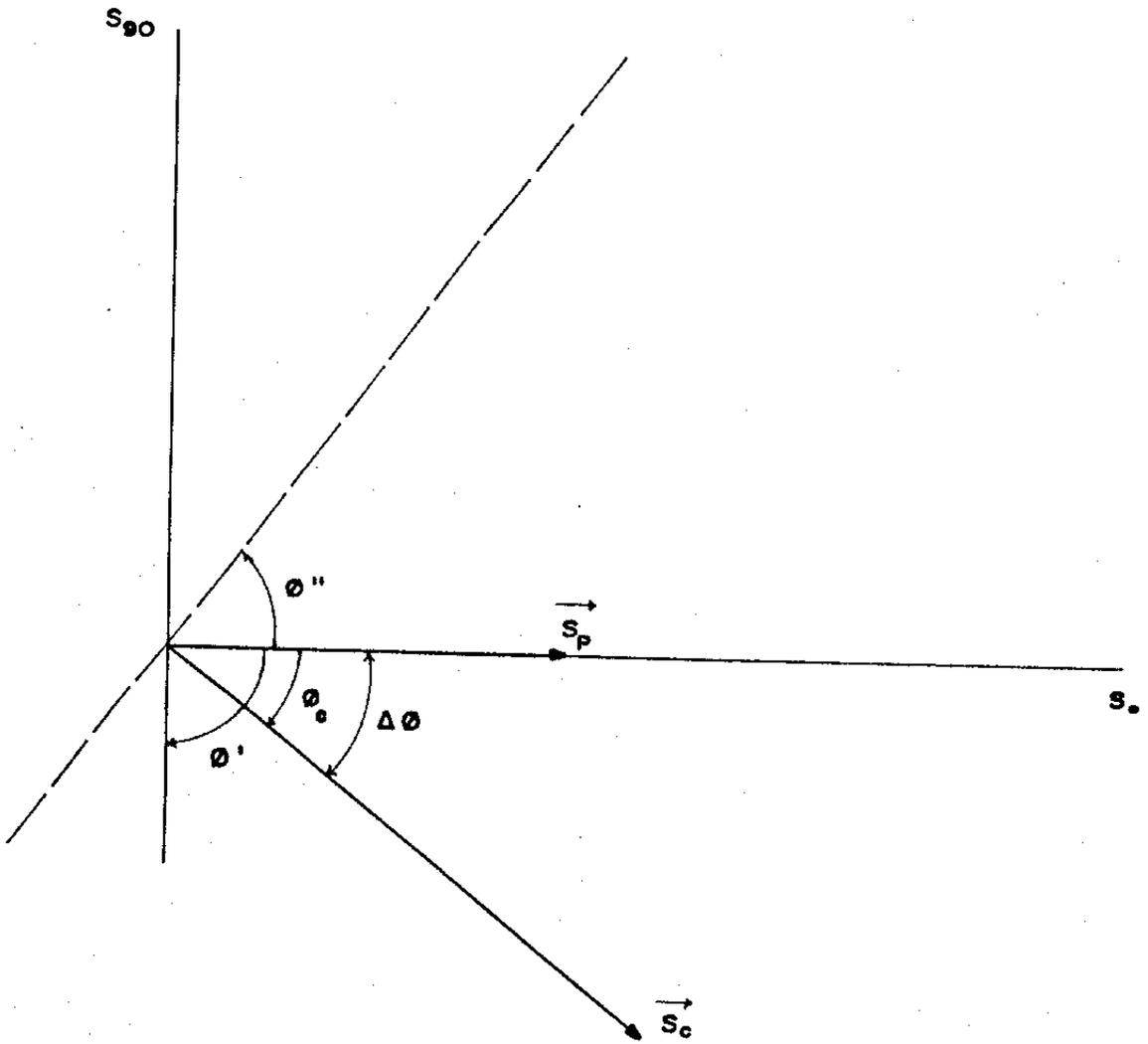


FIG. 4-13

Representação esquemática dos sinais fotoacústicos correspondentes à cera ( $\vec{S}_c$ ) e aos pigmentos ( $\vec{S}_p$ ) na situação de separação dos espectros pela aplicação do MS $\phi$ .

#### IV.4. MECANISMOS DE AÇÃO DE HERBICIDAS

Quando um herbicida entra em contato com uma planta uma enorme variedade de efeitos podem se suceder, dependendo do particular herbicida, sua via de aplicação, da espécie de planta, tempo de exposição ao herbicida e ainda das condições ambientais no período subsequente à aplicação, tais como umidade, intensidade da radiação solar, temperatura, etc. (13-15). Isso não obstante, para a grande maioria dos herbicidas esses efeitos apresentam uma evolução temporal que se inicia com influências sobre a fotossíntese, progredindo para alteração de permeabilidade e ruptura de membranas e finalmente interferindo na divisão celular. Um quadro demonstrativo da cronologia desses efeitos e suas inter-relações é mostrado na Tab. 4-1.

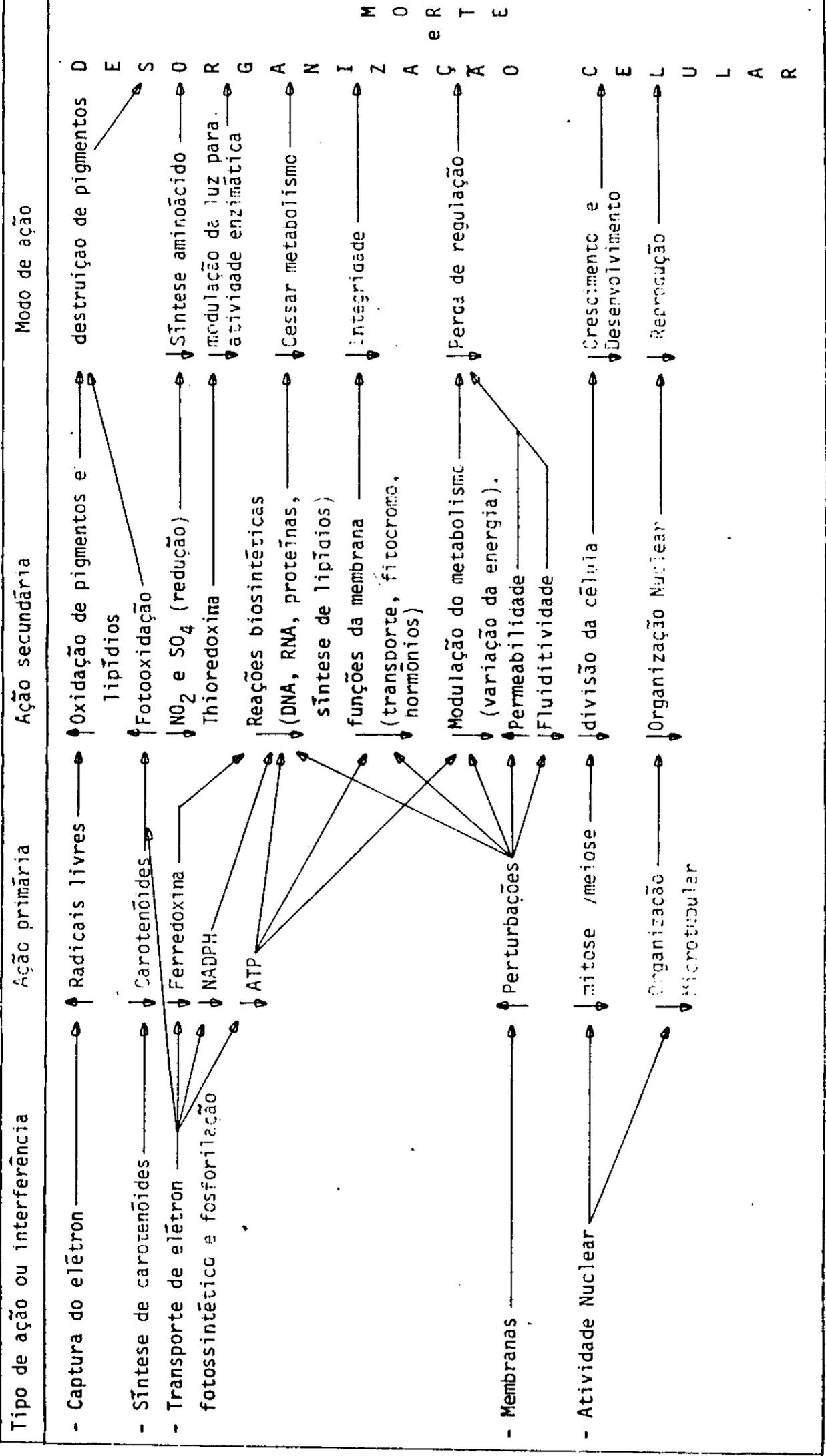
Os herbicidas por nós estudados, em particular, são demonstram eficácia quando aplicados sob iluminação. No caso de um deles (Paraquat) existe consenso na literatura sobre estar o seu mecanismo de ação intimamente ligado à Fotossíntese. Desta forma iniciaremos nosso estudo da ação de herbicidas fazendo uma breve descrição do fenômeno da Fotossíntese, a fim de podermos situar em que estágio desse importante processo natural o herbicida revela sua atividade.

##### IV.4.1. A Fotossíntese

A Fotossíntese é um processo complicado cujas ramificações envolvem várias áreas da Ciência. Grande parte do conhecimento adquirido da Fotossíntese foi obtido a partir de experimentos com extrações de material fotossinteticamente ativo. É provável que os processos a nível celular envolvam uma maior complexidade do que os processos observados com esses materiais isolados.

A Fotossíntese compreende uma cadeia de reações através da qual

Tabela 4-1: Mecanismos de ação de herbicidas em plantas



M O R T E

D E S O R G A N I Z A Ç Ã O C E L U L A R

a energia luminosa proveniente do sol é convertida em energia química. Sob condições especiais a Fotossíntese pode converter até cerca de 30% da energia luminosa incidente em energia química. Porém sob condições naturais essa conversão não ultrapassa 1%<sup>(16)</sup>. Mesmo assim a energia que é aproveitada para a Fotossíntese no globo terrestre supera em muito toda a energia utilizada pelo homem para fins industriais.

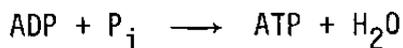
Nas plantas o  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  são convertidos em material orgânico e  $\text{O}_2$ . Esse resultado é obtido através de duas cadeias de reações. A primeira, que exige luz, envolve a produção de  $\text{O}_2$ , compostos estáveis de alta energia, entre os quais o difosfopiridina-nucleotídeo (NADPH) e trifosfato de adenosina (ATP). Nos subsequentes processos de escuro, que também podem ocorrer na presença de luz, esses compostos são utilizados para reduzir o  $\text{CO}_2$  atmosférico a carboidratos, proteínas, lipídeos, etc., com liberação de  $\text{O}_2$ .

Essas reações ocorrem nos cloroplastos em virtude dos pigmentos estarem organizados em dois grupos ou conjuntos funcionais<sup>(5,16,17)</sup> e que se encontram ligados a cadeias de transporte de elétrons distintas. Esses grupos funcionais são denominados de Fotossistema I e Fotossistema II.

O elemento identificador principal do Fotossistema I é um pigmento, que supõe-se tratar de uma clorofila a associada com um tipo específico de proteína. Ele comparece nos cloroplastos na proporção de um para cada 400 moléculas de Clorofila e possui a propriedade de apresentar máxima absorção de luz no comprimento de onda 700 nm e por isso é denominado de  $\text{P}_{700}$ . Observações demonstram que o  $\text{P}_{700}$  é capaz de capturar excitons de outras moléculas de clorofila, servindo a energia desses excitons para propiciar a perda de um elétron por parte do  $\text{P}_{700}$ .

Por outro lado, o Fotossistema II é caracterizado pela presença de um outro pigmento coletor de excitons, o  $\text{P}_{680}$  que possui máxima absorção luminosa no comprimento de onda 680 nm.

É mostrado na Fig. 4-14 o esquema das reações fotoquímicas ao nível dos Fotossistemas I e II. A incidência de um determinado fóton no fotossistema II produz dois efeitos iniciais: a água é decomposta em oxigênio, prótons e elétrons, sendo os elétrons doados ao Fotossistema II, e a molécula reativa do Fotossistema II, o  $P_{680}$ , é excitado a um nível de energia alto o suficiente para que dois elétrons de sua estrutura possam ser transferidos a um acceptor primário de elétrons. Ainda existem dúvidas sobre a identidade desse acceptor de elétrons do  $P_{680}$ . Em seguida esses elétrons percorrem uma cadeia de moléculas compostas de citocromos, Plastoquinona e Plastocianina, onde sofrem sucessiva queda de energia a cada transferência entre essas moléculas. Nessa fase de transporte de elétrons através da cadeia ocorre a reação denominada de Fosforilação Fotossintética ou simplesmente Fosforilação, onde o ADP (Adenosina Difosfato) em presença de Fosfato Inorgânico ( $P_i$ ) é transformada em Adenosina Trifosfato, segundo a reação



Por outro lado, a incidência de um fóton no Fotossistema I resulta na excitação do  $P_{700}$  e perda de dois elétrons a seu acceptor primário de elétrons, cuja identidade também não é perfeitamente definida. Esses elétrons são então capturados por uma substância denominada Ferredoxina (Fd), a qual possui como acceptor ideal de elétrons o  $NADP^+$  (Trifosfopiridina-dinucleotídeo-fosfato) a qual é reduzida em presença de prótons a NADPH. A equação para essa reação é dada por



onde observamos que durante a reação a Ferredoxina passa de sua forma reduzida Fd(II) para sua forma oxidada Fd (III).

Observamos ainda na Fig. 4-14 que ocorre transferência de elétrons do Fotossistema II ao Fotossistema I, através da cadeia de citocromos e após a reação de fosforilação. Essa transferência de elétrons compensa a

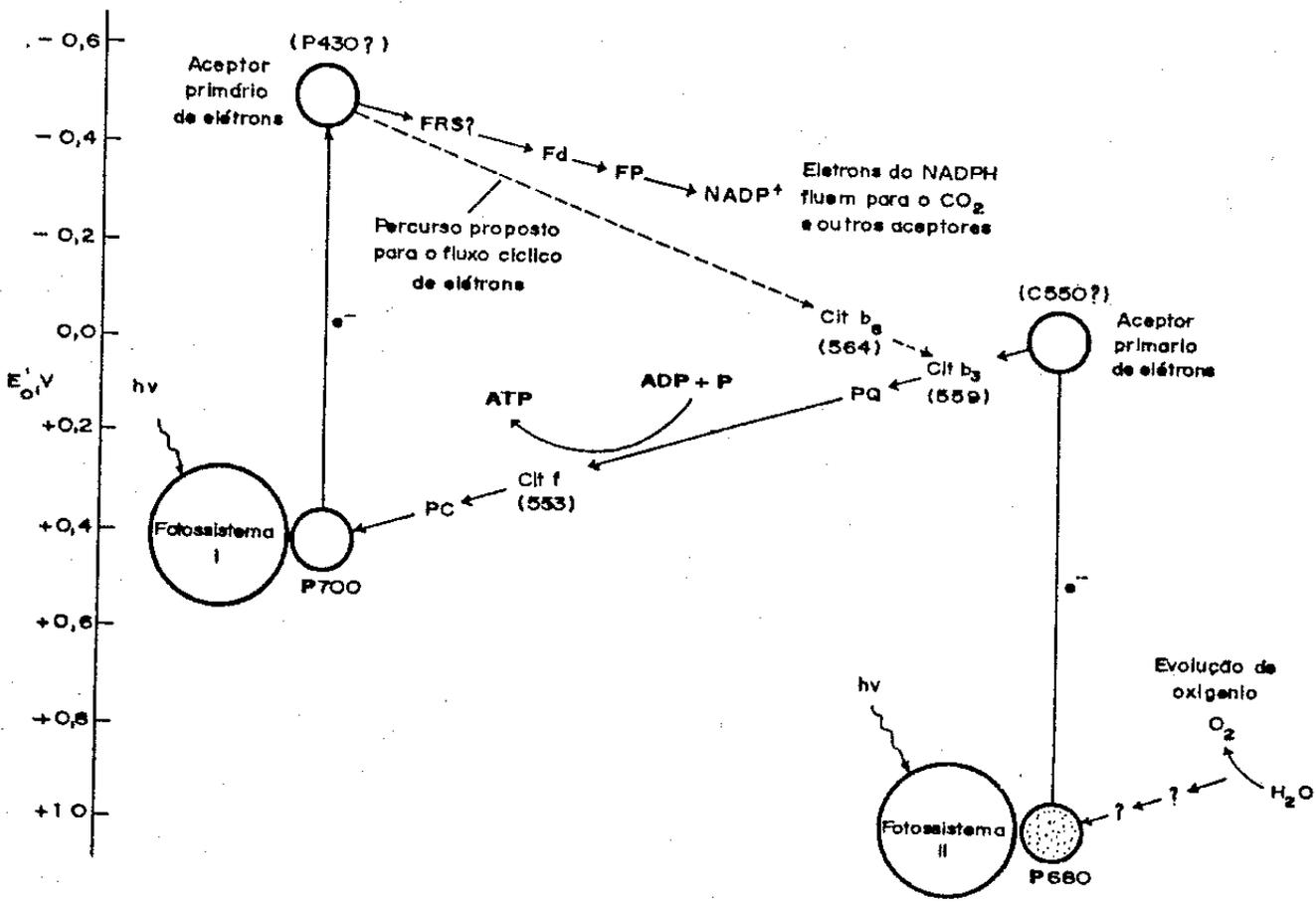
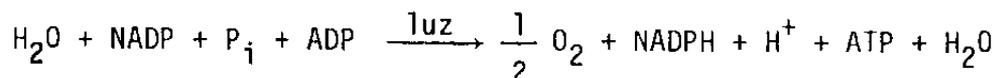


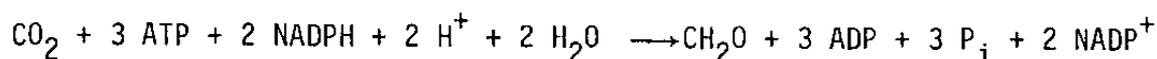
FIG. 4-14

Representação esquemática da cadeia de reações que compõe a fotossíntese. Estão representados por interrogações membros da cadeia, cuja identidade não é perfeitamente definida.

perda de elétrons inicial por parte do Fotossistema II e fecha o ciclo das reações luminosas da Fotossíntese. A equação que sumariza as reações químicas luminosas globais da Fotossíntese pode ser escrita como:



O ciclo completo da Fotossíntese é obtido quando ocorre o denominado "processo de escuro". A equação para esse processo é dada por



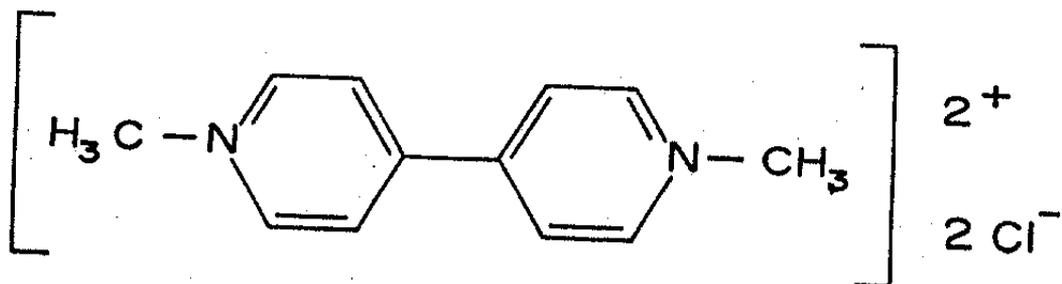
Nessa equação transparece a redução de  $\text{CO}_2$  ao carboidrato  $\text{CH}_2\text{O}$ , o qual é responsável pelo armazenamento de energia na planta. Por sua vez, a energia concentrada nos carboidratos é transferida em processos posteriores ao ATP que é a molécula universal responsável pelo transporte da energia que será utilizada para satisfazer as necessidades da célula. Fica evidenciado então que a Fotossíntese é protagonista do importante papel de desencadear a formação dos principais compostos necessários ao desenvolvimento vegetal.

#### IV.4.2. O Herbicida Paraquat

O Paraquat é um membro do grupo de compostos denominado bipyridílio ou dipiridílio, cuja fórmula estrutural é dada na Fig. 4-15. Desde a sua descoberta na década de 50 esse herbicida tem sido amplamente utilizado no controle de ervas daninhas e como dissecante em colheitas que exigem a prévia secagem de folhas<sup>(14)</sup>.

##### Principais usos:

- preparação da terra para cultivo de milho, soja, etc.;
- herbicida de pré-emergência em colheitas de germinação lenta;
- renovação de pastagens.



Paraquat

FIG. 4-15

Fórmula estrutural plana do Paraquat (Bipiridílio).

### Características:

- é altamente solúvel em água;
- é um cátion muito forte;
- em razão de sua forte adsorção e absorção pela folha, a ocorrência de chuva após 30 minutos da aplicação não afeta os resultados;
- provocam a morte rápida da planta, normalmente um ou dois dias após a aplicação ;
- sua atividade é altamente intensificada na presença de luz;
- sua atividade no solo é extremamente baixa;
- é altamente tóxico aos mamíferos e pouco tóxico aos peixes;
- devido à rapidez com que a planta é levada à morte, praticamente não ocorre translocação, que é o deslocamento do herbicida para outros elementos da planta além das folhas.

### Modo de ação:

Os bupiridílios são definidos como aceptores de elétrons e é essa propriedade que resume a sua atividade como herbicida atuante sobre o processo da Fotossíntese.

Vimos na Fig. 4-14 que após incidência de um fóton no Fotossistema I, ocorre transferência de elétrons do  $P_{700}$  para um aceptor primário e em seguida para a Ferredoxina, visando a formação de NADPH. É justamente na etapa de transferência de elétrons à Ferredoxina que o Paraquat interfere, por ser cátion forte. Esses elétrons são capturados por íons Paraquat, que se transformam em radicais Paraquat. Posteriormente, o radical Paraquat formado reage com oxigênio molecular e água, retornando ao seu estado original de íon e formando Peróxido de Oxigênio ou água oxigenada ( $H_2O_2$ ) e

Íons hidroxila. O esquema e equações dessas reações são vistos na Fig.4-16. O Peróxido de Hidrogênio tem conhecida ação fototóxica, conduzindo a alterações na permeabilidade de membranas e até à sua destruição (18,19) o que explica o conhecido efeito dissecante do Paraquat. Pode-se concluir, então, que o Paraquat, após penetrar nas células do paliçádico produz sua cadeia de efeitos continuamente, uma vez que o Íon Paraquat é sempre reconstituído após cada ciclo de reações. Portanto, sua atividade persiste até que o processo de fotossíntese deixe de ocorrer.

#### IV.4.3. Herbicidas do Grupo Difenil éter

O grupo Difenil éter é formado pelos herbicidas Acifluorfen (Tackle), Fomesafen (Flex), Lactofen (Cobra), Oxifluorfen (Goal) e Bifenox (Mowdown). Esses herbicidas tem sido amplamente utilizados quer como herbicidas de contato, quer via incorporação ao solo<sup>(20)</sup>. Nossos estudos utilizaram os três primeiros, cujas fórmulas estruturais são fornecidas na Fig.4-17.

##### Principal uso:

Contrôle pós emergência de ervas daninhas de folhas largas.

##### Características:

- é necessária incidência de luz para sua atividade;
- a morte da planta após a exposição ao herbicida e luz ocorre dentro de um ou dois dias;
- sua incorporação ao solo reduz em muito sua atividade;
- sua ação residual no solo é pequena, não havendo registros de ocorrência de efeitos em colheitas rotativas;
- a toxicidade a pássaros e mamíferos é pequena, mas para peixes se enquadra entre baixa e moderada;

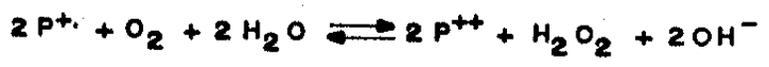
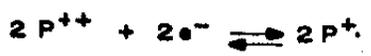
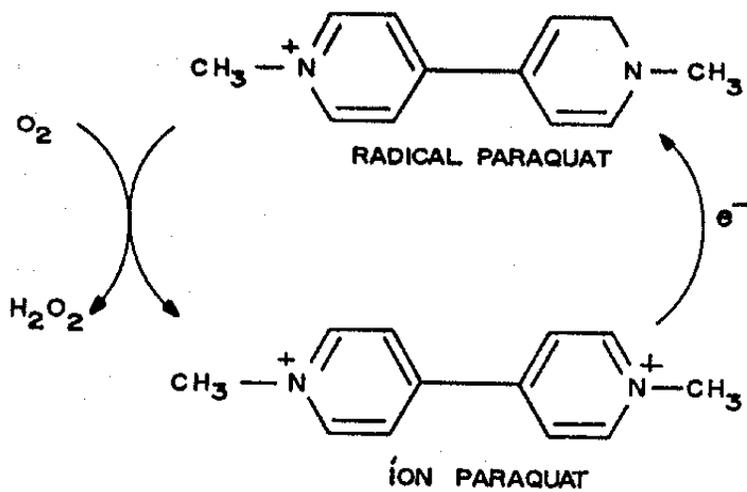
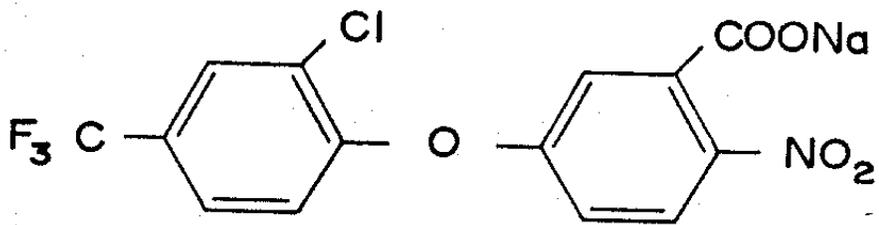
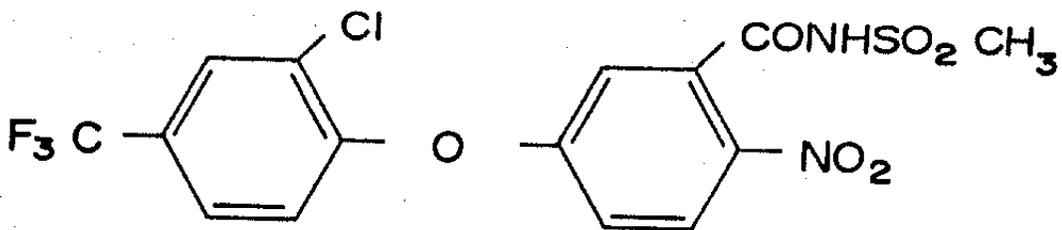


FIG. 4-16

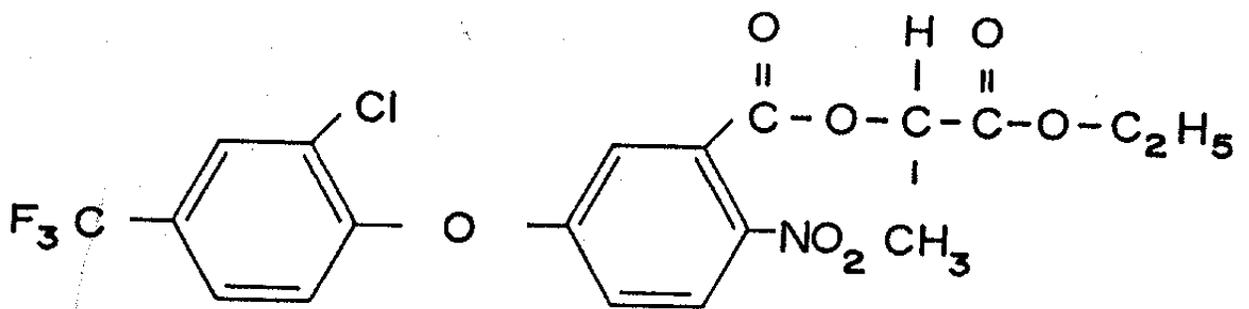
Representação esquemática das reações químicas que indicam a interferência do Paraquat na fotossíntese.



Acifluorfen



Fomesafen



Lactofen

FIG. 4-17

Fórmulas estruturais planas dos herbicidas do grupo difenil éter, Acifluorfen, Fomesafen e Lactofen.

- sua translocação para o resto da planta quando aplicado em folhas é pequena ou nula.

#### Modo de ação:

A literatura especializada registra profundas divergências no tocante aos mecanismos de ação desses herbicidas. Trebest et al.<sup>(21)</sup> propõe que alguns herbicidas do grupo difenil éter possuem um efeito inibidor do transporte de elétrons na Fotossíntese, com centro de atividade junto ao Fotossistema II, mais especificamente junto a um plastoquinona presente no percurso dos elétrons entre o Fotossistema II e o Fotossistema I, como é visto na Fig. 4-14. Esses herbicidas teriam ação efetiva no lado oxidante da plastoquinona, impedindo o fluxo normal de elétrons. Entretanto, Esminger et al.<sup>(22)</sup> propõe que a Fotossíntese não é requerida para a ocorrência da toxicidade desses herbicidas, e tampouco as membranas tilacóides dos cloroplastos seriam o ponto primário da sua ação. Todavia, Moreland et al.<sup>(23)</sup> trabalhando com três herbicidas concluiu que estes apresentaram efeitos sobre o transporte de elétrons e sobre a fosforilação, portanto sobre o Fotossistema II. Atualmente acredita-se que o envolvimento da ação desses herbicidas com a incidência de luz, seria causado por sua ação sobre os caratenóides<sup>(24,25)</sup>. Esses herbicidas atuariam sobre os pigmentos inibindo a dissipação de sua energia obtida da luz incidente. O pigmento, em consequência, provocaria a redução de uma substância ainda desconhecida, que iniciaria um processo de peroxidação de lipídeos, com prejuízos à permeabilidade das membranas celulares e subsequente perda dos constituintes celulares, que passariam para os espaços intercelulares, provocando a morte da planta.

#### IV.4.4. Efeitos do Herbicida Paraquat Observados pelo MS $\phi$

##### Descrição do Experimento:

O Herbicida Paraquat em solução aquosa a uma concentração de 5% em volume foi pulverizado numa folha de planta de soja adulta. A planta foi então submetida à iluminação gerada por uma lâmpada de filamento incandescente de 100W, mantida a uma distância de aproximadamente 30 cm da folha, para simular bem as condições de iluminação solar.

A intervalos de tempo de aproximadamente 30 minutos foram extraídos da folha cortes em forma de disco de 0,5 cm de diâmetro, efetuados a uma distância mínima de 1 cm da nervura central, alternando-se o lado da nervura central do qual se extraia o disco e partindo da base para a extremidade afilada da folha. O instante considerado como sendo realizada a medida foi o início da varredura do espectro, ou seja o disparo do monocromador. A planta foi mantida em vaso com solução nutritiva durante todo o experimento.

##### Aparelhagem Utilizada:

A montagem experimental empregada neste experimento é representada esquematicamente na fig. 4-18. A fonte de luz consiste de uma lâmpada de arco de Xenônio da Oriel Corp. de 1000 Watts de potência. Um "chopper" da PAR é usado como modulador, produzindo a energia luminosa pulsada que incidirá na amostra. A luz branca atravessa um sistema monocromador de rede de difração refletiva da Jarrel Ash Div. A luz já monocromada e modulada passa por um sistema de espelhos côncavos marca Funbec e incide sobre uma célula fotoacústica. A geometria da célula fotoacústica utilizada é a mesma que foi descrita no item II.1.1 no estudo de adulterantes do café, excetuando-se o fato da cavidade porta-amostras utilizada no presente estudo ser cilíndrica.

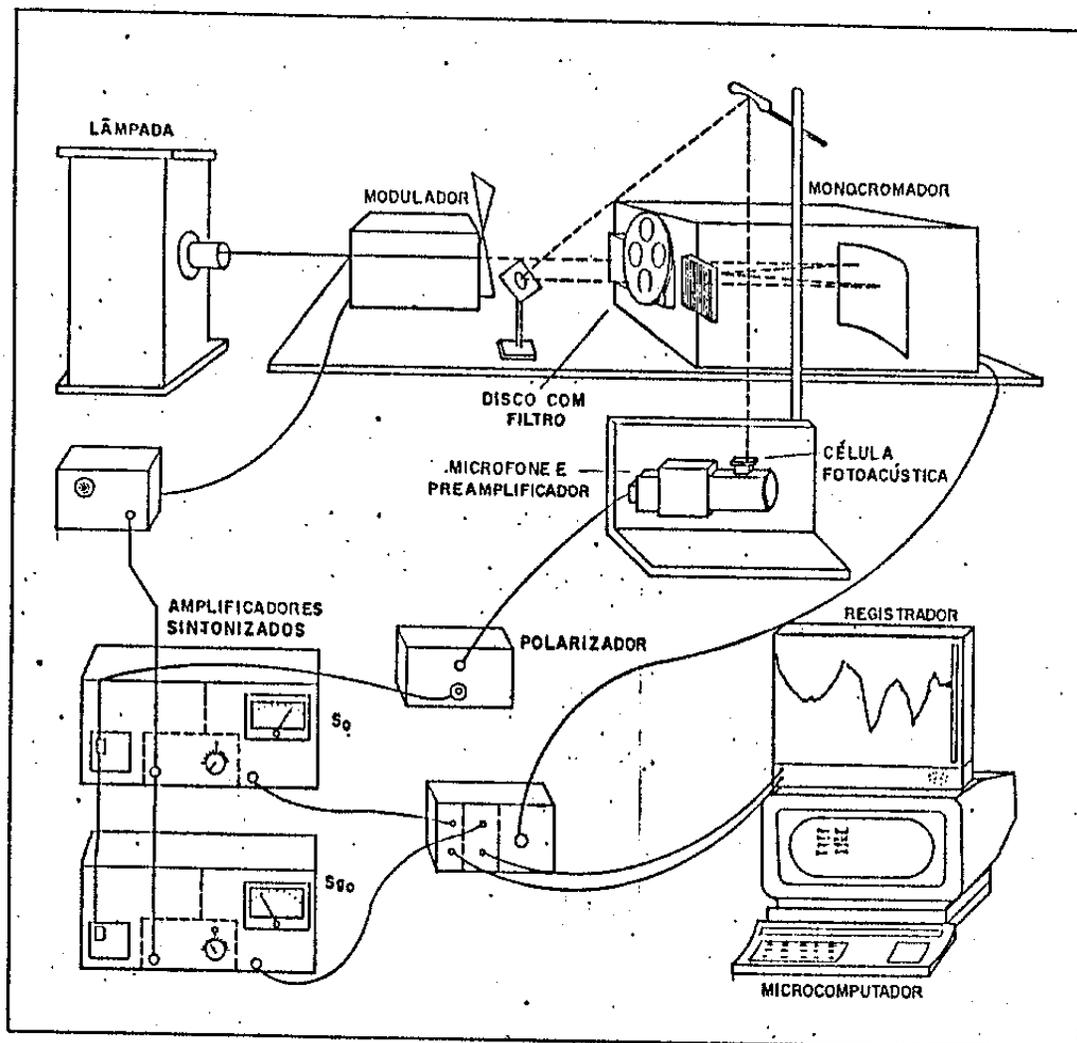


FIG. 4-18

Representação esquemática do arranjo experimental empregado no estudo dos mecanismos de ação de herbicidas pelo MSΦ.

O porta-amostra da célula possui também diâmetro de 0.5 cm propiciando o encaixe perfeito da amostra. A câmara onde é depositada a amostra é lacrada com uma janela de quartzo, para garantir que mesmo os comprimentos de onda na faixa do UV não tenham sua intensidade reduzida. Comunica-se com a câmara fotoacústica um microfone da Bruel & Kjaer modelo BK 4166 que será o detector das flutuações de pressão dentro da câmara. O sinal detetado pelo microfone é enviado ao sistema de dois lock-in referidos no ítem IV.3.2, colocados em quadratura. Completa o arranjo experimental um micro-computador Commodore modelo CBM 4032, uma unidade de disco, os quais permitem a aquisição dos dados provenientes dos lock-in a intervalos de 1 nm, após a sua normalização, ou seja, a compensação da variação com o comprimento de onda da intensidade luminosa incidente. O sistema processador é interfaciado com os detectores lock-in e com um traçador gráfico, tendo sido a interface construída em nossos laboratórios<sup>(26)</sup>. As condições de medida por nós utilizadas foram: frequência de modulação: 25 Hz; sensibilidade: 50 mV; constante de tempo: 1s; corrente na lâmpada: 30 A; velocidade de varredura do espectro: 25 nm/min; largura da banda passante: 12 nm.

Simultaneamente às medidas fotoacústicas e a intervalos de tempo de 2 horas foi realizada a microscopia óptica de cortes transversais da folha, a fim de investigar eventuais alterações estruturais no sistema foliar. Foram também tiradas fotografias desses cortes. O instrumento utilizado foi o microscópio Zeiss modelo II, operado pelo Prof. Antonio C. Gabrielli do Instituto de Biologia da Unicamp.

Por fim, objetivando estabelecer um paralelo entre a variação da diferença de fase e a variação da espessura da folha em consequência da desidratação, idealizamos junto ao Prof. Gabrielli, um arranjo experimental que possibilitou medir a variação de espessura após aplicações do herbicida, com a folha "in vivo" ou seja, na própria planta. O método consiste em se manter a folha presa entre lâminas de vidro, sendo que na lâmina superior é

previamente praticado um traço com um diamante usado para corte de vidro. É centrado o foco do microscópio sobre um dos inúmeros "trincos" microscópicos produzidos pelo diamante. É anotada a posição do micrométrico de ajuste do microscópio. A intervalos de tempo regulares são feitos novos ajustes de foco sobre o trinco e o deslocamento do micrométrico para cada novo ajuste corresponde exatamente à variação de espessura da folha. As condições de iluminação e tamanho da folha, bem como a dosagem do herbicida foram tanto quanto possível as mesmas do experimento com a fotoacústica. O arranjo experimental utilizado para as medidas de variação de espessura é representado esquematicamente na Fig. 4-19.

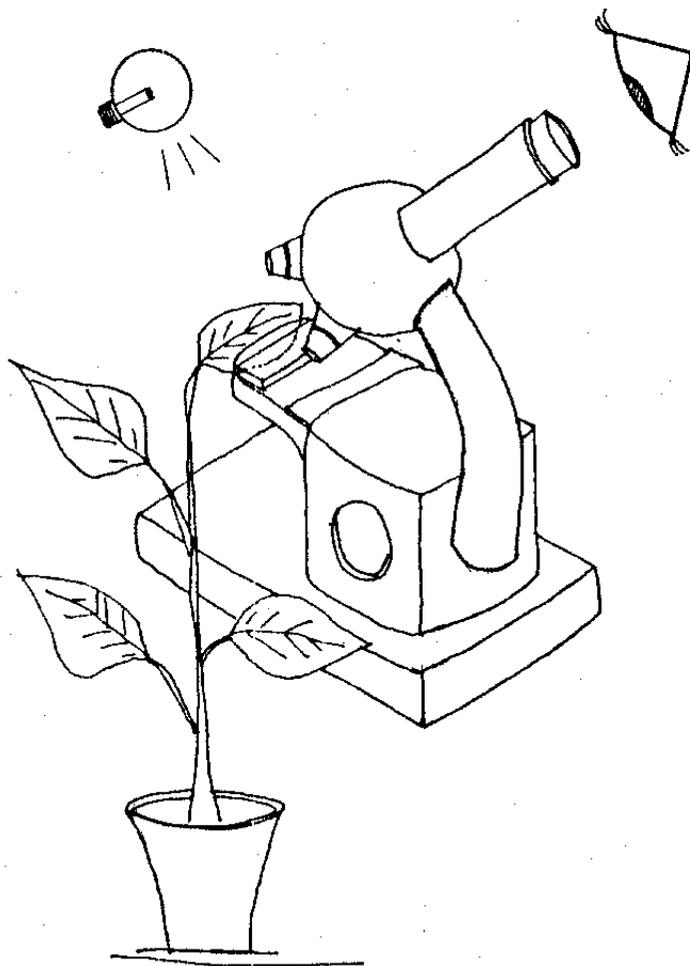


FIG. 4-19

Representação esquemática do método microscópico utilizado para estudar a variação na espessura da folha sob ação do herbicida Paraquat.

## Resultados e Discussão:

A Tab. 4-2 resume os resultados por nós obtidos para todas as medidas realizadas. São vistos na Fig. 4-20 os espectros na situação de separação, em  $t = 135\text{min.}$  e  $t = 315\text{ min.}$  As intensidades dos picos foram avaliadas nos seguintes comprimentos de onda: cêra: 350 nm; carotenóides: 480 nm; clorofila 680 nm. Da análise da tabela 4-2 podemos concluir que, embora com algumas flutuações, as grandezas diferença de fase e as intensidades fotoacústicas para cêra, carotenóides e clorofila sofreram uma redução com o evoluir do tempo.

O decréscimo observado na diferença de fase pode ser explicado com base na hipótese de contínua desidratação da folha. Se denotarmos por  $\Delta x$  a distância média entre as camadas de cutícula e dos pigmentos, a diferença de fase  $\Delta\phi$  pode ser escrita como:

$$\Delta\phi = a\Delta x$$

onde  $a$  representa o coeficiente de difusão térmica da água, que é o meio de propagação da onda térmica quando no interior da folha. A desidratação produz estreitamento na espessura da folha e redução em  $\Delta x$ , o que implica também na redução em  $\Delta\phi$ .

Representamos graficamente na Fig. 4-21a a evolução temporal da diferença de fase e na Fig. 4-21b a evolução temporal da espessura da folha sob a ação do herbicida. Notamos que ambas as grandezas apresentam comportamento bastante semelhante, diferindo apenas na cronologia e amplitude dos efeitos representados. Devemos entretanto, lembrar que os experimentos da fotoacústica e microscopia óptica foram realizados em folhas diferentes. É possível também que a pressão das lâminas sobre a folha, no caso

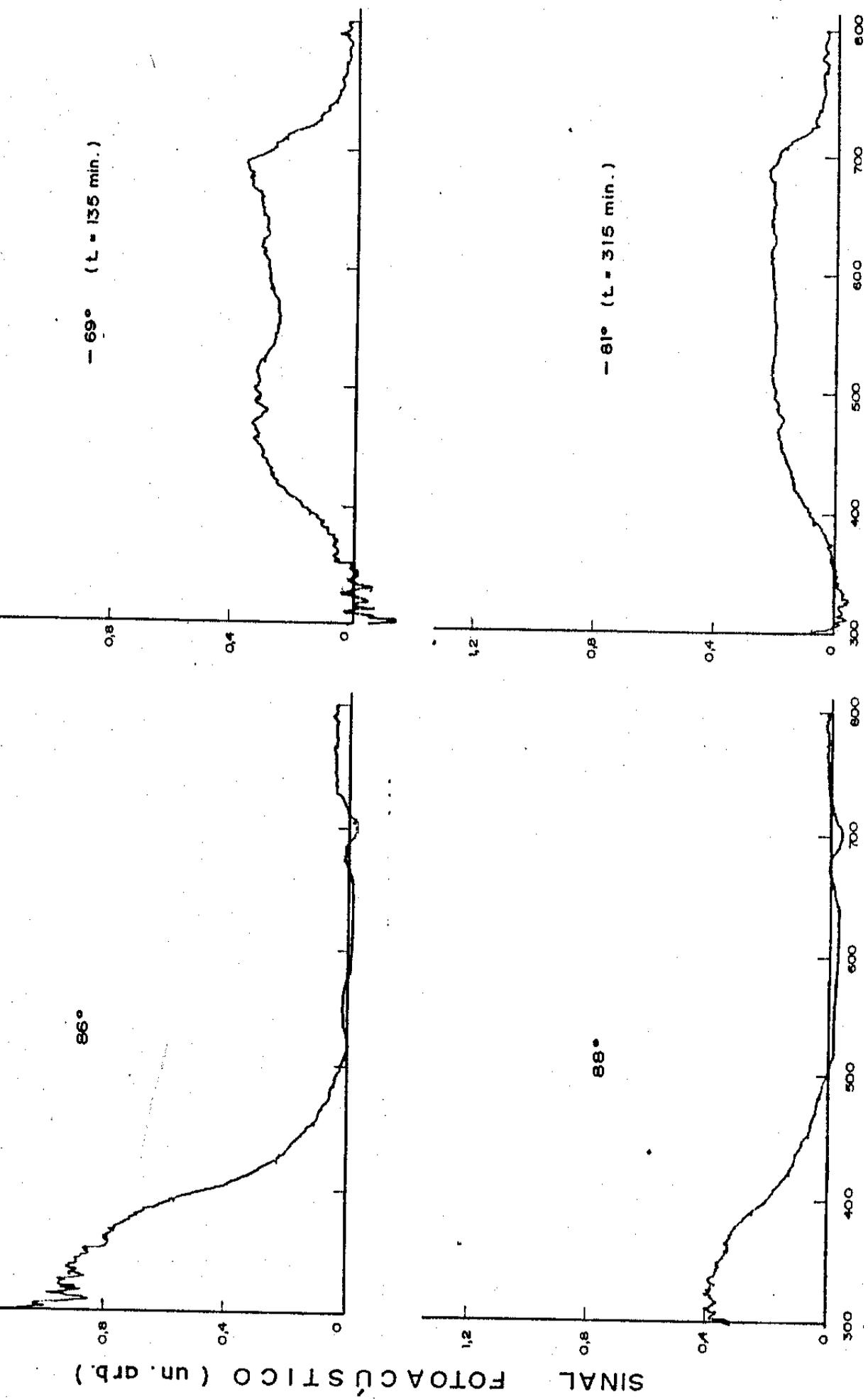
Tabela 4-2. Resultados obtidos na monitoração de efeitos do herbicida Paraquat em folha de soja com a aplicação do MS $\phi$

$t$	$\phi'$	$\phi_p$	$\phi''$	$\phi_c$	$\Delta \phi$ (*)	$S_{cera}$ (**)	$S_{car}$ (***)	$S_{clor}$ (***)
(min)	(graus)	(graus)	(graus)	(graus)	(graus)	(un.arb.)	(un.arb.)	(un.arb.)
0	87	-3	-66	24	27	14	5	7
35	85	-5	-68	22	27	16	6	7
65	85	-5	-68	22	27	17	6	7
100	88	-2	-66	24	26	18	6	8
135	86	-4	-69	21	25	18	7	8
170	86	-4	-70	20	24	18	6	8
190	88	-2	-72	18	20	14	5	6
220	88	-2	-80	10	12	8	4	5
250	88	-2	-80	10	12	7	4	5
280	88	-2	-79	11	13	7	4	5
315	88	-2	-81	9	11	8	4	4
350	88	-2	-79	11	13	8	5	5

(\*) valores afetados por um desvio de 2 un.

(\*\*) valores afetados por um desvio de 1 un.

(\*\*\*) valores afetados por um desvio de 0,5 un.



COMPRIMENTO DE ONDA ( nm )

FIG. 4-20

Espectros da cera e dos pigmentos da folha de soja na situação de separação em dois instantes diferentes.

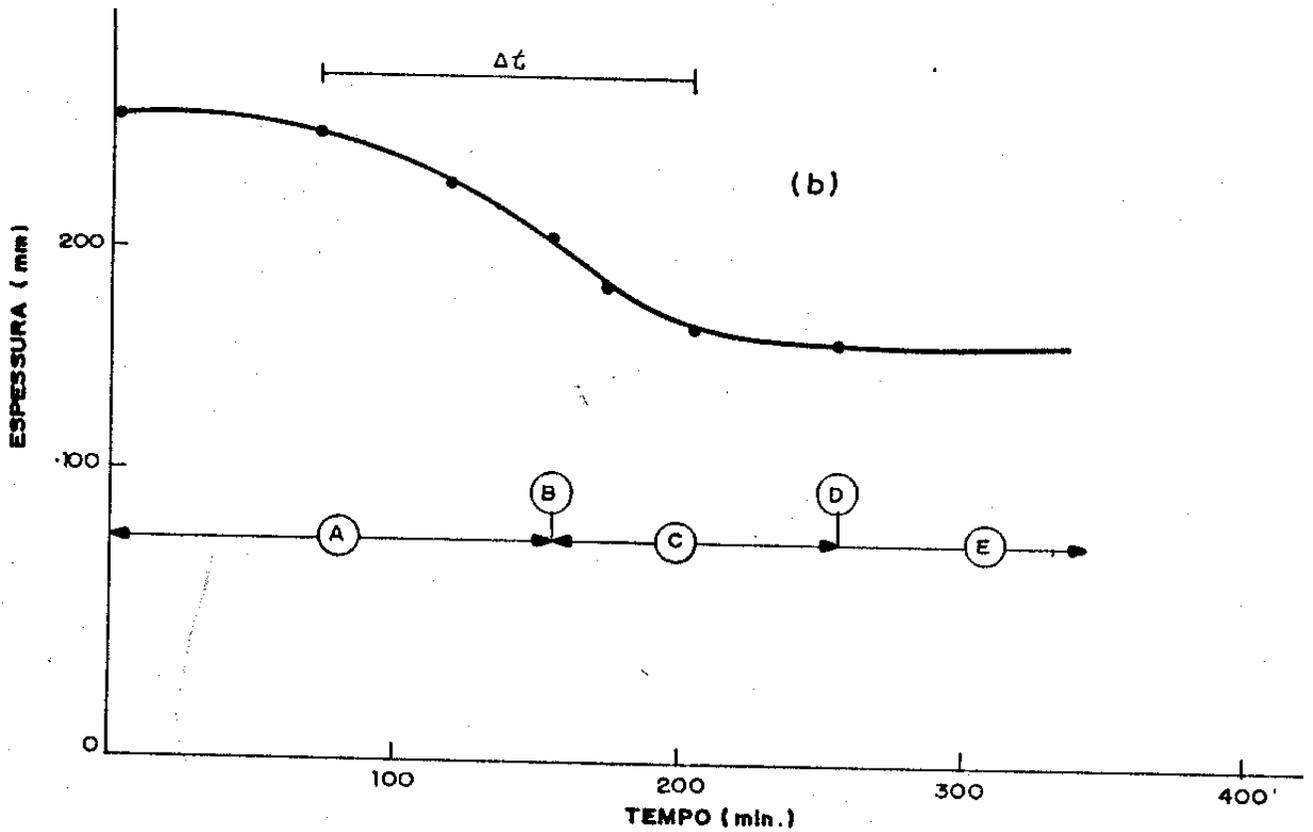
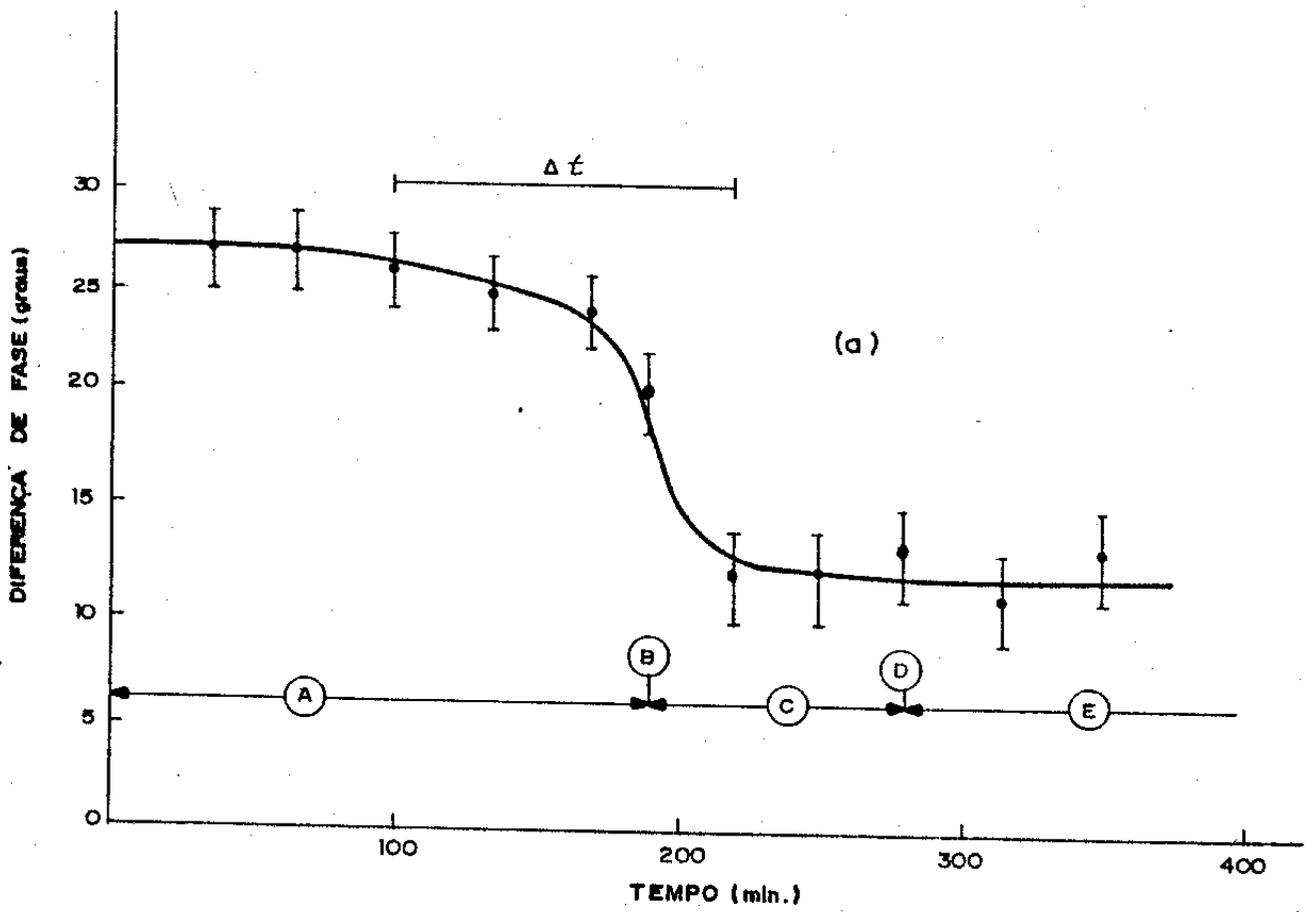


FIG. 4-21

(a) variação temporal da diferença de fase entre os sinais fotoacústicos da cera e dos pigmentos de uma folha de soja submetida à aplicação do herbicida Paraquat; (b) variação temporal da espessura de uma folha de soja submetida à aplicação do herbicida Paraquat.

da microscopia e a eventual barreira imposta pelas lâminas à perda d'água na região entre as lâminas tenham sido, em parte, responsáveis pelas diferenças observadas. Consideraremos mais tarde o efeito da pressão das lâminas, que conseguimos isolar.

Os gráficos da Fig. 4-21 permitem as seguintes conclusões:

- na região representada por (A) o herbicida se difunde pela folha sendo progressivamente aumentado o seu efeito desidratante;
- em (B) ocorre um ponto de inflexão da curva. Nesse ponto, as células já perderam substancial quantidade de água, ocorrendo a partir daí, mudança no comportamento da variação de espessura, por ser a perda d'água mais lenta, o mesmo ocorrendo com a diferença de fase.
- em (C) a perda d'água vai se reduzindo progressivamente, até cessar em (D), quando a espessura passa a não variar ou variar muito lentamente, compreendendo a região (E).
- outro fato marcante é a existência do intervalo  $\Delta t$  que compreende a queda acentuada na espessura e diferença de fase, ou seja, representa o período de máxima atividade do herbicida.

Na fig. 4-22 fornecemos a representação gráfica da evolução temporal das intensidades fotoacústicas produzidas pela cêra, clorofila e carotenóides. Considerando a ocorrência inevitável de variabilidade composicional, nas amostras por nós tomadas ao longo da folha, preferimos ao traçar os gráficos considerar os valores médios da intensidade em cada ramo das curvas antes e depois da queda acentuada, ao invés de acompanhar a sequência aleatória de pontos. Entendemos que o comportamento real da variação dessas intensidades só poderá ser obtido através de uma análise "in vivo", situação em que as medidas são concentradas sobre uma mesma região da folha. Isso não obstante, informações importantes podem ser destacadas desses gráficos.

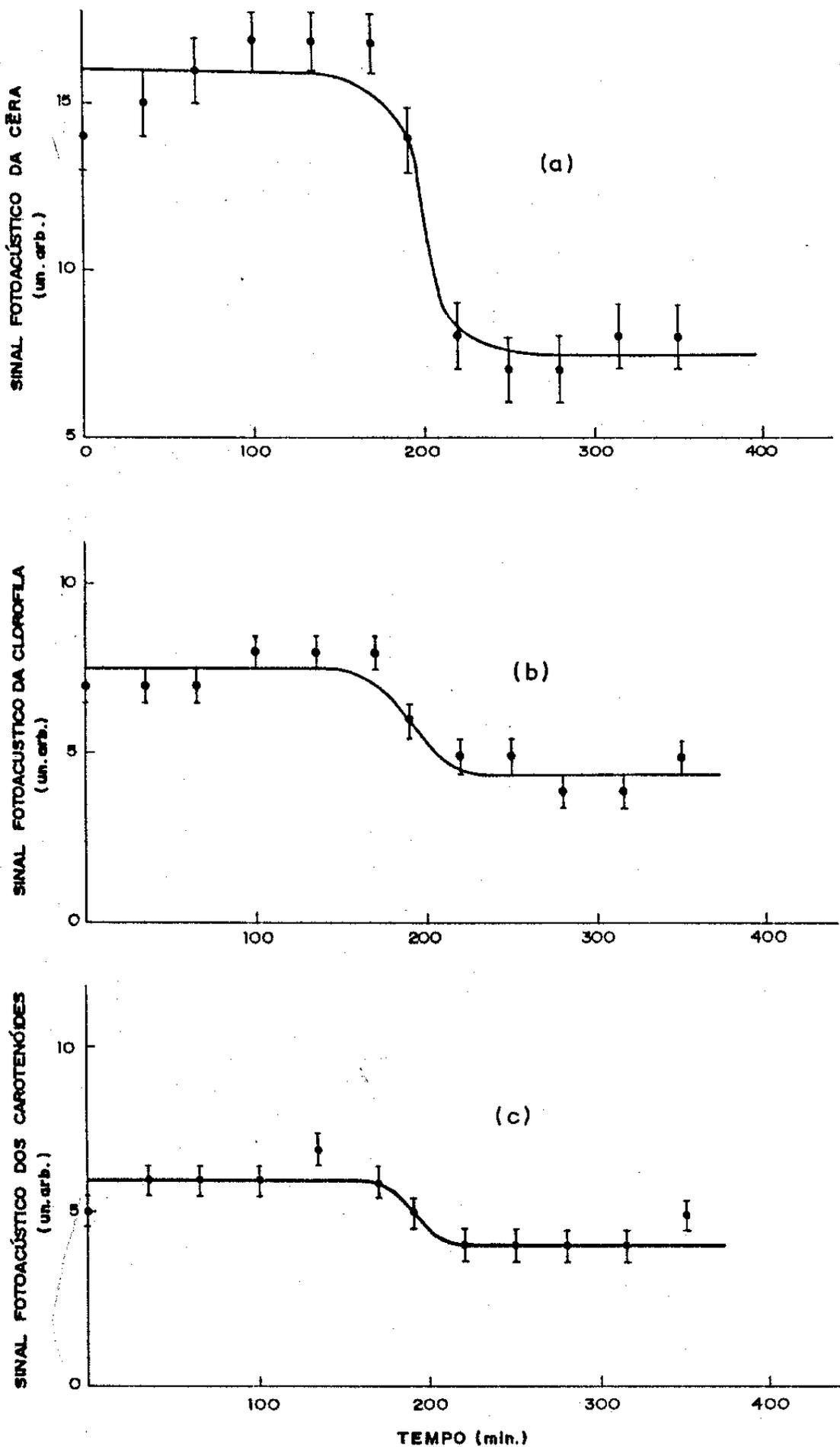


FIG. 4-22

Varição temporal do sinal fotoacústico (a) da cera, (b) da clorofila e (c) dos carotenóides de uma folha de soja submetida à aplicação do herbicida Paraquat.

Observa-se por exemplo uma simultaneidade perfeita na ocorrência da queda acentuada das intensidades, além do que existe simultaneidade entre esses gráficos e o gráfico da evolução temporal da diferença de fase. Essa semelhança na dinâmica dos fenômenos de redução na intensidade atribuída aos vários constituintes foliares sob nossa consideração, nos leva a concluir que a medida em que a camada protetora de cutícula é destruída, o que é comprovado pela redução da intensidade fotoacústica a ela associada, o herbicida por ser altamente solúvel em água, se difunde rapidamente através da folha, destruindo quase que simultaneamente as membranas, tanto celulares quanto dos cloroplastos e também as clorofilas e os carotenóides. Mostramos na Tab. 4-3, as variações percentuais ocorridas durante o período de ação do herbicida sob nosso estudo, para todas as grandezas por nós consideradas. Observamos nessa tabela que a cêra sofreu maior variação percentual. Acreditamos que o fato da cutícula ser o primeiro elemento foliar a entrar em contato com o herbicida, implique em um efeito mais intenso sobre a mesma.

Tabela 4-3. Variações percentuais observadas em folha de soja sob a ação do herbicida Paraquat:

Espessura	Dif. de Fase	Intensidades		
		Cêra	Clorofila	Carotenóides
35	50	53	40	33

Conforme adiantamos, procedemos também ao estudo "in vivo" da variação de espessura de uma folha, sem a aplicação do herbicida, no intuito de avaliar o papel da pressão exercida pelas lâminas na variação de espessura. O gráfico que resume o experimento é mostrado na Fig. 4-23. Notamos que o efeito da pressão das lâminas não produz variação além dos 7% e além disso, a curva apresenta um comportamento totalmente diverso da curva representativa da variação de espessura por ação do herbicida.

Acreditamos que as lacunas produzidas na folha, ao extrair-se as amostras circulares são responsáveis pela diferença entre as variações percentuais na espessura e na diferença de fase. Essas lacunas podem ter contribuído para intensificar a desidratação, produzindo um acréscimo na diferença de fase em relação à que seria observada com a folha inteira. Essa pode ter sido uma das razões para a diferença de fase ter alcançado uma variação percentual maior do que a que ocorreu com a espessura.

Procuramos estudar também uma folha, simplesmente desidratando fora da planta, sem a ação do herbicida, a fim de levantar semelhanças e diferenças com a desidratação produzida pelo herbicida. Os gráficos para a variação da diferença de fase são mostrados na Fig. 4-24 e 4-25. O gráfico da Fig. 4-24 mostra que o comportamento da curva é totalmente diferente do comportamento observado com o herbicida. A aparência da curva sugere um comportamento exponencial. Porém, como é mostrado na Fig. 4-25 em papel monolog, o comportamento exponencial não existe (curva a) ou só se manifesta após decorrido algum tempo (curva b).

Finalmente, apresentamos na Fig. 4-26, as fotos obtidas ao microscópio com uma folha de soja sob ação do herbicida 0, 2, 4, e 6 horas após a aplicação. Notamos que na 2ª hora após a aplicação já são observadas alterações ao nível das células do mesófilo, o que concorda com a curva da diferença de fase. Danos profundos ao nível das membranas celulares e dos cloroplastos são notados na foto da 4ª hora após aplicação, onde se

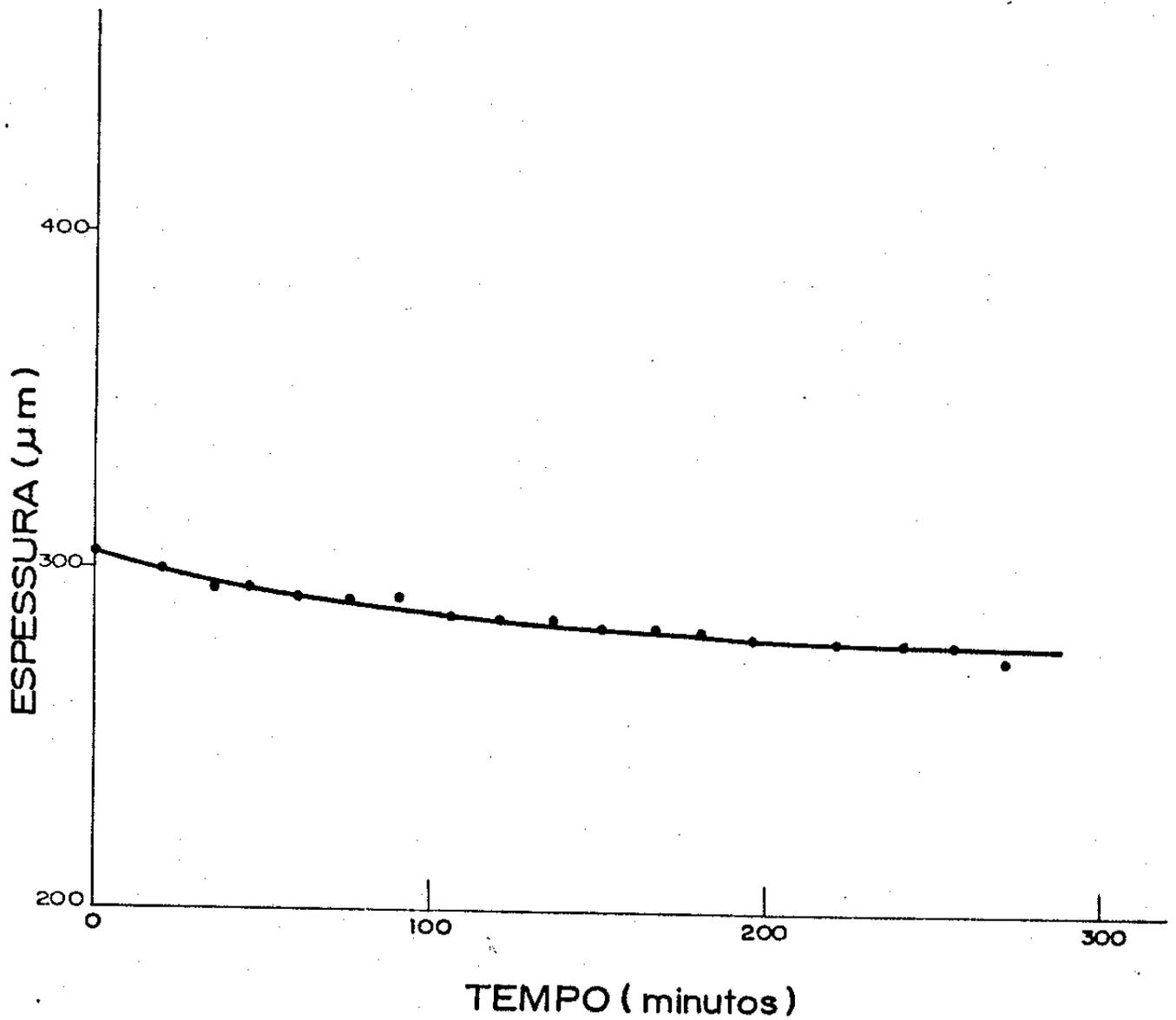


FIG. 4-23

Representação gráfica do efeito da pressão exercida na folha de soja pelas duas lâminas de vidro utilizadas no processo de medida da variação de espessura da folha.

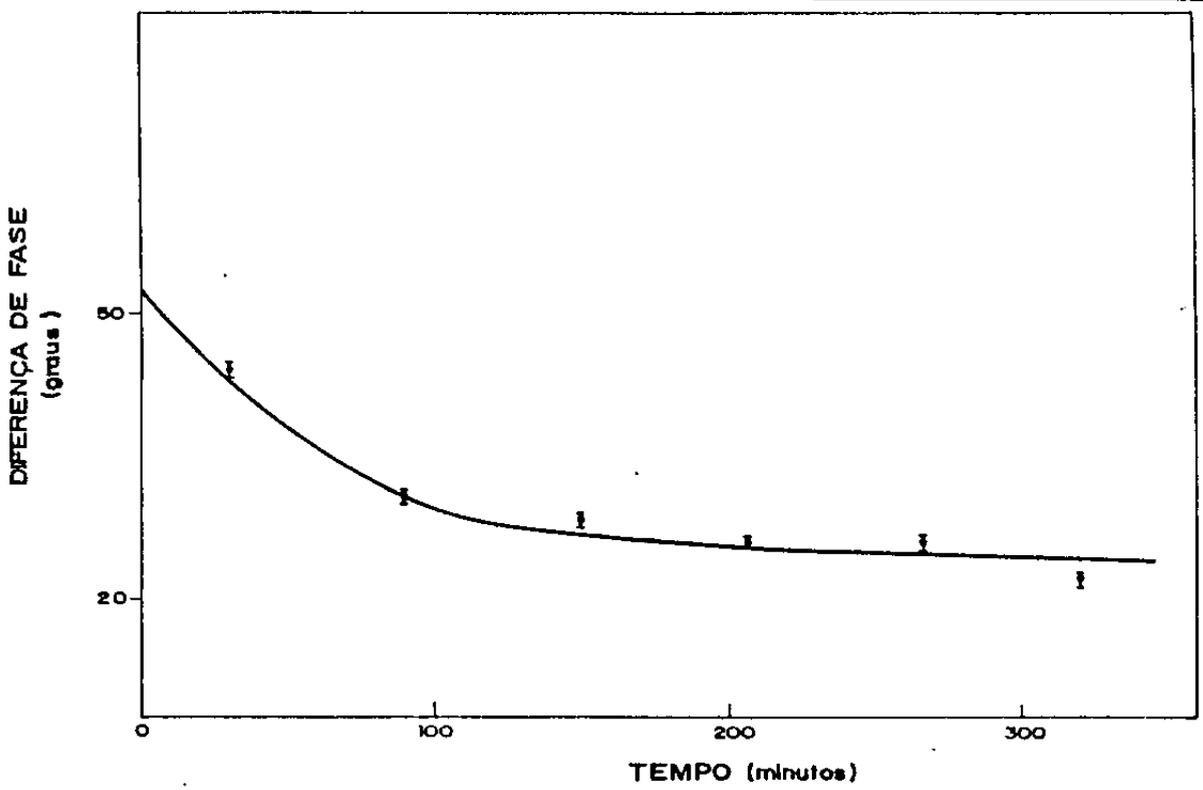


FIG. 4-24

Variac̃o~ temporal da diferen~a de fase entre os sinais fotoac̃usticos da cera e dos pigmentos de uma folha de soja submetida ã simples desidrata~o~ produzida pela sua retirada da planta.

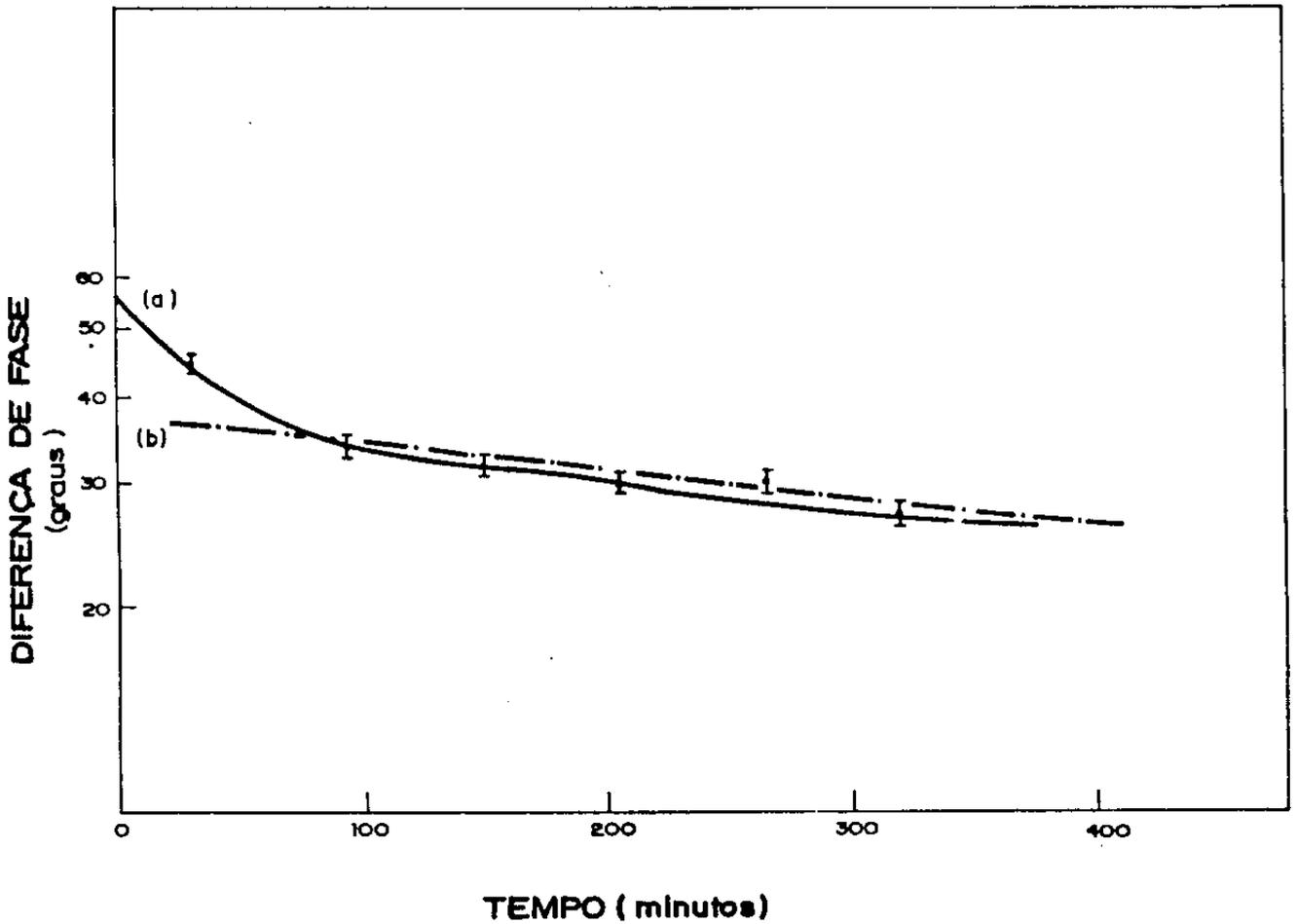


FIG. 4-25

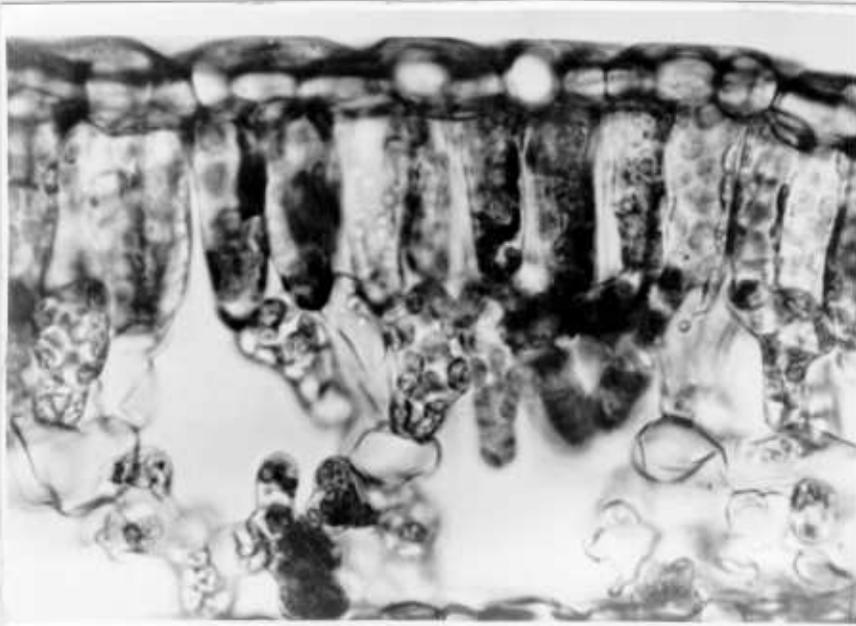
Representa~o~ em papel mono-log da varia~o~ temporal da diferen~a de fase entre os sinais fotoac̃usticos da cera e dos pigmentos de uma folha de soja submetida ã simples desidrata~o~. (a) o comportamento global n~o e~ exponencial, mas (b) pode ser aproximado por uma exponencial ap~s decorrido certo tempo.

FIG. 4-26

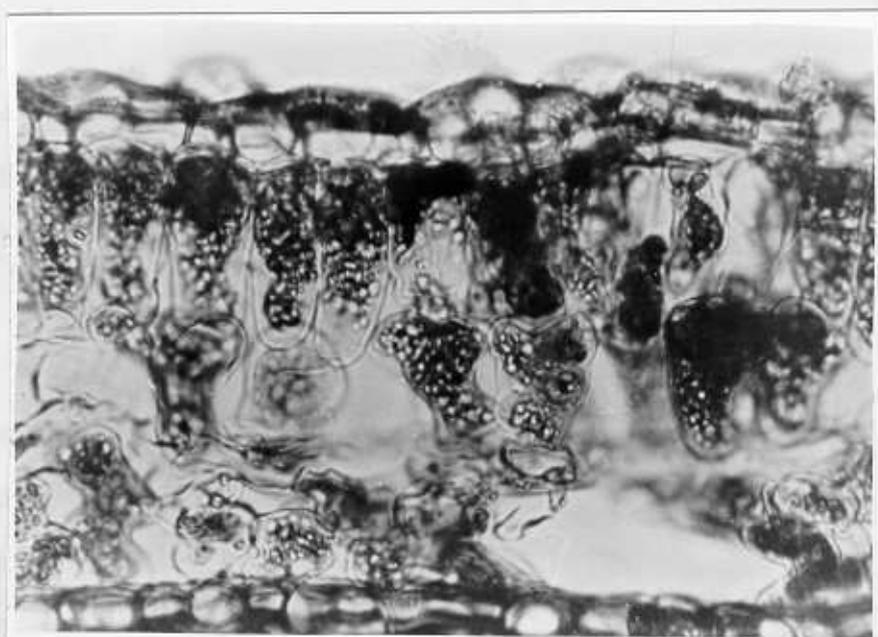
Fotografias de cortes longitudinais em folha de soja sob observação microscópica



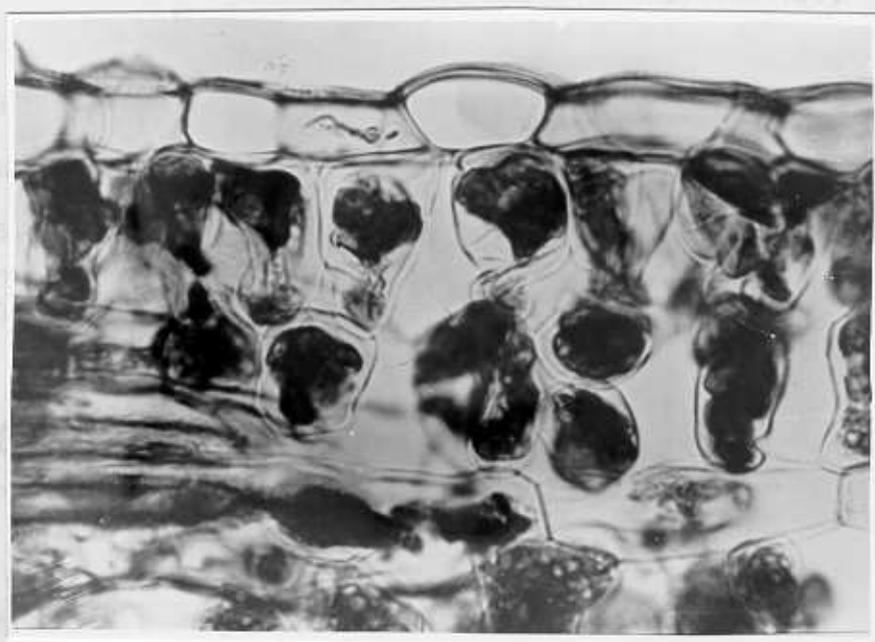
(a) não submetida à aplicação do herbicida.



(b) transcorridas duas horas após a aplicação do herbicida Paraquat; Nota-se a ocorrência de plasmólise em algumas células.



- (c) transcorridas quatro horas após a aplicação do herbicida Paraquat; Nota-se intensificação no efeito da plasmólise e mudanças na configuração dos cloroplastos.



- (d) transcorridas seis horas após a aplicação do herbicida Paraquat. Nota-se plasmólise em alto grau e destruição dos cloroplastos, que não mais se distinguem do restante do conteúdo celular.

observa um alto grau de plasmólise e destruição dos cloroplastos. Na foto da 6ª hora após a aplicação, o conteúdo celular praticamente não permite a identificação de quaisquer organelas em consequência de sua destruição.

Fellows e Boyer<sup>(27)</sup> utilizando técnicas precisas para medida de potenciais de água e microscopia óptica e eletrônica observaram que a desidratação (não associada a herbicidas) de folhas produz grande perda de organelas celulares, o que só não ocorre para as membranas tilacóides dos cloroplastos, que conservam sua integridade mesmo no caso de alto "stress" hídrico. Já no caso da ação do Paraquat, nossas observações mostraram a ocorrência de destruição dessas membranas, simultaneamente à desidratação. É visível, portanto, a diferença entre o efeito global da ação desse herbicida e uma simples desidratação da folha.

As informações obtidas a partir das fotos da Fig. 4-26 concordam com as curvas das Figs. 4-21 e 4-22. A plasmólise, que se relaciona com a perda d'água e portanto, com a variação de espessura, atinge seu ápice na 4ª hora após a aplicação, como é visto na Fig. 4-21. As alterações nos cloroplastos, também evidentes na foto da 4ª hora são obtidas nos gráficos das intensidades da clorofila e carotenóides mostrados na Fig. 4-22.

Essas observações estão em bom acôrdo com registros de Van Hensen<sup>(28)</sup>, segundo os quais radicais do grupo peridilio quando oxidados produzem peroxidações de lipídeos e pigmentos, já observáveis dentro de uma hora ou duas. Moreland<sup>(15)</sup> aponta que a destruição de clorofila e inibição da síntese de carotenóides são evidenciados após "diversas" horas de tratamento. No nosso caso esses efeitos foram observados a partir da 3. hora, conforme a Fig. 4-22.

#### IV.4.5. Efeitos dos Herbicidas do Grupo Difenil Éter observados pelo MSφ

##### Descrição do Experimento:

Foram aplicados os herbicidas Acifluorfen, Fomesafen e Lactofen nas plantas *Amaranthus* e *Euphorbia*, que são consideradas ervas daninhas de ocorrência bastante comum em todo o território nacional.

As plantas eram bastante jovens, possuindo de 4 a 8 folhas, além de folículos primários. As folhas maiores possuíam cerca de  $2\text{cm}^2$  de área e as plantas, cerca de 10 cm de altura. Os herbicidas foram aplicados segundo especificações dos fabricantes, incluindo a adição de surfactante. A dosagem indicada é uma solução aquosa que corresponda a 125g de produto ativo por hectare. Na solução assim preparada foi acrescentado o surfactante Aterbane na concentração de 0,125% em volume a fim de propiciar boa adesão e penetração da solução contendo o herbicida. Após a aplicação as plantas foram expostas à radiação solar, que era bastante intensa nos dias em que os experimentos foram realizados, e foram mantidas em vasos com terra umedecida.

Para cada medida fotoacústica foi tomado como amostra um disco de 0,5 cm de diâmetro extraído de uma folha. Devido ao tamanho reduzido das folhas e a fim de evitar influência do eventual efeito traumático produzido pela extração da amostra, são extraídas uma amostra de cada folha, variando a folha a cada nova medida. Obviamente, isso nos obrigou a tomar para as medidas, mais de uma planta em cada caso.

Ao mesmo tempo em que extraímos a amostra para a medida fotoacústica, era extraída uma outra folha para a microscopia óptica de cortes transversais e para a obtenção da fotografia ao microscópio, que era opera

do pelo Prof. Gabrielli.

A montagem experimental utilizada foi a mesma descrita no experimento com o herbicida Paraquat, excetuando-se a iluminação artificial, que neste caso não foi utilizada.

### Resultados e Discussão:

Os resultados por nós obtidos são mostrados na Tabela 4-4. Devido ao grande número de resultados, dividiremos nossa discussão considerando cada planta e série de resultados separadamente.

#### A) Planta *Amaranthus*

- diferença de fase ( $\Delta\phi$ ): as medidas apresentam grandes flutuações, sem qualquer regularidade observável;
- intensidade fotoacústica para a cêra ( $S_{c\acute{e}ra}$ ): as medidas apresentam ora grandes flutuações (acifluorfen e lactofen-dose dupla), ora flutuações menores (fomesafem e lactofen-dose simples) mas sem nenhum comportamento regular.
- intensidade fotoacústica para os carotenóides ( $S_{car}$ ): observamos que ocorrem flutuações sem tendência a qualquer comportamento na maioria dos casos. Entretanto pode-se notar que no caso do herbicida lactofen-dose dupla observou-se uma redução na intensidade já a partir da 2ª hora. Após 24 horas de aplicação do herbicida essa redução na intensidade mostrou-se substancial, passando de 11 un. para 3 un.
- intensidade de fotoacústica para a clorofila ( $S_{cl}$ ): valem aqui os mesmos comentários utilizados no caso de intensidade para os caratenói

Tabela 4-4. Resultados obtidos na monitoração de efeitos dos herbicidas do Grupo Difenil Éter com a aplicação do MSφ.

t (h)	$\Delta\phi$ (graus)	$S_{c\grave{e}ra}^{(*)}$ (un.arb.)	$S_{carot}^{(**)}$ (un.arb.)	$S_{clor}^{(**)}$ (un.arb.)	herbicida	planta
0	25	16	11	10	ñ aplicado	A
2	35	22	11	12		M
4	30	23	12	13		
6	25	30	14	12	ACIFLUORFEN	A
8	30	12	7	6		R
2	20	28	12	14		A
4	35	24	12	13	FOMESAFEN	N
6	30	27	13	13		T
8	30	25	10	10		H
2	25	22	14	14		U
4	30	24	10	9	LACTOFEN	S
6	30	19	9	9		
8	25	25	12	13		
2	50	19	7	7		
4	40	20	7	7	LACTOFEN	
6	75	22	7	7	(dose dupla)	
8	10	29	8	7		
24	70	18	3	4		
0	40	16	10	13	ñ aplicado	E
2	40	15	8	11		U
4	45	16	11	11	ACIFULORFEN	P
6	30	19	9	10		H
8	30	11	6	6		
2	45	17	10	4		O
4	45	19	10	15		
6	30	22	11	14	FOMESAFEN	R
8	40	19	10	16		B
2	50	22	14	13		I
4	40	24	15	17		
6	45	21	10	14	LACTOFEN	A
8	25	28	10	13		

(\*) valores afetados por um desvio de 1 un.

(\*\*) valores afetados por um desvio de 0,5 un.

des.

## B) Planta Euphorbia

- diferença de fase ( $\Delta\phi$ ): embora tendo sido observadas flutuações, pode-se notar uma tendência à diminuição da diferença de fase.
- intensidade fotoacústica para a cêra ( $S_{c\acute{e}ra}$ ): as flutuações neste caso são grandes demais e as medidas não apresentam nenhuma regularidade ou tendência de comportamento.
- intensidade fotoacústica para os carotenóides ( $S_{car}$ ): os dados apresentam flutuações e nenhum comportamento regular, excetuando-se o caso do herbicida acifluorfen, em que existe certa tendência à redução na intensidade. Essa redução mostrou-se grande na 8ª hora.
- intensidade fotoacústica para a clorofila ( $S_{cl}$ ): valem os mesmos comentários empregados para os carotenóides.

Com referência à microscopia óptica, em nenhum caso foi observado qualquer efeito, como plasmólise das células ou alteração nos cloroplastos.

As plantas continuaram plantadas em vasos e as folhas restantes que não foram utilizadas nas medidas não revelaram "clorose" (manchas esbranquiçadas). Foi notado apenas um leve clareamento no tom verde das folhas, após 24 horas da aplicação, mas não ousamos atribuir unicamente ao herbicida esse efeito, uma vez que as plantas foram mantidas internas ao laboratório após 8 horas da aplicação.

O fato mais revelador da ação do herbicida foi, no nosso enten

der, um enrugamento e ressecamento dos folículos, o que denunciava a morte das plantas por impossibilidade de renovação foliar. Entretanto o tamanho exíguo dos folículos não permitiu que eles fossem tomados como amostras para fins de análise por fotoacústica.

Essa apresentação de dados nos conduzem às seguintes considerações:

- 1ª - As flutuações nas medidas devem estar relacionadas com a variabilidade morfológica e composicional das amostras, que foram obtidas a partir de folhas e plantas diferentes.
- 2ª - As diminuições nas intensidades  $S_{car}$  e  $S_{Cl}$  observadas seriam explicadas considerando-se a existência de efeitos sobre os carotenóides e sobre a clorofila. Neste caso deveríamos inferir que os carotenóides e a clorofila seriam destruídos ou levados a uma forma não absorvente de luz dentro dos próprios cloroplastos, sem que ocorressem simultaneamente efeitos sobre as membranas destes, uma vez que a microscopia óptica não revelou mudança observável na estrutura dos cloroplastos. Esta hipótese concorda com a maioria dos trabalhos mais atuais sobre a ação dos herbicidas por nós usados (15,22, 24, 25), que supõe a existência de duas etapas para a atividade dos herbicidas. Na primeira etapa os herbicidas interagem com os pigmentos de forma a impedir a usual dissipação da energia obtida da luz incidente. Numa segunda etapa, os pigmentos provocariam a redução de uma substância desconhecida que produziria a peroxidação de lipídeos, que leva ao aumento na permeabilidade e à ruptura de membranas. É evidente que nossas observações neste caso só teriam abrangido eventos da primeira etapa. É possível que a manifestação da segunda etapa demore a acontecer, já que a morte da planta é prevista para ocorrer dentro de 24 ou 48 horas após a aplicação. Porém, nossas

observações ao microscópio realizadas 24 horas após um dos tratamentos não evidenciaram essa manifestação.

#### IV.4.6 Conclusões

##### Herbicida Paraquat

Nossos estudos revelaram que o MS $\phi$  pode ser um método importante na monitoração dos mecanismos de ação dos herbicidas Paraquat em folhas. Vários efeitos desse herbicida relatados pela literatura especializada, como por exemplo a destruição de membranas e pigmentos podem ter sua cronologia e magnitude determinados pelo MS $\phi$ .

Os estudos podem ser bastante aprimorados se as análises forem feitas com a folha "in vivo". Eliminar-se-iam assim as variabilidades composicionais na cutícula e nos pigmentos, as quais foram responsáveis por flutuações nas medidas, o que dificultou um conhecimento mais preciso do comportamento de grandezas por nós monitoradas.

##### Herbicidas do Grupo Difenil-éter

Dos quatro casos de aplicação dos herbicidas do grupo difenil-éter à planta *Amaranthus*, apenas um caso revelou algum efeito de tetável sobre os pigmentos da planta (lactofen-dose dupla). Porém o efeito só foi intenso 24 horas após a aplicação.

Dos três casos de aplicação desses herbicidas à planta *Euphorbia*, em apenas um caso observou-se algum efeito significativo (acifluorfen). Esse efeito só mostrou-se relevante 8 horas após a aplicação.

ção.

O reduzido tamanho das folhas das plantas nos obrigou a utilizar uma metodologia inadequada na obtenção das amostras, extraíndo cada amostra de uma folha diferente, o que implicou em excessivas variabilidades morfológicas e composicionais, que podem ter mascarado eventuais efeitos dos herbicidas.

O estudo ora realizado deveria ser repetido com análises "in vivo" realizadas sobre a mesma região de uma única folha. Eliminar-se-ia a ocorrência da indesejável variabilidade e mesmo efeitos pequenos poderiam com segurança ser atribuídos à ação dos herbicidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LIMA, C.A.S.; VARGAS, H.; CESAR, C.L.; LIMA, M.B.S.; PRIOLI, L.M. & SILVA, W.J. Non-destructive Assessment of Chlorophyll - Deficient Mutants of Maize (*Zea Mays* L.) by Photoacoustic Spectroscopy. *Plant Science*, 38: 47, 1985.
2. BÜCHNER, B.; KORPIUN, P.; LÜSCHER, E. & SCHÖNHERR, J. Influence of the Transport of Water in Plant Cuticles on the PA Signal. *Journal de Physique*, 44: 125, 1983.
3. PANDEY, G.C. Photoacoustic Spectroscopy in the Study of Metal Toxicity. *Journal de Physique* 44: 379, 1983.
4. KOLATTUKUDY. The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Vol. 4 (Cap. 18) Academic Press, Inc., New York, 1980.
5. LEHNINGER, A.L. Bioquímica. Vol. 2 (Cap.22). Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 1976.
6. GOODWIN, T.W. & MERCER, E.I. Introduction to Plant Biochemistry (Cap.5). Pergamon Press Ltd. Oxford, 1972.
7. BULTS, G.; HORWITZ, B.A.; MALKIN, S. & CAHEN, D. Leaf Physiology and Anatomy by Photoacoustics, em "Topical Meeting on Photoacoustic Spectroscopy", artigo TuB28, Ames, 1979.
8. CESAR, C.L.; VARGAS, H. & MIRANDA, L.C.M. Photoacoustic Microscopy of Layered Samples: Phase Detection Technique. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 18: 599, 1985.
9. CESAR, C.L.; VARGAS, H.; PELZL, J. & Miranda, L.C.M. Phase- Resolved Photoacoustic Microscopy: Application to Ferromagnetic Layered Samples. *J. Appl. Phys.* 55(10): 3460, 1984.

10. ANJO, D.M. & MOORE, T.A. A Photoacoustic Depth Profile of Carotene in Skin. *Photochem. and Photob.* 39(5): 635, 1984.
11. O'HARA, E.P.; TOM, R.D. & MOORE, T.A. Determination of the *in vivo* Absorption and Photosynthetic Properties of the Lichen *Acarospora Schleicheri* Using Photoacoustic Spectroscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 38 (6): 709, 1983.
12. LIMA, G.A.R.; BAESSO, M.L.; ARGUELLO, Z.P.; SILVA, E.C.; VARGAS, H. & MIRANDA, L.C.M. Phase Resolved Photoacoustic Spectroscopy: Application to Metallic-ion-doped Glasses. *Phys. Rev. B.* 36(0): 9812, 1987.
13. ASHTON, F.M. & CRAFTS, A.S. Mode of Action of Herbicides. 2a.Ed. (Cap.11). *John Wiley & Sons*, New York, 1981.
14. WARREN, G.F. & HESS, F.D. An Intensive Course on the Activity, Selectivity, Behavior and Fate of Herbicides in Plants and Soils: Diquat and Paraquat. Ed. Gail E. Ruhl, Purdue University: 147, Novembro de 1985.
15. MORELAND, D.E. Mechanisms of Action of Herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 597, 1980.
16. HESS, D. Plant Physiology. (Cap.2). *Springer-Verlag*, New York, 1975.
17. RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & CURTIS, H. *Biologia Vegetal* - 2a. Ed.(Cap 2) Ed. Guanabara Dois, RJ. 1978.
18. CHIA, L.S.; McRAE, O.G. & THOMPSON, J.E. Light-dependence of Paraquat-initiated Membrane Deterioration in Bean Plants. Evidence for the Involvement of Superoxide. *Physiologia Plantarum.* 56: 492, 1982.
19. PRENDEVILLE, G.N. & WARREN, G.F. Effects of Four Herbicides and Two Oils on Leaf-cell Permeability. *Weed Res.* 17: 251, 1978.

20. WARREN, G.F. & HESS, F.D. An Intensive Course on Activity, Selectivity, Behavior and Fate of Herbicides in Plants and Soils: Diphenylethers and Oxadizon. Ed. Gail E. Ruhl, Purdue University, 153, Novembro de 1985.
21. TREBST, A.; WIETOSKA, H.; DRABER, W. & KNOPS, H.J. The Inhibition of Photosynthetic Electrons Flow in Chloroplasts by the Dinitrophenylether of Bromo- or Iodo-nitrothymol. *Z. Naturforsch. Teil C* 33: 919, 1978.
22. ESMINGER, M.P., HESS, F.D. Photosynthesis Involvement in Mechanisms of action of Diphenyl Ether Herbicides. *Plant Physiol.* 78: 46, 1985.
23. MORELAND, D.E.; BLACKMON, W.J.; TODD, H.G. & FARMER, F.S. Effects of Diphenylether Herbicides on Reactions of Mitochondria and Chloroplasts. *Weed Science.* 18(5): 636, 1970.
24. KUNERT, F.J. The Diphenyl-ether Herbicide Oxyfluorfen: a Potent Inducer of Lipid Peroxidation of Higher Plants. *Z. Naturforsch.* 39C: 476, 1984.
25. LAMBERT, R.; KRONECK, P.M.H. & BOGER, P. Radical Formation and Peroxidative Activity of Phytotoxic Diphenyl ethers. *Z. Naturforsch.* 39C: 486, 1984.
26. CAVALHEIRO, F.P.F. *Automação, Desenvolvimento e Performance de um Espectrômetro Fotoacústico.* Tese de Mestrado apresentada no Departamento de Engenharia Elétrica, FEC-Unicamp.
- 27- FELLOWS, R.J. & BOYER, J.S. Altered Ultrastructure of Cells of Sunflower Leaves Having Low Water Potentials. *Protoplasma.* 93: 381, 1978.
28. VAN RENSEN, J.J.S. Lipid Peroxidation and Chlorophyll Destruction caused by Diquat during Photosynthesis in *Scenedesmus* *Physiol. Plant.* 33: 42, 1975.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

O nível de desenvolvimento e precisão atingido pelas técnicas físicas, ao lado das metodologias empregadas e também do estágio alcançado pelas teorias físicas, tornam de grande valia a contribuição que físicos podem proporcionar à obtenção de conhecimentos em outras áreas da Ciência, tais como a Biologia, Química e Medicina, bem como de suas sub-áreas. No presente trabalho, de cunho multidisciplinar, pudemos constatar a viabilidade da aplicação das técnicas físicas RPE e Espectroscopia Fotoacústica a materiais biológicos.

No trabalho visando a determinação de adulterantes do café, através da espectroscopia fotoacústica, constatamos a viabilidade de dois métodos distintos, que mostraram-se rápidos e precisos, quando comparados com aqueles, ditos convencionais, atualmente empregados no controle do grau de pureza do produto. Como estudos adicionais, visando a aprimoração dos métodos por nós propostos, sugerimos tentativas no sentido de estender os métodos a misturas ternárias, e de possibilitar a prévia determinação qualitativa do(s) adulterante(s) presente(s), evitando-se a observação ótica ao microscópio. É possível que a utilização de condições experimentais espectroscópicas de mais alta resolução possam identificar picos característicos dos diferentes adulterantes, que em nosso trabalho são ocorreram para a soja.

Em nossos estudos visando a determinação da qualidade da bebida do café, obtivemos resultados animadores, que indicam ser possível a utilização de métodos físicos sistemáticos para a classificação,

tais como a RPE e a espectroscopia fotoacústica. Esbarramos no problema da heterogeneidade das amostras que, no nosso entender, seria evitado com a torração simultânea dos diferentes cafês, e com a torração de quantidade maior de cada café, e que pudesse por isso, ser estatisticamente mais representativa da particular bebida. cremos, ainda, que estudos adicionais deveriam incorporar a cooperação permanente de provadores, a fim de que amostras oriundas da mesma torração fossem analisadas pelas técnicas físicas e submetidos à prova de xícara. Seria conveniente também o envolvimento de químicos para tentar viabilizar a identificação de compostos químicos e sua correlação com a concentração de radicais livres, com a absorção fotoacústica e com a qualidade da bebida.

Com respeito à monitoração de efeitos de herbicidas em folhas, utilizando a espectroscopia fotoacústica, conseguimos observar diversos efeitos que são registrados pela bibliografia especializada. Entretanto, a totalidade dos artigos por nós manipulados infere resultados a partir de observações realizadas em extrações de pigmentos fotossintéticos, ou em lipídeos, que são componentes de membranas celulares. cremos por isso que os resultados obtidos através da fotoacústica são substancialmente mais significativos, uma vez que são obtidos a partir de observações realizadas sobre esses componentes foliares na própria folha. Além disso, existe a possibilidade de que nossos estudos sejam aprimorados com a utilização de uma célula fotoacústica que propicie realizar espectroscopia "in vivo", isto é, com a folha na própria planta. Abrem-se, portanto, perspectivas do conhecimento de fenômenos com ocorrência ao nível da folha e que podem ir muito além do estudo de efeitos de herbicidas por nós realizado.

Do acima exposto, podemos avaliar a importância do engajamento de pesquisadores de diferentes áreas na solução de problemas multidisciplinares . Quer nos parecer que o número de trabalhos com características de multidisciplinaridade, e que exige esse trabalho cooperativo, é vastíssimo. Consequentemente, os panoramas científico e tecnológico não podem prescindir de tal cooperação científica.

## RESUMO

Na presente dissertação procedemos à aplicação da Espectroscopia Fotoacústica e da RPE a materiais biológicos.

Inicialmente foram apresentados dois métodos, utilizando a espectroscopia fotoacústica no infra-vermelho próximo, visando a determinação do teor de adulterantes presentes em misturas binárias de café adulterado. Os métodos baseiam-se na utilização de curvas de calibração construídas a partir de espectros fotoacústicos exibidos por misturas previamente preparadas de café com materiais comumente utilizados no Brasil na adulteração desse produto. Foi feita a aplicação de um dos métodos à determinação de teores desconhecidos de adulterantes, em misturas de café com os adulterantes cascas e pergaminho. Os resultados obtidos com o método fotoacústico revelaram-se muito próximos das análises quantitativas previamente realizadas pelo IBC, para as mesmas amostras.

O trabalho seguinte concentrou-se na tentativa de obter um método sistemático para a classificação das bebidas de café - a qual é atualmente realizada pela prova de degustação ou prova de xícara - tendo sido para isso aplicadas as técnicas RPE e Fotoacústica. Os resultados obtidos com a RPE revelaram que a taxa de formação de radicais livres durante a torração é diferente para cafés de diferentes qualidades. Isto viabiliza a utilização das intensidades das linhas de RPE como elemento diferenciador das diferentes bebidas. No caso da espectroscopia fotoacústica, foi constatado que, em especial, o pico centrado em  $0,88 \mu\text{m}$  possui intensidades diferentes para as diferentes bebidas, o que possibilita também a aplicação desta técnica na distinção das diferentes bebidas e sua correlação com a RPE.

O terceiro estudo por nós realizado enfocou a monitoração de efeitos de herbicidas em folhas, utilizando-se a espectroscopia fotoacús

tica na região do visível. No caso da aplicação do herbicida Paraquat a uma folha de soja, foi constatado que uma série de efeitos do herbicida registrados pela bibliografia especializada puderam ter sua cronologia e magnitude determinados pelo Método da Separação dos Espectros na Fase ( $MS\phi$ ). Entre esses efeitos podem ser citados a destruição de membranas, com a conseqüente perda d'água pela folha (plasmólise) e a destruição da clorofila e carotenóides, que são pigmentos fotossintéticos. Finalmente, procedemos à aplicação de três herbicidas do grupo difenil-éter às plantas *Amaranthus* e *Euphorbia*, mas apenas em alguns casos foram observadas regularidades nos efeitos por nós monitorados.

## ABSTRACT

In this work we have applied Photoacoustic Spectroscopy (PAS) and Electron Paramagnetic Resonance (EPR) to biological materials.

Initially, two methods using PAS in the near-infrared for the determination of adulterant content in binary mixtures of coffee were presented. The basis of the methods is the establishment of calibration curves constructed from the photoacoustic spectra of previously prepared mixtures of coffee and its adulterants commonly utilized in Brazil. We have applied one of the methods for the determination of unknown amounts of adulterants in mixtures of coffee with coffee peal and parchment. The results of the photoacoustic method were in good accordance with the results obtained from the quantitative analysis previously realized by IBC.

We have also tried to obtain a systematic method for the classification of the coffee beverages, which is presently realized through the flavour proof (or cup proof). We have employed two different techniques: The EPR and PAS. The results obtained with EPR showed that the rate of free radicals formation during roasting is different for each quality of coffee. This makes possible to use the EPR intensities as an identifier of the different beverages. In the case of photoacoustic spectroscopy we have noted that, in particular, the peak centered at  $0,88 \mu\text{m}$  has different intensities to the different beverages. This allows also the application of this technique for the identification of the different beverages and its correlation with EPR.

Finally, we have applied photoacoustic spectroscopy in the visible region for the monitoring of herbicide effects in leaves. In

the first case we have applied "Paraquat" to a soybean leaf and the results we have obtained are in good accordance with data registered in the specialized literature. We have concluded that some effects commonly produced by this herbicide were detected and their magnitude and cronology were precisely determined by the Phase Resolved Method (PRM). One of these effects was the membranes destruction and consequent loss of water by the leaf (plasmolisis). Another observed effect was the chlorophyll and carotenoid destruction. In another case we have applied three herbicides of the Diphenylether group to the plants *Amaranthus* and *Euphorbia*, but only in a few cases regularities of herbicides effects were observed.