

ANTONIO CARLOS PEREIRA

**CONTRIBUIÇÃO
POR ESPECTROSCOPIA FOTOTÉRMICA
AO ESTUDO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS.**

*Este exemplar corresponde a versão final da
Tese de Doutorado defendida pelo senhor
Antonio Carlos Pereira e aprovada pela Comissão
Examinadora.*

Orientador:
Prof. Dr. Helion Vargas

Campinas, 2 de Setembro de 1993
Helion Vargas

Esta apresentação ao Instituto de
Física "Gleb Wataghin", da Uni-
versidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Dedico este trabalho à minha esposa, Nilza; minhas filhas, Júlia, Valéria e Olívia; e aos meus irmãos; Roque, Marlí, Conceição e Lourdes.

Agradecimentos

Agradeço a todos os que, de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, bem como aqueles com os quais estive em contato durante este período, sobretudo pelo carinho e amizade que me dedicaram, em especial:

Ao prof. Helion Vargas, pela orientação, amizade, estímulo e constante acompanhamento deste trabalho e, acima de tudo, pelo espírito de colaboração científica estimulando o desenvolvimento de pesquisa interdisciplinar.

Ao prof. Curt Egon Hennies, pela amizade e discussões em assuntos computacionais e de ensino de física.

Ao prof. Edson Corrêa da Silva, pela amizade, colaboração e sugestões e apoio dedicados.

Ao prof. Flávio C. G. Gandra, pelo apoio e incentivo.

Ao prof. Luiz C. M. Miranda, pela amizade e discussões em parte deste trabalho.

Ao prof. William José da Silva, à prof^a. Laudenir M. Prioli e Marcelo do Instituto de Biologia da Unicamp, pelo fornecimento das amostras utilizadas, pelas valiosas discussões e incentivo ao longo deste trabalho.

Ao Norberto Cella, do Instituto Politécnico do Rio de Janeiro, pela colaboração, discussões, apoio e incentivo ao longo deste trabalho.

À Dinah A. B. Serra, pela amizade, incentivo e apoio até o final deste trabalho.

Ao prof. Graciliano de Oliveira Neto do Instituto de Química da Unicamp, pelo apoio e colaboração ao longo deste trabalho, em particular, nas discussões e participação durante a calibração do oxigênio.

Ao prof. E. S. Godinho do Instituto de Química da Unicamp, pela colaboração e apoio na dosagem de nitrato de cádmio em folhas de soja.

Ao prof. Antonio Carlos Gabrielli e Sebastião H. Militão Jr. do Instituto de Biologia da Unicamp, pela colaboração nos trabalhos de microscopia óptica em folhas de soja e de milho.

Ao prof. Antonio A. S. Brito, pesquisador do Laboratório de Eletrônica e Disposi-

tivos da Unicamp e à prof^a. Alba Regina S. Brito do Instituto de Biologia da Unicamp, pela amizade, apoio e incentivo desde o início deste trabalho.

Ao prof. Antonio M. Mansanares pela sua constante colaboração durante a fase de minha adaptação no laboratório.

Ao prof. José Francisco Julião da Universidade Federal do Ceará, pela amizade e incentivo dedicados.

Ao prof. Gildo H. Cavalcanti e Kátia Cavalcanti, pela amizade, carinho e apreço, a mim, dedicados.

Ao prof. Antonio Trigueiros, pela amizade e convívio.

A todos os membros que fazem ou fizeram parte deste grupo e, de certa forma, colaboraram com a realização deste trabalho: Alexandre, Bento, Ossamu, Guilherme, Ana Cláudia, Miriam e Mauro, pela amizade e apoio.

Aos amigos do laboratório de Ligas e Metais, Medina, Lobato e Venerando, pela convivência e apoio.

Aos professores Juan Jose Alvarado Gil e Orlando Zelaya Angel, do Departamento de Física do Centro de Investigacion y Estudios Avanzados del IPN, México, pela amizade, apoio e colaboração na parte final deste trabalho.

À Cora, Miyoko, Stela, Marta, Lídia, Rose e Melita, da secretaria do DEQ, pela amizade, apoio e compreensão.

Ao Sanclair, Polaquini e Joãozinho, da oficina mecânica do DEQ, amizade e, presteza na confecção das peças necessárias para a realização deste trabalho.

À Nilza, Tereza, Tânia, Rita, Maria José, Ângela, Maria Célia, Célia Marina e Neusa da Biblioteca do IFGW, pela constante atenção e compreensão.

À Maria Inez, Cidinha e Armando da secretaria da Pós-Graduação, pela amizade e apoio dedicados.

À Ana Toma, Beth e Lúcia, pela amizade e carinho dedicados.

Aos amigos do desenho, Charles, Vasco e Walter, pela atenção e colaboração dispensadas na confecção dos desenhos para as publicações e também para este trabalho.

À Antonella e ao Sidney, pelos ensinamentos de computação.

À minha esposa, filhas, pela compreensão, carinho e ajuda nos momentos mais difíceis e, aos meus irmãos durante minha ausência.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Física da Universidade

Federal do Maranhão, pelo apoio e confiança demonstrados no meu afastamento. Em especial, ao prof. Antonio Pinto Neto, pela atenção e apoio dispensados nesta cidade, ao prof. Antonio J. S. Oliveira e ao prof. José Raimundo R. Siqueira, pelo apoio dispensado em S. Luis(Ma).

À Universidade Federal do Maranhão e à CAPES-PICD, pela liberação e suporte financeiro.

Resumo

A técnica fotoacústica é aplicada numa variedade de experimentos para diferentes materiais biológicos.

Desenvolvemos uma série de medidas em pericarpos de variedades de milho comum e de pipoca onde encontramos as principais diferenças entre suas propriedades térmica, mecânica e estrutural. Os dados, combinados com o modelo do vaso de pressão para explicar o mecanismo do “estouro”, não só explicou a razão do milho da pipoca “estourar”, como apontou as condições necessárias, e portanto, explicar as mudanças que podem ter ocorrido durante a evolução para que o fruto do milho de pipoca tenha a habilidade de “estourar”.

Um novo e sensível método para estudo de atividade fotossintética em folha vegetal “in vivo” e “in situ”, com a folha ainda presa ao caule é descrito. A utilidade geral deste método é ilustrada através da espectroscopia e atividade fotossintética em folhas de milho e de soja. A evolução de oxigênio, detetada na folha, com este novo detetor foi comparada com medidas usando um eletrodo de Clark. Finalmente, um estudo com a fotoacústica em folhas adaptadas ao escuro é apresentado.

Summary

The photoacoustic technique is applied in a variety of experimental arrangements for different biological materials.

We have performed a series of measurements of the pericarp of popcorn and corn varieties to find out what are the main differences among their mechanical, thermal and structural properties. The data, combined with the pressure vessel model for the popping mechanism, not only explains why popcorn pops, but point out what are the necessary conditions, and therefore, the necessary changes that might have occurred during evolution, for a fruit to be able to pop in this species.

A new and highly sensitive method is described for "in vivo" and "in situ" studies of photosynthetic activity of undetached leaves. The general utility of this method is illustrated by examining the spectroscopic and photosynthetic activity of undetached leaves of maize and soybean. The leaf photosynthetic oxygen evolution in this new detector was estimated by comparing with measurement using a Clark-type O_2 electrode detector. Finally, a study of photoacoustic from dark-adapted leaves is presented.

Apresentação

A característica comum da espectroscopia fotoacústica e técnicas fototérmicas relacionadas é devida ao fato de que os sinais detectados são proporcionais à conversão da energia absorvida em calor. Alguns aspectos dos processos da absorção e conversão da energia luminosa, em particular, têm sido explorados para o estudo de moléculas biológicas, células e tecidos. Além das vantagens óbvias e reconhecidas para o estudo das características espectrais de sistemas biológicos, os métodos fototérmicos têm sido largamente usados para a obtenção de novas informações, algumas delas, não acessíveis por métodos convencionais: estudos de perfil de profundidade de sistemas constituídos de duas camadas, transferência de energia inter-molecular “in vitro”, processos de armazenamento de energia, processos de adaptação e mudanças de morfologia, etc.

Na presente dissertação, apresentamos o uso da técnica fotoacústica, numa variedade de situações experimentais em sistemas biológicos. Em particular, metodologia de como utilizar esta técnica no estudo e pesquisa da fotossíntese em folhas vegetais “in vivo” e “in situ” é demonstrada.

O presente trabalho é constituído de seis capítulos e um apêndice, organizados da seguinte forma:

No capítulo 1 apresentamos aspectos gerais relativos à espectroscopia fotoacústica, seu modelo teórico e suas extensões. Em particular, a introdução do novo detetor, denominado “célula fotoacústica aberta” (OPC), bem como a dependência deste, com parâmetros ópticos e térmicos das amostras “in vivo” e “in situ” são considerados.

Os métodos experimentais utilizados durante o trabalho, a preparação das amostras, obtenção de espectro óptico, bem como a calibração da célula aberta para detecção do oxigênio evoluído com o eletrodo de Clark, constitui o capítulo 2.

No capítulo 3 é mostrado um estudo das diferenças estruturais entre o pericarpo do milho comum e o de pipoca. Tendo-se como base, o modelo do vaso de pressão, é demonstrado as razões que levam o milho de pipoca, ao contrário do milho comum, “explodir”.

No capítulo 4 é mostrado o uso da célula aberta (OPC) numa variedade de situações experimentais “in vivo” e “in situ”. A obtenção da energia armazenada e oxigênio evoluído de folha de soja envenenada e de milho constitui o tema deste capítulo.

A heterose tem despertado o interesse dos melhoramentistas de vegetais, desde o início do século, que buscam criar melhores híbridos adaptáveis às diversas condições ambientais. Em particular, para o milho, uma metodologia com uso da célula aberta (OPC), monitorando a atividade fotossintética após desativação do aparelho fotossensível da planta é apresentada no capítulo 5.

As conclusões e perspectivas de estudo são apontadas no capítulo 6.

Tópicos de fotossíntese e morfologia de folhas vegetais são apresentados no apêndice

A.

O trabalho constante desta dissertação deu origem às seguintes publicações:

1- Pereira, A.C., Zerbetto, M., Silva, C.G., Vargas, H., Silva, W.J., O. Neto, G., Cella, N. and Miranda, L.C.M.; OPC technique “in vivo” e “in situ” studies in plant photosynthesis resarch; Means. Sci. Technol. 3(1992)931.

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

3- Pereira, A.C., Prioli, L.M., Silva, W.J., Oliveira Neto, G., Vargas, H., Cella, N. and Alvarado, J.J.; “In vivo” and “in situ” measurements of undetached leaves using the OPC technique; Plant Science, submetido à publicação, 1993.

Conteúdo

1	Efeito Fotoacústico: Considerações gerais	1
1.1	Introdução	1
1.2	Histórico	1
1.3	Mecanismos de Geração do Sinal Fotoacústico em Sólidos	2
1.4	Modelos Teóricos	4
1.4.1	Difusão térmica	4
1.4.2	Expansão térmica	13
1.4.3	Flexão termoelástica	16
1.5	Célula Fotoacústica Aberta (OPC)	19
1.5.1	Considerações Gerais	19
1.5.2	Espectroscopia com Amostras Opticamente Transparentes	25
2	Métodos Experimentais e Preparação das Amostras	29
2.1	Introdução	29
2.2	Medidas por Espectroscopia Fotoacústica em Folhas Vegetais “In Vivo” e “In Situ” utilizando OPC	29
2.3	Medidas Fotoacústica Não Espectroscópicas em Folhas Vegetais “In vivo” e “ In situ” com uso da Célula Aberta	34
2.4	Calibração da Célula Fotoacústica Aberta com o Eletrodo de Clark	36
2.4.1	O Eletrodo de Clark	36
2.4.2	Calibração do Eletrodo de Clark com o Microanalisador Biológico	36
2.4.3	Calibração de Glucosímetro com o Microanalisador Biológico	37
2.4.4	Calibração da Célula Fotoacústica aberta com o glucosímetro	38

2.5	Configuração Experimental e Modelo Teórico para Determinar a Rigidez Mecânica de Pericarpos de Milho	47
2.5.1	Configuração Experimental	47
2.5.2	Modelo Teórico	49
2.6	Técnica Fotoacústica da Diferença de Fase de Dois Feixes	51
2.7	Determinação da Capacidade Térmica por Unidade de Volume (ρC)	53
2.8	Preparação das Amostras	58
2.8.1	Pericarpo de Milho	58
2.8.2	Plantio e Crescimento de Soja e Milho	59
3	Determinação das Propriedades Térmicas e Mecânicas de Pericarpo de Milho Comum e de Pipoca.	62
3.1	Introdução	62
3.2	Medidas de Difusividade Térmica (α) e Capacidade Térmica por Unidade de Volume (ρC)	63
3.3	Medidas de Rigidez Mecânica	64
3.4	Modelo do Vaso de Pressão	67
3.5	Discussão	72
3.6	Aspectos Complementares	72
4	Estudo da Fotossíntese em Folhas Vegetais “In vivo” e “In Situ” com OPC	77
4.1	Introdução	77
4.2	Equação da Fotossíntese e Efeitos Observados com OPC	78
4.3	Medidas de Evolução de Oxigênio e Energia Armazenada em Folhas de Soja “In Vivo” e “In Situ” com OPC	80
4.3.1	Caracterização de Folhas de Soja sem Tratamento de Nitrato de Cádmio com uso da OPC	82
4.3.2	Estudo de Evolução de Oxigênio e Energia Armazenada em Folhas de Soja “Envenenadas” com Solução de Nitrato de Cádmio	89
4.3.3	Aspectos Complementares	93

4.4	Estudo de Evolução de Oxigênio e Energia Armazenada em Folhas de Milho “In Vivo” e “In Situ” com OPC	95
4.4.1	Medidas de efeito negativo, área foliar e peso seco em plantas de milho	95
4.4.2	Medidas de Oxigênio Evoluído em Folhas de Milho e Normalização do Sinal OPC com a Espessura da Folha	98
5	Estudo da Heterose em Folhas de Milho, com Uso da OPC, “In Vivo” e “In Situ” por Indução Fotossintética em Folhas Adaptadas ao Escuro	104
5.1	Introdução	104
5.2	Procedimento Experimental	106
5.3	Resultados e Discussão	107
6	Conclusões e Perspectivas de Estudo	115

Capítulo 1

Efeito Fotoacústico: Considerações gerais

1.1 Introdução

Neste capítulo trataremos dos aspectos teóricos, fundamentais do efeito fotoacústico. Inicialmente será mostrada sua evolução e os mecanismos de geração do sinal, seguidos das respectivas teorias. Na última parte apresentaremos a teoria da célula fotoacústica aberta (OPC) que foi o método utilizado em nossos experimentos envolvendo folhas vegetais “in vivo” e “in situ”, tema central de nosso trabalho.

1.2 Histórico

Ao incidir radiação eletromagnética (de ondas de rádio ao raio x, elétrons, fótons, ultra-som, etc.) modulada, numa amostra, parte dela pode ser transmitida ou refletida pela amostra e outra parte absorvida [1]. A absorção dessa radiação incidente converte-se diretamente em calor, ou com certo atraso, via processo de desexcitação, luminiscência, energia fotoquímica ou energia fotoelétrica. O calor gerado na amostra é o responsável pelos chamados “Efeitos Fototérmicos”, produzindo ondas acústicas ou outros efeitos termoelásticos que são detectados por sensores adequados para cada resposta emitida. A técnica fotoacústica é a mais antiga com base nesse efeito [2] e foi a que inspirou o desenvolvimento das demais.

O efeito sonoro devido ao aquecimento periódico de um sólido foi primeiramente

observado em 1880, por Alexander Graham Bell [3]; no ano seguinte Bell concluiu que “a natureza dos raios que produzem efeitos sonoros em diferentes substâncias, dependem da natureza das substâncias expostas ao feixe, e os sons são, em todos os casos, devidos aos raios do espectro absorvido pelo corpo”[4]. Nesse trabalho Bell investigou o efeito fotoacústico em líquidos e em gases. No mesmo ano outros pesquisadores também investigaram esse efeito [5,6].

O efeito fotoacústico para amostras gasosas já era bem entendido desde 1880, quando Bell verificava a possibilidade de usar o efeito para uma investigação do espectro de absorção de gases e vapores, tendo construído um instrumento denominado “espectrofone”. Em 1938, com o advento do microfone, foi despertado o interesse de pesquisadores em realizar uma série de experimentos em análises qualitativa e quantitativa em mistura de gases [7] e, uma teoria para o espectrofone foi proposta por R. Kaiser em 1959 [8].

No caso de amostras sólidas em forma de discos finos e flexíveis era adotada, inclusive por Bell, a teoria de Rayleigh [9] que considerava como fonte do sinal fotoacústico a vibração mecânica do disco, resultante do aquecimento desigual deste, quando iluminado.

A partir de 1973 o efeito fotoacústico voltou a ser empregado em amostras sólidas [10]. Somente em 1976 surgiu a primeira interpretação teórica do efeito fotoacústico, para estes tipos de amostras, sendo proposta por Rosencwaig e Gersho [3]. As mais variadas aplicações dessa técnica passaram, então a serem apresentadas na literatura [11-13].

Atualmente a fotoacústica tem sido aplicada, com sucesso, em muitos problemas não só em física, como também em química, engenharia, biologia, agricultura e medicina.

As aplicações da técnica fotoacústica tornaram-se importantes devido sua versatilidade, permitindo análise não destrutiva do material em estudo, além de ter a vantagem sobre outras espectroscopias, de oferecer medidas de perfil de profundidade [14,15], como no caso do comprimento de difusão térmica dependendo da frequência de modulação. Em particular, por permitir a obtenção de espectros de absorção óptica em materiais opacos.

1.3 Mecanismos de Geração do Sinal Fotoacústico em Sólidos

A absorção da radiação pela amostra é seguida de processos de transferência de energia térmica para todo material. Se essa transferência é feita através de difusão,

caracteriza o mecanismo de difusão térmica.

Outro mecanismo de geração de sinal fotoacústico ocorre quando o material, após receber radiação, apresenta uma expansão térmica. Nesse caso o efeito é denominado “termoelástico”, causando como consequência dois efeitos diferentes na amostra, que dependem da constante de expansão térmica e da velocidade de propagação do som.

Um desses efeitos, é devido ao aquecimento periódico, onde todo o material sofre expansão ou contração, e sua superfície passa a funcionar como um pistão vibratório. Essa situação ocorre principalmente em altas frequências de modulação, sendo dominante em amostras com baixo coeficiente de absorção óptica e não depende do comprimento de difusão térmica, uma vez que toda absorção deve contribuir para a “expansão térmica”.

O outro efeito consequente da expansão térmica é gerado pelo aquecimento não homogêneo da amostra. Os gradientes de temperatura fazem com que ondas elásticas sejam geradas e se propaguem em todo o material. Se as bordas da amostra estiverem presas, o gradiente de temperatura, na espessura, provoca uma “flexão termoelástica” gerando o sinal fotoacústico. Esse efeito é similar ao efeito “gongo” produzido num tambor quando uma batida no centro provoca vibrações no plano.

O sinal fotoacústico, também, pode ser gerado pelo mecanismo de liberação de gás, notadamente O_2 , quando induzimos reações fotoquímicas ou fotossintéticas em folhas vegetais. Neste caso teremos duas contribuições para o sinal fotoacústico. A primeira é a componente denominada “fototérmica”. Essa componente é gerada a partir de parte da radiação absorvida que é utilizada em reações fotoquímicas e convertida em calor. A segunda componente do sinal fotoacústico é denominada “fotobárica”, e corresponde a parte da radiação absorvida atuante no ciclo fotossintético com liberação de oxigênio.

Uma particularidade do sinal fotoacústico gerado por reações induzidas de fotoquímica ou fotossintética é a presença dos dois sinais simultâneos em baixa frequência de modulação ($f < 200\text{Hz}$) e presença de sinal fotoacústico puramente térmico em frequências de modulação superiores a 200Hz [16].

A forma de separar essas duas componentes do sinal, em baixas frequências de modulação, é aplicar luz branca, contínua, de intensidade superior à luz modulada (em torno de dez vezes), simultaneamente com a radiação modulada.

A ocorrência ou não de um, ou de outro mecanismo, e a predominância de um sobre outro depende das condições experimentais, bem como, do material a ser estudado

[17-19].

Todas essas formas de mecanismos de geração do sinal fotoacústico, figura 1.1, são detetadas por microfones existentes nas células fotoacústicas.

1.4 Modelos Teóricos

1.4.1 Difusão térmica

O modelo teórico para o mecanismo de difusão térmica, em amostras sólidas, para a detecção fotoacústica convectiva foi proposto por Rosencwaig-Gersho, (RG). A configuração da célula fotoacústica da qual emerge essa teoria está representada na figura 1.2. Sua fundamentação teórica parte do princípio de que, qualquer luz absorvida por sólidos é convertida, totalmente ou em parte, via processos de desexcitação não-radiativa dentro do sólido, gerando calor.

Para o desenvolvimento teórico, foram definidas as seguintes grandezas:

Física

k_i	condutividade térmica	$\frac{\text{cal}}{\text{cm.s.}^\circ\text{C}}$
ρ_i	densidade	$\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$
C_i	calor específico	$\frac{\text{cal}}{^\circ\text{C}}$
$\alpha_i = \frac{k_i}{\rho_i C_i}$	difusividade térmica	$\frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$

Parâmetros

$l_\beta = \frac{1}{\beta}$	comprimento de absorção óptica	cm
$a_i = \left(\frac{\omega}{2\alpha_i}\right)^{1/2}$	coeficiente de difusão térmica	cm^{-1}
$\sigma_i = (1 + j_i)a_i$	coeficiente de difusão complexo	cm^{-1}
$\mu_i = \frac{1}{a_i}$	comprimento de difusão térmica	cm

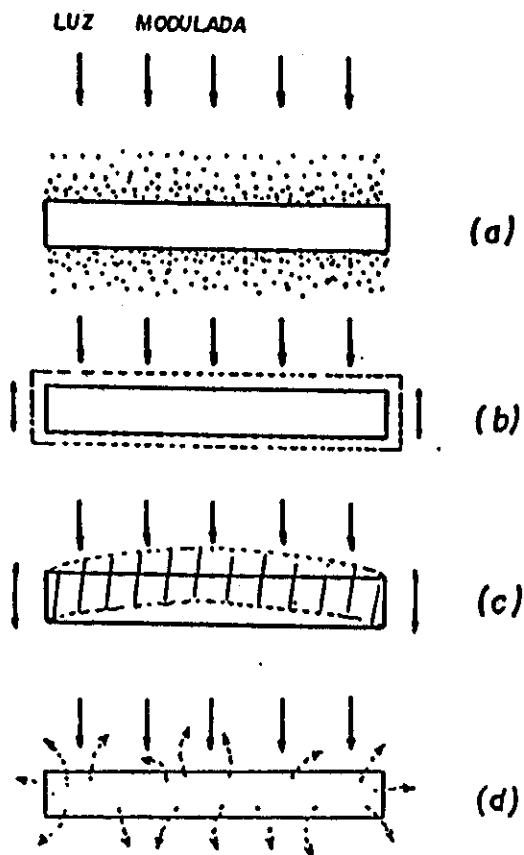


Figura 1.1: Mecanismos de geração do sinal fotoacústico. (a) difusão térmica; (b) expansão térmica; (c) flexão termoelástica; (d) evolução de gases.

Geométricas

l_b	comprimento do suporte	cm
l_s	comprimento da amostra	cm
$l_g = L - l_s - l_b$	comprimento da coluna de gás	cm
L	comprimento da amostra	cm

O índice i assume : s para a amostra, g para o gás e b para o suporte.

Considerando uma fonte de luz monocromática senusoidalmente modulada, numa frequência $\omega = 2\pi f$, incidindo na amostra (de comprimento, l_s , em contato com uma câmara de gás, geralmente ar, de espessura l_g e opostamente em contato com um suporte de espessura l_b) com intensidade

$$I(t) = \frac{1}{2} I_o [1 + e^{j\omega t}] \quad (1.1)$$

onde I_o é o fluxo de radiação monocromática incidente (W/cm^2).

Para uma amostra que possui absorção homogênea, a atenuação da intensidade da radiação até uma profundidade x é (segundo a lei de Beer $I(x, t) = I_o(t)e^{\beta x}$) dado por

$$I_a = I(t)(1 - e^{\beta x}) \quad (1.2)$$

onde β denota o coeficiente de absorção óptica.

Devido a absorção de luz pelo sólido, uma densidade de calor produzida em qualquer ponto x , é dada por:

$$s(x, t) = \frac{dI_a}{dx} = \frac{1}{2} \beta \eta I_o e^{\beta x} (1 + e^{j\omega t}) \quad (1.3)$$

onde x toma valores no intervalo de $x = 0$ a $x = -l_s$ e $\eta = 1$ é a eficiência da amostra em conversão de luz em calor.

Na geometria da figura 1.2, o conjunto de equações de difusão acopladas que descrevem a distribuição da fonte de calor podem ser dadas na forma unidimensional [20], por :

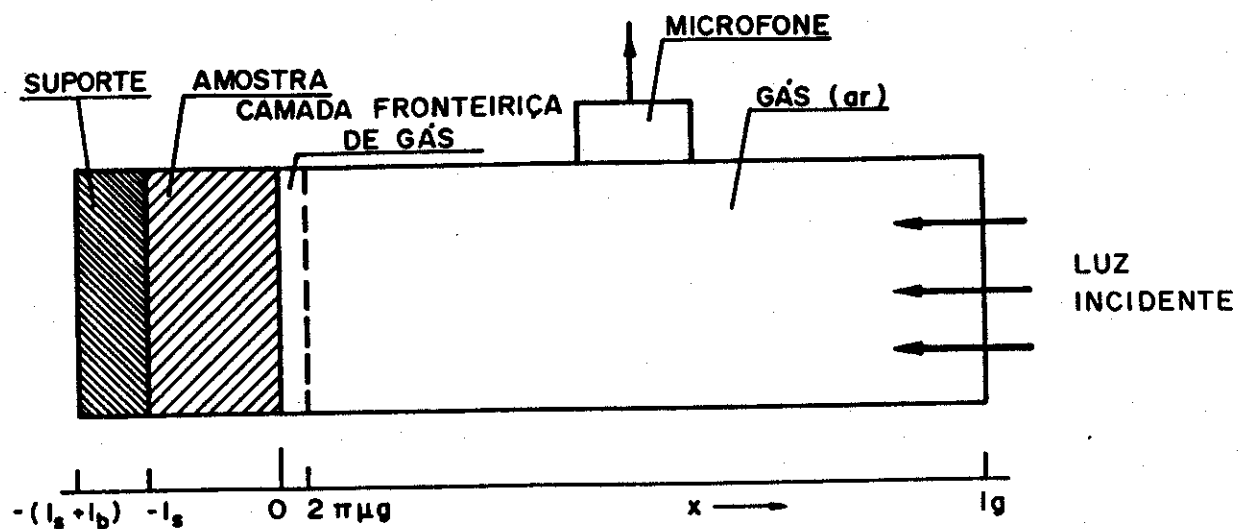


Figura 1.2: Configuração esquemática da célula fotoacústica convencional.

$$\frac{\partial^2 \Theta_s(x, t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial \Theta_s(x, t)}{\partial t} + f(x, t) = 0 \quad -l_s \leq x \leq 0 \quad (amostra) \quad (1.4)$$

$$\frac{\partial^2 \Theta_g(x, t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_g} \frac{\partial \Theta_g(x, t)}{\partial t} = 0 \quad 0 \leq x \leq l_g \quad (gas) \quad (1.5)$$

$$\frac{\partial^2 \Theta_b(x, t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_b} \frac{\partial \Theta_b(x, t)}{\partial t} = 0 \quad -l_s - l_b \leq x \leq -l_s \quad (suporte) \quad (1.6)$$

onde $f(x, t) = s(x, t)k_s$ e $\alpha_i = k_i/\rho_i C_i$ é a difusividade térmica.

Nas equações 1.5 e 1.6 não aparece o termo $f(x, t)$ porque no modelo RG considera-se que não há absorção da radiação incidente pelo gás nem pelo suporte, conseqüentemente não haverá geração de calor por esses meios.

As condições de continuidade para temperatura e fluxo de calor são:

$$\Theta_i = \Theta_j \quad (1.7)$$

e

$$k_i \frac{\partial \Theta_i}{\partial x} = k_j \frac{\partial \Theta_j}{\partial x} \quad (1.8)$$

os índices i e j correspondem aos meios adjacentes.

A primeira condição, da continuidade de temperatura, supõe que não há perda de calor na interface e a segunda condição garante o fluxo de calor.

A flutuação da temperatura no gás nas proximidades da amostra, encontrada resolvendo as equações 1.4, 1.5 e 1.6 de difusão com aplicação das condições de contorno (equações 1.7 e 1.8) é dada por

$$\Theta_g = \Theta e^{-\sigma_g x} e^{j\omega t} \quad (1.9)$$

onde

$$\Theta(x, t) = \frac{1}{k_s \sigma_s} \int_s^0 dx \left[\frac{(b-1)e^{-\sigma_s(l_s+x)} - (b+1)e^{\sigma_s(l_s+x)}}{(g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s} - (g+1)(b+1)e^{\sigma_s l_s}} \right] f(x, t) \quad (1.10)$$

A solução geral para a componente espacial $\Theta(x)$ sem especificar as condições de contorno ou a natureza da absorção óptica expressa por $f(x)$ pode ser encontrada aplicando-se o método das funções de Green [21].

A forma explícita para $\Theta(0)$ que fornece a flutuação térmica na interface amostra-gás, dada por:

$$\Theta(0) = \frac{\beta I_0}{2k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \left[\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s} + 2(b-r)e^{-\beta l_s}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s}} \right] \quad (1.11)$$

Esta é a expressão obtida por RG, onde:

$$b = k_b a_b k_s a_s, \quad g = k_g a_g k_s a_s, \quad r = (1+j)\beta/2a_s = \beta\sigma_s$$

Na equação 1.9 observamos que a flutuação da temperatura no gás atenua rapidamente para zero a medida que a distância x aumenta. Em $x = 2\pi\mu_g$, onde $\mu_g = l_a g$ é o comprimento de difusão térmica no gás, a flutuação é completamente nula. Rosencwaig-Gersho relata que somente a camada fronteira do gás responde termicamente à flutuação periódica na superfície da amostra, portanto agindo como um pistão para o restante da coluna de gás.

A temperatura média na camada de espessura $2\pi\mu_g$ (camada fronteira do gás) determinada por:

$$\bar{\Theta}(t) = \frac{1}{2\pi\mu_g} \int_0^{2\pi\mu_g} \Theta(0) e^{-\sigma_g x + j\omega t} dx \quad (1.12)$$

$$\bar{\Theta}(t) \approx \frac{1}{2\pi\sqrt{2}} \Theta(0) e^{j(\omega t - \pi/4)} \quad (1.13)$$

Assumindo que a coluna de gás responde à ação do pistão adiabaticamente, a variação da pressão fotoacústica na célula obtida com uso da lei dos gases [20] é dada por:

$$\delta P(t) = \frac{\gamma P_0 \Theta(0)}{\sqrt{2} l_g a_g T_0} e^{j(\omega t - \pi/4)} \quad (1.14)$$

onde $\gamma = C_p/C_v$; C_p e C_v são os calores específicos do gás a pressão constante e a volume constantes, respectivamente. P_0 e T_0 são a pressão e temperatura do meio; $e^{-j\pi/4}$ dá a defasagem devido a transdução.

O sinal fotoacústico é a componente não temporal da variação de pressão na célula, portanto sua expressão é

$$S_f = \frac{\gamma P_0 \Theta(0)}{\sqrt{2} l_g a_g T_0} e^{-j\pi/4} \quad (1.15)$$

mas $\Theta(0) = |\Theta(0)| e^{j\phi}$, então

$$S_f = \frac{\gamma P_0 |\Theta(0)|}{\sqrt{2} l_g a_g T_0} e^{j(\omega\phi - \pi/4)} \quad (1.16)$$

onde $\phi = \varphi - \pi/4$ é a fase do sinal fotoacústico.

Como somente os pontos da amostra que estão dentro do comprimento de difusão térmica, μ_s , podem gerar calor, a fase ϕ representa a média ponderada dos tempos de atenuação da oscilação térmica de cada ponto na superfície da amostra.

A equação 1.9 é muito difícil de ser interpretada devido a complicada expressão de Θ . Entretanto pode ser simplificada para alguns casos especiais, definidos conforme a opacidade da amostra, determinada pela relação do comprimento de absorção óptica dada por

$$l_\beta = \frac{1}{\beta} \quad (1.17)$$

A classificação térmica da amostra é verificada através do comprimento de difusão térmica (μ_s) da amostra. Mas μ_s depende da frequência de modulação (f), pois $\mu_s = [\alpha_s / \pi f]^2$, portanto uma mesma amostra pode passar do regime termicamente fino para o grosso. A frequência na transição entre os dois regimes é denominada frequência de corte (f_c), determinada quando fazemos $\mu_s = l_s$, assim $f_c = \alpha_s / \pi l_s^2$.

Na tabela 1.1 estão listados os casos especiais previstos para o modelo teórico de RG, de acordo com as características ópticas e térmicas da amostra.

Tabela 1.1 Casos especiais previstos para o modelo RG

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

Como pode ser visto na figura 1.2, o modelo desenvolvido está supondo a incidência de radiação na parte frontal da amostra, isto é, a luz recebida pela amostra incide na face em contato com o gás da célula. Porém, é possível incidência de radiação na face traseira da amostra (desde que o suporte seja transparente ou o próprio ar) gerar sinal fotoacústico, cuja diferença de fase (dos sinais frontal e traseiro), permite o cálculo de parâmetros físicos de interesse em caracterização de materiais. Nesse caso, a técnica utilizada é denominada “técnica da diferença de fase dos dois feixes” (T2F), que trataremos no capítulo 2.

A flutuação de temperatura na interface amostra-gás da célula fotoacústica devido ao processo de incidência traseira (possível somente com suporte transparente) é determinada por analogia à incidência frontal. Portanto, a absorção homogênea para iluminação traseira, supondo que se dá conforme a lei de Beer e toda energia absorvida converte-se em calor, a intensidade da luz absorvida é dada pela expressão:

$$I(x) = I_0 [1 - e^{-\beta(l_s - x)}] \quad (1.18)$$

e a fonte de calor para essa absorção tem a forma

$$f(x) = \frac{\beta I_0}{k_s} e^{-\beta(l_s - x)} \quad (1.19)$$

Com essas considerações, a flutuação de temperatura na camada fronteira do gás na célula fotoacústica devido a incidência traseira é dada por:

$$\Theta(0) = \frac{\beta I_0}{k_s (\beta^2 - \sigma_s^2)} \left[\frac{(r+1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (r-1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s} e^{-\beta l_s} - 2(b+r)}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l_s} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l_s}} \right] \quad (1.20)$$

Considerando o caso em que a absorção é localizada na profundidade x_0 da amostra, esta absorção localizada, pode ser representada por uma função $\delta(x_0)$ de maneira que a fonte de calor é

$$f(x_0) = \frac{\beta' I_0}{k_s} \delta(x_0) \quad (1.21)$$

onde β' é o coeficiente (adimensional) de absorção superficial.

Desprezando-se g ($g \ll 1$ para qualquer amostra sólida) e lembrando que $x_0 < 0$ na convenção adotada, encontramos a expressão:

$$\Theta(0) = \frac{\beta' I_0}{k_s - \sigma_s} \left[\frac{(b+1)e^{\sigma_s(l_s - x_0)} - (b-1)e^{-\sigma_s(l_s - x_0)}}{(b+1)e^{\sigma_s l_s} + (b-1)e^{-\sigma_s l_s}} \right] \quad (1.22)$$

As equações 1.20 e 1.22 fornecem a temperatura na interface amostra-gás para o caso de incidência traseira e absorção superficial, respectivamente.

No caso de amostra termicamente grossa ($\mu_s \ll l_s$) a temperatura na interface reduz-se para

$$\Theta(0) = \frac{\beta' I_0}{k_s \sigma_s} e^{\sigma_s x_0} \quad (1.23)$$

Em medidas de difusividade térmica utilizando a técnica dos dois feixes (descrita no capítulo 2) a absorção é superficial e o suporte é o próprio ar ($b = g \approx 0$). Assim, quando a incidência é frontal ocorre em $x=0$ na equação 1.22, e para incidência traseira (na superfície em contato com o suporte) a absorção processa-se em $x = -l_s$ na mesma equação. Portanto, obtém-se [22]:

$$\Theta(0) = \frac{\beta_f' I_f \cosh(\sigma_s l_s)}{k_s \sigma_s \sinh(\sigma_s l_s)} \quad (1.24)$$

$$\Theta(0) = \frac{\beta_t' I_t}{k_s \sigma_s} \frac{1}{\sinh(\sigma_s l_s)} \quad (1.25)$$

1.4.2 Expansão térmica

Em 1978, McDonald e Wetsel [23] propuseram o modelo do pistão composto, cujo ponto principal foi estender o modelo de RG incluindo o efeito da expansão térmica. Nessa teoria, tanto a difusão do calor quanto a expansão térmica na amostra davam origem ao sinal acústico. A existência do efeito de expansão térmica requer um aquecimento uniforme da amostra, depende de sua temperatura média e, é proporcional ao coeficiente de dilatação térmica, α_T , do material. Resolvendo-se a equação de difusão térmica para cada meio do sistema, semelhante ao modelo de difusão térmica, obtém-se o perfil de temperatura da amostra, a partir do qual chega-se à temperatura média.

Esse mecanismo foi utilizado por Baesso [24] para determinar os tempos de relaxação não radiativos e os de difusão térmica de centros absorvedores em uma matriz de vidro soda-lime triturado.

As equações 1.4, 1.5 e 1.6 podem ser resolvidas para o caso onde não haja transferência de calor para o gás, com as seguintes condições de contorno:

$$\Theta_i = \Theta_j \quad (1.26)$$

para a temperatura na interface entre os meios adjacentes e,

$$k_s = \frac{\partial \Theta_s(0)}{\partial x} = 0 \quad (1.27)$$

$$k_s = \frac{\partial \Theta_s(-l_s)}{\partial x} = k_b \frac{\partial \Theta_b(-l_s)}{\partial x} \quad (1.28)$$

para o fluxo de calor.

Os índices utilizados nesta seção são os mesmos definidos anteriormente, pois estamos tratando de idêntica configuração geométrica para a célula fotoacústica.

A expressão encontrada para a temperatura em qualquer ponto x da amostra é dada por

$$\Theta_s = \frac{A}{B} \left\{ \left[(r - b)e^{-\beta l_s} - (1 + b)re^{\sigma_s l_s} \right] e^{\sigma_s x} + C + e^{\beta x} \right\} \quad (1.29)$$

onde

$$A = \frac{-\beta I_0}{\sigma_s^2 k_s (r^2 - 1)(1 + j\omega\tau)} \quad B = (1 + b)e^{\sigma_s l_s} - (1 - b)e^{-\sigma_s l_s} \quad (1.30)$$

e,

$$C = \left[(r - b)e^{-\beta l_s} - (1 - b)re^{-\sigma_s l_s} \right] e^{-\sigma_s x}. \quad (1.31)$$

A temperatura média na amostra é

$$\bar{\Theta} = \frac{1}{l_s} \int_0^{l_s} \Theta_s(x) dx \quad (1.32)$$

Calculando-se a temperatura média obtém-se:

$$\bar{\Theta} = \frac{A}{\beta l_s} \left[\left(1 - e^{-\beta l_s} \right) - r^2 - \frac{r(r - b)e^{-\beta l_s} (e^{\sigma_s l_s} - e^{-\sigma_s l_s}) + 2br}{(1 + b)e^{\sigma_s l_s} - (1 - b)e^{-\sigma_s l_s}} \right] \quad (1.33)$$

O incremento δl_s na espessura da amostra devido a expansão térmica é dado por

$$\delta l_s = \alpha_s l_s \bar{\theta} \quad (1.34)$$

Considerando que o gás seja comprimido adiabaticamente pela amostra, relaciona-se a variação de pressão no gás com δl_s da seguinte forma:

$$\delta P = \frac{\gamma P_o}{l_s} \alpha_T e^{j\omega t} \quad (1.35)$$

Simplificando a expressão acima para estudar os casos limites de interesse, consideremos inicialmente $b \gg 1$, isto é, a condutividade térmica da amostra é muito menor do que a do suporte, então a equação 1.33 torna-se

$$\bar{\theta} \approx \frac{A}{\beta l_s} \left\{ (1 - e^{-\beta l_s}) - r^2 - r \left[\frac{\left(\frac{r}{b} - 1\right) e^{-\beta l_s} (e^{\sigma_s l_s} - e^{-\sigma_s l_s}) + 2}{(1+b)e^{\sigma_s l_s} - (1-b)e^{-\sigma_s l_s}} \right] \right\} \quad (1.36)$$

No caso de amostra termicamente grossa, $\sigma_s l_s \gg 1$ e $r/b \approx 0$, esta expressão se reduz para

$$\bar{\theta} \approx \frac{A}{\beta l_s} \left[(1 - e^{-\beta l_s}) - r^2 + r e^{-\beta l_s} \right] \quad (1.37)$$

Para o caso de amostras transparentes, $\beta l_s \ll 1$, usando a aproximação $e^{\beta l_s} \approx 1 + \beta l_s$, a equação 1.37 toma a forma

$$\bar{\theta} \approx -(r+1) \frac{\beta I_o}{\sigma_s^2 k_s (r^2 - 1)(1 + j\omega\tau)} \quad (1.38)$$

ou

$$\bar{\theta} \approx -(r+1) \frac{-\beta I_o}{\sigma_s^2 k_s \left(\frac{\beta}{\sigma_s} - 1\right) (1 + j\omega\tau)} \quad (1.39)$$

A equação acima tem módulo e fase, dados na referência [24], respectivamente, por:

$$|\bar{\theta}| = \frac{\beta I_o \alpha_s}{k_s \omega} \frac{1}{\left(1 - \frac{\beta}{\sigma_s} + \frac{\beta^2}{2\sigma_s^2}\right)^{1/2}} \frac{1}{[1 + (\omega\tau)^2]^{1/2}} \quad (1.40)$$

$$\Phi = - \left\{ \frac{\pi}{2} + \arctg(\omega\tau) + \arctg \left[\frac{1}{(2\omega\tau_\beta)^{1/2} - 1} \right] \right\} \quad (1.41)$$

onde $\tau_\beta = \frac{1}{\alpha_s \beta^2}$

Utilizando a intensidade e a fase do sinal fotoacústico é possível calcular o tempo de relaxação não radiativo (τ) e o tempo de difusão térmica (τ_β).

1.4.3 Flexão termoelástica

O efeito de flexão termoelástica que é dominante, principalmente, em altas frequências de modulação, é essencialmente devido ao gradiente de temperatura dentro da amostra de raio R e, normal ao seu plano. Esse gradiente de temperatura paralelo ao eixo x , faz com que a expansão térmica da amostra dependa da profundidade x , de tal forma que haja flexão da amostra conforme a figura 1.3.

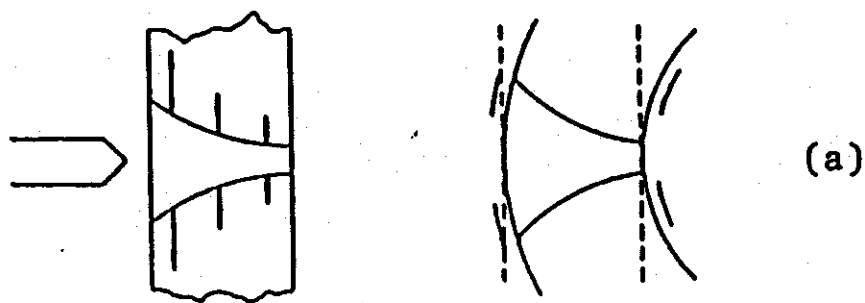
Proposto por Rousset et al. [25], considera-se que o perfil de temperatura na amostra não é influenciado pelas deformações termoelásticas, isto é, a temperatura na amostra é obtida resolvendo-se a equação de difusão térmica convencional (equações 1.4, 1.5 e 1.6, independentemente das equações termoelásticas).

O modelo teórico proposto dá uma solução geral para as equações termoelásticas, onde são previstos deslocamentos em duas direções na amostra; u_r , na direção radial e, u_x , na direção normal ao plano da amostra. Resolvendo as equações termoelásticas [25], obtém-se

$$u_x(r, x) = \alpha_T \left\{ 6(R^2 - r^2)A_\Theta + \left(\frac{1+\nu}{1-\nu} \right) l_s B_\Theta - \frac{\nu}{1-\nu} \left[12A_\Theta \left(\left(x - \frac{l_s}{2} \right)^2 - \frac{l_s^2}{4} \right) + C_\Theta x \right] \right\} \quad (1.42)$$

onde r é a coordenada radial de um sistema de coordenadas cilíndricas com o eixo de simetria passando pelo centro da amostra (figura 1.3.b), ν é a razão de Poisson, α_T é o coeficiente de expansão da amostra, x a coordenada normal, R o raio da câmara fotoacústica e A_Θ , B_Θ e C_Θ são descritos por:

$$A_\Theta = \frac{1}{l_s^3} \int_{-l}^0 \left(x + \frac{l_s}{2} \right) \Theta(x) dx \quad (1.43)$$



(b)

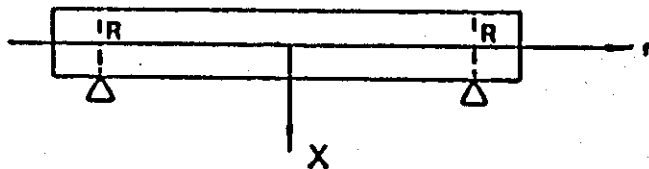


Figura 1.3: (a) Ilustração da flexão termoelástica da amostra; (b) sistema de coordenadas cilíndricas adotado. O eixo de simetria está na direção x e passa pelo centro da amostra, R é o raio da célula fotoacústica, ao longo do qual apoia-se a amostra.

$$B_{\Theta} = \frac{1}{l_s} \int_0^x \Theta(x) dx \quad (1.44)$$

$$C_{\Theta} = \frac{2}{l_s} \int_{-l_s}^0 \Theta(x) dx \quad (1.45)$$

Na interface amostra-gás, $x = 0$, a equação 1.42 reduz-se para:

$$u_x(r, 0) = 6\alpha_T(R^2 - r^2)A_{\Theta} \quad (1.46)$$

nesse ponto, o deslocamento médio da amostra é dado por

$$\overline{u_x} = \frac{1}{\pi R^2} \int_0^R 2\pi r u_x(r, 0) dr = 3\alpha_T R^2 A_{\Theta} \quad (1.47)$$

No caso do gás comprimir a amostra adiabaticamente, a variação da pressão na câmara é :

$$\delta P = \frac{\gamma P_0 R^2 u_x}{R_i^2 l_g} \quad (1.48)$$

onde R_i é o raio interno da câmara fotoacústica.

Substituindo a equação 1.47 em 1.48, obtém-se a forma para a variação de pressão da célula, cuja expressão explícita depende do cálculo de $\Theta(x)$ e do termo de fonte adequado para as situações de incidência de luz, assim

$$\delta P = \frac{3\gamma P_0 R^4 A_{\Theta} \alpha_T}{R_i^2 l_g} \quad (1.49)$$

Considerando absorção superficial e incidência de luz frontal, o termo de fonte é dado por $f(x) = (\beta_f I_f / k_s) \delta(x)$.

Substituindo esse termo na equação 1.10 e fazendo $b = g = 0$, obtém-se:

$$\Theta(x) = \frac{\beta_f I_f \cosh[\sigma_s(x + l_s)]}{k_s \sigma_s \sinh \sigma_s l_s} \quad (1.50)$$

Substituindo $\Theta(x)$ na equação (1.43) e integrando, encontramos

$$A_{\Theta} = -\frac{\beta_f I_f}{k_s \sigma_s^3 l_s^3} \left[\frac{\cosh \sigma_s l_s - \left(\frac{\sigma_s l_s}{2}\right) \sinh \sigma_s l_s - 1}{\sinh \sigma_s l_s} \right] \quad (1.51)$$

Uma vez determinado A_θ , basta substituí-lo na equação 1.49 para obter a variação de pressão na câmara fotoacústica devido a incidência frontal de luz para o mecanismo de flexão termoelástica. Portanto,

$$\delta P_f = -\frac{3\gamma P_0 R^4 \beta_f I_f \alpha_T}{R_i^2 l_g l_s^3 k_s \sigma_s^3} F \quad (1.52)$$

onde

$$F = \frac{\cosh \sigma_s l_s - \left(\frac{e_s l_s}{2}\right) \sinh \sigma_s l_s - 1}{\sinh \sigma_s l_s} \quad (1.53)$$

De forma semelhante à incidência frontal, podemos determinar a variação de pressão na câmara fotoacústica para incidência traseira. Nesse caso o termo de fonte é $f(x) = (\beta_T I_T / k_s) \delta(x + l_s)$ e a expressão para $\Theta(x)$ é:

$$\Theta(x) = \frac{\beta_T I_T \cosh \sigma_s x}{k_s \sigma_s \sinh \sigma_s l_s} \quad (1.54)$$

A variação de pressão na câmara fotoacústica devido a incidência traseira é dada por

$$\delta P_t = -\frac{3P_0 R^4 \beta_t I_t \alpha_T}{R_i^2 l_g l_s^3 k_s \sigma_s^3} F \quad (1.55)$$

1.5 Célula Fotoacústica Aberta (OPC)

1.5.1 Considerações Gerais

O modelo teórico para detecção do sinal fotoacústico pelos diversos modelos citados prevêem câmaras fotoacústicas nas quais estão acoplados microfones especiais como elemento de transdução. Esses transdutores recebem somente ondas de pressão através do gás contido na câmara.

Silva et al. [26] introduziram uma nova versão de detecção do sinal fotoacústico denominada de "célula fotoacústica aberta". Embora esse termo fosse primeiramente empregado por Helander [27] e McQueen [28], há uma diferença fundamental entre as duas versões de OPC. Na primeira versão, a detecção do sinal é feita através de piezolétrico, nesse caso o transdutor usual é cerâmica PZT onde a amostra é diretamente fixada (técnica de detecção do tipo "contato"). Na segunda versão de OPC, a amostra é colocada no topo

de um microfone comercial de eletreto; o ponto comum entre as duas versões é dispensar um meio transdutor adicional, um gás ou o ar. Essa técnica é caracterizada como técnica de detecção fotoacústica de volume mínimo [29].

As figuras 1.4a e 1.4b, mostram a seção reta de uma célula fotoacústica aberta e seu diagrama geométrico. Neste tipo de detecção é permitida apenas incidência de luz traseira na amostra.

A câmara fotoacústica, de forma cilíndrica tem raio de 3,5mm com espessura de 1mm (correspondente à coluna do gás); a abertura de comunicação com a face da amostra tem raio de 1,5mm. O microfone consiste de uma membrana na qual é depositado um diafragma metalizado de aproximadamente 12 μ m (de tetrafluoroethylene / hexafluoropropylene, copolímeros) sobre o eletrodo metálico com espessura entre 50 e 100nm, separados de uma placa metálica por um “gap” de ar medindo aproximadamente 45 μ m.

O sinal fotoacústico detetado com OPC é proveniente dos mecanismos anteriormente apresentados, seguido da contribuição da membrana. Quando uma onda mecânica (ou radiação modulada) atinge a membrana esta vibra (ou sofre processo de evolução ou contração) e provoca variação espacial no “gap” de ar alterando o campo elétrico pela indução de cargas nas camadas dielétricas e uma diferença de potencial (ddp) sobre o R. Essa ddp é transmitida à base de um transistor de efeito de campo (FET) inserido na cápsula do microfone. Devido a esse componente eletrônico torna-se necessário tensão de polarização dc na faixa de 3 a 9V para a maioria dos microfones de eletreto.

A densidade de carga induzida (σ_i) está relacionada com a ddp, V [30], por:

$$V = RA \frac{d\sigma_i}{dt} = RA\epsilon_0 \frac{dE_0}{dt} \quad (1.56)$$

onde A é a área da placa metálica, σ_i a densidade de carga induzida na superfície e E_0 o campo elétrico.

A tensão de saída do microfone (V_{opc}) devido a variação de pressão na câmara fotoacústica (δP) é dada por [31,32]:

$$V_{opc} = V_0 \left(\frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \right) \frac{\delta P e^{j\omega t}}{\gamma P_0} \quad (1.57)$$

onde $\omega = 2\pi f$, f é a freqüência de modulação da luz, C a capacitância do microfone, P_0 a pressão ambiente, $\gamma = C_p/C_v$ e, C_p , C_v calores a específicos a pressão e volume constantes,

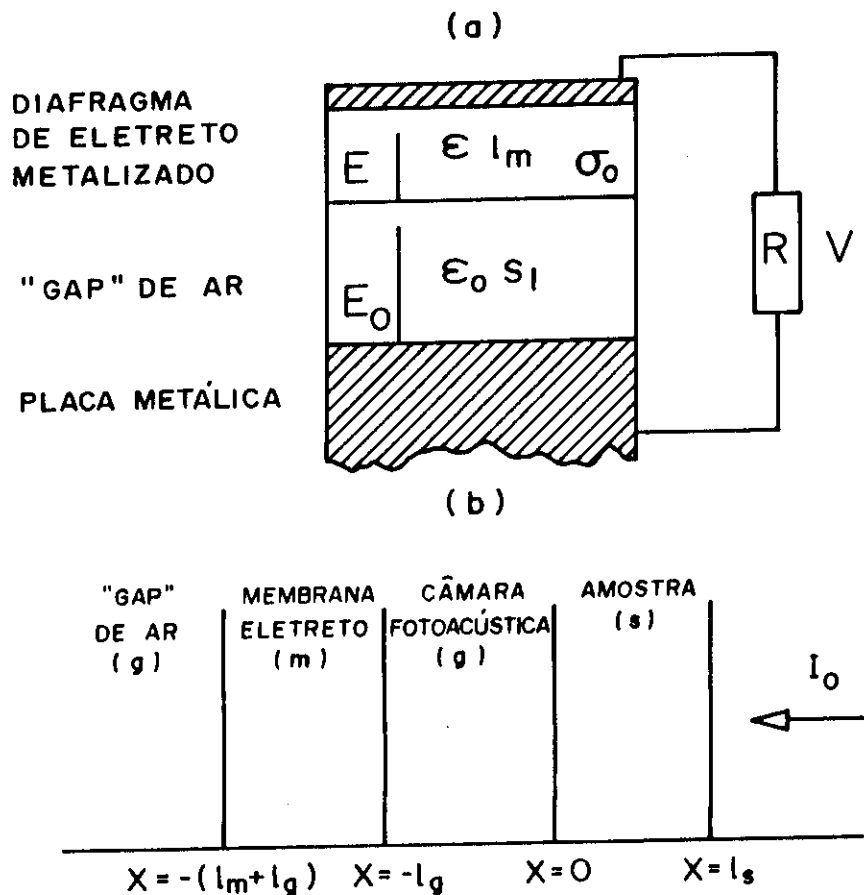


Figura 1.4: (a) secção reta do microfone de eletreto e, (b) esquema geométrico da célula fotoacústica aberta.

respectivamente e,

$$V_0 = \frac{l_b l_m \sigma_0}{l_b \epsilon + l_m \epsilon_0} \quad (1.58)$$

onde l_b é a espessura do “gap” do ar, ϵ e ϵ_0 são constantes dielétricas do eletreto e do ar, respectivamente e, σ_0 é a densidade de carga superficial do eletreto.

De acordo com o modelo RG, onde a flutuação de pressão na câmara fotoacústica é devido ao fluxo de calor da amostra para o gás, podemos escrever:

$$\delta P = \frac{\gamma P_0 \overline{T_g}}{T_0} \quad (1.59)$$

onde T_0 é a temperatura ambiente e T_g é a flutuação de temperatura do ar na câmara fotoacústica.

Combinando as equações 1.59 com 1.57 obtemos:

$$V_{opc} = \frac{V_0}{T_0} \left(\frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \right) e^{j\omega t} \overline{T_g} \quad (1.60)$$

Assumindo a configuração da figura 1.4b representando esquematicamente a geometria da OPC, e que um feixe de luz monocromática modulada com frequência angular $\omega = 2\pi f$ e intensidade $I_0 e^{j\omega t}$ incide na amostra que absorve na forma $I(x) = I_0 e^{-\beta(l_s - x)}$, podemos escrever as equações de difusão térmica como sendo [29]:

$$\frac{\partial^2 T_s}{\partial x^2} - \sigma_s^2 T_s + \frac{\beta I_0}{k_s(1 + j\omega\tau)} e^{-\beta(l_s - x)} = 0 \quad 0 \leq x \leq l_s \quad (1.61)$$

$$\frac{\partial^2 T_g}{\partial x^2} - \sigma_g^2 T_g = 0 \quad -l_g \leq x \leq 0 \quad (1.50b) \quad (1.62)$$

$$\frac{\partial^2 T_m}{\partial x^2} - \sigma_m^2 T_m - \frac{\beta' I_0}{k_m} e^{-\beta l_s} \delta(x + l_g) = 0 \quad -(l_m + l_g) \leq x \leq -l_g \quad (1.63)$$

onde $\sigma_i = (1 + j)a_i$ com $a_i = \left(\frac{\pi f}{\alpha_i}\right)^{1/2}$ $i = (m$ para a membrana, g para o gás e s para a amostra); β' é o coeficiente de absorção superficial (adimensional) da membrana, e τ é o tempo de relaxação não radiativa.

Os terceiros termos das equações 1.61 e 1.63 são os termos que representam as fontes de calor, na amostra e na membrana, respectivamente. O primeiro termo de fonte

de calor é devido à absorção de luz pela amostra e o segundo refere-se à geração de calor na membrana devido a luz incidente sobre esta. A incidência sobre a membrana pode ser através da amostra (quando não é opaca) ou incidência direta sobre esta; neste último caso, a câmara é fechada com janela de vidro que não seja absorvedor na região de interesse, sobre tudo, quando trabalhamos com espectroscopia na faixa de 300 a 800 nm, caso típico para estudos envolvendo folhas vegetais.

A fonte de calor na membrana do microfone foi assumida como sendo devida a absorção superficial, que é uma boa aproximação para conversão de luz em calor numa superfície metálica [29].

Resolvendo as equações 1.61 ,1.62 e 1.63, obtém-se

$$\bar{T} = \theta_s + \theta_m \quad (1.64)$$

onde,

$$\theta_s = \frac{I_0 r [\cosh(l_g \sigma_g) - 1] \left\{ 2r - e^{-\beta l_s} \left[(r+1)e^{l_s \sigma_s} + (r-1)e^{-l_s \sigma_s} \right] \right\}}{(1 + j\omega\tau) l_g \sigma_g k_s \sigma_s (r^2 - 1) \sinh(l_g \sigma_g) (e^{l_s \sigma_s} - e^{-l_s \sigma_s})} \quad (1.65)$$

$$\theta_m = \frac{\beta' I_0 e^{-\beta l_s} \cosh(l_m \sigma_m) [\cosh(l_g \sigma_g) - 1]}{l_g \sigma_g k_m \sigma_m \sinh(l_m \sigma_m)} \quad (1.66)$$

A equação 1.65 representa a contribuição da amostra para a flutuação de temperatura na câmara, onde $r = \beta/\sigma_s$

e, a equação 1.66 representa a contribuição da membrana.

Substituindo a equação 1.64 em 1.59 e o resultado na equação 1.57, podemos escrever a resposta da célula aberta na forma:

$$V_{opc} = V_0 \left(\frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \right) \left(\frac{\theta_s + \theta_m}{T_0} \right) e^{j\omega t} \quad (1.67)$$

A expressão 1.67 é bastante complicada devido a forma de θ_s e θ_m , semelhante ao modelo RG. Entretanto é possível reduzi-la para os casos de interesse , em função da opacidade e espessura térmica da amostra em estudo. Desta forma consideramos uma amostra opticamente fina quando $\beta l_s \ll 1$ e opticamente grossa se $\beta l_s \gg 1$ e, termicamente fina se $l_s a_s \ll 1$ ou $l_s a_s \gg 1$ para amostra termicamente grossa. Para simplificar

o modelo é assumido que o gás da câmara fotoacústica é grosso; uma aproximação muito boa para uma coluna de gás de 1mm em frequências de modulação (f) maior do que 10Hz.

No caso em que a amostra é opaca não há contribuição da membrana para o sinal fotoacústico; fazendo $e^{-\beta l_s} \approx 0$ e assumindo $r^2 = \frac{\beta^2}{\sigma_s^2} \approx 0$, obtemos a redução da equação 1.67 em sua forma final, para as amostras:

a) Termicamente fina,

$$V_{opc} = V_0 \left[\frac{j\omega RC I_0 e^{j\omega t}}{(1 + j\omega RC)(1 + j\omega\tau) T_0 l_g k_s \sigma_s l_s \sigma_g} \right] \quad (1.68)$$

b) Termicamente grossa,

$$V_{opc} = V_0 \left[\frac{j\omega RC I_0 e^{j\omega t} e^{-l_s \sigma_s}}{(1 + j\omega RC)(1 + j\omega\tau) T_0 l_g \sigma_g k_s \sigma_s} \right] \quad (1.69)$$

1.5.2 Espectroscopia com Amostras Opticamente Transparentes

O caso mais importante para uso da OPC em espectroscopia é quando a amostra é opticamente transparente e termicamente grossa ($l_s \sigma_s \gg 1$). No caso particular de folhas vegetais, no qual a difusividade térmica é da ordem de $0.001 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e espessura na ordem de $150 \mu\text{m}$ é considerado termicamente grossa para frequências superiores a 2Hz, pois a frequência de corte ($f_c = \alpha_s / \pi l_s^2$) é aproximadamente 2Hz [30]. Usando as equações 1.65, 1.66 e 1.67 podemos escrever

$$V_{opc} = V_0 \chi G \frac{I_0 F_s}{T_0 l_g \sigma_g k_s \sigma_s} e^{j\omega t} \quad (1.70)$$

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

$$F_s = \left[\frac{r}{(1 + j\omega\tau)(1 - r)} + \beta' \frac{k_s}{k_m} \left(\frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right)^{1/2} F_m \right] e^{-\beta l_s} \quad (1.71)$$

com $F_m = \coth(l_m \sigma_m)$.

Para altas frequências de modulação, no intervalo onde a amostra é termicamente grossa, o segundo termo da equação 1.71 é dominante e proporcional a $e^{-\beta l_s}$, portanto

$$F_s \simeq \beta' \frac{k_s}{k_m} \left(\frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right)^{1/2} F_m e^{-\beta l_s} \quad (1.72)$$

para este caso, a expressão (1.70) significa que o sinal V_{opc} é proporcional à densidade de potência transmitida $(I_0 e^{-\beta l_s})$ e varia com f^{-1} .

Utilizando a técnica OPC para espectroscopia de absorção com amostra transparente é necessário normalização do sinal, pois haverá contribuição da membrana. Para normalizar obtemos o sinal da membrana; neste caso, a câmara fotoacústica é fechada com uso de uma janela transparente (em geral vidro BK7 com espessura de $300\mu m$).

Nessas condições, θ_s e β são iguais a zero nas equações 1.65, e 1.66 então obtemos para o sinal de incidência direta, a seguinte expressão:

$$V_D = V_0 \chi G \frac{I_0}{T_0 l_g \sigma_g k_s \sigma_s} \beta' \frac{k_s}{k_m} \left(\frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right)^{1/2} coth(l_m \sigma_m) \quad (1.73)$$

Comparando as equações 1.70, 1.72 e 1.73 obtemos o sinal P.A. normalizado, dado por

$$V_N = \frac{V_D - V_{OPC}}{V_D} = 1 - e^{-\beta l_s} \quad (1.74)$$

Referências Bibliográficas

- [1] Vargas, H. and Miranda, L.C.M.; Physics Reports 161(2)(1988)45.
- [2] Bento, A.C.; Tese de Doutorado, apresentada no IFGW-UNICAMP, Campinas, 1987.
- [3] Bell, A.G.; Am.J.Sci.,120 (1880)120.
- [4] A.G.Bell, Philos. Mag.,11(5) (1881)510.
- [5] Tyndall, J.; Proc. R. Soc. London, 31(1881)307.
- [6] Roentgen, W.C.; Philos.Mag.,11(5)(1881)308.
- [7] Viengerov, M.L.; Doklady Akad. Nauk USSR, 19(1938)687.
- [8] Kaiser, R.; Canadian Journal of Physics, 37(1959).
- [9] Lord Rayleigh; Nature, 23(1881)274.
- [10] Parker, J.G.; Appl.Opt.,12(12)(1973)2974.
- [11] Rousset, G., Lepoutre, F., Bertrand, L.; J. Appl. Phys.,54(5) (1983).
- [12] Pessoa Jr., O., Cesar, C. L., Patel, N. A., Vargas, H., Ghizoni, C. C., and Miranda, L. C. M.; J. Appl. Phys.,59(4) (1986).
- [13] McDonald, F.A. and Wetsel Jr.,G.C.; J. Appl. Phys., 49(4) (1978).
- [14] Nery, J.W., Pessoa Jr.,O., Vargas,H., Cesar,C.L., Reis,F.A.M. Grabrielli,A.C., Miranda,L.C.M., Vinha,A.C.;Analyst,112(1987)1487.
- [15] Netzelmann,U., Pelzl,J., Vargas,H., Cesar,C.L. and Miranda, L.C.M.; MAG.20(1984)1252.
- [16] Bults, G., Hortiz, B.A., Malkin, S. and David, C.; B.B.A.,679 (1982)452.
- [17] Rousset, G., Lepoutre, F. and Bertrand, L.; J. Appl. Phys.54 (1983)2383.
- [18] Cella, N.; Tese de Mestrado, IFGW-UNICAMP (1985).
- [19] Abritta, T., Cella, N. and Vargas, H.; Chem. Phys. Letters, 161(12)(1989).
- [20] Rosencwaig, A. and Gersho, A.; J.Appl.Phys.,47(1)(1976)64.
- [21] Cesar, C.L.; Tese de Doutorado, IFGW-UNICAMP (1985).
- [22] Pinto Neto, A.; Tese de Doutorado, IFGW-UNICAMP (1990).
- [23] McDonald, F.Alan, C.Grover Jr. and Wetsel; J.Appl.Phys.49(4) 1978.
- [24] Baesso, M.L.; Tese de Doutorado, IFGW-UNICAMP (1990).
- [25] Rousset, G. and Lepoutre, F.; J.Appl.Phys. 54(5)(1983).
- [26] da Silva, M.D., Bandeira, I.N. and Miranda, L.C.M.; J.Phys.E: Sci Instrum., 20(1987)1476.
- [27] Halander, P.; J.Photoacoustic, 1(1982)103.
- [28] McQueen, D.H.; J.Phys.E, 16(1983)738.

- [29] Marquezini, M.V., Cella, N., Mansanares, A.M., Vargas, H. and Miranda, L.C.M.; Meas. Sci. Technol., 2(1991)396.
- [30] Cella, N.; Tese de Doutorado, IFGW-UNICAMP (1990).
- [31] Leite, N.F., Miranda, L.C.M., Cella, N. and Vargas, H.; J.Appl.Phys. (1988).
- [32] Morse, P.M.; Vibrations and Sound, McGraw Hill, New York, 1948.

Capítulo 2

Métodos Experimentais e Preparação das Amostras

2.1 Introdução

Neste capítulo apresentaremos os métodos experimentais, bem como os aspectos teóricos específicos, utilizados nas medidas com a técnica fotoacústica e nas medidas complementares.

2.2 Medidas por Espectroscopia Fotoacústica em Folhas Vegetais “In Vivo” e “In Situ” utilizando OPC

Em nossos experimentos com a técnica fotoacústica utilizamos plantas de soja e milho, em pequenos vasos, como mostrado na figura 2.1, note que a folha está localizada no topo da célula. Assim, podemos utilizar uma amostra por várias vezes inclusive acompanhar o desenvolvimento da planta, pois esta permanece intacta.

Na figura 2.2 mostramos o espectro de absorção óptica de uma folha de milho, ainda presa ao caule, usando a célula aberta.

A célula OPC é constituída de um microfone de eletreto comercial (mostrado na figura 2.3) alimentado com tensão, dc, entre 3 e 12V. A necessidade dessa tensão é devida a existência de um preamplificador cujo elemento ativo é um transistor de efeito de campo

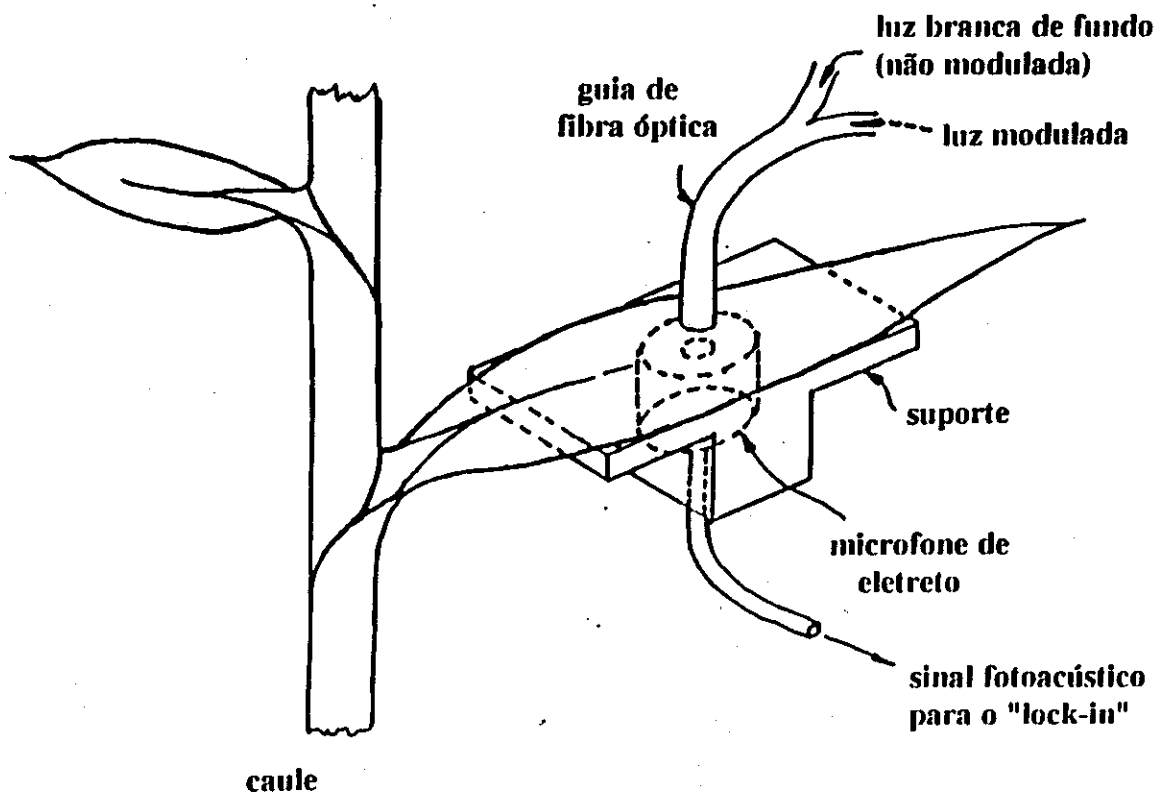


Figura 2.1: *Vista de uma folha sobre a célula aberta.*

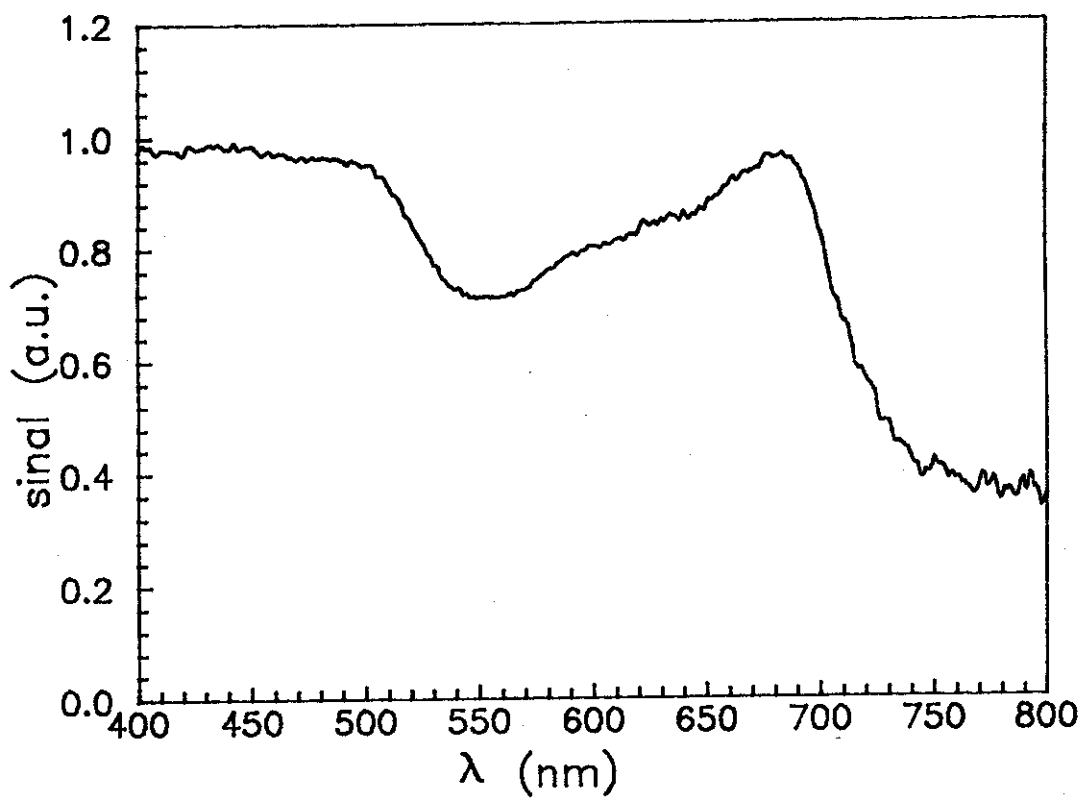


Figura 2.2: *Espectro de folha de milho obtido com OPC.*

(FET), localizado na própria cápsula do microfone. A célula é acomodada em um suporte de alumínio de forma a facilitar a fixação da folha vegetal.

Para maior estabilidade da folha sobre a célula, durante o experimento coloca-se uma lâmina de alumínio com janela de vidro em sua parte central; o diâmetro dessa janela é de 5mm e permite passagem de luz incidente. A fixação da folha no sistema de detecção requer o cuidado de não danificar a amostra por pressão excessiva.

A radiação incidente na folha é conduzida por uma fibra óptica bifurcada. Por um dos ramos da fibra, a radiação conduzida é modulada enquanto que no outro ramo, quando necessário incidimos luz branca contínua. O sinal fotoacústico é produzido pela luz modulada enquanto que a luz branca é utilizada para saturação da fotossíntese durante a aquisição de dados.

A fonte de luz branca é uma lâmpada halógena de 24V-250W, do tipo ELC (equipada com refletor parabólico). A alimentação da lâmpada é fornecida por uma fonte de tensão DC, ajustável (Tectrol, modelo TCA40-50A) e focalizada, através de lente convergente, para um ramo da fibra óptica. Entre a lâmpada e a lente usamos um filtro de água com espessura de 6cm com a finalidade de absorver a radiação infravermelho próximo.

A fonte de luz de excitação é uma lâmpada de Xenônio de 1000W de potência (Oriel, modelo 6269), de emissão contínua na faixa espectral do ultravioleta ao infravermelho. Essa lâmpada é alimentada por uma fonte de tensão estabilizada (Oriel, modelo 6128) que garante a estabilidade de emissão.

A radiação emitida passa por um modulador mecânico (PAR-EGG, modelo 191). O modulador possui pá giratória cuja velocidade é selecionada, por controlador eletrônico, na faixa de 2,5 a 100 rps de forma estável; a frequência de modulação é dada pelo produto da velocidade selecionada com o número de furos na pá giratória. Uma célula fotoelétrica fornece o sinal de referência da modulação ao amplificador "lock-in" que utiliza essa referência para estabelecer a fase do sinal fotoacústico.

A luz modulada é difratada, em um comprimento de onda selecionado, através de um monocromador (Oriel, modelo 77250). A rede de difração utilizada (Oriel, modelo 77298) possui 1200 linhas/mm, com "blaze" em 500nm, permitindo varredura na faixa de 300 a 1000nm. A entrada e saída de luz do monocromador são providas de "slits" (Oriel, modelo 77269) com fenda selecionada na posição 1.56, cuja resolução é $\pm 5nm$, com banda

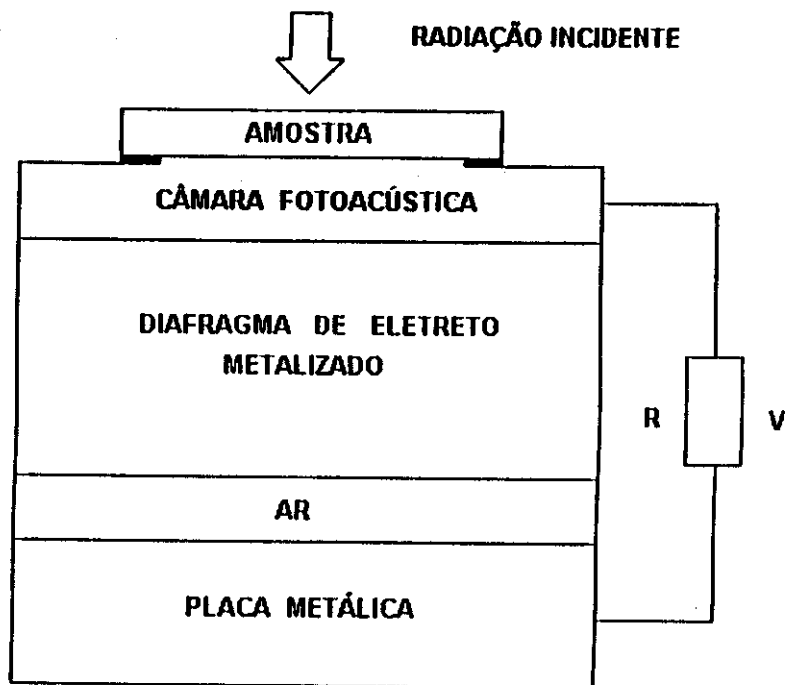


Figura 2.3: *Microfone de eletreto utilizado na técnica OPC.*

passante de 10nm centrada no comprimento de onda, λ , selecionado.

Para evitar ordens superiores de difração, num espectro com varredura na faixa de 400 a 800nm, usamos um filtro (NEWPORT, modelo WG 305) que corta comprimentos de onda abaixo de 305nm e, um filtro (FUNBEC, modelo CO-55-26) que corta os comprimentos de onda abaixo de 550nm; a luz monocromática é focalizada, por meio de uma lente, para o outro ramo da fibra óptica. O controle da varredura na faixa de comprimentos de ondas de interesse é feita através de motor de passo, integrado ao monocromador e comandado por microcomputador, via interface controladora (Oriel, modelo 20010) durante a fase de aquisição de dados.

O sinal do microfone é introduzido ao amplificador “lock-in” de duplo canal (PAR-EGG, modelo 5210). Esse amplificador permite leitura direta do sinal e da fase, além de possuir internamente uma interface GPIB proporcionando seu acoplamento direto a um microcomputador do tipo PC, onde são registrados tanto o sinal quanto a fase deste; a referência é recebida do modulador. A sensibilidade do amplificador permite medir sinais desde 1mV até 3V, em frequências de modulação de 0,5 a 120Hz.

O programa de aquisição gera dois arquivos de saída, um deles com extensão VIS, no qual estão armazenados os dados com relação à amostra e o outro, com extensão DAT, onde são armazenados os comprimentos de onda, o sinal fotoacústico normalizado (pelo sinal obtido com incidência direta da fonte de radiação sobre a membrana do microfone) e a fase do sinal. Na figura 2.4 mostramos o espectrômetro fotoacústico utilizado em nossas medidas.

2.3 Medidas Fotoacústicas Não Espectroscópicas em Folhas Vegetais “In vivo” e “In situ” com uso da Célula Aberta

Os experimentos, nos quais observamos evolução de oxigênio, energia armazenada e tempo de resposta fotobárica em folhas de soja e de milho, foram realizados com o mesmo espectrômetro descrito na secção anterior. As diferenças entre estas e aquelas medidas são: a) manter fixo um comprimento de onda da luz modulada (no caso, $\lambda = 680nm$ que é um dos picos de absorção da clorofila “a”), para as medidas não espectroscópicas em

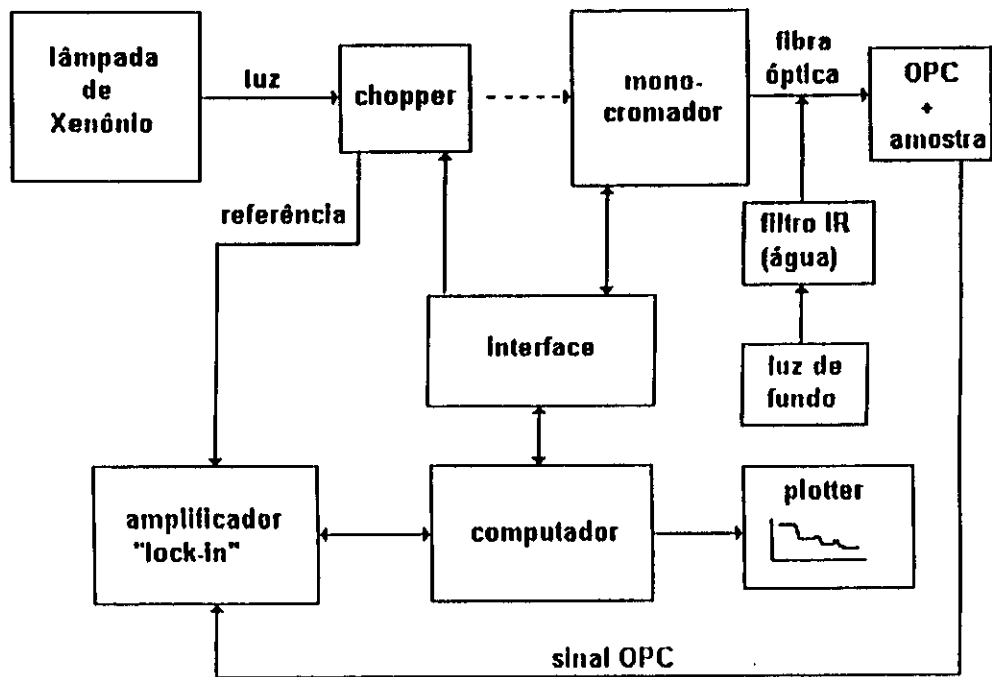


Figura 2.4: Diagrama em blocos do espectrômetro fotoacústico utilizado em nossas medi-
das.

vez da varredura de uma faixa de comprimentos de ondas nas medidas espectroscópicas; b) a utilização da luz branca contínua que na espectroscopia pode permanecer ligada para saturação da fotossíntese e, nas outras medidas produz os efeitos positivo e negativo, descritos no capítulo 4.

2.4 Calibração da Célula Fotoacústica Aberta com o Eletrodo de Clark

2.4.1 O Eletrodo de Clark

O eletrodo de Clark é um dispositivo constituído de um cátodo de platina e um anodo de prata que são mergulhados numa solução eletrolítica fornecida pelo fabricante. Entre outras aplicações, o eletrodo de Clark é utilizado para quantificar o oxigênio evoluído de folhas vegetais [1,2], em geral cortadas em pequenos discos, com diâmetro aproximadamente de 1 cm.

Com objetivo de quantificar a concentração de oxigênio relativa ao efeito negativo (ver capítulo 4) obtido com a célula fotoacústica aberta, utilizamos um eletrodo de Clark (Radelkis, modelo OP934-S).

O catodo e anodo do eletrodo foram mergulhados numa solução saturada de cloreto de potássio, fornecida pelo fabricante. O eletrodo, de forma tubular, tem comprimento de 8 cm e base com 1 cm de diâmetro; a base é revestida por uma membrana de polipropileno permeável ao oxigênio. A estabilidade do eletrodo é assegurada 24 após o contato com a solução eletrolítica.

2.4.2 Calibração do Eletrodo de Clark com o Microanalisador Biológico

O funcionamento do eletrodo requer tensão de polarização de 0,65 V. Esta tensão pode ser fornecida por qualquer equipamento, desde que responda às suas pequenas variações. Em nossa calibração utilizamos, primeiramente, um microanalisador biológico (Radelkis, modelo OP-210/3) acoplado ao eletrodo de Clark. Assim, quando oxigênio difunde através da membrana, reduz-se no catodo de platina e provoca variação na tensão de polarização. A taxa de concentração de oxigênio, nos dois lados da membrana, sendo

constante limita o fluxo através da célula e, neste estágio é proporcional à pressão parcial na amostra sendo lida diretamente na escala do microanalisador, em mmHg [3].

Inicialmente calibramos o eletrodo, usando o microanalisador e, passando no porta amostra um fluxo, determinamos a pressão parcial de oxigênio relativa à concentração zero. Em seguida, um fluxo de mistura de gases, cuja concentração de oxigênio é padronizada em 11,8%. Esses dois pontos iniciais servem para calibrar manualmente as pressões parciais relativas às concentrações zero e 11,8%. Uma vez determinados esses pontos e conhecendo-se a pressão parcial, a concentração do gás ao qual submetemos o eletrodo de Clark é determinada pela expressão [2],

$$pO_2 = (B - a) \frac{cO_2}{100} \quad (2.1)$$

onde B , é a pressão atmosférica (em Campinas = 712 mmHg); a , a pressão de vapor d'água; cO_2 , a concentração de O_2 em percentual de volume.

2.4.3 Calibração de Glucosímetro com o Microanalisador Biológico

Devido a dificuldades de transporte do analisador (laboratório do prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto, no IQ-UNICAMP) para o nosso laboratório optamos por usar um glucosímetro portátil (Radelkis, OP-960) com as mesmas características de polarização (0,65 V) para o eletrodo de Clark. Lia-se a resposta do glucosímetro, relativa à variação provocada pelo eletrodo, através de um pHmetro (Radelkis, OP-271), do qual utilizamos um milivoltímetro eletrônico com leitura automática, isto é: os resultados eram expostos no "display" após estabilização do sinal.

Foi construída, na oficina mecânica do IQ-UNICAMP, uma célula em acrílico medindo, 5 cm de comprimento, 3 cm de diâmetro externo e 1,2 cm de diâmetro interno (por onde foi introduzido o eletrodo de Clark). A distância entre a membrana do eletrodo e a face posterior da célula é de 1 mm, com diâmetro de 0,9 cm, comunicando-se com o meio externo por intermédio de um duto com 3 mm de diâmetro. As dimensões da câmara da célula reproduzem as características geométricas da célula aberta, correspondendo ao mesmo volume da câmara fotoacústica. Uma placa metálica com janela de vidro permite a fixação da folha vegetal e o posicionamento da fibra óptica por onde penetra a

luz. Na figura 2.5 mostramos a célula com o eletrodo.

Inicialmente calibramos o glucosímetro com o microanalisador biológico. Para isto, o eletrodo de Clark conectado no microanalisador foi introduzido na célula de acrílico; em seguida passamos um fluxo de nitrogênio gasoso com a finalidade de ajustar a pressão parcial de O_2 com o zero da escala do medidor. O segundo passo foi passar um fluxo de mistura padronizada, contendo 11,8% de O_2 . Após estabilização da pressão parcial, ajustamos o controle de fundo de escala até o mostrador indicar a pressão parcial de 80mmHg, correspondente à concentração de 11,8% de O_2 , calculada através da equação 2.1. Neste cálculo levamos em consideração a pressão atmosférica e a temperatura no laboratório. A seguir passamos pela célula um fluxo de ar atmosférico (contém 20,93% de O_2) e depois um fluxo de O_2 a 95% (produzido por White Martins). As leituras, após estabilização dos sinais, foram bem próximas dos valores calculados.

Conectamos o eletrodo de Clark no glucosímetro, e sua saída no pHmetro, refazendo o mesmo processo anterior. Os resultados da calibração do glucosímetro com o microanalisador biológico são mostrados na figura 2.6, onde podemos observar um bom ajuste com a equação abaixo:

$$pO_2(mmHg) = -1.88X + 4025,74 \quad (2.2)$$

onde X é a leitura feita no pHmetro em mV.

Devido a sensibilidade do eletrodo de Clark com a temperatura é necessário recalibrar o glucosímetro, com as concentrações de O_2 a 0% (com nitrogênio) e a 11,8% (com a mistura padrão de gases) antes do início de cada medida, com a finalidade de corrigir a curva de calibração.

2.4.4 Calibração da Célula Fotoacústica aberta com o glucosímetro

Montamos o sistema do eletrodo de Clark em nosso laboratório ao lado do espectrômetro fotacústico (descrito na secção 2.3). As amostras utilizadas foram folhas de milho plantadas em pequenos vasos.

Os primeiros testes foram para verificar a sensibilidade do eletrodo de Clark na medida do O_2 evoluído de uma folha vegetal. Para isso incidimos radiação (de $\lambda =$

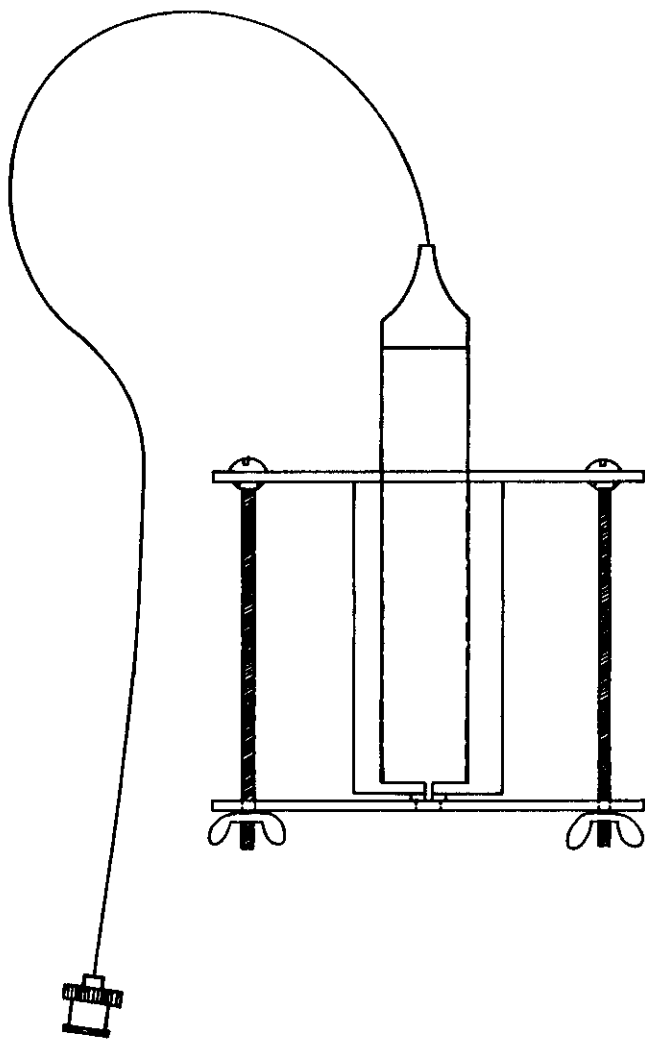


Figura 2.5: *Célula utilizada com o eletrodo de Clark para calibração da célula aberta “in vivo” e “in situ”.*

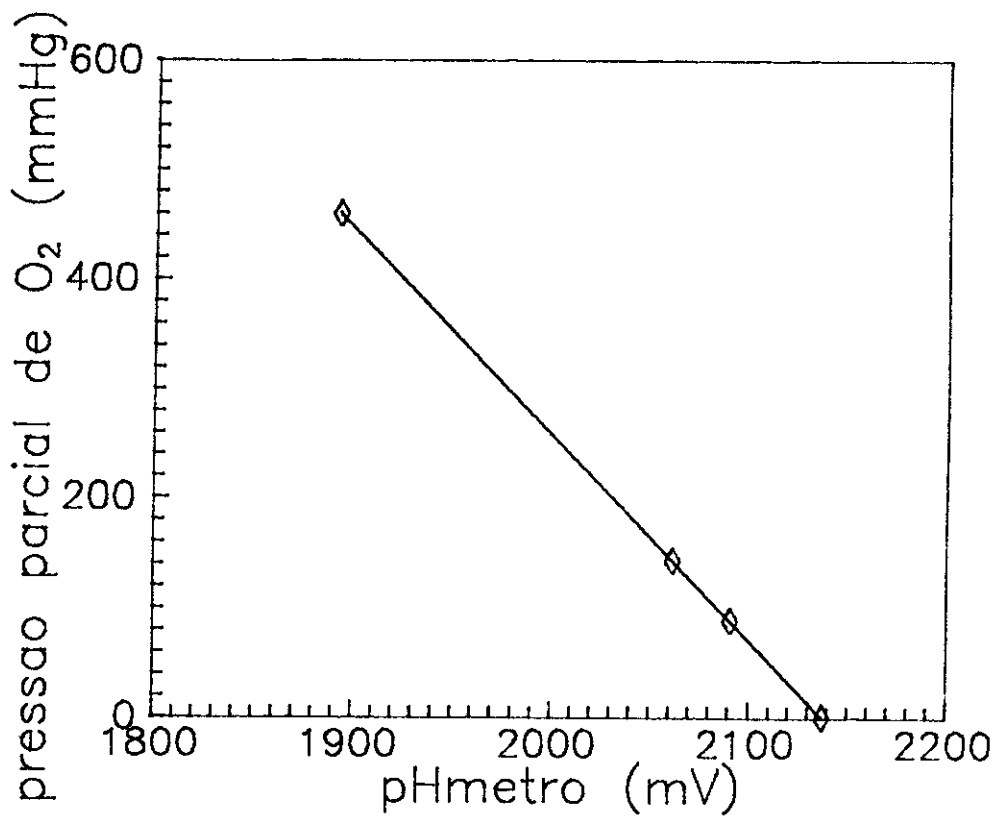


Figura 2.6: *Curva de calibração do glucosímetro com o microanalisador biológico.*

680nm), com intensidade de 22 W/m^2 até que o sistema entrasse em equilíbrio, fornecendo leitura constante.

Uma vez confirmada a sensibilidade do eletrodo, variamos a intensidade luminosa, medindo as respectivas respostas. Cada medida feita com o eletrodo era repetida com a fotoacústica na mesma folha.

Durante essas medidas, sempre que o sistema do eletrodo de Clark fornecia uma leitura, correspondente à concentração de oxigênio existente no ar dentro da câmara, mesmo com iluminação, a fotoacústica detetava somente a componente térmica da folha. Isto significa que naquele momento, por motivos inerentes à própria folha, não havia liberação de oxigênio. Provavelmente isto é devido ao fechamento de estômatos (poros das folhas por onde se verificam as trocas gasosas), devido a seus elementos de controle.

Os resultados obtidos com o glucosímetro foram substituídos na equação 2.2. Conhecida a pressão parcial, calculamos a concentração de O_2 , em mg/l , através da equação abaixo [4].

$$C = \frac{\kappa \cdot C_t}{100f} \quad (2.3)$$

onde:

C é a concentração O_2 em mg/l ;

$\kappa = cO_2$, concentração de O_2 em % do volume;

C_t , solubilidade do O_2 a 1 atm em mg/l e,

f , fator de correção em função da altitude.

Os valores de C_t e f estão tabelados na referência 5 e os dados que utilizamos são referentes à temperatura 22°C , $C_t = 8,53$ e $f = 1,08$.

As figuras 2.7, 2.8 e 2.9 mostram as variações de resposta do glucosímetro em função do tempo, devido à variação da concentração de oxigênio na câmara do detetor, para três intensidades de radiação incidente ($\lambda = 680\text{nm}$), moduladas em 17Hz.

As equações da variação de concentração de O_2 no tempo, obtida com o glucosímetro e a correspondente variação de pressão, respectivamente, podem ser escritas na forma, $X=at+b$ e $Y = cX+d$. Combinando essas expressões obtemos,

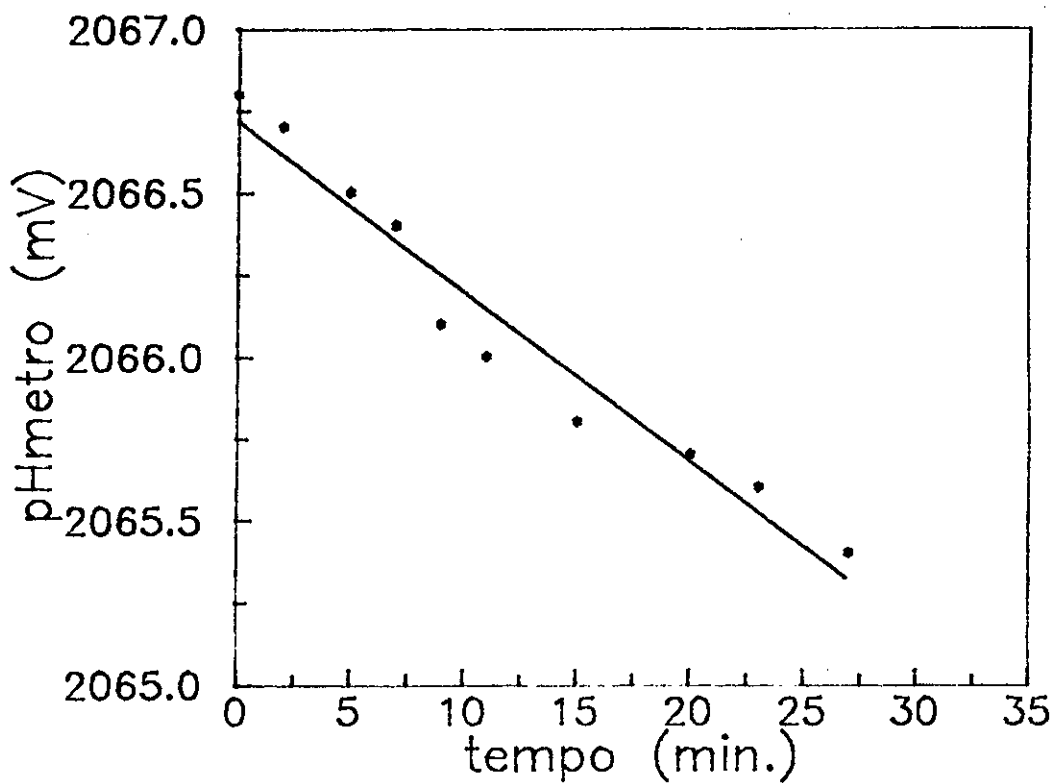


Figura 2.7: Dependência da variação da resposta do glucosímetro em função do tempo, para $I = 20,28 \text{ W/m}^2$.

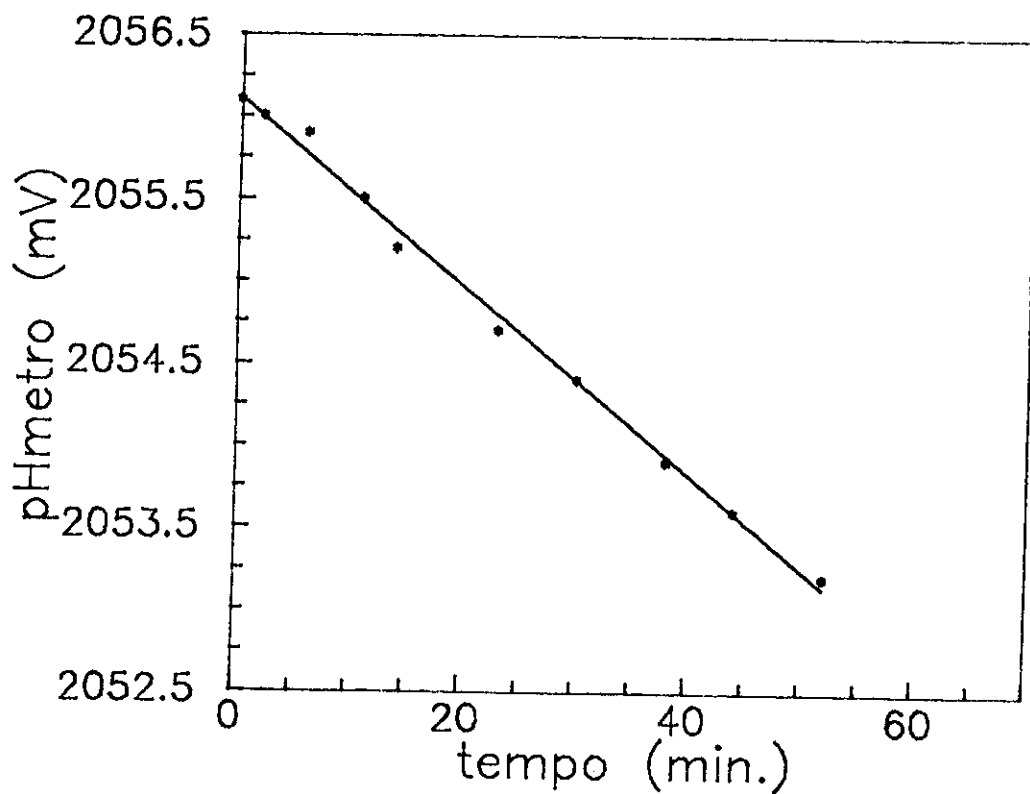


Figura 2.8: Dependência da variação da resposta do glucosímetro em função do tempo, para $I = 26,20 \text{ W/m}^2$.

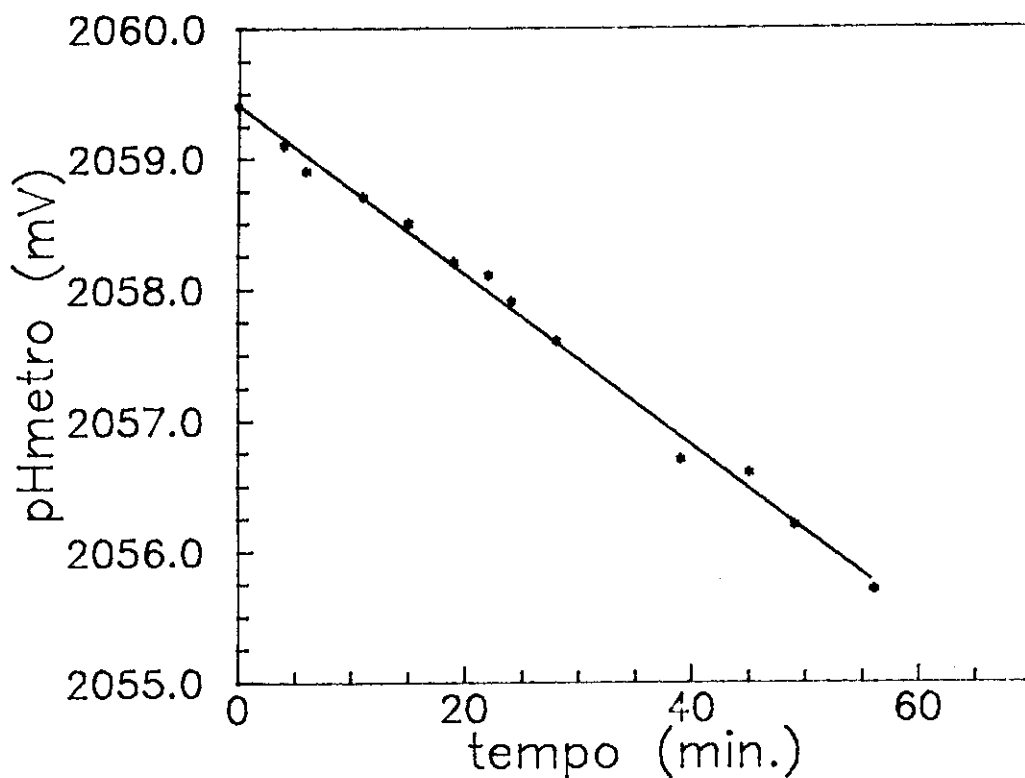


Figura 2.9: Dependência da variação da resposta doglucosímetro em função do tempo, para $I = 32,12 \text{ W/m}^2$.

$$Y = et + f \quad (2.4)$$

onde o coeficiente “e” nos dá a variação da pressão parcial em um determinado tempo t e, Y fornece a pressão parcial nesse tempo.

Utilizando os dados obtidos na calibração e aplicando na equação 2.4 obtemos:

$$Y(1) = 0,098t + 131,25 \quad (2.5)$$

$$Y(2) = 0,108t + 151,25 \quad (2.6)$$

$$Y(3) = 0,123t + 145,03 \quad (2.7)$$

As equações 2.5, 2.6 e 2.7, representam as pressões parciais em qualquer tempo t e, suas inclinações são as variações das pressões parciais de O_2 na unidade de tempo. Portanto, com uso dos coeficientes de t , nas equações 2.1 e 2.3 obtemos as concentrações de O_2 em $\text{mg l}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Considerando o volume da câmara do eletrodo de Clark ($0,58\text{cm}^2$) e a área iluminada da folha, foi possível determinar a concentração do oxigênio evoluído em $\mu\text{g m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Com a técnica OPC calculamos o efeito negativo como sendo a diferença entre o sinal total (ver capítulo 4) e a componente térmica do sinal; os resultados foram correlacionados com os obtidos através do eletrodo de Clark, mostrados na figura 2.10.

O resultado do ajuste linear para os pontos foi $Y = 0,08X + 0,97$. Utilizando essa expressão podemos quantificar o oxigênio evoluído de uma folha vegetal, obtido com a célula aberta “in vivo” e “in situ”.

Na tabela 2.1 mostramos os resultados obtidos na quantificação do oxigênio evoluído de folhas de milho, utilizando o efeito negativo observado com a técnica OPC e calculado com a equação da curva de calibração.

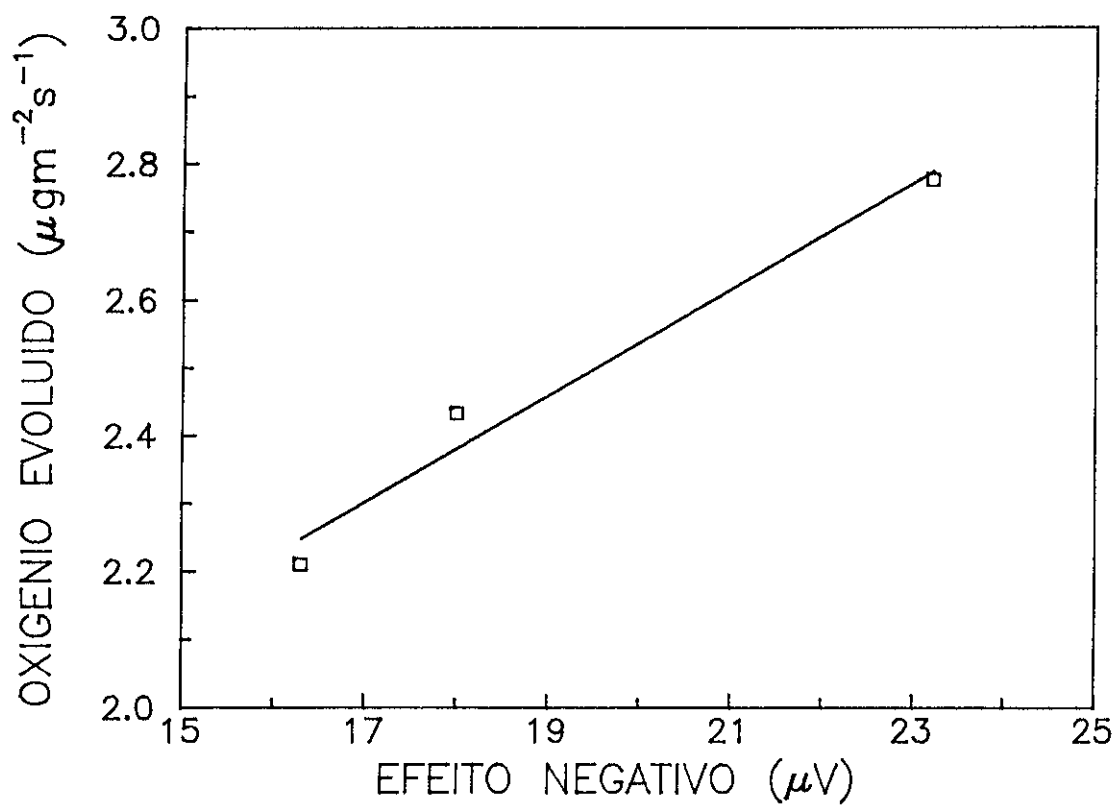


Figura 2.10: Resultados obtidos na calibração da OPC com o eletrodo de Clark.

Tabela 2.1: *Relação entre o efeito negativo e o oxigênio evoluído de folhas de milho.*

Efeito Negativo (μV)	Oxigênio Evoluído ($\mu g.m^{-2}s^{-1}$)
2,0	0,16
3,2	0,26
3,7	0,30
3,9	0,31
4,7	0,38
5,6	0,45
7,6	0,61
9,5	0,76
11,4	0,91

2.5 Configuração Experimental e Modelo Teórico para Determinar a Rigidez Mecânica de Pericarpos de Milho

2.5.1 Configuração Experimental

Para medir a rigidez mecânica dos pericarpos de milho foi desenvolvido um sistema constituído por uma célula de pressão como porta amostra, representada na figura 2.11. Essa célula é um cilindro metálico de 1 polegada de diâmetro com orifício central medindo 1.5 mm de raio no topo. O orifício comunica-se com a entrada de ar comprimido por um duto, através do qual submetemos as várias pressões. A amostra é ajustada no topo do cilindro e fixada por meio de uma tampa, também com furo central de 3 mm de diâmetro, rosqueada no corpo do cilindro.

O sistema completo para estes experimentos é constituído, além da célula acima descrita, por um medidor mecânico de pressão (Dinaltex, com capacidade para até 150 PSI) acoplado ao circuito de forma a medir a pressão do ar confinado na célula. A transferência e a retenção do ar na célula de pressão foi controlada por uma válvula de fluxo do tipo agulha.

Como fonte de luz incidente na amostra foi usado um laser de He-Ne. A detecção foi feita através de um fotodiodo (EG & G Judson, UV100BQ) com área ativa de $5,1mm^2$,

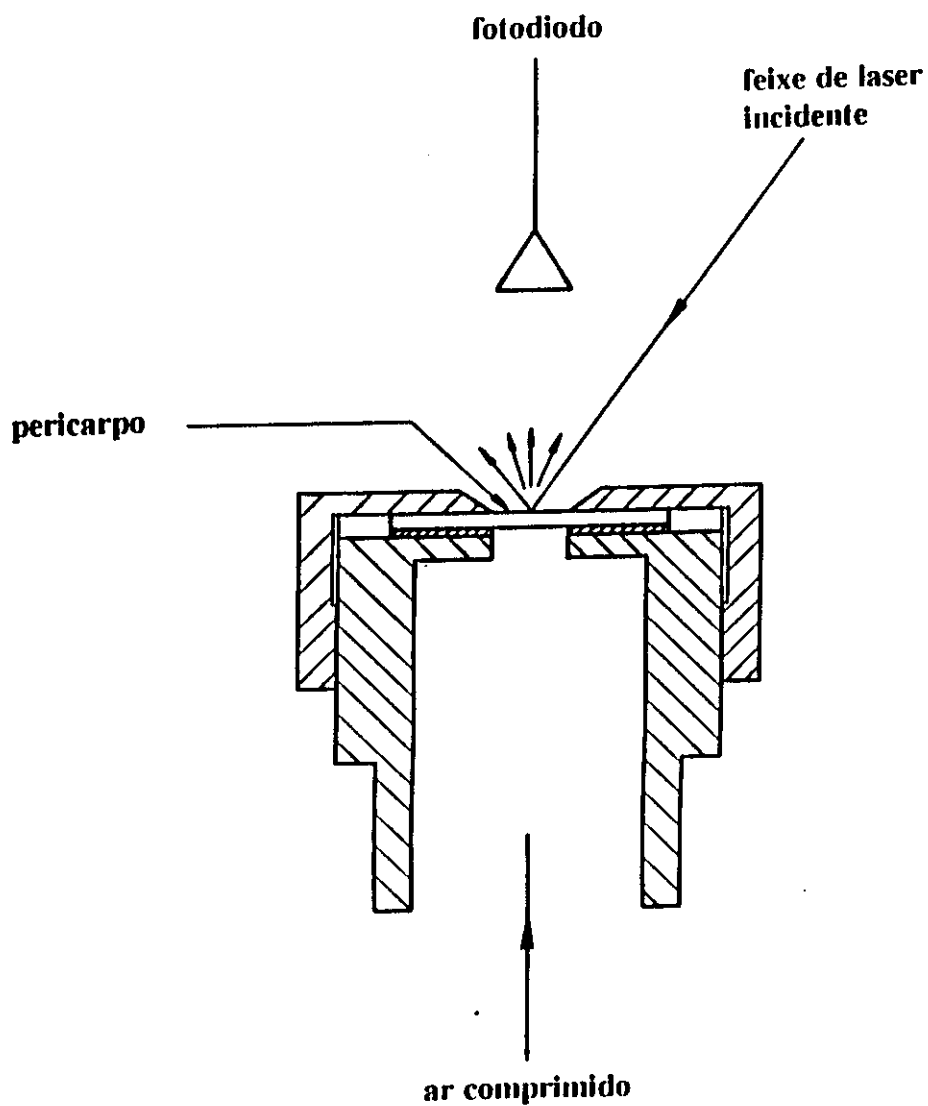


Figura 2.11: *Célula de pressão utilizada para as medidas de rigidez mecânica de pericarpo de milho.*

posicionado em frente da amostra, onde captava a radiação difusa emitida pelo pericarpo.

A fototensão foi medida por um registrador gráfico, XY (HP, 7100BM-12). Os registros eram feitos com e sem pressão na amostra.

A figura 2.12 mostra a montagem completa do sistema.

2.5.2 Modelo Teórico

Consideremos que uma membrana de raio “a” e espessura “l” seja iluminada com um laser e submetida a uma pressão ΔP . A reflexão difusa emitida pela superfície da amostra, atuando como fonte pontual, sensibiliza um fotodiodo com intensidade que varia com o inverso do quadrado da distância (s^{-2}) entre a fonte e o detetor. A pressão (ΔP) aplicada na membrana produz um deslocamento, $u(r)$, de sua posição de equilíbrio (r), que é inversamente proporcional à sua rigidez mecânica. A flexão da membrana é dada [5] pela solução da equação:

$$D\nabla^4 u = \Delta P \quad (2.8)$$

onde $D = \frac{Eh^3}{12(1-\nu^2)}$ é a rigidez flexural da membrana; E e ν são, respectivamente, o módulo de Young e a razão de Poisson.

A solução da equação 2.8 é dada por

$$u(r) = u_0 \left(1 - \frac{r^2}{a^2} \right)^2 \quad (2.9)$$

onde $u_0 = \frac{\Delta P a^4}{64D}$, tal que o deslocamento médio da membrana é,

$$\bar{u} = \frac{u_0}{3} = \frac{\Delta P a^4}{192D} \quad (2.10)$$

Desta expressão observamos que a membrana mais rígida permite menor deslocamento médio quando submetida a uma pressão ΔP .

Considerando que o fotodiodo utilizado em nossas medidas tem área, A_d , posicionado à distância, s , do centro do pericarpo, e denotando por J a intensidade da fonte luminosa gerando resposta (S) no fotodiodo, o sinal detetado pode ser escrito como:

$$S = \kappa \frac{J A_d}{s^2} \quad (2.11)$$

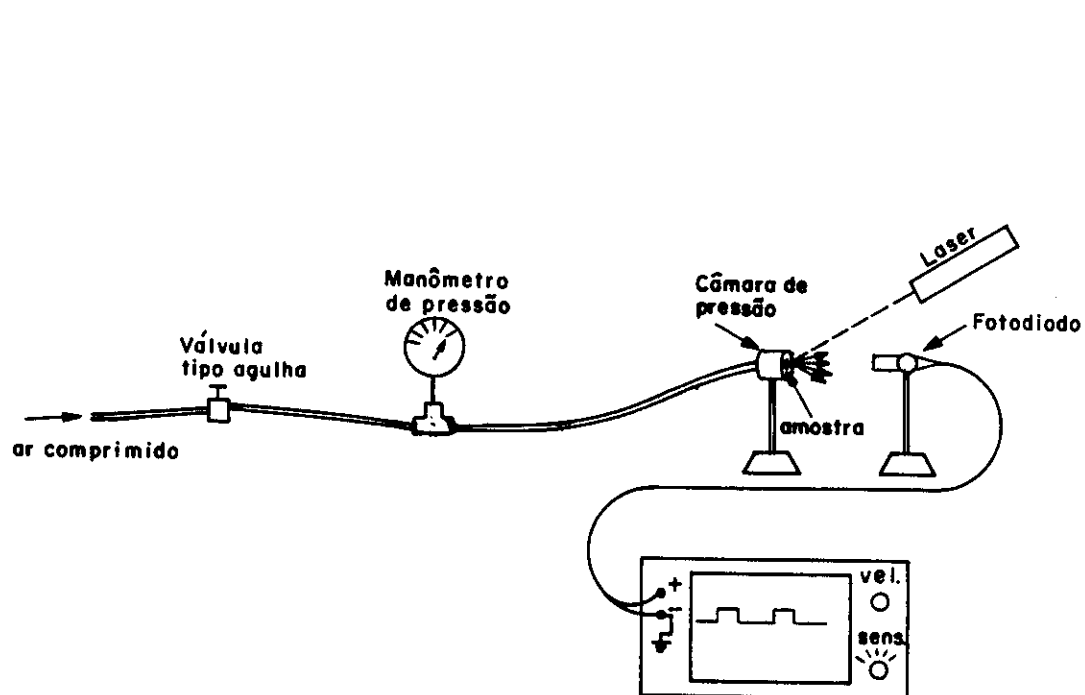


Figura 2.12: *Montagem experimental para determinar a rigidez mecânica de pericarpos de milho.*

Para uma pressão, ΔP , aplicada, $s = s_0 \bar{u}$, onde s_0 é a distância inicial entre a amostra e o detetor. Para pequenos deslocamentos, a equação 2.11 se reduz para

$$S = \kappa \frac{JA_d}{s^2} \left(1 + \frac{2\bar{u}}{s_0} \right) = S_0 + \Delta S \quad (2.12)$$

onde $S_0 = \kappa \frac{JA_d}{s_0^2}$ é o sinal de saída do fotodiodo sem pressão aplicada e $\Delta S = S_0 \frac{2\bar{u}}{s_0}$ é a variação do sinal devido à pressão, (ΔP) , aplicada. Combinando as equações 2.10 e 2.12, encontramos

$$D = \frac{\Delta P a^4}{96 s_0 \left(\frac{\Delta S}{S_0} \right)} \quad (2.13)$$

De acordo com a equação 2.13 torna-se necessário obter, no experimento, as intensidades do sinal de saída do fotodiodo correspondentes à amostra, sem e com pressão, para determinar a rigidez mecânica.

2.6 Técnica Fotoacústica da Diferença de Fase de Dois Feixes

A difusividade térmica (α) é uma quantidade de interesse físico, pois mede a taxa de difusão do calor em um material, inclusive em sistemas biológicos. Sua determinação permite encontrar o valor da condutividade térmica, se a densidade (ρ) e a capacidade térmica (C), em pressão constante, são conhecidas através da relação:

$$\alpha = \frac{k}{\rho C} \quad (2.14)$$

O primeiro método para determinar a difusividade térmica foi introduzido por Angström [6] no início de 1861. Consiste no aquecimento periódico de um ponto numa barra, sendo a oscilação da temperatura medida em outro ponto. A diferença de fase (ϕ) da oscilação térmica entre dois pontos quaisquer fornecem uma precisa determinação de α , como foi feito por Hirschman et al. [7].

Vários métodos utilizando o efeito fotoacústico foram desenvolvidos para medida de α . Adams e Kirkbrigh [8] calcularam α de várias amostras através da fase do sinal fotoacústico, obtido da iluminação da face traseira da amostra ($f^{1/2}$), onde f é a frequência

de modulação da fonte luminosa. Esses autores supuseram que $\phi = l_s a_s$, onde $a_s = (\phi/2\alpha)^{1/2}$ e, l_s , a espessura da amostra; isto é uma aproximação para o caso termicamente grosso ($l_s a_s > 1$).

Outra forma para medida de α foi introduzida por Yasa e Armer [9], que mediram a atenuação do sinal da iluminação traseira em relação ao sinal de iluminação frontal. No experimento desses autores a amostra, de formato plano, era presa por suas bordas de forma a não repousar em nenhum suporte.

Em 1986, Pessoa et al. [10] propuseram um novo método para medida da difusividade térmica denominado "Técnica da diferença de fase de dois feixes" (T2F). Essa técnica utiliza a montagem experimental sugerida por Yasa e Amer e mede a diferença de fase entre os sinais frontal e traseiro. A expressão teórica é derivada do modelo de RG, usando as condições para absorção superficial ($\beta_s l_s \gg 1$; $\beta_s \gg a_s$) e tendo o ar como suporte.

A razão entre as intensidades dos sinais frontal e traseiro (das equações 1.24 e 1.25) é dada por:

$$\frac{S_f}{S_t} = \frac{\beta_f I_f}{\beta_t I_t} \left\{ \cosh^2(l_s a_s) - \sinh^2(l_s a_s) \right\}^{1/2} \quad (2.15)$$

e

$$tg \Delta \phi = tg h z . tg z \quad (2.16)$$

onde $z = l_s a_s$.

A equação 2.15 foi utilizada por Yasa e Armer para calcular α a partir da declividade dos valores S_f/S_t para várias frequências.

No método T2F usa-se a equação 2.16 medindo-se a diferença de fase dos sinais frontal e traseiro em única frequência (f) de modulação, fornecendo o produto $l_s a_s$. Assim, conhecendo a espessura l_s da amostra, obtém-se α_s , pois

$$\alpha_s = \frac{l_s^2}{z^2} \pi f = \pi f \frac{1}{a_s^2} \quad (2.17)$$

A vantagem da técnica é que não depende de calibrações precisas das intensidades dos feixes incidentes na amostra e nem de condições idênticas de polimento nas duas faces para que β_f e β_t sejam iguais. Esta técnica tem sido aplicada, com sucesso, na

de modulação da fonte luminosa. Esses autores supuseram que $\phi = l_s a_s$, onde $a_s = (\phi/2\alpha)^{1/2}$ e, l_s a espessura da amostra; isto é uma aproximação para o caso termicamente grosso ($l_s a_s > 1$).

Outra forma para medida de α foi introduzida por Yasa e Armer [9], que mediram a atenuação do sinal da iluminação traseira em relação ao sinal de iluminação frontal. No experimento desses autores a amostra, de formato plano, era presa por suas bordas de forma a não repousar em nenhum suporte.

Em 1986, Pessoa et al. [10] propuseram um novo método para medida da difusividade térmica denominado "Técnica da diferença de fase de dois feixes" (T2F). Essa técnica utiliza a montagem experimental sugerida por Yasa e Amer e mede a diferença de fase entre os sinais frontal e traseiro. A expressão teórica é derivada do modelo de RG, usando as condições para absorção superficial ($\beta_s l_s \gg 1$; $\beta_s \gg a_s$) e tendo o ar como suporte.

A razão entre as intensidades dos sinais frontal e traseiro (das equações 1.24 e 1.25) é dada por:

$$\frac{S_f}{S_t} = \frac{\beta_f I_f}{\beta_t I_t} \left\{ \cosh^2(l_s a_s) - \sen^2(l_s a_s) \right\}^{1/2} \quad (2.15)$$

e

$$tg\Delta\phi = tghz.tgz \quad (2.16)$$

onde $z = l_s a_s$.

A equação 2.15 foi utilizada por Yasa e Armer para calcular α a partir da declividade dos valores S_f/S_t para várias frequências.

No método T2F usa-se a equação 2.16 medindo-se a diferença de fase dos sinais frontal e traseiro em única frequência (f) de modulação, fornecendo o produto $l_s a_s$. Assim, conhecendo a espessura l_s da amostra, obtém-se α_s , pois

$$\alpha_s = \frac{l_s^2}{z^2} \pi f = \pi f \frac{1}{a_s^2} \quad (2.17)$$

A vantagem da técnica é que não depende de calibrações precisas das intensidades dos feixes incidentes na amostra e nem de condições idênticas de polimento nas duas faces para que β_f e β_t sejam iguais. Esta técnica tem sido aplicada, com sucesso, na

determinação da difusividade térmica de amostras opacas e transparentes [11,12]. É adequada para o caso no qual o mecanismo de geração do sinal predominante (em baixas frequências) é a difusão térmica.

Na figura 2.13 mostramos a célula fotoacústica utilizada na detecção usando a técnica T2F.

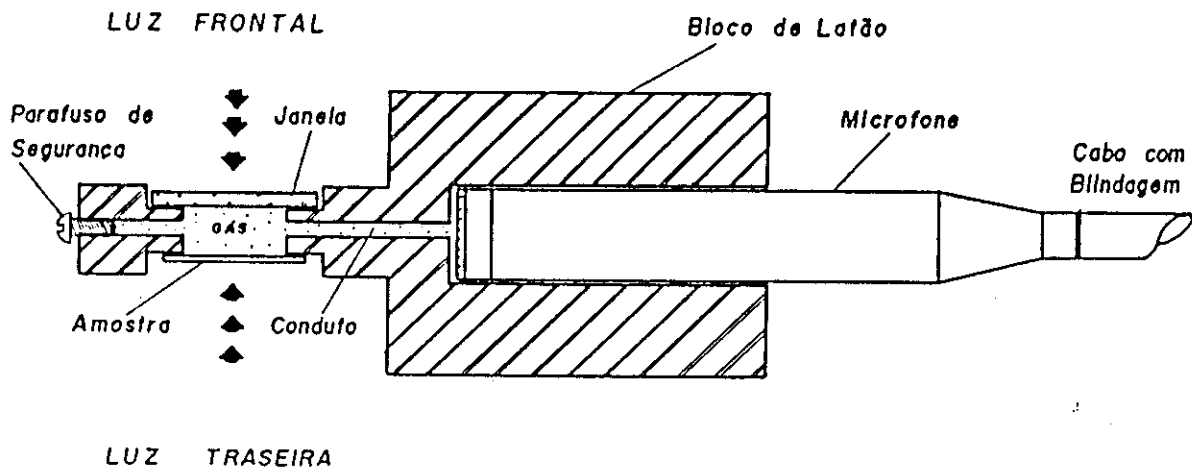
Em amostras termicamente fina ($l_s a_s < 1$) o sinal fotoacústico, obtido com incidência traseira de luz, decresce na forma $f^{-1.5}$ a medida que a frequência de modulação cresce. Se a amostra é termicamente grossa ($l_s a_s > 1$), o sinal comporta-se na forma $(1/f) e^{(-A_s f^{1/2})}$, onde $A_s = l_s (\pi/\alpha_s)^{1/2}$. Para os outros mecanismos de geração do sinal, no regime termicamente grosso, o sinal gerado por incidência traseira em amostras com absorção superficial, comporta-se na forma f^{-1} . Portanto, podemos garantir a predominância de certo mecanismo de geração do sinal fotoacústico através do comportamento da amplitude do sinal com incidência de luz na parte traseira da amostra.

No caso de amostras transparentes [13] a condição de absorção superficial é satisfeita usando-se uma folha de alumínio de aproximadamente $20\mu m$ de espessura em cada face da amostra, de acordo com a figura 2.14. O contato térmico entre o alumínio e a amostra é feito por uma fina camada de óleo.

2.7 Determinação da Capacidade Térmica por Unidade de Volume (ρC)

As condutividades térmicas dos pericarpos de milho comum e de pipoca foram calculadas com auxílio da difusividade térmica e da medida de ρC , obtida pelo método da elevação (ou descida) da temperatura por iluminação contínua.

O método baseia-se na subida (ou descida) da temperatura do material sob iluminação contínua [14,15]. Cada amostra foi suspensa adiabaticamente dentro de um "dewar" no qual foi estabelecido vácuo na ordem de 10^{-3} torr. A radiação de uma lâmpada (halógena de 250W/24V) chega até um face da amostra através de uma janela no "dewar". A outra face da amostra é termicamente ligada a um termopar (Chromel-Alumel) que monitora a temperatura no tempo; o contato térmico foi estabelecido com pasta térmica. As amostras medindo $5 \times 5mm$, e espessuras entre 50 e $110\mu m$, foram pintadas com fina camada de tinta preta para garantir absorção superficial e tornar conhecida a



CÉLULA P.A. PARA DOIS FEIXES.

Figura 2.13: Célula fotoacústica para a T2F. A amostra é usada como vedação da célula. Na face oposta a vedação é com janela de quartzo.

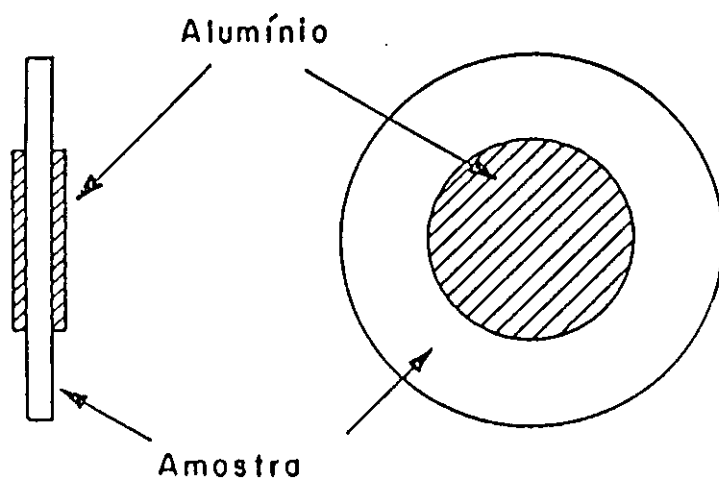


Figura 2.14: *Amostra transparente com folha de alumínio para garantir absorção superficial.*

emissividade ($\epsilon = 1$). A figura 2.15 mostra os detalhes da câmara utilizada na medida de ρC .

Considerando que, no arranjo descrito, não haja perda de calor por condução ou convecção, a potência efetivamente aproveitada para o aquecimento da amostra (dQ/dT) é dada pela diferença entre a potência incidente (P_0) e a perda de potência por radiação (L), ou seja

$$\frac{dQ}{dt} = P_0 - L \quad (2.18)$$

com

$$L = A\epsilon\sigma (T^4 - T_0^4) \quad (2.19)$$

onde A é a área da amostra; ϵ , a emissividade; T_0 , a temperatura inicial; T , a temperatura final e, $\sigma = 5,67 * 10^{-12} W/cm^2 K^4$, a constante de Stefan-Boltzmann.

Escrevendo $T = T_0 + \Delta T$ então,

$$T^4 = T_0^4 + 4T_0^3\Delta T + 6T_0^2\Delta T^2 + \dots \quad (2.20)$$

Considerando o limite em que $\Delta T \ll T_0$, e substituindo a equação 2.19 em 2.20, obtemos:

$$L \approx A\epsilon\sigma 4T_0^3\Delta T \quad (2.21)$$

Por outro lado, a variação de temperatura na amostra (ΔT) gera uma energia dada por

$$Q = \rho CV\Delta T \quad (2.22)$$

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

A variação temporal de 2.22 é,

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = \rho CV \frac{\partial T}{\partial t} \quad (2.23)$$

Comparando a expressão 2.23 com 2.18 e substituindo a equação 2.21, obtemos:

$$\rho CV \frac{\partial T}{\partial t} - H\Delta T = P_0 \quad (2.24)$$

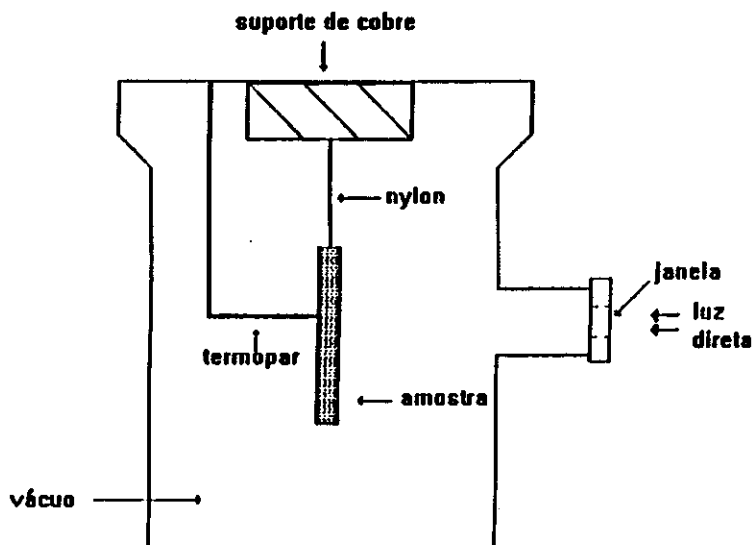


Figura 2.15: Câmara utilizada na medida da capacidade térmica por unidade de volume.

onde $H = A\epsilon\sigma 4T_0^3$,

A solução da equação diferencial acima, com a condição de contorno $\Delta T(0) = 0$, é dada por [14],

$$\Delta T(t) = \frac{P_0}{H} (1 - e^{-t/\tau_s}) \quad (2.25)$$

com,

$$\tau_s = \frac{l\rho C}{8\epsilon\sigma T_0^3} \quad (2.26)$$

onde l é a espessura da amostra.

A partir do parâmetro τ_s , podemos determinar a capacidade térmica por unidade de volume (ρC) através do ajuste dos dados experimentais, da subida da temperatura em função do tempo, com a expressão 2.25.

Após atingir o equilíbrio térmico ($L = P$), a temperatura da amostra fica saturada. Interrompendo o feixe incidente, a temperatura desce na forma,

$$\Delta T(t) = \frac{P_0}{H} e^{-t/\tau_d} \quad (2.27)$$

onde $\frac{P_0}{H}$ é a variação máxima da temperatura na subida.

2.8 Preparação das Amostras

Nesta secção descreveremos a preparação das amostras utilizadas nos diversos experimentos, por nós desenvolvidos, tanto para as medidas utilizando a técnica fotoacústica quanto para as técnicas complementares.

2.8.1 Pericarpo de Milho

Para remover os pericarpos, os grãos das variedades de milho estudadas foram postos em água durante um período de 4 a 6 horas. Após esse tempo cada grão foi cortado em todo seu perímetro com uso de bisturi; em seguida o pericarpo foi removido com uma pinça fina.

Seguindo a remoção, com os pericarpos agrupados pela espécie e variedade (descritas no capítulo 3) foram colocados entre duas folhas de papel tipo ofício e submetidos à pressão de um bloco metálico com massa de aproximadamente 2Kg, dentro de um dessecador durante o tempo de 24 horas. O objetivo desse processo foi proporcionar a configuração plana para os pericarpos, de forma a ajustarem-se aos diversos equipamentos de medidas.

No experimento com a célula fotoacústica de dois feixes, onde são necessárias amostras opacas, utilizamos dois discos de alumínio com diâmetro de 5mm e espessura de 20 μ m, fixados com uma fina camada de óleo, conforme descrito na referência 13.

Nas medidas de capacidade térmica por unidade de volume, os pericarpos foram pintados com tinta preto fosco proporcionando a absorção que o método requer [15], aproximando a emissividade da amostra para 1, semelhante ao corpo negro.

No caso da rigidez mecânica não foi necessária nenhuma preparação especial para os pericarpos de milho, entretanto cuidados foram tomados, a fim de não pressionar demais as amostras, evitando enfraquecimento na área submetida à pressão do ar.

2.8.2 Plantio e Crescimento de Soja e Milho

As amostras de soja, em número de dez plantas foram semeadas pelo Prof. Dr. Paulo Mazafera (IB-UNICAMP) e crescidas em vasos adequados para utilização em nosso laboratório. Cinco delas, denominadas controle, identificadas com numeração de 1 a 5, e cinco outras, com numeração de 6 a 10, chamadas experimento. Estas últimas foram tratadas com várias doses de nitrato de cádmio ($Cd(NO_3)_2$) a 100ppm diluída na proporção de 25ml para 1, 5l de água, em intervalos de 5 em 5 dias; enquanto que as do controle não foram submetidas à solução. O início do tratamento ocorreu quando as plantas estavam com 24 dias após o plantio e todas elas cresceram numa pequena casa de vegetação construída nas proximidades do laboratório. As primeiras experiências ocorreram com as plantas controle e experimento, antes da aplicação do nitrato de cádmio (descritas no capítulo 4), e constam da caracterização geral das amostras.

As amostras de milho, para os primeiros experimentos, foram produzidas, selecionadas e semeadas no laboratório de Genética Vegetal pelo Prof. Dr. William José da Silva (IB-UNICAMP); constituíam cinco grupos compostos por um híbrido, denominado

F1, e seus pais que eram linhagens puras ou parentais. Cada tipo de planta contava com cinco amostras de mesma idade. O início dos experimentos com milho ocorreu quando as amostras estavam com 20 dias após o plantio.

Visando manter sempre as mesmas condições iniciais das plantas, a partir do segundo conjunto de grupos passamos a condicionar todas as amostras em estufa com luz artificial. A estufa mede 70cm de largura, 150cm de comprimento e 70cm de altura; a iluminação é feita por quatro lâmpadas fluorescentes de 40W e, cinco incandescentes de 15W. A intensidade luminosa no interior da estufa garante iluminação e calor necessários para assegurar o desenvolvimento das plantas durante o período dos experimentos (em geral duram uma semana).

As amostras de milho, para os experimentos nos quais havia incubação no escuro, foram semeadas pela Prof. Dra. Laudénir M. Prioli utilizando sementes de mesma origem das anteriores. As incubações foram feitas numa caixa de papelão medindo 80cm de altura com 60cm de lado e, fechada com pano preto, espesso, de forma a bloquear a entrada de luz.

Referências Bibliográficas

- [1] Pontes, T.A., Tese de Doutorado, IB-UNICAMP (1990).
- [2] Delieu, T.J. and Walker, D.A.; Plant. Physiol. 73(1983)534.
- [3] Radelkis Eletrochemical Instruments; Biological Mikro Analyzer, Type OP-210/3; Operating Manual.
- [4] Analisador de O₂ FAC 204; Manual de Operação.
- [5] Timoshenko, S.; Theory of Plates and Shells, McGraw-Hill, New York (1940).
- [6] Angström, A.J.; Annalen der Physik, 64(1881)513.
- [7] Hirschman, A., Dennis, J., Derken, W. and Monahan, T.; In International Developments in Heat Transfer, Part IV(ASME, New York)(1961)863.
- [8] Adams, M.J. and Kirkbringth, G.F.; Analyst, 102(1977)281.
- [9] Yasa, Z. and Amer, N.M.; Topical Meeting on Photoacoustic Spectroscopy, AMES (1979)WA5.
- [10] Pessoa Jr., O., Cesar, C.L., Patel, N.A. and Vargas, H.; Ghizoni, C.C. and Miranda, L.C.M.; J.Appl.Phys.59(4)(1986).
- [11] Bento, A.C., Vargas, H., Aguiar, M.M.F. and Miranda, L.C.M.; Phys. Chem. Glasses, 28(3)(1987)127.
- [12] Silva, E.C., Vargas, H., Bento, A.C., Jardim, R.F., Gama, S., Pinheiro, E.A. and Galembeck, F.; Progress in High Temperature Superconductivity, Vol.9, World Scientific.(1987).
- [13] Mansanares, A.M., Tese de Doutorado, IFGW-UNICAMP (1991).
- [14] Mansanares, A.M., Bento, A.C., Vargas, H., Leite, N.F. and Miranda, L.C.M.; Physical Review B, 42(7)(1990)4477.
- [15] Bento, A.C., Tese de Doutorado, IFGW-UNICAMP (1990).

Capítulo 3

Determinação das Propriedades Térmicas e Mecânicas de Pericarpo de Milho Comum e de Pipoca.

3.1 Introdução

Neste capítulo apresentaremos estudos do pericarpo de milho comum e de pipoca, utilizando o efeito fotoacústico para determinar a difusividade térmica, e em conjunto com a técnica da elevação da temperatura por iluminação contínua, calcular a condutividade térmica. A rigidez mecânica foi obtida por experimento no qual, a reflexão difusa do pericarpo incide num fotodiodo cuja resposta está relacionada com a curvatura da amostra submetida a certa pressão.

A teoria do vaso de pressão apresentada neste capítulo faz a conexão entre as propriedades térmicas e mecânicas, com o objetivo de determinar o mecanismo de estouro da pipoca.

Foram analisados os pericarpos de quatro espécies de milho comum e duas de milho de pipoca, denominadas pelo Prof. Dr. William José da Silva (IB. UNICAMP) por C08, C10, C12, C16 e P60, P61. As letras C e P representam milho comum e de pipoca, respectivamente, enquanto que os números representam as variedades resultantes de diferentes cruzamentos genéticos.

Estudos com este objetivo têm sido desenvolvidos na área de agronomia [2], desde a primeira metade deste século [3], visando o melhoramento das espécies com habilidade

de estourar para atender ao mercado consumidor.

3.2 Medidas de Difusividade Térmica (α) e Capacidade Térmica por Unidade de Volume (ρC)

As difusividades térmicas dos pericarpos de milho comum e de milho de pipoca foram determinadas com uso da técnica fotoacústica da diferença de fase de dois feixes, descrita no capítulo 2.

A absorção superficial foi garantida com a fixação das folhas de alumínio com fina camada de óleo, visto que as amostras são transparentes à radiação incidente, neste caso, um feixe de laser de argônio operando com 80 mW de potência, no modo multilinha (faixa de 457.9 a 514.5 nm) em todas as medidas.

O mecanismo de geração de calor predominante foi o de difusão térmica devido ao comportamento termicamente grosso das amostras na faixa de frequências utilizada (entre 10 e 50 Hz), conforme mostram as figuras 3.1a e 3.1b, para as espécies de milho comum C10 e, para o milho de pipoca P61, respectivamente. Observamos que a amplitude do sinal traseiro é dominada pelo comportamento exponencial ($\frac{1}{f} \exp(-a\sqrt{f})$), como prevê o modelo de difusão térmica para amostras termicamente grossas. . Essa faixa de frequências ficou definida após varredura inicial, em faixa maior, observando-se a mudança de regime de termicamente fino para termicamente grosso. Usando as diferenças de fase dos sinais frontal e traseiro e aplicando as expressões 2.16 e 2.17 calculamos a difusividade térmica de cada pericarpo.

Na tabela 3.1 são apresentados os resultados obtidos para as diversas amostras. Cada valor tabelado é resultante do valor médio de uma série de medidas de cada amostra e variedade.

A condutividade térmica (k) está relacionada com a difusividade térmica (α) através da expressão:

$$\alpha = \frac{k}{\rho c} \quad (3.1)$$

onde o produto entre a densidade (ρ) e o calor específico (c) é a capacidade térmica por unidade de volume do material.

Tabela 3.1: *Resultados das propriedades térmicas dos pericarpos de milho comum e de pipoca para as variedades estudadas.*

Variedades	C10	C12	C16	C08	P60	P61
Difusividade Térmica (α) (cm^2/s) 10^{-3}	0.32	0.45	0.55	0.77	1.42	1.56
Condutividade Térmica (k) mW/cmK	0.62	0.95	1.31	1.79	2.27	2.30
Calor Específico (ρC) $\text{J}/\text{cm}^3 \text{K}$	1.93	2.12	2.37	2.33	1.60	1.45

As medidas de ρc dos pericarpos de milho comum e de pipoca foram obtidas através do método da elevação e diminuição da temperatura sob iluminação contínua, conforme descrito no capítulo 2.

As figuras 3.2a e 3.2b mostram os resultados da subida e descida da temperatura para uma variedade de milho comum (C10) e uma de milho de pipoca (P61). Ajustando-se esses dados de temperatura em função do tempo de iluminação com uso das expressões 2.25 e 2.27 encontramos os valores de ρC . Usando a expressão 3.1 com os valores das difusividades térmicas, já calculados, determinamos as condutividades térmicas dos pericarpos.

Na tabela 3.1 estão os resultados obtidos para a condutividade térmica e capacidade térmica por unidade de volume, onde observamos diferenças bastante acentuadas.

3.3 Medidas de Rigidez Mecânica

A avaliação da rigidez mecânica dos pericarpos foi realizada com uso do sistema constituído de uma célula de pressão, um laser de He-Ne e um fotodiodo, como elementos principais, descritos na secção 2.5. O fotodiodo linearizado com resistor de 500Ω foi fixado à distância de 2cm da amostra; a área exposta do pericarpo foi limitada pela abertura da tampa da câmara de pressão (3mm). O laser com potência de 2mW foi localizado à distância de aproximadamente 30cm da amostra, com ângulo de incidência próximo de

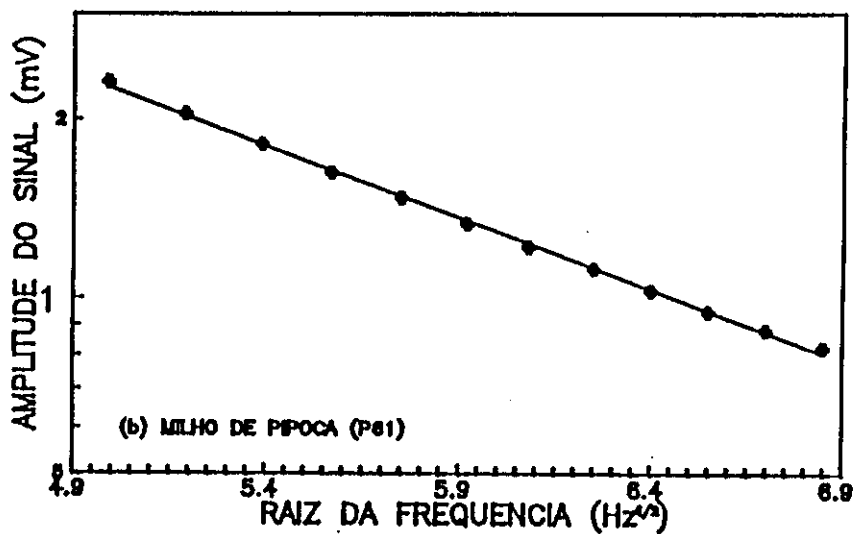
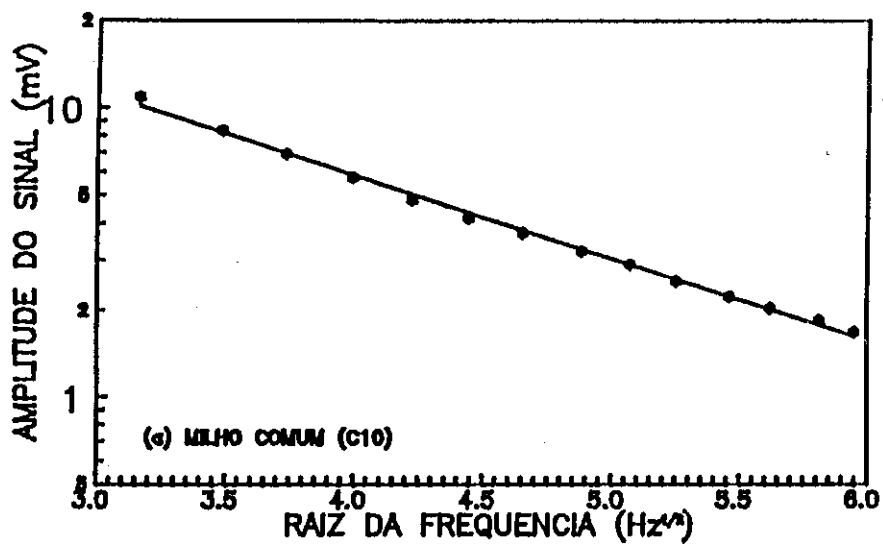


Figura 3.1: Dependência da amplitude do sinal traseiro com a raiz da frequência de modulação para o pericarpo do (a) milho comum e (b) para o milho de pipoca.

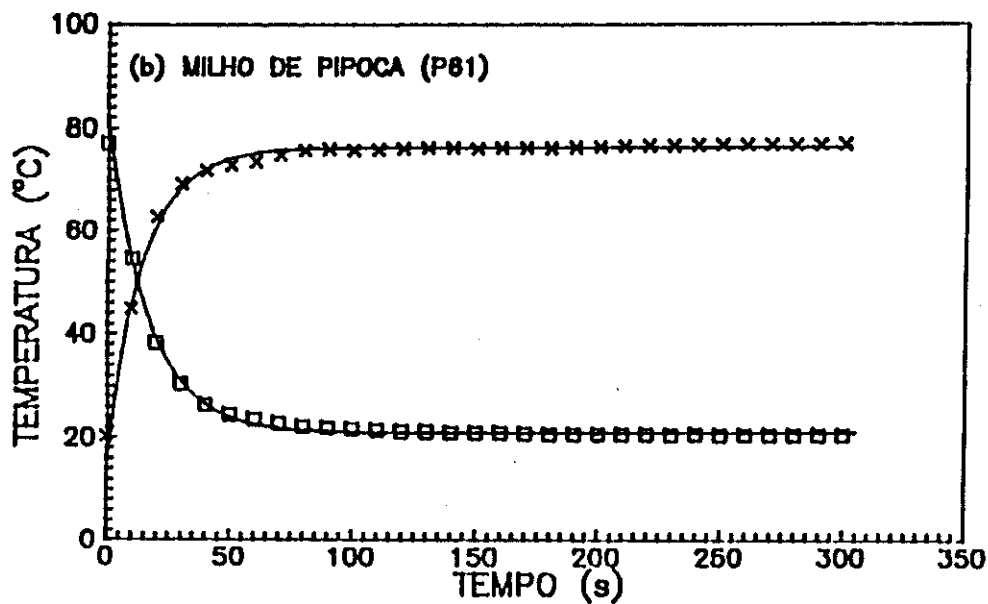
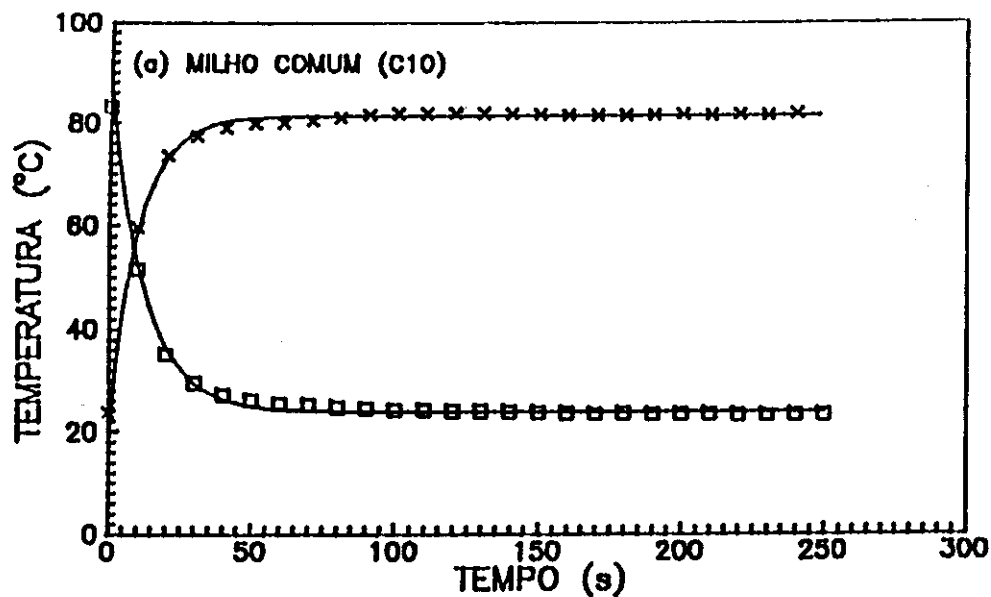


Figura 3.2: Variação da temperatura dos pericarpos de milho comum (a) e de pipoca (b) em função do tempo. As linhas contínuas representam os ajustes pelas expressões 2.22 e 2.24.

Tabela 3.2: *Valores da propriedade mecânica, para os pericarpos de milho comum e de pipoca.*

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

45°.

As pressões que submetemos os pericarpos foram variadas de tal forma a não produzir deformações permanentes. Isto foi verificado através do retorno do sinal no registrador ao nível inicial quando era cessada a pressão em cada amostra.

O registrador XY foi ajustado para velocidade de varredura de 5cms e escala de sensibilidade em 10mV.

Os resultados das pressões, rigidez mecânica e espessuras dos pericarpos são mostrados na tabela 3.2. Esses resultados são valores médios de uma série de medidas.

3.4 Modelo do Vaso de Pressão

O mecanismo de estouro da pipoca tem como fatores principais, bem definidos, a temperatura e a pressão interna dos grãos. Isto mostra que o sistema requer um modelo no qual possamos relacionar essas grandezas físicas, sendo feito através do vaso de pressão [1, 2, e 3].

O grão de milho tem configuração que pode ser representada por um vaso com forma aproximadamente esférica de raio efetivo R , contendo em seu interior amido e água. O material interno tem densidade ρ , condutividade térmica, k e difusividade térmica, α . A troca de calor com sua vizinhança se faz através de uma parede fina (o pericarpo) de espessura l_p e condutividade térmica k_p . O coeficiente de transferência de calor, h , é dado por:

$$h = \frac{k_p}{l_p} \quad (3.2)$$

O vaso inicialmente com temperatura T_0 e pressão P_0 é aquecido com fluxo de calor constante ϕ_0 , então sua temperatura final pode ser determinada através da equação de difusão térmica, escrita na forma,

$$\nabla^2 T = \frac{1}{\alpha} \frac{\partial T}{\partial t} - \frac{1}{k} [\phi_0 \theta(t) - hT] \delta(r - R) \quad (3.3)$$

onde $\theta(t)$ é a função degrau unitária. Usando a técnica da transformada de Laplace, encontramos a solução para a equação 3.3, dada por:

$$T(r, s) = \frac{\phi_0 R}{2sr} \left[\frac{(e^{\sigma r} - e^{-\sigma r})}{h \sinh(\sigma r) + (k/R)(\sigma r \cosh(\sigma r))} \right] \quad (3.4)$$

Calculando a média temporal da temperatura e tomando a transformada de Laplace inversa, encontramos a expressão para a evolução da temperatura no domínio do tempo, dada por:

$$T(t) = \frac{\phi_0}{h} \left[1 - e^{-t/\tau} \right] \quad (3.5)$$

onde $\tau = \frac{R^2}{\alpha}$, é o tempo de relaxação para o vaso atingir a temperatura final $\frac{\phi_0}{h}$.

Podemos concluir, da equação 3.5, que vasos pequenos atingem a temperatura final em menor tempo que vasos maiores. Quanto maior o coeficiente de transferência de calor menor será a temperatura final. Isto significa que os grãos do milho de pipoca, por serem menores e possuírem alto coeficiente de transferência de calor, atingem a temperatura final mais rápido do que os grãos de milho comum. Este último além de ter maiores grãos, têm baixo coeficiente de transferência de calor.

Para as amostras P61 e C10, os comportamentos da temperatura obtidos da equação 3.5, são dados pelas seguintes expressões:

$$T_p(t) = \frac{\phi_0}{h} \left[1 - e^{-x} \right] \quad (3.6)$$

e,

$$T_c(t) = \frac{\phi_0}{h} 1,89 \left[1 - e^{-x/8} \right] \quad (3.7)$$

onde $x = \frac{t}{\tau_p}$; sendo $\tau_c = 8\tau_p$, $h_p = 1,89h_c$.

As curvas para os milho de pipoca e comum obtidas com as expressões 3.6 e 3.7 estão na figura 3.3.

Até aqui desprezamos o fato de que o amido inicia o processo de decomposição na temperatura de aproximadamente 105°C. Passando a considerá-lo, a expressão da temperatura na superfície do vaso, em função do tempo, é obtida fazendo-se $r = R$, e considerando $l\sigma R \gg 1$ na expressão 3.4. Isto resulta em:

$$T(R, s) = \frac{\phi_0}{h} \left[1 - e^{a^2 t} \operatorname{erfc}(at^{-1/2}) \right] \quad (3.8)$$

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

Fazendo $x = a^2 t$, para x pequeno, e considerando que $a_c = 0,5a_p$ e $h_p = 2h_c$, encontramos as expressões para as variedades de milho de pipoca (P61) e comum (C10), respectivamente dados por:

$$T_p(R, t) = \frac{\phi_0}{h_p} \left\{ 1 - e^x \left[1 - \left[1 - e^{-4x/\pi} \right]^{1/2} \right] \right\} \quad (3.9)$$

$$T_c(R, t) = \frac{\phi_0}{h_p} 2 \left\{ 1 - e^{0,25x} \left[1 - \left[1 - e^{-x/\pi} \right]^{1/2} \right] \right\} \quad (3.10)$$

As curvas de temperatura em função do tempo dadas pelas expressões 3.9 e 3.10 estão na figura 3.4.

As expressões para a temperatura no centro do grão ($r = 0$) são obtidas da mesma forma que para a superfície, dadas por:

$$T_p(0, t) = \left[\frac{2\phi_0 R}{k} \right] e^{(\lambda+x)} \left\{ 1 - \left[1 - \exp \left[-\frac{4}{\pi i} \left[\sqrt{x} + \frac{\lambda}{2\sqrt{x}} \right]^2 \right] \right]^{1/2} \right\} \quad (3.11)$$

$$T_c(0, t) = \left[\frac{2\phi_0 R}{k} \right] e^{0,25(2\lambda+x)} \left\{ 1 - \left[1 - \exp \left[-\frac{1}{\pi} \left[\sqrt{x} + \frac{\lambda}{\sqrt{x}} \right]^2 \right] \right]^{1/2} \right\} \quad (3.12)$$

onde $\lambda = \frac{Ra}{\alpha}$.

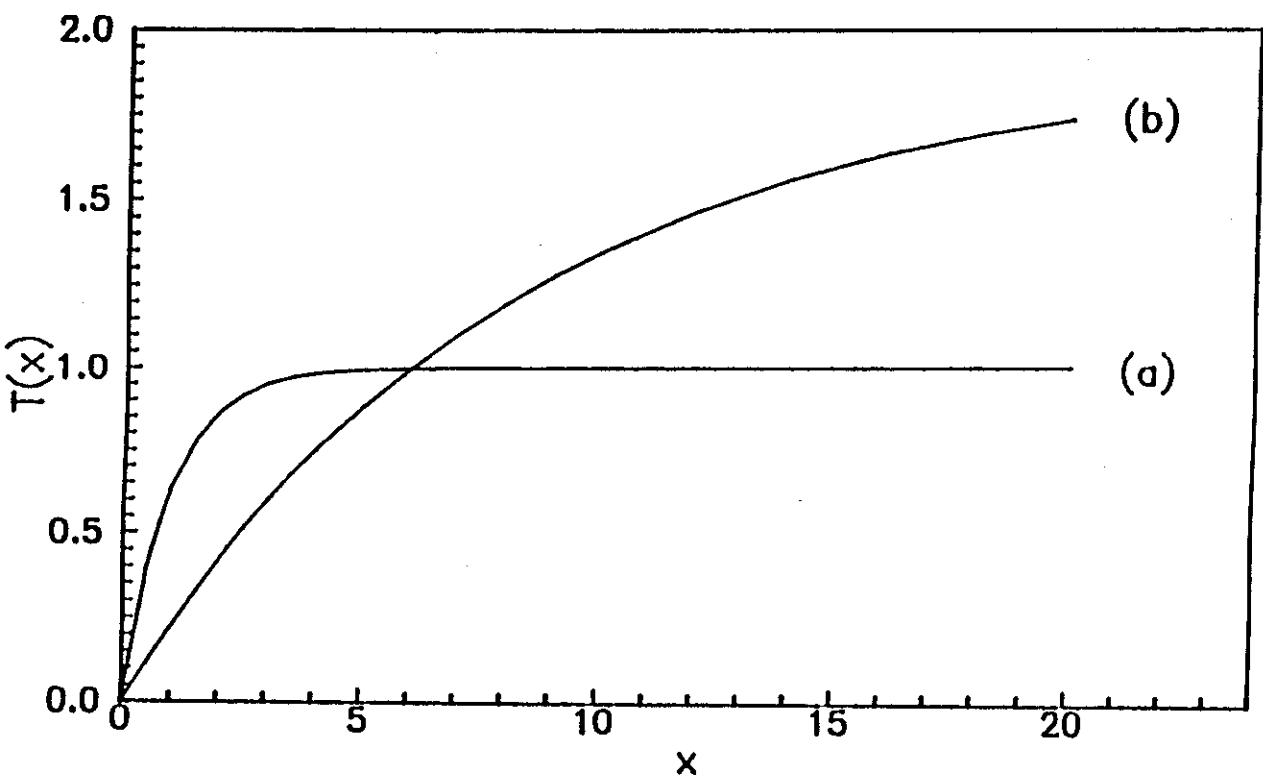


Figura 3.3: Curvas de temperatura em função do tempo ($x = t/\tau_p$) obtidas para pericarpos de milho de pipoca (a) e comum (b), obtidas através das expressões 3.6 e 3.7, respectivamente.

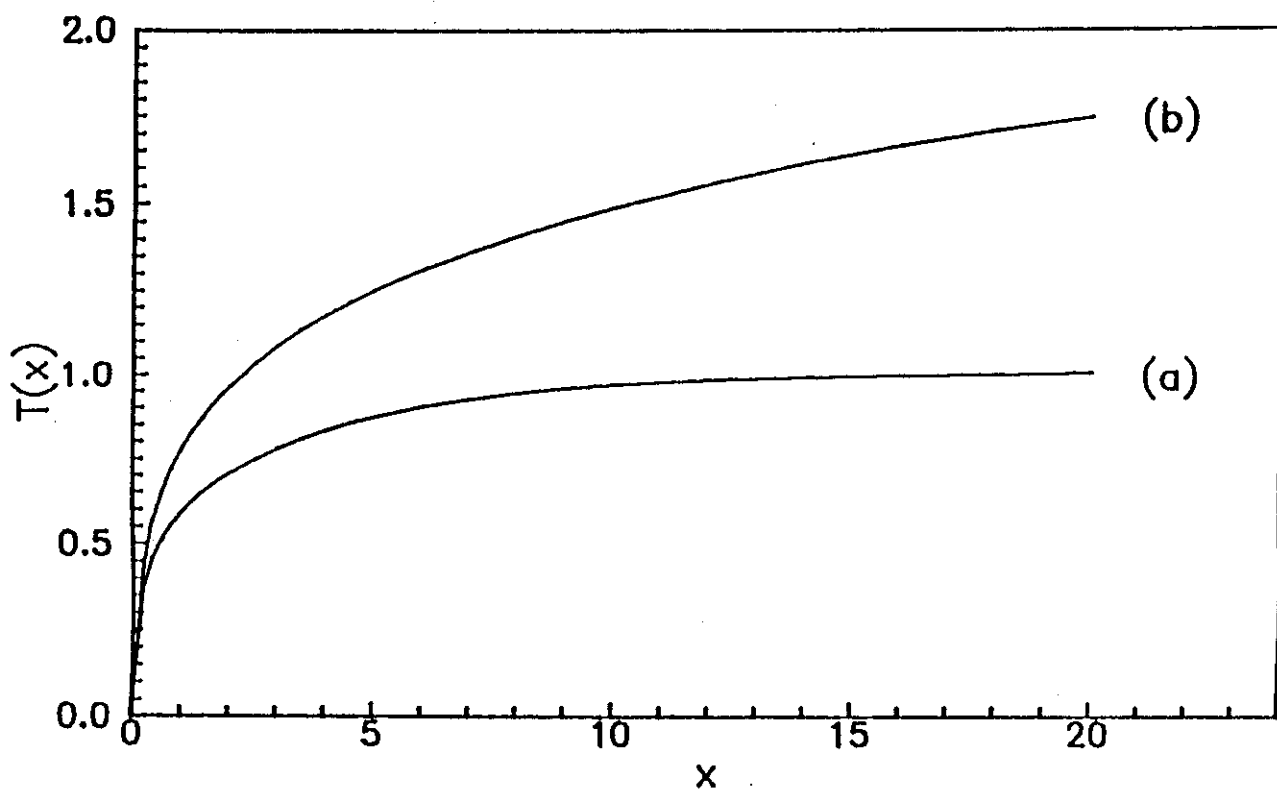


Figura 3.4: Curvas de temperatura em função do tempo ($x = a^2t$) obtidas, para a superfície do amido de milho de pipoca (a) e comum (b), através das expressões 3.9 e 3.10, respectivamente.

3.5 Discussão

Os resultados apresentados na tabela 3.1 mostram que o pericarpo do milho de pipoca tem difusividade e condutividade térmica de aproximadamente 2,9 e 2,0 vezes maior, respectivamente, que as mesmas para o pericarpo do milho comum. Esses valores sugerem que o pericarpo do milho de pipoca é menos amorfo (no sentido de ser estruturalmente mais organizado) do que o pericarpo do milho comum.

Assim sendo é de se esperar que a rigidez mecânica do pericarpo do milho de pipoca seja maior. Isto foi comprovado com os resultados mostrados na tabela 3.2, onde a rigidez mecânica do pericarpo do milho de pipoca é cerca de 4 vezes maior do que esta para o milho comum.

Com o modelo do vaso de pressão relacionamos as propriedades térmicas e mecânica permitindo as seguintes conclusões:

a) Usando os dados térmicos verificamos que o coeficiente de transferência de calor, equação 3.2, é aproximadamente 1,9 vezes maior no pericarpo do milho de pipoca do que no pericarpo do milho comum, proporcionando maior eficiência na transferência de calor para o amido no milho de pipoca, de forma que sua temperatura interna aumenta mais rápida e fortemente, enquanto a temperatura na capa permanece mais baixa que o pericarpo do milho comum. A baixa temperatura minimiza o risco de combustão do pericarpo no momento em que o amido atinge a temperatura para sua máxima expansão. No milho comum, o pericarpo queima-se quando atinge a temperatura na qual ocorre a máxima expansão do amido.

b) A rigidez mecânica do pericarpo do milho de pipoca mostra que este suporta maior pressão que o pericarpo do milho comum, portanto o mecanismo do estouro é favorecido nas variedades de milho de pipoca.

3.6 Aspectos Complementares

As caracterizações térmica e mecânica mostraram perfeita discriminação entre as estruturas dos pericarpos de milho comum e de pipoca. Dos resultados podemos afirmar que o mecanismo de estouro da pipoca está relacionado com o pericarpo.

A expansão máxima do amido ocorre na temperatura de 180°C e pressão de 135PSI,

condições que o milho comum não consegue atingir devido à queima e ruptura de seu pericarpo.

Em observação de microscopia óptica de birrefringência, (feitas pelo Prof. Dr. Benedito Vidal (IB-UNICAMP)), ficou comprovado que o pericarpo do milho de pipoca possui arranjo cristalino da celulose, enquanto que no pericarpo do milho comum o arranjo é fibrilar. Essa diferença estrutural, mostrada na figura 3.5, garante maior rigidez para o pericarpo do milho de pipoca.

Dois experimentos de expansão do amido (aumento de volume do grão após o estouro, com relação ao volume inicial do grão) dos grãos foram feitos pelo Prof. Dr. William José da Silva (IB-UNICAMP) com objetivo de verificar o papel do amido e do pericarpo no mecanismo de estouro da pipoca. O primeiro, "popping" consiste em colocar os grãos de milho em óleo vegetal a uma temperatura de 180°C. No segundo, "puffing" os grãos são colocados numa câmara de pressão aquecida a 180°C e levada à pressão de 135PSI. Ao atingir essa pressão, a tampa da câmara é instantaneamente aberta e os grãos de milho são expostos à pressão atmosférica; neste experimento a câmara simula a ação do pericarpo durante o mecanismo do estouro.

As amostras utilizadas nos experimentos do "popping" e "puffing" foram duas variedades de milho comum, C10 e C12, e duas variedades de milho de pipoca, P61 e P62. Ambos os experimentos foram realizados com grãos inteiros e sem os pericarpos.

Os resultados obtidos no "popping", para o milho comum, mostraram que a retirada do pericarpo não modifica a expansão. Neste caso os grãos com casca demonstram pouca capacidade de expansão, enquanto que as variedades de milho de pipoca sofreram redução de 90,4% na capacidade de expansão com a retirada do pericarpo.

Quanto ao "puffing" foi verificada a grande capacidade de expansão do milho comum, com valores próximos aos do milho de pipoca. Essa capacidade de expansão revelada, neste experimento, pelo milho comum é atribuída à câmara de pressão que simula um pericarpo resistente sobre os grãos.

Os resultados desses experimentos são mostrados na figura 3.6 e confirmam, mais uma vez, a importância do pericarpo no mecanismo do estouro da pipoca.

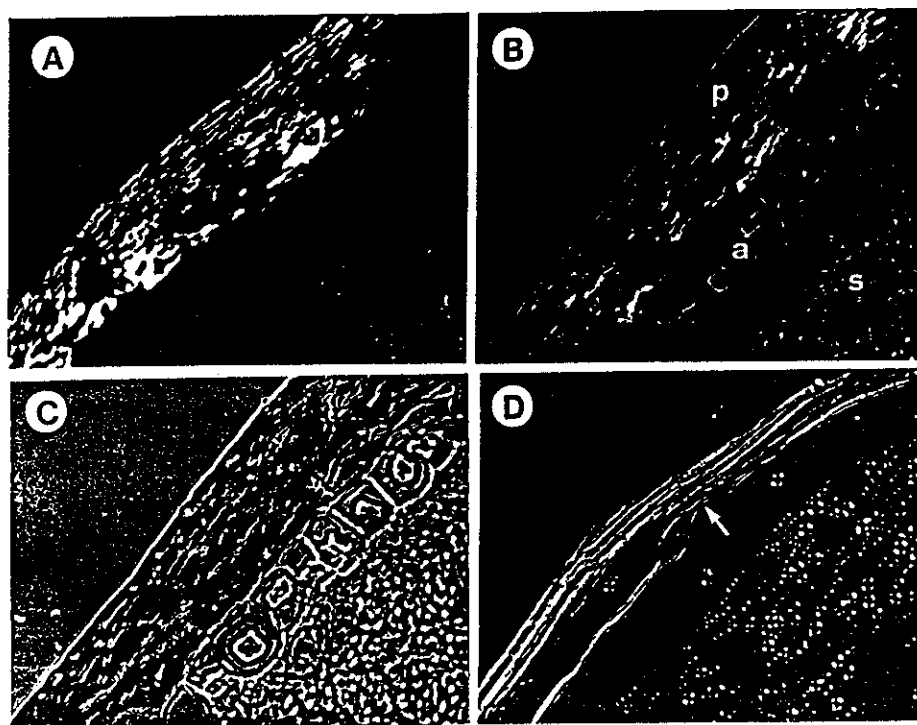


Figura 3.5: (A-C) Resultados da microscopia de birrefringência em uma secção de $7\mu\text{m}$ de espessura de milho de pipoca, mostrando o pericarpo (p), aleuroma (a) e subaleuroma (s); (367x). (D) Resultado da microscopia de birrefringência em uma secção de $7\mu\text{m}$ de espessura de um grão de milho comum.

VARIETY	POPPED			PUFFED		
	WHOLE	HULLED		WHOLE	HULLED	
C 10	 2.00	 1.83	1.88 c	 16.60	 18.97	17.78 c
C 12	 1.83	 1.93	1.92 c	 13.47	 18.23	15.85 d
P 61	 33.22	 2.77	18.00 a	 27.90	 25.60	26.75 a
P 62	 30.33	 3.33	16.80 b	 27.10	 23.20	25.15 b
	16.85 a	2.47 b		21.50 a	21.27 a	

Figura 3.6: Resultados dos experimentos de “popping” e “puffing” em grãos inteiro e sem pericarpo. Os números indicam a expansão após o estouro, ou seja, quantas vezes o volume do grão expandiu-se com relação ao grão original.

Referências Bibliográficas

- [1] Eldredge, J.C. and Lyerley, P.J.; Iowa Agric. Exp. Stn. Bull, 54(1943)765.
- [2] Richardson, D.L.; Agron. J., 51(1959)631.
- [3] Hanes, E.R.; MS. Thesis, Purdue University, W. Lafayette, Indiana (1973).

Capítulo 4

Estudo da Fotossíntese em Folhas Vegetais “In vivo” e “In Situ” com OPC

4.1 Introdução

O efeito fotoacústico investiga, essencialmente, processos de desexcitação não-radiativa que ocorrem num sistema o qual é periodicamente excitado pela absorção de luz modulada. A sensibilidade seletiva desta técnica faz dela excelente para estudos em amostras fotossintetizantes.

O espectro fotoacústico de folhas vegetais foi primeiramente obtido por Adams, Kirkbrigh e colaboradores [1] em 1976. Utilizaram solução de clorofila extraída de folhas de espinafre, mostrando a existência da camada de cera. Em 1978, Rosencwaig [2] mostrou a possibilidade de obter espectro fotoacústico de folhas vegetais intactas. Ainda em 1978 Cahen et al. [3] demonstraram a possibilidade de estudo do processo fotossintético e outros processos fotobioquímicos. Em 1982, Gerard Bults et al. [4] estudaram a atividade fotossintética em folhas intactas de fumo monitorada pelo efeito fotoacústico, utilizando iluminação contínua de intensidade saturante. Foram observados os efeitos “positivo” e “negativo”, respectivamente em alta e baixa frequências de modulação. Um ano mais tarde, a fotoacústica foi utilizada para monitorar “stres” hídrico “in vivo” em folhas de fumo [5]. Nesse estudo foi verificado que a deficiência de água na folha causa redução na componente do sinal relativa ao oxigênio evoluído e, um forte aumento na

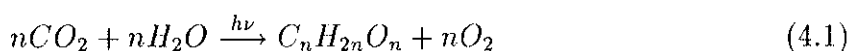
componente térmica do sinal. Vargas, Miranda e colaboradores [6] analisaram o perfil de profundidade e mostraram a ação de herbicidas em plantas verdes.

As amostras, em todos os estudos citados acima, foram discos de folhas ou solução de cloroplastos. Em todos os casos, os termos “in vivo” e “intacta” significam que a parte fotossensível do vegetal estavam em bom funcionamento. Entretanto o envelhecimento das amostras é inevitável, podendo ocorrer em torno de 3 horas, para os discos; quanto a solução de cloroplastos, o tempo de envelhecimento é um pouco maior. Em ambos os casos é impossível monitorar a atividade fotossintética por vários dias com a mesma amostra. A Célula Aberta, com amostras vegetais, foi primeiramente utilizada na obtenção de espectros de absorção [8], objetivando estudar a ação da toxidez metálica (do Al^{3+}) em plantas de milho.

Neste capítulo mostraremos o estudo da atividade fotossintética, realizado pela primeira vez, “in vivo” e “in situ” em plantas de soja e milho. As folhas, neste contexto, foram utilizadas ainda presas ao caule e plantadas em pequenos vasos. No estudo da soja determinamos a evolução de oxigênio e energia armazenada em plantas crescidas com solução nutriente, sem tratamento específico, em outras, tratadas com solução de nitrato de cádmio adicionada na solução nutriente. Em outras palavras, “envenenadas”. Quanto ao milho, o nosso objetivo foi correlacionar a atividade fotossintética com o vigor do híbrido (heterose) apresentado dentro das famílias; o híbrido é obtido através do cruzamento genético de duas linhagens.

4.2 Equação da Fotossíntese e Efeitos Observados com OPC

O processo de fotossíntese consiste na conversão de parte da energia absorvida, pelos vegetais verdes, em energia química seguida da liberação de oxigênio. Este processo pode ser sumarizado [9] através da equação química dada por:



O primeiro termo do lado direito da equação 4.1 representa os produtos sintetizados através da energia armazenada pela folha, e o último representa o oxigênio evoluído.

O sinal fotoacústico total, devido à incidência de luz modulada, em folhas vegetais, é composto da soma de duas contribuições. A primeira é a contribuição fototérmica devido à conversão, de parte ou total, da luz modulada incidente em calor. A segunda contribuição é a fotobárica, relativa à evolução do oxigênio fotossintético, gerado pela excitação periódica do fotossistema. Ambas as contribuições são originadas nos cloroplastos, de onde o calor e o oxigênio se difundem pelo interior da folha.

Para determinar o oxigênio evoluído e a energia armazenada em folhas vegetais utilizamos os efeitos produzidos por luz branca, contínua de alta intensidade, denominada luz de saturação. Esses efeitos se verificam em baixas frequências de modulação (efeito negativo) e em altas frequências (efeito positivo), assim descritos:

a) Efeito negativo.

Quando adicionamos luz contínua suficientemente intensa, esta satura a fotossíntese pelo “fechamento” dos centros de reação, eliminando a componente modulada da evolução de oxigênio, resultando num decréscimo do sinal fotoacústico. O efeito negativo é dado por:

$$E_N = \frac{PA_- - PA_+}{PA_+} \quad (4.2)$$

onde PA_- é o sinal na ausência da luz de saturação, e PA_+ é o sinal em presença da luz de saturação.

b) Efeito positivo.

Aumentando a frequência de modulação até o ponto em que a contribuição do oxigênio evoluído seja eliminada (devido a lenta difusão comparada com a frequência de modulação), a adição da luz de saturação produz sinal de maior amplitude do que sem esta. O acréscimo do sinal fotoacústico é devido a conversão de praticamente toda energia absorvida em calor. O efeito positivo é dado [10] por:

$$E_P = \frac{PA_+ - PA_-}{PA_+} \quad (4.3)$$

O efeito positivo também chamado de “perda fotoquímica” (PL) é relativo à energia armazenada pela planta; essa energia será utilizada na síntese de outros compostos necessários para o seu desenvolvimento.

Nas figuras 4.1a e 4.1b ilustramos esses dois efeitos.

Em baixas frequências de modulação os efeitos coexistem e portanto a componente fototérmica do sinal fotoacústico é reduzida por uma fração equivalente à parte da perda fotoquímica. Levando em conta a correção para mudança de nível fototérmico, o sinal devido ao oxigênio [11] é dado por:

$$O_2(sinal) = PA_- - (1 - PL)PA_+ \quad (4.4)$$

onde PL é a perda fotoquímica. Assim, o oxigênio evoluído, com relação ao sinal térmico é calculado pela seguinte expressão:

$$O_2 = \frac{PA_- - S_t}{S_t} \quad (4.5)$$

onde o sinal térmico, $S_t = (1 - PL)PA_+$.

4.3 Medidas de Evolução de Oxigênio e Energia Armazenada em Folhas de Soja “In Vivo” e “In Situ” com OPC

Nesta secção apresentamos o estudo realizado em folhas de soja submetida à ação de nitrato de cádmio, onde monitoramos o oxigênio evoluído e a energia armazenada. Como amostras, foram utilizadas cinco plantas submetidas à solução de nitrato de cádmio, denominadas “experimento” e cinco outras sem uso dessa solução as quais denominamos “controle”.

O experimento com folhas de soja foi realizado em duas etapas. Na primeira caracterizamos as amostras observando o desempenho da OPC no sentido de: a) Observar sensibilidade para determinação do oxigênio evoluído; b) verificar a transição entre os efeitos positivo e negativo em função da frequência de modulação; c) A energia armazenada e, d) Adaptação da folha à luz de excitação. Na segunda etapa investigamos o efeito do

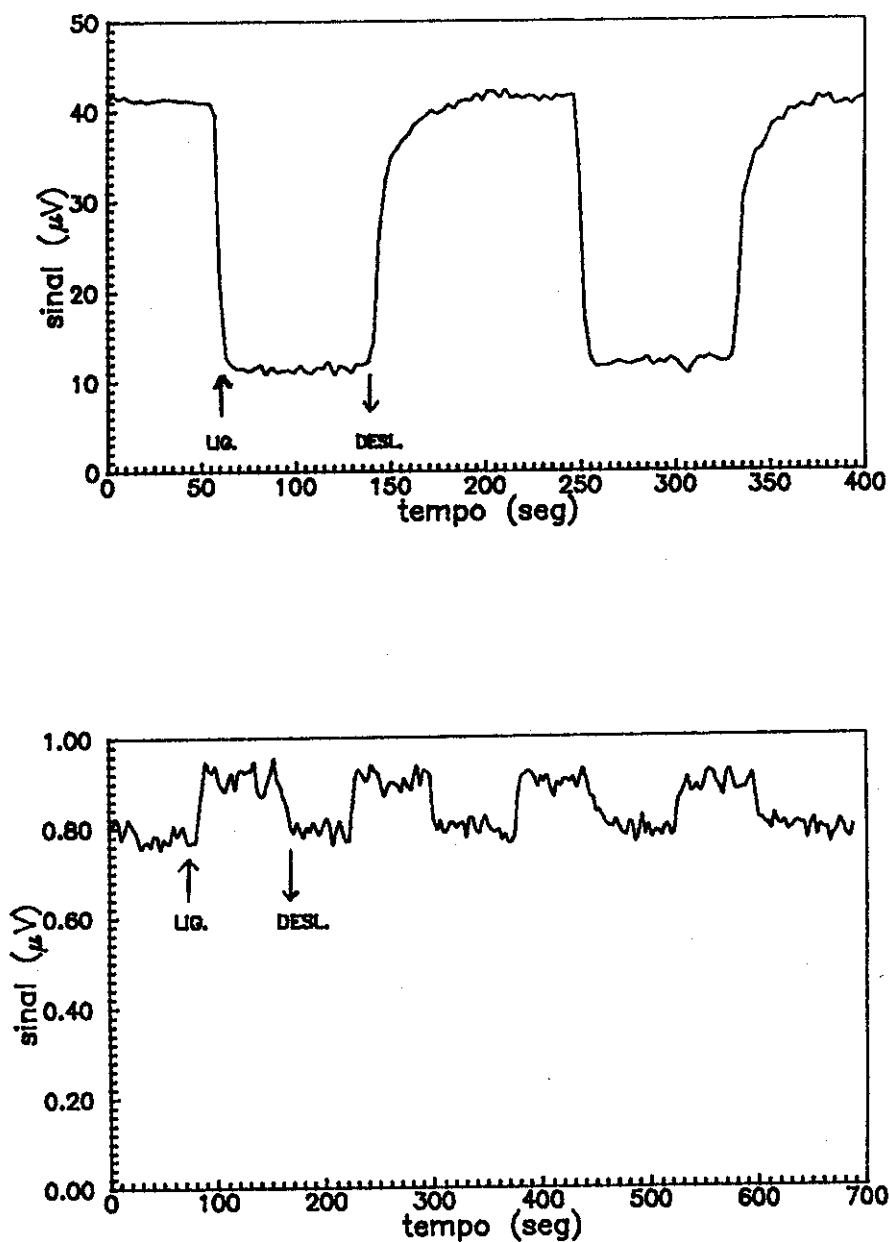


Figura 4.1: Efeitos da luz de saturação: a) efeito negativo (19Hz), e b) efeito positivo (352Hz). As intensidades luminosas para ambos os efeitos foram: luz modulada ($\lambda=680\text{nm}$) $I=22\text{W/m}^2$, e luz branca contínua com intensidade $I=230\text{W/m}^2$.

nitrito de cádmio ($Cd(NO_3)_2$) aplicado às amostras denominadas “experimento”, através da energia armazenada e da evolução de oxigênio.

4.3.1 Caracterização de Folhas de Soja sem Tratamento de Nitrato de Cádmio com uso da OPC

A folha ainda presa ao caule (ver figura 2.1) foi fixada na célula fotoacústica (OPC). Incidimos sobre a amostra a luz ($\lambda = 680nm$ que é um dos picos de absorção da clorofila “a”) modulada em 19Hz e intensidade de aproximadamente $12,7W/m^2$. Por duas vezes adicionamos luz branca contínua, com intensidade de $220W/m^2$, para saturar a fotossíntese, eliminando assim a componente fotobárica do sinal. O resultado é o efeito negativo. Em seguida a folha foi separada do caule com objetivo de monitorar, através do efeito negativo, o tempo de atividade fotossintética. Podemos observar que a folha de soja, quando separada do caule, perde gradualmente suas funções vitais devido ao efeito da desidratação. Isto é verificado com a diminuição de atividade fotossintética mostrada, nas figuras 4.2 e 4.3, através da redução do oxigênio evoluído (relacionado com o efeito negativo).

Usando a expressão 4.5 determinamos a evolução de oxigênio da folha no caule e obtemos 1,87 com relação ao sinal térmico máximo. Após o corte, o oxigênio evoluído passou de 1,87, nos primeiros minutos, para 0,25 em 200min. O valor da taxa de evolução de oxigênio final da aquisição corresponde a aproximadamente 11% da taxa inicial, mostra que a folha está “morrendo”.

Os efeitos negativo e positivo dependem do índice de hidratação da folha, das intensidades luminosas (modulada e contínua) e, também da frequência de modulação. Usualmente a frequência para estudo do efeito negativo é menor do que 100Hz e, para o positivo é acima de 200Hz. Em cada tipo de planta, a dependência dos efeitos positivo e negativo com a frequência de modulação pode variar; portanto é importante conhecer essa dependência em cada sistema a ser estudado [12]. Com a finalidade de encontrar as frequências de modulação que produzem melhor observação desses efeitos, foi realizada uma varredura entre 46 e 500Hz com saturações periódicas.

Na figura 4.4 mostramos a variação dos efeitos negativo e positivo com a frequência de modulação. As intensidades luminosas foram, respectivamente, $12,7W/m^2$ e $220W/m^2$

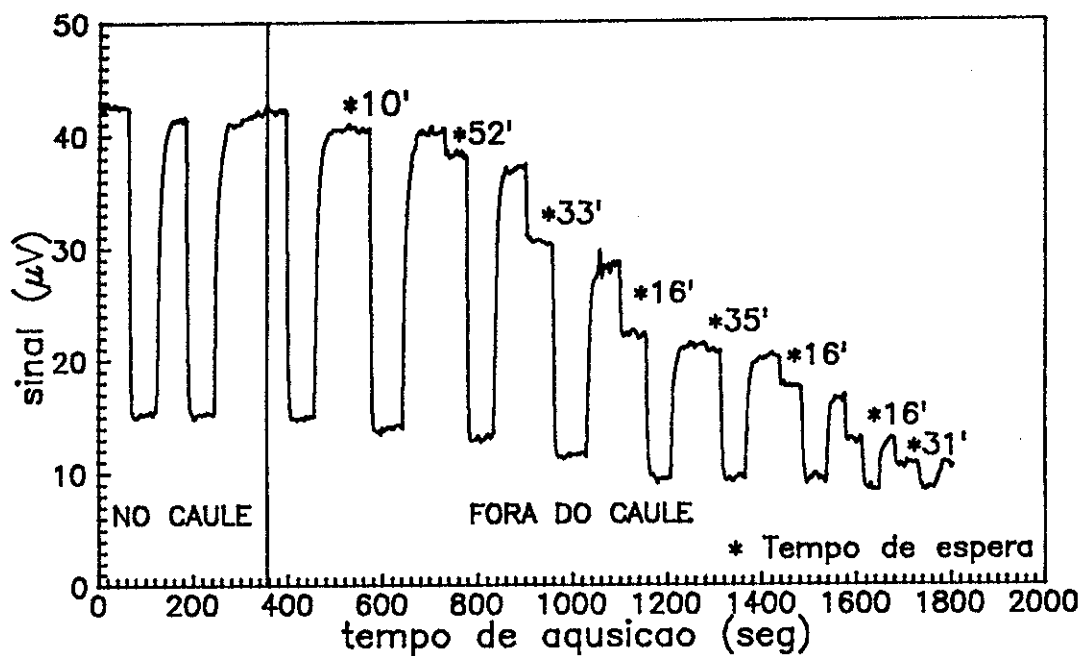


Figura 4.2: Transientes obtidos com OPC para determinar a atividade fotossintética de folha de soja presa no caule e quando separada deste.

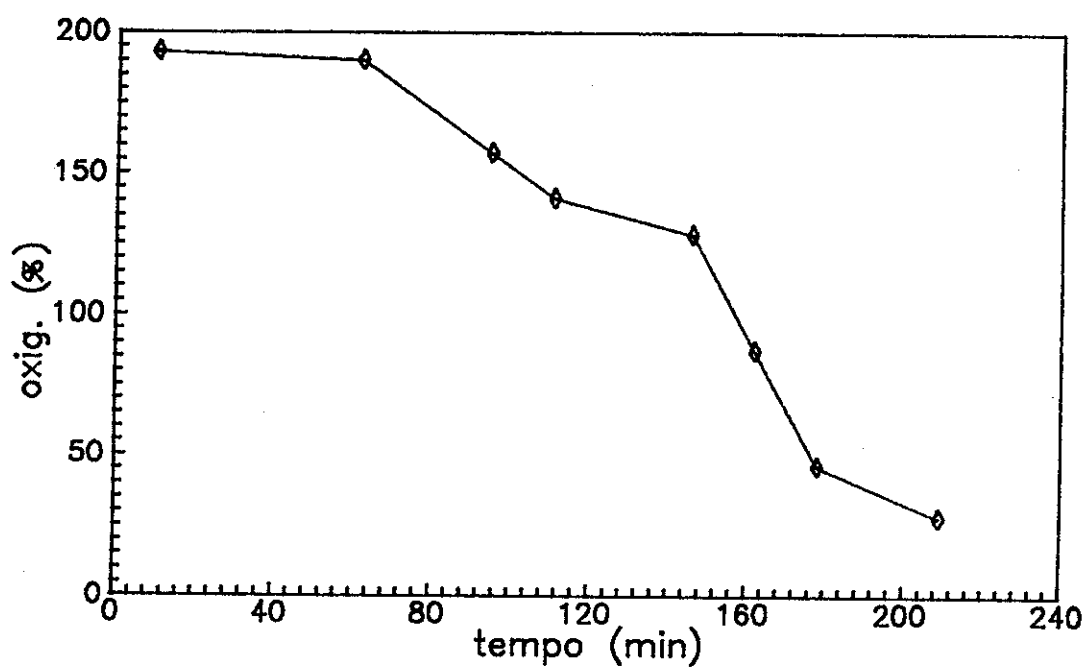


Figura 4.3: *Tempo de desidratação de folha de soja, reduzindo sua atividade fotossintética.*

para a luz modulada ($\lambda = 680nm$) e contínua. Observa-se que na frequência de 125Hz a competição entre os dois efeitos faz com que se anulem mutuamente. Isto significa que a partir dessa frequência de modulação a predominância será do efeito positivo; o oxigênio produzido difunde-se lentamente pelo interior da folha não contribuindo para o sinal fotoacústico e, indica que a partir de 150Hz podemos utilizar qualquer frequência para determinar a perda fotoquímica.

Um dos aspectos mais importantes em atividade fotossintética é a parte da energia absorvida que é armazenada em processos fotoquímicos intermediários, também chamada de perda fotoquímica [13], dada pela expressão:

$$PL = \left(\frac{PA_+ - PA_-}{PA_+} \right) 100\% \quad (4.6)$$

Essa expressão representa o percentual de energia armazenada.

O valor do PL varia com a intensidade da luz modulada incidente e, a extrapolação linear do recíproco do PL, para a intensidade zero fornece a medida da máxima energia armazenada [14]. Os transientes da dependência do efeito positivo com a intensidade da luz modulada e a extrapolação do recíproco do PL obtidos com OPC, “in vivo” e “in situ” estão nas figuras 4.5 e 4.6, respectivamente.

Ao incidirmos luz numa folha vegetal verde estamos induzindo a fotossíntese. O efeito dessa indução depende principalmente da intensidade luminosa, do estado de hidratação da folha e do nível de iluminação em que a planta se encontrava; Assim, podemos ter curto e longo períodos de indução. Estes são caracterizados pelo tempo necessário para a taxa de oxigênio atingir seu maior valor e permanecer constante.

O efeito da indução fotossintética é observado, com a fotoacústica, através da componente fotobárica do sinal, e pode ser estimulada com luz de saturação. Esse estímulo é verificado com o retorno do sinal para níveis mais altos, após desligar a luz contínua, até que a resposta fotoacústica permaneça constante no tempo. Com novas saturações o sinal retorna ao mesmo nível em que se encontrava. A este estágio denominamos estado estacionário e representa a adaptação da folha à intensidade da luz de excitação.

Em experimento de indução fotossintética, com uso da OPC e folha de soja “in vivo” e “in situ” observamos que o sinal fotoacústico inicial foi fortemente diminuído (de 8 para $5\mu V$) nos primeiros minutos de aquisição. Ao incidirmos luz de saturação, o sinal

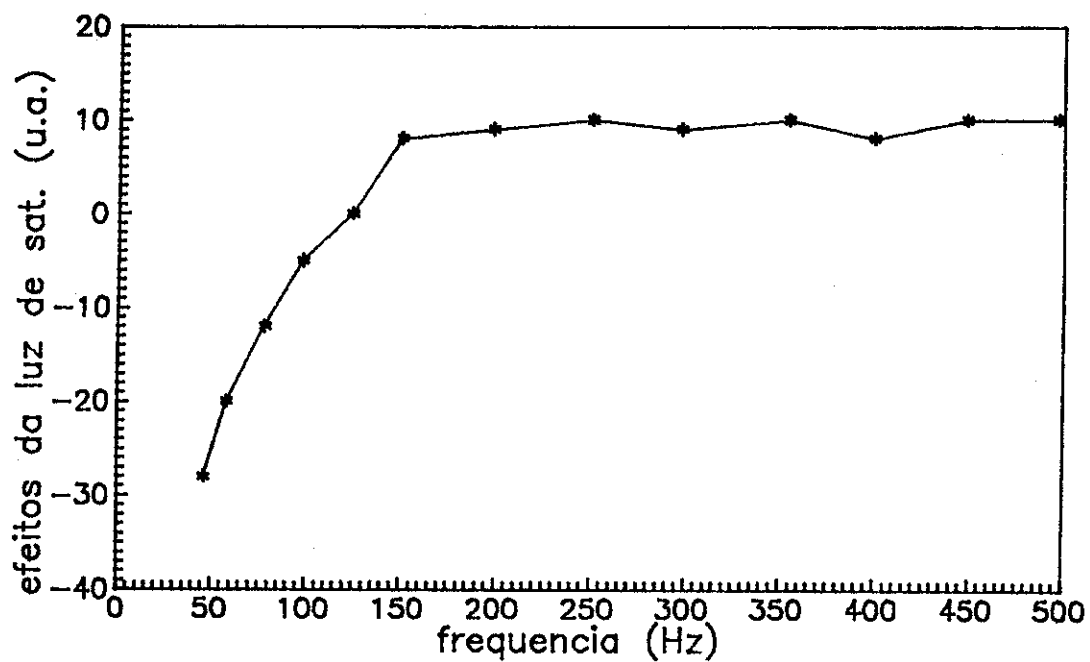


Figura 4.4: *Variação dos efeitos negativo e positivo em função da frequência de modulação.*

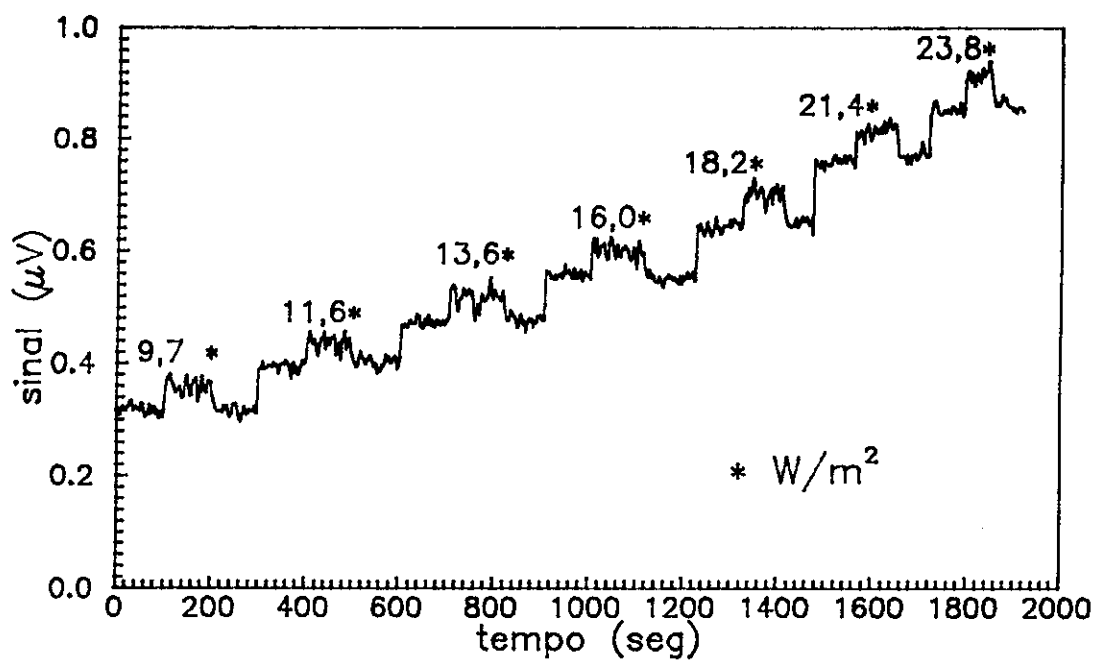


Figura 4.5: *Efeito positivo em função da intensidade da luz modulada ($\lambda = 680nm$, $f=354Hz$ e luz de saturação com $220W/m^2$).*

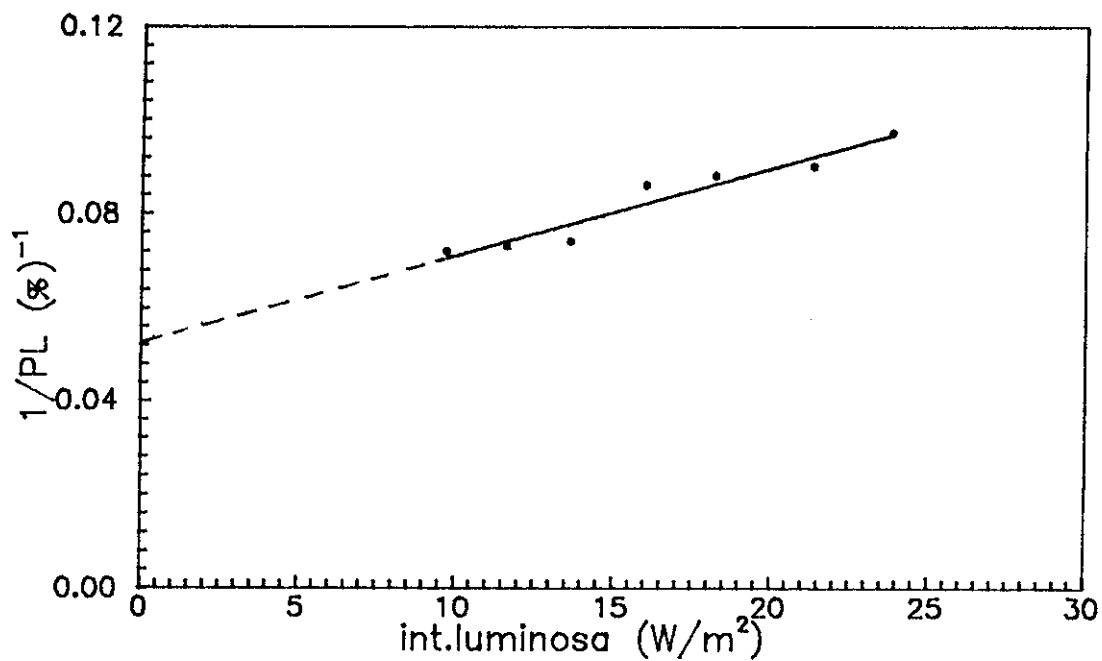


Figura 4.6: *Extrapolação do recíproco do PL para determinar a energia máxima armazenada.*

fototérmico obtido foi de $1,5\mu V$ demonstrando que não houve redução total de oxigênio. Esse transiente indica que as primeiras absorções de fótons tem um fluxo maior do que o fluxo anterior; isto é, a intensidade luminosa na qual a planta se encontrava era menor do que a intensidade de excitação, causando fotoinibição ou fechamento parcial de estômatos.

Após sucessivas saturações da fotossíntese houve estímulo, para aumento da atividade fotossintética, até que o estado estacionário fosse atingido (50min após o início do experimento). Portanto, a indução fotossintética, em particular, de longa duração deve ser observada em condições reais de vida. Em situações nas quais a folha foi cortada em forma de disco, esse efeito pode fornecer atividade fotossintética que não representa a atividade real (para a área da folha em estudo), devido ao efeito da desidratação. O resultado deste experimento é mostrado na figura 4.7.

4.3.2 Estudo de Evolução de Oxigênio e Energia Armazenada em Folhas de Soja “Envenenadas” com Solução de Nitrato de Cádmio

Sabe-se que o cádmio é um dos maiores contaminantes do meio ambiente, sendo tóxico para plantas, em altas concentrações. Origina-se naturalmente como resultado, por exemplo, de emissões vulcânicas e combustão de carvão de pedra e óleo [16], estando presente em água e solos, especialmente em áreas de pesado tráfego de automóveis. É considerado um inibidor efetivo das plantas e particularmente de processos fotossintéticos nos vegetais superiores [15]. Em 1978, Lamoreaux e Chaney [16] sugeriram que o cádmio inibe a fotossíntese pelo aumento da resistência do mesófilo (parte intermediária interna das folhas) e dos estômatos para a fixação de CO_2 .

Com objetivo de observar o efeito do nitrato de cádmio em folhas de soja utilizando a técnica OPC, procedemos os estudos monitorando a evolução de oxigênio e energia armazenada após cinco semanas de tratamento, descrito no capítulo 2.

Neste experimento observamos a atividade fotossintética, “in vivo” e “in situ”, ao longo do desenvolvimento das plantas até a fase de frutificação. As medidas de oxigênio evoluído e energia armazenada foram feitas através dos efeitos negativo e positivo, como foi mostrado nas secções anteriores, com uso das equações 4.5 e 4.6 para as amostras “controle” e “experimento”, nos mesmos dias e nas mesmas condições experimentais.

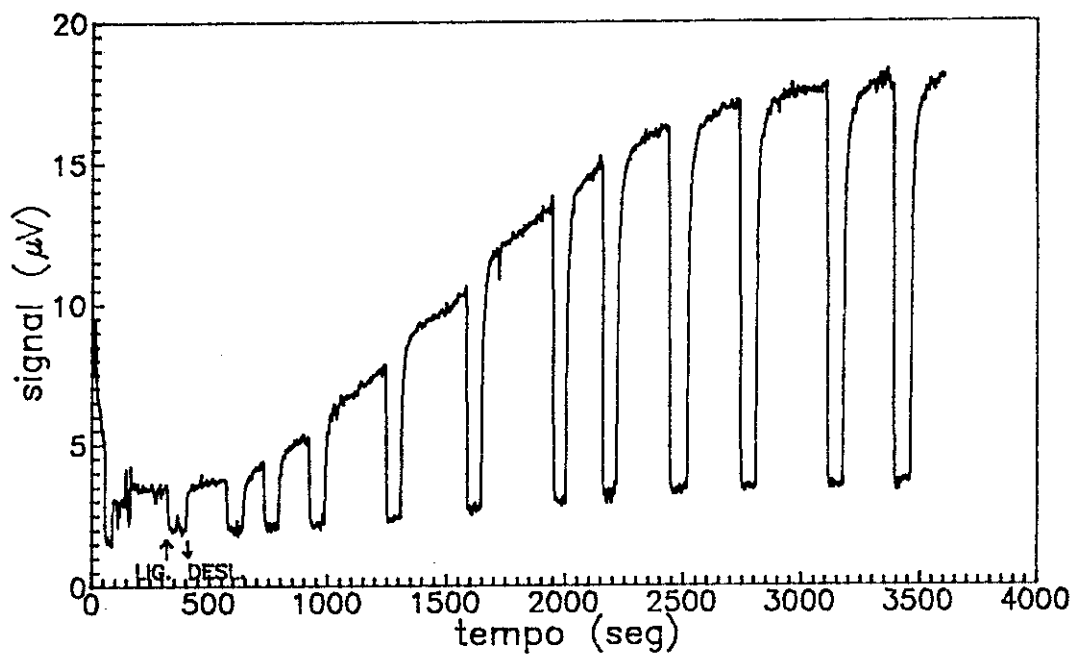


Figura 4.7: Transiente obtido na adaptação de folha de soja à luz de excitação ($I = 22\text{W/m}^2$, $\lambda = 680\text{nm}$) modulada em 19Hz. As setas indicam ($\uparrow$) liga e ($\downarrow$) desliga a luz de saturação com 220W/m^2 .

Tabela 4.1: Resultados obtidos com OPC em folhas de soja. A coluna $PL(\%)$ corresponde à perda fotoquímica com $20W/m^2$.

Data	Mostra	Idade (semana)	$O_2(u.a)$	$PL(\%)$	$PL_{max}(\%)$
11/10/91	controle	7,5	3,10	11,0	25
	experimento	7,5	1,04	13,0	20
30/10/91	controle	13,0	1,96	16,5	29
	experimento	13,0	1,10	16,4	20
15/11/91	controle	15,0	6,54	37,0	40
	experimento	15,0	4,96	34,0	38

Nas figuras 4.8a e 4.8b, mostramos os transientes dos efeitos negativos para as amostras “controle” e “experimento”. Neste experimento a fotossíntese foi induzida com radiação de 680nm, intensidade $20W/m^2$, modulada em 19 Hz e, a luz de saturação com intensidade de $220W/m^2$.

Na tabela 4.1 apresentamos os resultados obtidos através das equações 4.5 e 4.6 em três dias diferentes.

Os resultados apresentados na tabela 4.1 mostram que após três semanas de tratamento a taxa de O_2 foi diminuída em torno de 60%, quando comparada com as plantas controle. Estando, portanto em bom acordo com o efeito do Cd^{2+} aplicado em vegetais, medido com outro método [17]. Esta redução é associada com o fluxo de elétrons no fotossistema II. Outro fato que pode contribuir com o decréscimo do oxigênio evoluído é a diminuição da condutância estomatal [18].

Com seis semanas de tratamento, a redução baixou para 25%, estando este resultado em boa concordância com estudos desenvolvido anteriormente, com outro método [17], onde foi verificado que a toxidez de metais pesados depende do estado de crescimento da planta.

Os resultados da energia armazenada (tabela 4.1) permaneceram equivalentes durante o experimento e são coerentes, visto que a energia medida refere-se ao percentual da energia absorvida pela planta destinada às reações enzimáticas, ou seja: a energia absorvida para o processo da fotossíntese, é primeiramente, utilizada na oxidação das moléculas de água produzindo oxigênio; neste sentido, embora com mesma intensidade

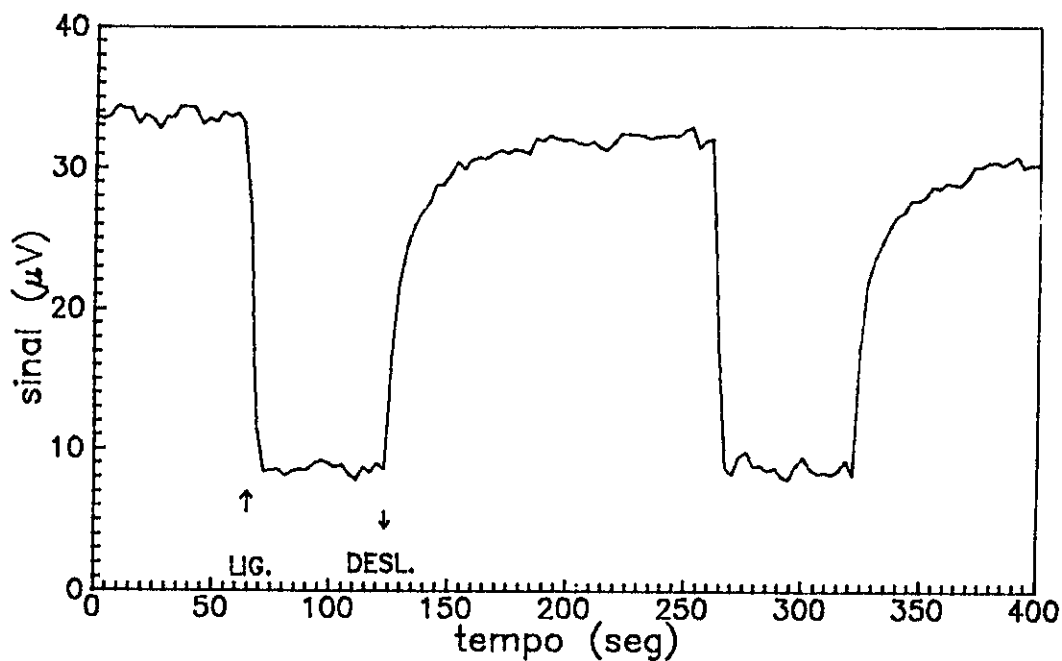
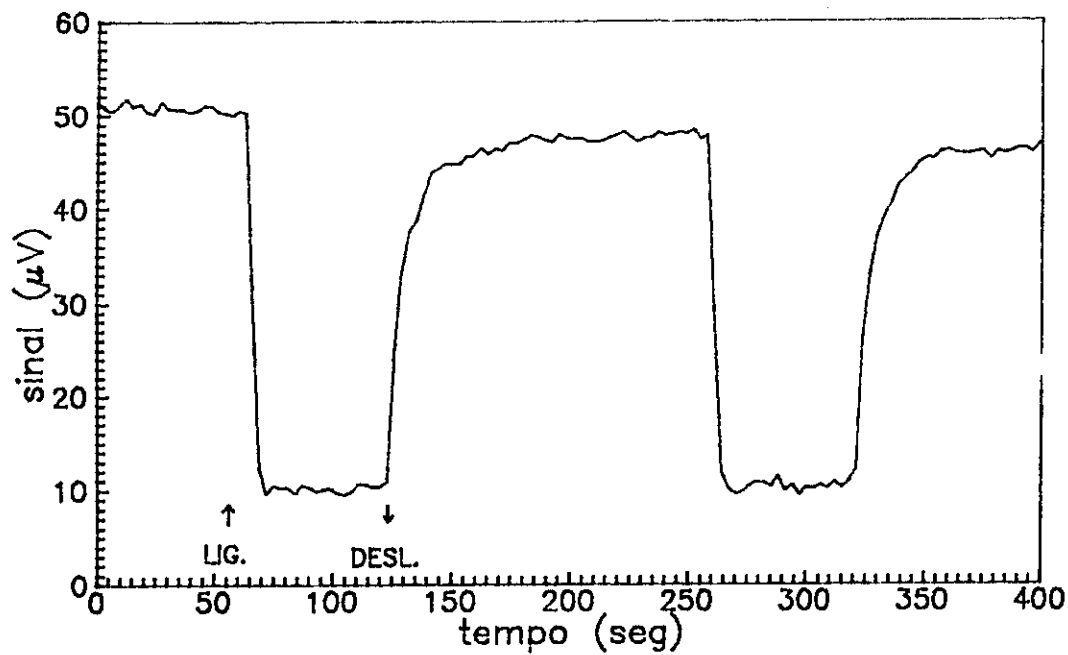


Figura 4.8: a) Efeito negativo da amostra controle, b) efeito negativo da amostra experimental. As setas indicam ($\uparrow$) liga e ($\downarrow$) desliga a luz de saturação.

de radiação incidente, a amostra “controle” absorve maior número de fótons do que a amostra “experimento” (devido maior concentração de pigmentos na amostra “controle”). Isto pode ser observado na taxa de oxigênio evoluído e nos níveis dos sinais térmicos mostrados nas figuras 4.8a e b. Assim, o mesmo percentual de energia armazenada em ambas as folhas são diferentes em valores absolutos.

No estudo inicial “in vivo” e “in situ” com folhas de soja usando a técnica OPC pela primeira vez, observamos que os parâmetros fundamentais para estudos da atividade fotossintética, por medidas não-espectroscópicas, são bem definidos pela técnica OPC mostrando boa concordância com resultados da literatura obtidos com fotoacústica convencional.

Na segunda fase do estudo destacamos a versatilidade da técnica em acompanhar a atividade de uma amostra durante meses, onde podemos observar o mecanismo de abertura estomatal (ver apêndice) através do comportamento da componente fotobárica do sinal, isto é: em transientes onde a componente do O_2 decresce indica estado de estresse na folha causando fechamento parcial dos estômatos como prevenção de possível perda de água.

4.3.3 Aspectos Complementares

A estrutura interna das folhas de soja foi observada através de microscopia óptica. Isto foi realizado com a colaboração do prof. Dr. Antonio Gabrielle (IB-UNICAMP), cujos resultados são apresentados na figura 4.9a,b. Observamos uma diminuição média de 37% na espessura da folha tratada com nitrato de cádmio, em relação ao controle. A maior diferença foi observada no mesófilo lacunoso calculada em 45%; a espessura, dos constituintes do mesófilo paliádico, da amostra tratada com nitrato de cádmio corresponde, em média a 71% da não tratada. Os resultados mostram que o efeito do “veneno” utilizado diminuiu a concentração de pigmentos na folha.

O teor de cádmio depositado nas folhas foi quantificado nas amostras “experimento”, pelo prof. Dr. Oswaldo E.S. Godinho (IQ-UNICAMP), após 23 semanas de tratamento. O processo utilizado foi o método polarográfico depois de calcinar a folha picada e secada a $80^{\circ}C$. O valor encontrado foi 0,014% de folha seca.

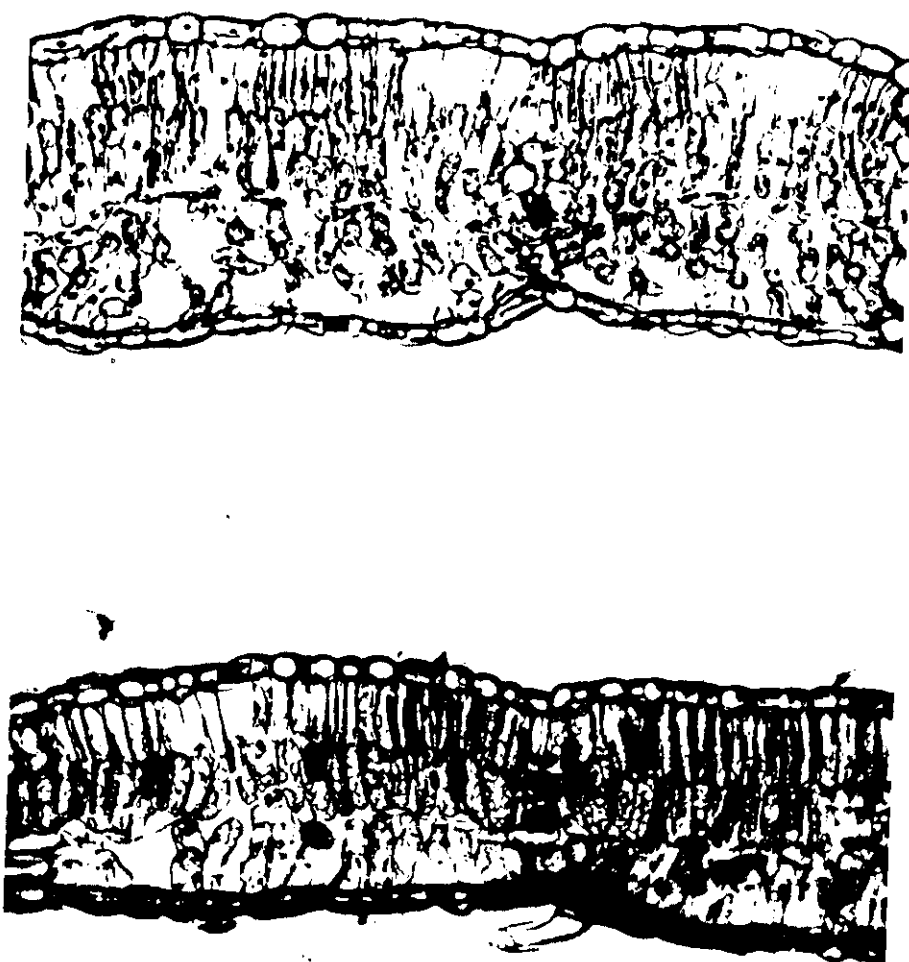


Figura 4.9: Corte transversal de folha de soja obtido com microscopia óptica. a) controle e, b) experimento.

4.4 Estudo de Evolução de Oxigênio e Energia Armazenada em Folhas de Milho “In Vivo” e “In Situ” com OPC

Nesta secção mostraremos o estudo desenvolvido em folhas de milho utilizando a técnica OPC. O estudo foi realizado em dois experimentos: no primeiro, analisamos o efeito negativo, peso seco e área foliar; no segundo, medimos o oxigênio evoluído e, em etapa complementar, normalizamos o sinal fotoacústico com a espessura das folhas para relacionar com a eficiência fotossintética. O objetivo de ambos os experimentos foi correlacionar a atividade fotossintética, de duas linhagens de milho e do seu respectivo híbrido com o efeito da heterose (ver capítulo 5) ligado à produtividade da planta.

4.4.1 Medidas de efeito negativo, área foliar e peso seco em plantas de milho

As amostras para este experimento foram semeadas em seis grupos com três plantas (duas linhagens e um híbrido) com três repetições. Entre o plantio de cada grupo foi mantido o intervalo de uma semana. Para cada conjunto, foram plantadas mais três amostras do híbrido com diferença de uma semana; esse procedimento permitiu amostras com mesma idade e mesmo tamanho dentro dos grupos, devido ao crescimento mais rápido do milho híbrido.

A área foliar foi medida através da relação entre a massa de um retângulo de papel (de uso em fotocopadoras) e sua área; as folhas foram moldadas no papel e recortadas. As massas dos recortes foram comparadas com a massa do retângulo do mesmo papel e, a partir dessa relação determinamos a área da folha.

O “peso” seco corresponde à massa da planta após seca-la numa estufa a 60°C durante 5 dias.

Neste experimento, optamos pelo uso do efeito negativo (proporcional ao oxigênio evoluído) como uma variável de estudo devido a dificuldades na medida da energia armazenada em folhas de milho. O milho faz parte do grupo de plantas “C4” que têm mecanismo especial para fixação de carbono (ver apêndice).

O efeito negativo foi calculado com uso da expressão 4.2. As intensidades luminosas

Tabela 4.2: *Formação dos grupos estudados. Os germoplasmas citados são linhagens e, os F1 são híbridos gerados do cruzamento genético das linhagens.*

Grupo	Amostra	Germoplasma
1	1	L222N
	3	L910(N)
	10	F1(híbrido)
2	1	L222N
	8	L78(7700)
	11	F1(híbrido)
3	5	L910Wx
	6	L473Wx
	12	F1(híbrido)
4	1	L222N
	2	L222(90)
	13	F1(híbrido)
5	4	L910(90)
	9	L910(80)
	14	F1(híbrido)
6	6	L473Wx
	7	L833(80)Wx
	15	F1(híbrido)

utilizadas foram $20W/m^2$, para a luz modulada em 17Hz com $\lambda = 680nm$ e, $220W/m^2$, para a luz de saturação. E as medidas efetuadas, em cada grupo, de modo que o intervalo de tempo entre duas amostras não excedesse 30min, evitando mudanças nas condições ambientais com esse procedimento.

Os grupos foram compostos de acordo com a tabela 4.2.

Os dados obtidos para o efeito negativo, área foliar e peso seco foram submetidos, pelo prof. Dr. William José da Silva IB-UNICAMP, ao teste estatístico das médias de Tukey. Esse teste é dito de grande importância para estatística em biologia (sendo conhecido como o teste das diferenças totalmente significantes), considera o método hipótese nula [19]. Os resultados da estatística estão na tabela 4.3.

A análise estatística com as médias de Tukey mostra que não houve diferenças significativas entre o efeito negativo (proporcional ao oxigênio evoluído) dos seis híbridos es-

Tabela 4.3: *Resultados do efeito negativo médio, peso seco e área foliar de dois grupos de milho, obtidos em 3 repetições em amostras de mesma denominação, em plantas diferentes.*

Grupo	Amostra	E.N.(u.a.)	R.A.Foliar(cm)	P.Seco(g)
1	1	1,42a	7,00b	0,25b
1	3	1,27a	8,91ab	0,39a
1	10M	1,52a	10,28a	0,41a
1	10D	1,29a	7,60ab	0,29a
2	1	1,42ab	8,19b	0,37b
2	8	1,15b	9,62ab	0,44b
2	11M	1,50a	12,52a	0,61a
2	11D	1,43ab	9,86ab	0,43b
3	5	1,27a	8,92a	0,40a
3	6	1,51a	6,70b	0,28b
3	12M	1,50a	9,50a	0,43a
3	12D	1,20a	5,07b	0,21b
4	1	1,43a	7,50ab	0,35ab
4	2	1,48a	9,26a	0,45a
4	13M	1,50a	8,83ab	0,44a
4	13D	1,48a	7,07b	0,31b
5	4	1,26a	8,65b	0,42b
5	9	1,08a	8,30bc	0,38c
5	14M	1,33a	11,23a	0,54a
5	14D	1,13a	6,93c	0,28d
6	6	1,27a	7,98b	0,34b
6	7	1,33a	10,01a	0,45a
6	15M	1,32a	10,00a	0,45a
6	15D	1,24a	6,31b	0,23c

tudados em relação às suas linhagens parentais. Foi observado que a evolução de oxigênio, por unidade de área, se comporta de forma semelhante nas plantas de mesma família e com a mesma idade. Isto sugere que a densidade de pigmentos fotossintetizantes é igual, nos conjuntos estudados, e significa que o O_2 evoluído não explica as diferenças de vigor registradas, de 19,1 a 125% (valores obtidos, correlacionando área foliar e peso seco, no teste de Tukey).

4.4.2 Medidas de Oxigênio Evoluído em Folhas de Milho e Normalização do Sinal OPC com a Espessura da Folha

Motivados pelos resultados do experimento anterior, no qual nem uma diferença entre híbridos e linhagens foram observadas, tentamos, nesta investigação, correlacionar o vigor do híbrido com as componentes fotobárica e fototérmica do sinal do oxigênio evoluído, normalizadas com a espessura da folha. Nosso principal objetivo foi verificar se o efeito da heterose está associado com a eficiência fotossintética. Partimos da hipótese de que o milho híbrido, devido sua maior área foliar e maior produção de grãos, tem maior eficiência fotossintética quando comparado com suas linhagens parentais.

Neste experimento utilizamos dois grupos de amostras de mesma origem das anteriores, com três repetições. Os grupos foram compostos por:

Grupo 1: linhagens L222N (amostra 1) e L78(7700) (amostra 8); híbrido (amostra 11) obtido com o cruzamento das linhagens.

Grupo 2: linhagens L222N (amostra 1) e L910N (amostra 3); híbrido (amostra 10) obtido com o cruzamento dessas linhagens.

O oxigênio evoluído de folhas vegetais é detetado, em fotoacústica, através das componentes fotobárica e fototérmica em baixas frequências de modulação. A componente fotobárica corresponde ao sinal fotoacústico total, sem presença de luz de saturação, após atingir o estado estacionário. A componente fototérmica é observada através do sinal em presença da luz contínua de fundo. Devido a energia armazenada pela folha, é necessário introduzir correção para o sinal térmico; isto é feito através da perda fotoquímica (PL), obtida em altas frequências de modulação. Neste experimento o oxigênio evoluído foi determinado com uso da equação 4.4, onde a perda fotoquímica foi obtida com a mesma intensidade luminosa utilizada para o efeito negativo.

A máxima energia armazenada em folhas de milho não foi medida devido a particularidades desta planta, tipo C4 (ver apêndice). A anatomia das folhas dessas plantas difere das folhas do tipo C3, por exemplo, soja. A energia armazenada das plantas C4 é processada pela bainha vascular e, o mesófilo apresenta reduzido espaço intercelular no mesófilo, que contribuem para captação do sinal térmico. As intensidades luminosas utilizadas foram $220W/m^2$ e $17W/m^2$, respectivamente, para luz contínua de saturação e, de excitação ($\lambda = 680nm$) modulada, em 17Hz para o efeito negativo e 258Hz para a energia armazenada.

A sistemática adotada para as medidas foi trabalhar com cada grupo em três dias alternados, e com cada amostra três repetições. As espessuras foram medidas com micrômetro (Mitutoyo, ref.7309) e confirmadas com espectroscopia óptica.

Um dos parâmetros importantes na detecção fotoacústica é a espessura da amostra. Em folhas vegetais verdes, a espessura é considerada para distinguir a atividade fotossintética quando duas espécies são comparadas [20]. Portanto, o sinal fotoacústico pode, em princípio, ser usado como ferramenta para a discriminação, em uma coleção de amostras da mesma espécie, aquela que apresenta maior produto vegetativo.

Na frequência de modulação de 17Hz uma folha vegetal é considerada amostra termicamente grossa [8] e, o sinal fotoacústico pode ser escrito na forma [21]

$$S \approx Af\epsilon e^{-l/\mu} \quad (4.7)$$

onde A é um fator constante que depende da intensidade da fonte luminosa; f, frequência de modulação (constante no experimento) $\epsilon = (1 - \eta)$, é a eficiência na qual a luz absorvida é transformada em calor, onde η representa a eficiência fotossintética; l, a espessura da amostra e, $\mu = (\alpha/\pi f)^{1/2}$, o comprimento de difusão térmica.

Para um sinal de referência (S_R) normalizado com a intensidade luminosa obtemos,

$$S_R(1) = \frac{1}{f} e^{-l(1)/\mu} \cdot \epsilon(1) \quad (4.8)$$

Essa expressão nos permite obter a eficiência fotossintética de uma folha vegetal. Quando comparamos duas plantas da mesma família, podemos analisar a razão entre os sinais fotoacústicos para determinar a planta de maior produtividade. Aqui estamos assumindo que a planta de maior atividade fotossintética exibe maior vigor, logo

$$\frac{\epsilon(1)}{\epsilon(2)} = \frac{S_R(1)}{S_R(2)} e^{[l(1)-l(2)]/\mu} \quad (4.9)$$

Com a expressão 4.9 podemos determinar a eficiência fotossintética do milho híbrido com relação às suas linhagens parentais.

A difusividade térmica da folha de milho é, $\alpha = 0,0012 \text{ cm}^2/\text{s}$ [7], portanto para o caso de $S_R = S_F$ (sinal fotoacústico total), $f=17\text{Hz}$ e para $S_R = S_t$ (sinal térmico com saturação) com a mesma intensidade luminosa, $f = 258\text{Hz}$. Portanto $\mu = 47,4\mu\text{m}$ para $f = 17\text{Hz}$ e $\mu = 12,3\mu\text{m}$ para 258Hz .

Na tabela 4.4 são mostrados os resultados obtidos com a expressão 4.9, para a relação entre as atividades fotossintéticas do milho com suas respectivas linhagens. Podemos observar que a relação entre a eficiência fotossintética, do milho híbrido e de suas linhagens parentais, não apresentou resultados que possam distinguir o milho mais produtivo dos grupos.

Os resultados obtidos nos dois experimentos com milho “in vivo” e “in situ” estão, de certa forma, em concordância com a literatura utilizando outros métodos. Alguns pesquisadores mostram que a diferenciação entre híbridos e linhagens não pode ser explicada pela atividade fotossintética, enquanto que outros mostram o contrário. Os parâmetros discriminativos mais utilizados são a área foliar e o peso seco, embora os processos sejam igualmente controvertidos. Assim sendo, a questão da heterose ainda continua em aberto.

Tabela 4.4: *Relação entre as eficiências fotossintéticas. Onde H representa o milho híbrido, e L a linhagem.*

Grupo	Repetição	Amostra	Mais Efic.
1	1	1	H
	1	8	=
	2	1	L
	2	8	L
	3	1	L
	3	8	L
2	1	1	H
	1	3	L
	2	1	H
	2	3	H
	3	1	L
	3	3	H

Referências Bibliográficas

- [1] Adams, M.J., King, A.A. and Kirkbrigh; *Analyst*, 101(1976)553.
- [2] Rosencwaig, A.; *Advances in Electronics and Electron Physics*, vol.46 (L.Marton Ed.), Academic Press, New York (1978).
- [3] Cahen, D., Malkin, S. and lerner, E.I.; *FEBBS LETT.*, 91(1978)339.
- [4] Bults, G., Horwitz, B.A., Malkin, S. and Cahen, D.; *Biochimica et Biophysica Acta*, 679(1982)452.
- [5] Havaux, M., Canaani, O. and Malkin, S.; *Plant Physiol*, 82(1986)827.
- [6] Nery, J.W., Pessoa Jr., O., Vargas, H., Reis, F.A.M., Gabrielle, A.C., Miranda, L.C.M., Vinha, C.A.; *Analyst*, 112(1987)1487.
- [7] Marquezini, M.V., Cella, N., Mansanares, A.M., Vargas,H. and Miranda, L.C.M.; *Meas. Sci. Technol.*; 2(1991)396.
- [8] Cella, N.; Tese de doutorado, IFGW-UNICAMP, (1990).
- [9] Zerbetto, M.; Tese de Mestrado, IFGW-UNICAMP, (1993).
- [10] Cahen, D., Bults, G., Garty, H. and Malkin, S.; *Journal Biochemical and Biophysical Methods*, 3(1980)293.
- [11] Malkin, S., Morgan, C.L. and Austin, R.B.; *Photosynthesis Research*, 7(1986)257.
- [12] Poulet, P., Cahen, D. and Malkin, S.; *Biochimica et Biophysica Acta*, 724(1983)433.
- [13] Carpentier, R., Leblanc, R.M. and Mineault, M.; *Biophysica Acta*, 975(1989)370.
- [14] Havaux, M., Lorrain, L. and Leblanc, M.R.; *FEBBS LETT.*, 250(2)(1989)395.
- [15] Hampp, R., Beulich, K. and Ziegler; *Z. Pflanzenphysiol.*, 77(1976)336.
- [16] Lamoreaux, R.J. and Chaney, W.R.; *Physiol. Plant.*, 43 (1975)231.
- [17] Sheoran, I.S., Singal, H.R. and Singh, R.; *Photosynthesis Research*, 23(1990)345.
- [18] Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I. and Sherwood, R.P.; *Physiol. Plant.*, 63(1985)293.
- [19] Zar,J.H.; *Biostatistical Analysis*, Second Edition, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA, (1984)718.
- [20] Lima, C.A.S., Mattos, J.C.V., Miranda, L.C.M., Penna, A.F.S., von Bülow, J.F.W. and Ghizoni, C.C.; *Journal of Photoacoustics*, 1(1982)61. N.F. and Miranda, L.C.M.; *Physical Review B*, 42(7)(1990) 4477.

[21] Mansanares, A.M., Bento, A.C. and Vargas, H.; Leite, N.F. and Miranda, L.C.M.; Physical Review B, 42(7)(1990) 4477.

Capítulo 5

Estudo da Heterose em Folhas de Milho, com Uso da OPC, “In Vivo” e “In Situ” por Indução Fotossintética em Folhas Adaptadas ao Escuro

5.1 Introdução

Neste capítulo apresentaremos o estudo da heterose em folhas de milho. No capítulo anterior tentamos identificar, através do oxigênio evoluído e da eficiência fotossintética, diferenças entre o milho híbrido e suas linhagens parentais, que explicassem o efeito da heterose. Os resultados que obtivemos no capítulo 4, não demonstraram correlação com o vigor híbrido. Neste experimento observamos a curva de resposta à indução fotossintética, em três grupos de plantas, em diferentes intensidades luminosas, depois de adaptadas ao escuro. Os grupos eram formados por duas linhagens e os respectivos híbridos. Nosso objetivo foi identificar parâmetros que sejam correlacionados com o efeito da heterose. A heterose (o aumento em vigor e produtividade) obtida no cruzamento de variedades, espécies e gêneros, tem recebido variados graus de atenção desde 1893 com as publicações de Kölreuter [1]. No cruzamento genético entre linhagens, normalmente o resultante (F1 ou híbrido), produz bem mais que suas linhagens parentais. Este efeito da heterose ficou muito conhecido desde as primeiras observações, por Shull [2], em 1909. No estudo da

heterose, muitos pesquisadores atribuem esse efeito à fotossíntese [3]. Em 1969, Heichel e Musgrave [3] mostraram que existem diferenças de 100 a 200 suas linhagens parentais. Resultados de outros pesquisadores, por exemplo, Moss [4] e, mais recentemente, nossos resultados (apresentados no capítulo 4), mostram que as diferenças não são significativas em fotossíntese, entretanto existe boa correlação entre a área foliar e o vigor híbrido.

Em estudo desenvolvido por Johnson e Tanner [5], o efeito da heterose não é atribuído ao grande índice de área foliar (LAI- relação entre a área total das folhas e área de terra onde está a planta) do híbrido, tornando-o capaz de interceptar mais luz do sol. Eles observaram que, em igual LAI e percentual de penetração de luz, o F1 e suas linhagens parentais foram iguais em produtos vegetativos. O menor tamanho de espigas das linhagens foi compensado pelo acréscimo do número de espigas por hectare e, o número de grãos foi menor ou intermediário entre as linhagens.

Atualmente a heterose em milho ainda permanece inexplicável e o método utilizado, na identificação dos cruzamentos que produzem os melhores híbridos, consiste na observação do plantio em grandes áreas. Admitimos que o efeito da heterose está relacionado com a capacidade do milho híbrido em responder, mais rapidamente e com maior intensidade, à baixa incidência de luz após adaptação ao escuro.

Durante o tempo de adaptação ao escuro, as folhas vegetais perdem sua capacidade fotossintética progressivamente [6] até chegar ao ponto onde somente um pequeno número de pigmentos, com absorção no infravermelho, permanece funcionando [7]. Nesse estágio a planta está adaptada ao escuro. Esse efeito é usualmente atribuído à desativação das enzimas no ciclo da ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) e esgotamento metabólico intermediário [8]. Além disso, em iluminação abaixo de $1W/m^2$, causa forte inibição na transferência de energia do fotossistema I, como se a principal antena fosse funcionalmente desligada de seus centros de reação.

Quando as plantas verdes são iluminadas, após um período de escuro, não iniciam imediatamente a fixação do dióxido de carbono nem alcançam a taxa máxima de oxigênio evoluído. Na maioria das vezes há um período de indução por alguns minutos [9]. Também pode haver uma variedade de flutuações transientes em troca de gases (consumo e liberação) os quais variam com as espécies e seus tratamentos anteriores, até que seja atingido o estado estacionário.

Outro fator importante, levado em conta para indução fotossintética, é a abertura

Tabela 5.1: *Formação dos grupos estudados.*

Grupo	Amostra	Germoplasma
1	1	L222N
	2	L222(90)
	13	F1(híbrido)
2	3	L910N
	4	L910(90)
	14	F1(híbrido)
3	5	L910Wx
	6	L473Wx
	12	F1(híbrido)

estomatal, isto porque causam atraso nas trocas gasosas quando as folhas são repentinamente iluminadas. Alguns trabalhos [10,11] concluem que o movimento estomatal pode continuar a afetar a fotossíntese por relativamente grandes períodos, após o início da iluminação. Frequentemente a influência estomatal é relativamente pequena. Por exemplo, tem sido observado em fenômeno de indução seguido de período muito breve no escuro conduzir a apreciável fechamento de estômatos. Da mesma forma os estômatos, enquanto fechados, podem afetar a troca de gases durante os primeiros segundos de fotossíntese, sendo pouco provável que os segundos iniciais de fotossíntese sejam afetados por deficiência de CO_2 [11], imposta pelo fechamento parcial ou total dos estômatos. Assim, o período de indução representa o tempo necessário para formar concentração intermediária de CO_2 suficiente para permitir fotossíntese em taxa controlada pela predominância de fatores ambientais [12] como intensidade luminosa, temperatura, etc..

5.2 Procedimento Experimental

Utilizamos o arranjo experimental descrito no capítulo 2 (para medidas não-espectroscópicas em folhas vegetais). Três grupos de plantas, cada um formado por duas linhagens e o híbrido (F1) (com a mesma origem dos outros milhos já citados), foram trazidos para o laboratório e postos na estufa (descrita no capítulo 2). A tabela 5.1 mostramos a formação dos grupos.

Inicialmente verificamos a resposta de indução fotossintética das plantas, “in vivo”

e “in situ” com uso da técnica OPC, para os tempos de adaptação ao escuro variando entre 15min a 12h. Desses testes iniciais, definimos o tempo de adaptação ao escuro em 2h e, 10 e 20W/m², as intensidades da luz de excitação (680nm modulada com 17 Hz) .

As intensidades luminosas foram escolhidas nesses níveis com base nos resultados dos experimentos anteriores, por nós desenvolvidos, que não mostraram diferenças significativas na taxa de fotossíntese entre o milho F1 e suas linhagens parentais. Nesses experimentos a intensidade da luz de excitação foi maior do que 20W/m².

Durante o experimento adotamos a sistemática seguinte:

1) As plantas trazidas para o laboratório e permaneciam, por dois dias na estufa, adaptando-se às novas condições ambientais.

2) Cada planta era retirada da estufa e levada para uma caixa (descrita no capítulo 2) onde permanecia por duas horas adaptando-se ao escuro.

3) Após o período de adaptação, a planta era levada para dentro de uma câmara escura, onde foi montada a célula fotoacústica aberta (OPC). Depois de ajustar a folha no topo da célula, o experimento era iniciado.

5.3 Resultados e Discussão

Estudamos a relação entre os sinais fotoacústicos máximo ($S_{\max}$) e mínimo ($S_{\min}$), o tempo (t_i) em que a amostra inicia o processo de fotossíntese e o tempo final (t_f), no qual inicia o estado estacionário. A derivada (dS/dt) da curva de adaptação com relação ao tempo foi também considerada. Na figura 5.1 mostramos um dos transientes obtidos, onde observamos o fenômeno de indução fotossintética e definimos as variáveis estudadas. Nas figuras 5.2 e 5.3 apresentamos os transientes obtidos respectivamente, com os grupos 1 e 2, após adaptação ao escuro de 2h.

Na tabela 5.2 apresentamos os resultados obtidos com a indução fotossintética em folhas de milho, “in vivo” e “in situ”, com uso da técnica OPC. A intensidade da luz de excitação foi 10W/m² e as plantas foram adaptadas ao escuro por 2h. Podemos observar que os tempos inicial e final são menores nos híbridos que nas linhagens dos três grupos estudados. Com relação à variação do sinal, entre o mínimo e o máximo, as linhagens forneceram maior diferença em 3 das 11 medidas. Esses resultados mostram que o milho híbrido, se readapta à luz mais rapidamente que as linhagens. Esses sinais, também

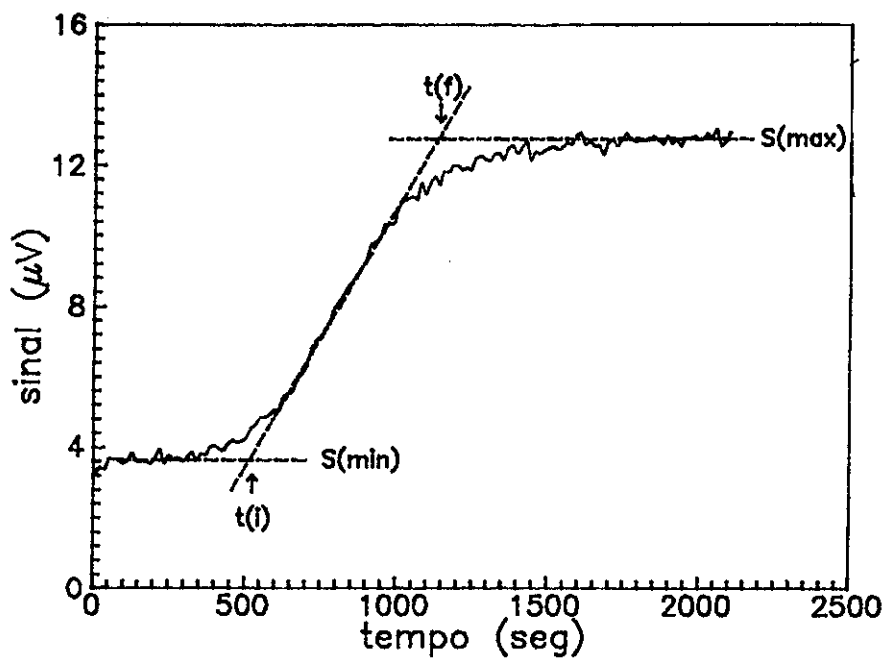


Figura 5.1: *Transiente fotoacústico obtido com OPC, em folha de milho “in vivo” e “in situ”.*

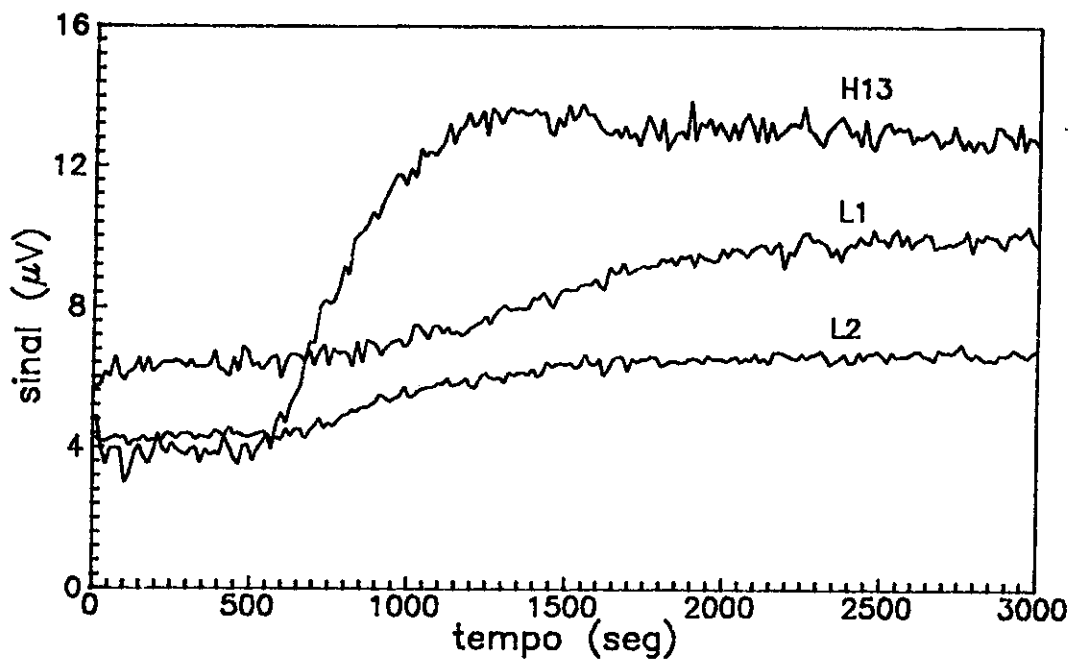


Figura 5.2: Transientes obtidos por indução fotossintética com as amostras do grupo 1, $I = 10W/m^2$.

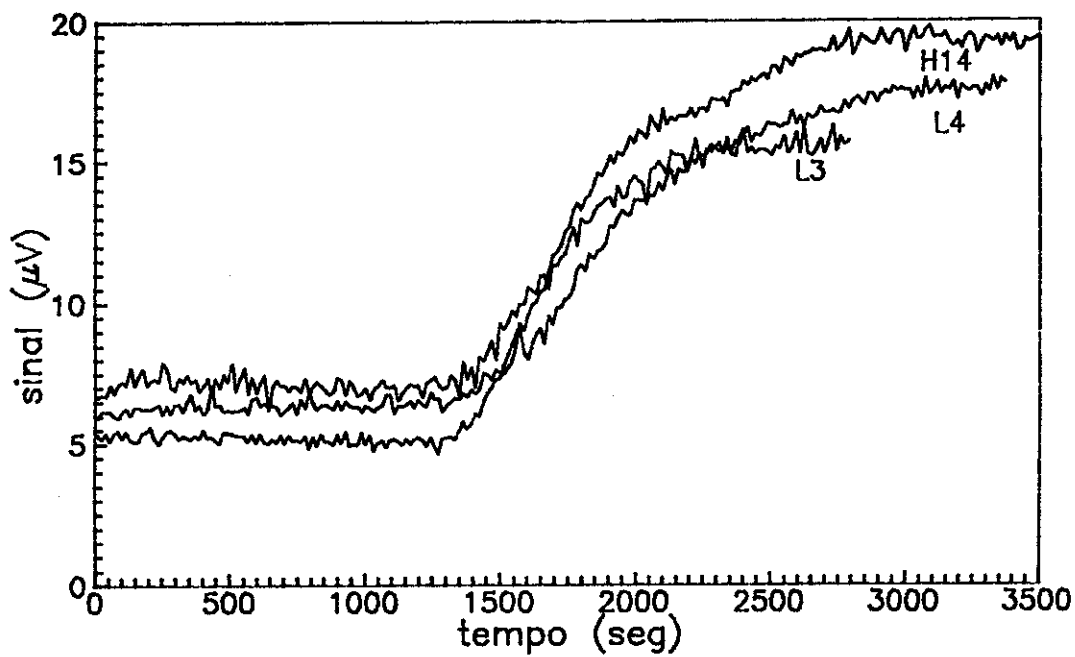


Figura 5.3: Transientes obtidos por indução fotossintética com as amostras do grupo 2, $I = 20W/m^2$.

indicam que os híbridos possuem maior eficiência fotossintética, em baixas intensidades de luz, quando comparado com as linhagens. Isto é mostrado através da derivada da curva de atividade fotossintética, que foi sempre maior nos híbridos de todos os conjuntos, excessão feita a uma das medidas do grupo 2.

Os resultados obtidos com incidência de luz de $20W/m^2$ são mostrados na tabela 5.3. Onde observamos que o tempo inicial da fotossíntese é sempre menor nos híbridos. Entretanto o sinal máximo observado no F1, é semelhante ao mesmo sinal, observado nas linhagens. Por outro lado, a derivada da curva de fotossíntese é maior nos híbridos com excessão de uma das medidas.

Podemos verificar nas tabelas 5.2 e 5.3, que a derivada da curva de atividade fotossintética, é um parâmetro que pode discriminar o milho híbrido de suas linhagens parentais. Os resultados da derivada mostram que o F1 de uma família de milhos, após adaptação ao escuro, responde mais rapidamente à excitação luminosa de baixa intensidade que as linhagens. Isto significa melhor aproveitamento de energia e, consequentemente indica forte correlação dessa resposta com a heterose apresentada pelo F1, resultando em maior produtividade de grãos e matéria vegetativa.

Os resultados deste experimento indicam que a heterose deve estar correlacionada com a rapidez com que o milho híbrido ativa os seus centros de reações fotossintéticas, observado através da curva de indução fotossintética. Verificamos que não deve existir diferenças no oxigênio evoluído, por unidade de área, quando incidimos sobre uma folha vegetal radiação com intensidade superior a $20W/m^2$. Esse fato é indicado através do sinal máximo obtido, ou seja; para a incidência de luz de $10W/m^2$, o filho (F1) apresentou maior sinal fotobárico que seus pais (linhagens), e para excitação de $20W/m^2$ o sinal, relativo ao oxigênio, mostra-se parecido dentro dos grupos estudados.

Ao contrário do observado anteriormente, em nosso estudo sobre heterose com o milho, os resultados deste experimento foram submetidos ao teste das médias de Tukey e mostraram claramente a correlação entre a heterose e a indução fotossintética, após a adaptação da planta ao escuro. Entretanto, novos experimentos estão sendo feitos para diminuir o desvio padrão no teste estatístico.

Tabela 5.2: Resultados obtidos da indução fotossintética, em plantas de milho, excitadas com luz de $10W/m^2$.

AMST	$S_{\max}(\mu V)$	$S_{\min}(\mu V)$	$\Delta S(\mu V)$	$t_f(s)$	$t_i(s)$	$\Delta T(s)$	dS/dt
1	14	3,0	11,0	1400	600	800	0,0137
2	5,6	4,5	1,1	1450	700	750	0,0014
13	13	3,5	9,5	800	250	550	0,0172
1	7,2	3,6	3,6	3700	2100	1600	0,0022
2	5,7	5,2	0,5	3300	3100	400	0,0012
13	12,8	4,4	8,4	1150	400	750	0,0112
1	10,7	2,8	7,9	1300	650	650	0,0121
2	5,6	4,0	1,6	1250	1100	150	0,0106
13	12,0	3,6	8,4	950	400	550	0,0152
1	10,0	6,4	3,6	2050	1050	1000	0,0036
2	6,3	4,2	2,1	1450	680	770	0,0027
13	12,9	3,8	9,1	1050	550	500	0,0182
3	7,2	4,0	3,2	1700	900	800	0,0040
4	7,4	4,8	2,6	2100	1150	950	0,0027
14	12,0	4,5	7,5	2000	900	1100	0,0068
3	6,4	5,6	0,8	2250	1900	350	0,0022
4	7,2	4,0	3,2	1650	1100	550	0,0058
14	12,4	2,8	9,6	1500	550	1050	0,0091
3	13,6	5,6	8,0	1350	850	500	0,0160
4	8,0	6,0	2,0	1900	1250	650	0,0030
14	12,0	5,6	6,4	1550	650	900	0,0071
3	6,8	6,2	0,6	2500	2000	500	0,0012
4	8,6	4,0	4,6	2250	1350	900	0,0051
14	11,5	3,6	7,9	1350	700	650	0,0121
5	9,0	1,5	7,5	1700	650	1050	0,0071
6	8,0	2,5	5,5	1950	950	1000	0,0055
12	14,5	2,0	12,5	1750	650	1100	0,0113
5	6,4	3,8	2,6	1800	1200	600	0,0043
6	11,2	4,4	6,8	1250	600	650	0,0104
12	13,8	2,8	11,0	1100	450	650	0,0169
5	12,2	2,9	9,3	850	300	550	0,0169
6	12,7	3,3	9,4	1000	450	550	0,0170
12	12,5	3,8	8,7	900	400	500	0,0174

Tabela 5.3: Resultados obtidos da indução fotossintética em plantas de milho, excitadas luz de $20W/m^2$.

AMST	$S_{\max}(\mu V)$	$S_{\min}(\mu V)$	$\Delta S(\mu V)$	$t_f(s)$	$t_i(s)$	$\Delta T(s)$	dS/dt
1	16,0	4,0	12,0	1700	450	1250	0,0096
2	12,5	2,5	10,0	1400	350	1050	0,0095
13	16,5	3,5	13,0	950	400	550	0,0236
1	26,5	4,0	22,5	1300	450	850	0,0265
2	22,5	3,0	19,5	1400	750	650	0,0300
13	27,5	4,0	23,5	1200	400	800	0,0294
3	19,0	4,5	14,5	1400	600	800	0,0181
4	14,0	6,0	8,0	1750	1000	750	0,0107
14	20,0	3,5	16,5	1600	1000	600	0,0275
3	15,5	7,0	8,5	2050	1450	600	0,0142
4	17,5	6,0	11,5	2450	1450	1000	0,0115
14	19,0	5,0	14,0	2250	1350	900	0,0156
5	15,0	5,0	10,0	1100	750	350	0,0286
6	14,0	3,5	10,5	1100	400	700	0,0150
12	17,5	6,0	11,5	800	400	400	0,0287
5	16,0	7,0	9,0	2750	1200	1550	0,0058
6	12,0	7,0	5,0	2650	1200	1450	0,0035
12	19,0	4,5	14,5	1100	600	500	0,0290
5	9,5	3,5	6,0	1400	500	900	0,0067
6	15,0	6,0	9,0	1100	600	500	0,0180
12	24,5	4,5	20,0	900	350	550	0,0364
5	7,5	3,5	4,0	1900	1000	900	0,0044
6	20,0	4,3	15,7	850	500	350	0,0449
12	20,0	4,3	15,7	900	550	350	0,0449

Referências Bibliográficas

- [1] Shull, G.H.; Amer. Breeders Assoc. Rpt. 5(1909)51.
- [2] Frankel, R. Ed., Heterosis, Reappraisal of Theory and Practice; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1983).
- [3] Heichel, G.H. and Musgrave, R.B.; Crop Science, 9(1969) 483.
- [4] Moss, D.N.; Proc. of 15th Annual Hybrid Corn Industry- Research Conference, 15(1960)54.
- [5] Johnson, D.R. and Tanner, J.W.; Crop Science, 12(1972)482.
- [6] Kelly, G.S., Latazko, E. and Gibbs, M.; Annu. Rev. Plant Physiol., 27(1976)181.
- [7] Buchanan, B. B.; Annu. Rev. Plant Physiol., 31(1980)341. [8] Canaani, O. and Malkin, S.; Biochim. Biophys. Acta, 766(1984)525.
- [9] Rabinowitch, E.I.; Photosynthesis and Related Process, vol.II, Pt2, Interscience, New York (1956)1313.
- [10] Willis, A.J. and Balasubramanian, S.; New Physiol., 67(1968)265.
- [11] Balasubramanian, S. and Willis, A.J.; New Physiol., 68(1969)663.
- [12] Osterhout, W.J.V. and Haas, A.R.C.; J.Gen.Physiol. X (1918)I.

Capítulo 6

Conclusões e Perspectivas de Estudo

Neste trabalho exploramos o efeito fotoacústico e mostramos sua notável aplicabilidade e versatilidade no estudo de sistemas biológicos. A potencialidade desta técnica foi evidenciada quando obtivemos parâmetros ópticos e térmicos das amostras estudadas, e também quando usamos tais parâmetros para monitorar processos físicos e químicos que ocorrem em amostras biológicas.

No caso dos grãos do milho e de pipoca, a medida da difusividade térmica no pericarpo destes, foi um parâmetro de fundamental importância, com a qual a técnica fotoacústica demonstrou sua notável possibilidade para detectar e monitorar diferenças estruturais, que levaram, a explicar o mecanismo do “estouro” do milho de pipoca. Da mesma forma, e auxiliada por outras técnicas complementares- condutividade térmica, microscopia, rigidez mecânica-, a técnica fotoacústica, combinada com o modelo do vaso de pressão, evidenciou as condições e variações que devem ter ocorrido durante a evolução e domesticação no fruto da pipoca.

No estudo de folhas vegetais, a performance da técnica fotoacústica foi demonstrada, em várias situações experimentais, nas quais o detetor “célula aberta” foi empregado. Em particular, mostramos a possibilidade, de se fazer, estudos “in vivo” e “in situ”, e com isso eliminar sérios problemas com a desidratação das amostras vegetais durante o experimento.

Obtivemos o espectro de absorção de soja e de milho, evolução de oxigênio e energia

armazenada fazendo uso da "célula aberta". Através da evolução de oxigênio observamos a "morte" de uma folha de soja, quando esta, foi separada do caule. Ainda com folhas de soja, estudamos o efeito do nitrato de cádmio durante o desenvolvimento da planta, até a fase de frutificação. Nesse experimento, "in vivo" e "in situ", foi observada uma forte diminuição (60%) na taxa de oxigênio, nos dois primeiros meses de envenenamento. Observamos também, que a energia armazenada nas plantas de soja submetidas ao nitrato de cádmio permaneceu com diferenças de até 8% com relação ao controle, estando este valor dentro do erro experimental e estatístico. Após quinze semanas as plantas de soja mostraram recuperação observada com aumento da taxa de oxigênio para, aproximadamente, 70% com relação à planta do controle. Em plantas de milho, sem uma adaptação ao escuro, foi medida a evolução de oxigênio "in vivo" e "in situ"; onde mostramos que esse parâmetro não aponta o mais produtivo, entre o F1 (híbrido) e seus pais (linhagens). Além da aplicação em folhas vegetais, para medidas de oxigênio e energia armazenada, procedemos a calibração da "célula aberta" com o eletrodo de Clark, onde mais uma vez, demonstramos a sensibilidade da técnica OPC e, ao mesmo tempo, desenvolvemos o método de calibração.

Um efeito de grande importância na área de melhoramento de vegetais é o efeito da heterose. Esse efeito é obtido com o cruzamento genético de linhagens, resultando num híbrido com maior capacidade de produção que seus pais. Em particular, o efeito da heterose, em plantas de milho tem despertado a atenção dos melhoramentistas dessa área. Em geral, a heterose é observada com o plantio das linhagens e do híbrido, onde os resultados das medidas de índice de área foliar (LAI) e o peso seco são estudados. Esse método é utilizado desde o início deste século e, apresenta resultados controversos. Com a indução fotossintética em baixa intensidade luminosa, após adaptação ao escuro, mostramos a possibilidade do uso da "célula aberta", em distinguir o mais produtivo, entre o híbrido e as linhagens da mesma família.

Como perspectivas de continuidade e futuros estudos, com a aplicação da "célula aberta", em sistemas biológicos "in vivo" e "in situ", destacamos a aplicação no estudo da ação de agrotóxicos, herbicidas, pesticidas, etc. em folhas vegetais. Em particular, podemos correlacionar, através das medidas de oxigênio evoluído e energia armazenada, a produtividade de plantas frutíferas e leguminosas.

Finalmente, esta técnica não destrutiva pode tornar-se bastante útil para os fisio-

logistas vegetais em outras investigações envolvendo interações de sistemas químicos com biológicos. Além disso, a possibilidade de desenvolver medidas “in vivo” e “in situ” pode ajudar em estudos que necessitem de informações da resposta fotossintética das plantas para absorção de nutrientes, intensidade luminosa, condições do ar, temperatura, e outras mudanças ambientais.

Apêndice A

O Processo da Fotossíntese e Estrutura de Folhas Vegetais

A.1 Histórico [1]

Fotossíntese é o processo pelo qual as plantas verdes e certos organismos transformam energia luminosa em energia química. A energia luminosa absorvida em plantas verdes é utilizada para converter água, dióxido de carbono e minerais em oxigênio e compostos orgânicos.

Os estudos em fotossíntese foram iniciados, em 1771, pelo químico inglês Joseph Priestley. Em seu experimento, Priestley acendeu uma vela dentro de uma caixa fechada, contendo somente ar, até que não houvesse mais combustão. Foi então colocado um ramo de hortelã dentro da caixa, e alguns dias após, ele descobriu que a planta produziu uma substância que fazia com que o ar, confinado na caixa ficasse combustível. Hoje sabemos que essa substância é o oxigênio. O trabalho de Priestley foi expandido pelo físico alemão Jan Ingenhousz, em 1779, mostrando que o oxigênio reaparecia se a planta fosse exposta à luz e o processo necessita de tecido verde.

Em 1782 foi demonstrado, por Senebier, que o gás combustível e reaparecia devido a presença de outro gás chamado “ar fixo”, sendo este mais tarde identificado como dióxido de carbono (CO_2).

Em 1804, outros experimentos mostraram que a maior contribuição para o crescimento e peso de uma planta vem da soma de carbono, retirado do CO_2 absorvido e da água recebida via raiz.

Em 1845, com base no conceito de energia química, foi descoberto que a energia luminosa do sol é transformada em energia química pela planta. Desde aquela época até os dias atuais, cientistas nas áreas de física, biologia e química pesquisam a fotossíntese para explicar, cada vez melhor, o processo passo a passo.

Em termos químicos a fotossíntese é um processo de oxi-redução usando a energia luminosa. A energia da luz é utilizada para oxidação da água (H_2O), produzindo O_2 , íons de hidrogênio (H^+) e elétrons. A maioria dos íons e elétrons removidos são transferidos para o CO_2 , que é reduzido a produtos orgânicos. Outros elétrons e íons são usados para

reduzir nitrato e sulfato em aminoácidos, os quais formam blocos de proteínas. Na maioria das plantas verdes, os carboidratos, especialmente amido e açúcar são os maiores produtos orgânicos vindo direto da fotossíntese, representados no primeiro membro do lado direito da equação 4.1 (capítulo 4), que sumariza o processo [2]. Essa reação envolve numerosas reações complexas que ocorrem em dois estágios [1]: a) o estágio de luz, consistindo das reações fotoquímicas dependentes da intensidade luminosa e do comprimento de onda da luz; b) o estágio escuro compreendendo reações químicas controladas por catalíticos orgânicos (enzimas). No primeiro estágio, a energia da luz é absorvida e usada para induzir transferência de elétrons, resultando na síntese dos compostos adenosina trifosfato (ATP) e o elétron doador reduzido em nicotina adenina dinucleotídeo (NADPH). Durante o estágio escuro, o ATP e NADPH formados nas reações de luz são usados para reduzir o dióxido de carbono para compostos orgânicos de carbono.

A.2 Pigmentos de Folhas Vegetais

Os pigmentos são os componentes mais importantes dos cloroplastos [3]. Eles absorvem a luz e iniciam a cadeia de reações enzimáticas que fazem a conversão de H_2O e CO_2 em carboidratos e oxigênio.

Os pigmentos podem ser divididos em três maiores classes [4]: 1) clorofilas; 2) carotenóides e 3) ficobile (este é um pigmento específico de algas).

A clorofila “a” encontrada em todos os vegetais fotossintetizantes, exceto nas bactérias, apresenta um duplo comportamento, pois tanto registra absorção máxima de energia em torno do comprimento de onda de 680nm, como em torno dos 700nm. Esse fenômeno não deve decorrer da estrutura molecular mas talvez de tipos diferentes de associação de sua molécula com outras substâncias, como lipídeos, proteínas e fosfolipídeos [5]. Essa clorofila também absorve em 435nm.

Outros tipos de clorofila são também encontradas em vegetais superiores e algas, entretanto a mais importante destas é a clorofila “b” com picos de absorção em 453 e 650nm quando dissolvidas em solventes orgânicos; em 480 e 650nm, em células.

Os carotenóides são encontrados em quase todos vegetais e dividem-se em dois grupos [3]: a) carotenos e, b) as xantofilas.

Os carotenos subdividem-se em: α -caroteno com absorção em 420, 440 e 470nm, en-

contrado em todas as folhas, em algas vermelhas e num grupo de algas verdes, chamadas sifonais. O β -caroteno, encontrado em todas as plantas é o principal do grupo dos carotenos; tem picos de absorção em 425, 450 e 480nm. O γ -caroteno é encontrado em bactérias verdes e em algumas plantas.

As xantofilas mais importantes são a luteína, presente em folhas verdes e em algas absorvem em 425, 445 e 475nm. A segunda mais importante é a violaxntol com absorção em 425, 450 e 475nm, sendo encontradas em folhas vegetais.

Todos os picos de absorção citados para os carotenóides, referem-se à solução destes em solventes, como hexano para os carotenos e etanol para as xantofilas. As bandas "in vivo" têm certa dificuldade de localização devido a forte superposição com as bandas violeta e azul das clorofilas. Portanto suas bandas são estimadas com deslocamento de 20nm, em torno dos comprimentos de onda, de suas posições em solução.

A.3 O Processo de Absorção e Transferência de Energia

A energia luminosa de 450nm absorvida por uma molécula de clorofila excita alguns elétrons, dentro de sua estrutura, para níveis mais altos, ou estados excitados. Uma molécula nesse estado facilmente libera energia na forma de calor e decai para um estado de menor energia. No caso da clorofila "a", este estado excitado de baixa energia corresponde ao de uma molécula que absorveu luz de 680nm. O retorno da clorofila para o estado fundamental requer liberação de energia do estado excitado. Isto pode ocorrer de várias formas. Em fotossíntese, a maior parte dessa energia é convertida em energia química pela transferência de um elétron da molécula da clorofila para um aceitador de elétrons. Quando esta transferência é bloqueada por inibidores ou por baixa temperatura, a energia pode ser liberada na forma de luz. Tal reemissão é chamada de fluorescência.

A.4 Estrutura de uma Folha Vegetal

Em corte transversal, a folha (figura 1) apresenta três camadas: a epiderme superior, o mesófilo e a epiderme inferior.

A epiderme superior é formada por uma camada de células estreitamente unidas; a parte de suas paredes que fica voltada para fora, em contato com o ambiente, forma a

cutícula que tem a função de proteger a folha da radiação ultravioleta do sol, da perda excessiva de água e de agentes externos, como os fungos [5].

O mesófilo, onde se localizam os cloroplastos, é formado por células ricas em clorofila dispostas em dois tecidos: o parênquima paliádico, logo abaixo da epiderme superior, onde as células alongadas acomodam a clorofila. Mais abaixo células arredondadas estão dispostas irregularmente formam o mesófilo esponjoso (ou lacunoso), deixando entre si lacunas por onde circulam os gases. Nesse último tecido passam as nervuras, formadas de vasos de seiva, tanto mineral, procedentes da raiz e de outras regiões de absorção ocasional, como orgânica, que se originam nas próprias folhas e distribuem alimentos por todas as regiões da planta.

Os estômatos são pequenos orifícios, por onde se processam as trocas gasosas, localizados na superfície epidermal. Os estômatos são circundados por células de defesa chamadas de “guardas” que controlam sua abertura [4]. Quando completamente aberto, o poro estomatal pode medir de 3 a $12\mu\text{m}$ de secção transversal [6].

A superfície de uma folha pode conter de 1000 a 6000 estômatos por cm^2 , dependendo da espécie. Em folhas de milho existem em torno de 6044 estômatos na epiderme superior e 9922 na epiderme inferior, por cm^2 [7]. Os estômatos são freqüentemente mais encontrados na superfície inferior da folha, mas ocorre em algumas espécies em ambas as superfícies [8].

A.5 Fatores que Afetam o Movimento Estomatal

Os fatores ambientais que exercem grande influência na abertura e fechamento de estômatos são a luz, água e temperatura.

Luz: Geralmente os estômatos de uma folha se abrem quando expostos à luz e permanecem abertos sob luz contínua, a não ser que algum outro fator torne-se limitante. Ao retornar ao escuro, os estômatos se fecham. A média de luz necessária para encontrar a máxima abertura estomatal varia com as espécies, mas usualmente é considerada (250fc) menor do que o necessário para máxima atividade fotossintética [9].

Água: Quando a taxa de transpiração excede a taxa de absorção para qualquer período de tempo, é criado um déficit de água na planta. O desenvolvimento do déficit causa um gradiente de propagação de pressão deficitária entre as células de defesa e o

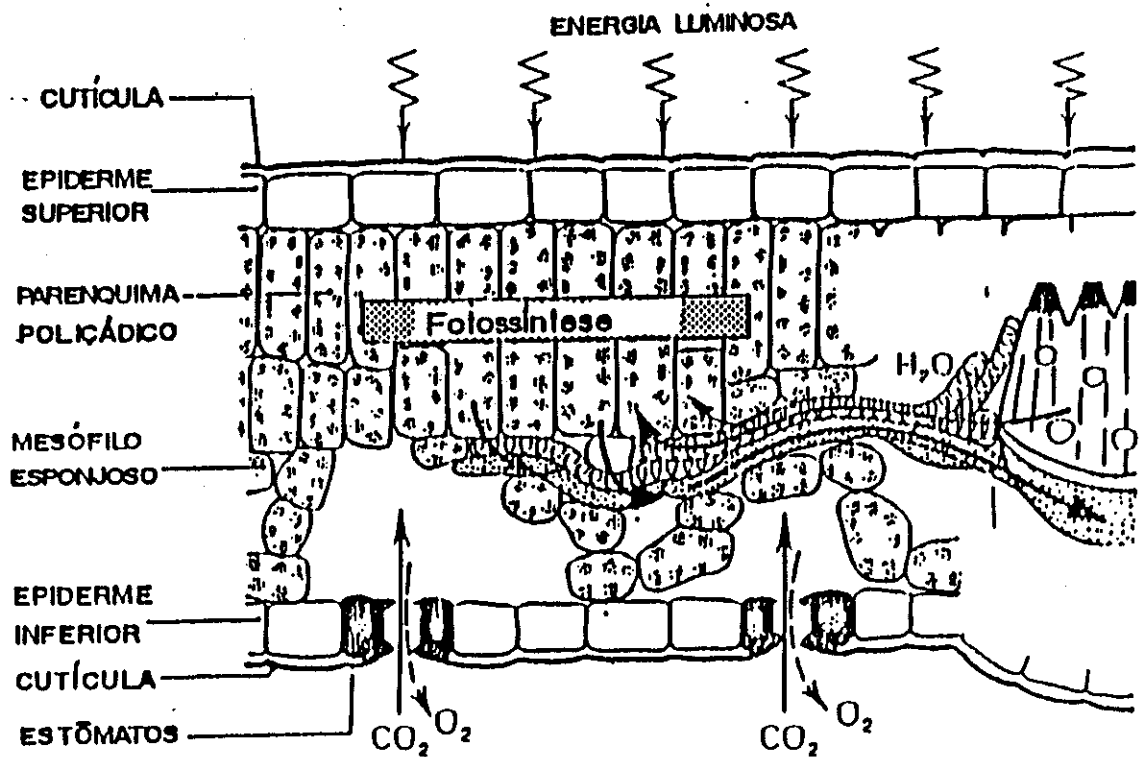


Figura .1: Corte transversal de uma folha vegetal

mesófilo esponjoso e, entre células epidérmicas e o meio ambiente. Esse gradiente favorece o movimento de água fora das células de defesa, causando fechamento dos estômatos, parcial ou total.

Temperatura: Quando todos os outros fatores são favoráveis, então é evidente que um acréscimo na temperatura causa um acréscimo na abertura estomatal. A faixa de temperatura entre 22 e 30°C permite abertura estomatal entre 80 e 95% [10].

A6. Plantas C4

Certas plantas, como a cana de açúcar e milho, têm mecanismo próprio de fixação de carbono. As folhas dessas plantas têm anatomia e bioquímica especiais. As folhas dessas plantas denominadas, C4, possuem dois tipos de células fotossintéticas, geralmente arranjadas com interface comum. As células do mesófilo são localizadas imediatamente abaixo da epiderme e próximo às células da bainha vascular que geralmente formam um círculo em torno dos centros vasculares [11].

Em particular, as funções fotossintéticas são divididas entre as células do mesófilo e bainha vascular. A fixação do carbono inicia nas células do mesófilo, onde o CO₂ é adicionado ao carbono 3 do ácido fosfoenolpiruvato (PEPA) por uma enzima chamada fosfoenolpiruvato carboxilase. O produto desta reação é o ácido oxaloacetato carbono-4, que é reduzido para malato, outra forma de ácido carbono-4. O malato é transferido para as células da bainha vascular, localizada próximo ao sistema vascular da folha, onde completa o ciclo C4, com algumas variações para diferentes espécies.

As plantas C4 transportam o CO₂ dos cloroplastos para a bainha vascular onde é utilizado na síntese de carboidratos.

O alto índice de CO₂ no interior dos cloroplastos serve para o acréscimo da taxa de carboxilação para a oxigenação, assim minimizando a fotorrespiração. Embora a planta gaste mais energia para o ciclo, a perda da energia é compensada pela eliminação da próxima fotorrespiração sob condições onde ocorreria. Isto é uma vantagem das plantas C4 que proporciona à cana de açúcar, milho e outras, grande produção anual de biomassa.

Referências Bibliográficas

- [1] Enciclopaedia Britannica, Photosynthesis, 805.
- [2] Bults, G., Horwitz, A., Malkin, S. and David, C.; Biochim. Biophys. Acta, 679(1982)452.
- [3] Rabinowitch, E. and Govindjee. Photosynthesis. John Willey & Sons Inc., USA (1969).
- [4] Walker, D.A.; New Phytol., 72(1973)209.
- [5] Enciclopédia Mirador Internacional- Enciclopaedia Britannica do Brasil Publicações LTDA., S.Paulo 9(1987).
- [6] Kramer, P.J.; Transpiration and the Water Economy of Plants. In F.C.Steward (ed.), Plant Physiology, Academic Press, New York 2(1959)607.
- [7] Wilson, C.L. and Loomis, W.E.. Botany. Holt,, Rinehart & Winston, New York, (1962).
- [8] Marquezini, M.V., Tese de Mestrado, IFGW-UNICAMP (1990).
- [9] Devlin, M.; Plant Physiology, Van Nostrand Reinhold Company, New York (1969).
- [10] Wilson, C.C.; Plant Physiol. 23(5)(1948).
- [11] Marshall, D.H.; Biochimica et Biophysica Acta, 895(1987) 81.