PRODUÇÃO E DIFUSÃO DE OXIGÊNIO: PROCESSOS BIOFÍSICOS DA FOTOSSÍNTESE INVESTIGADOS COM A TÉCNICA FOTOACÚSTICA

Paulo Roxo Barja

Orientador: Antonio Manoel Mansanares

Tese apresentada
no Instituto de Física
Gleb Wataghin (UNICAMP)
para obtenção do título de
doutor em Ciências

Campinas / 2000

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP

Barja, Paulo Roxo

B239p **Produção e difusão de oxigênio : processos biofísicos da fotossíntese investigados com a técnica fotoacústica. / Paulo Roxo Barja. - Campinas, SP : [s. n.], 2000.**

Orientador: Antonio Manoel Mansanares.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

1. Biofísica. 2. Fotossíntese. 3. Espectroscopia fotoacústica. 4. *Difusão de oxigênio. 5. Eucalipto. 6. Fisiologia vegetal. 7. *Célula fotoacústica aberta. I. Mansanares, Antonio Manoel. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.

Este trabalho é dedicado à memória de

Jorge Mascarenhas Roxo, meu avô,

que me ensinou a resistir bravamente

sempre mantendo o espírito aventureiro.

Resumo

Este trabalho mostra a caracterização de sistemas vegetais em função de sua atividade fotossintética a partir de medidas efetuadas com a técnica fotoacústica. Um modelo para a difusão de oxigênio em folhas é analisado e verificado através de medidas *in vivo* e *in situ* em plantas de diversas espécies. Medidas de indução da fotossíntese em mudas de eucalipto produzidas a partir de dois procedimentos diferentes permitiram constatar o melhor desempenho fotossintético dos clones obtidos por estaquia, quando comparados às mudas semeadas. A ocorrência de estresse radicular e seus efeitos na fotossíntese do eucalipto foram avaliados através de medidas fotoacústicas. Este estudo também permitiu comparar a eficiência das técnicas fotoacústica e fluorescência na diagnose das mudas sujeitas a estresse.

Palavras-chave: *Fotoacústica, fotossíntese, clones (eucalipto), difusão de oxigênio, estresse radicular, indução fotossintética*.

Abstract

This work shows the characterization of plant systems through their photosynthetic activity measured with the photoacoustic technique. A model for oxygen diffusion in leaves is analyzed and checked through *in vivo* and *in situ* measurements in plants from different species. Photosynthetic induction measurements in eucalyptus plants produced by two distinct procedures lead to the conclusion that clones (shoot cuttings) presented a higher photosynthetic performance than that shown by seedlings. The occurrence of radicular stress and its effects in the photosynthesis of eucalyptus samples were evaluated through photoacoustic measurements. This study also allowed the comparison between the efficiency of the photoacoustic and the fluorescence techniques on the diagnosis of plants subjected to stress conditions.

Agradecimentos

- ao Antonio, pela orientação atenta;
- à minha esposa Adriana Marques: “um brinde ao amor absoluto”;
- a toda a minha família, especialmente aos meus pais, Antônio e Ila Maria, minhas irmãs, Sílvia e Luísa, e minha avó, Dina, pela confiança;
- ao professor Edson Corrêa da Silva, pelo apoio irrestrito no decorrer do trabalho, incluindo as caronas;
- aos colegas do laboratório de Fototérmica: Dinah, Douglas, Jerias, José Roberto, Laura, Manoel, Alberto e Bernal, pela ajuda ao longo do percurso;
- ao prof. Antônio Magalhães, pela colaboração no início deste trabalho;
- ao prof. Pedro Alves, pelas amostras conseguidas junto à CELPAV, pelas medidas complementares (Cap.6) e pelas discussões;
- ao prof. Peter Korpiun, pela colaboração firmada em sua visita ao Laboratório de Fototérmica, em 1996 (projeto RHAE);
- ao prof. Carlos Labate, pelas discussões e referências;
- aos profs. Helion Vargas, Marco Aurélio P. Lima e Annette Gorenstein, pelo interesse e pelas sugestões;
- ao engenheiro Costa, pelos espectros de eucalipto;
- ao Gilmar, da gráfica, pela solicitude na encadernação;
- à Secretaria de Pós Graduação do IFGW, pelo apoio logístico;
- à CAPES, pelo apoio financeiro.

Apresentação

Este trabalho se divide em duas partes. A primeira parte (Capítulos 1 a 4) forma o corpo teórico que fundamenta o trabalho experimental desenvolvido e relatado na parte seguinte (Capítulos 5 e 6). A **Introdução** apresenta as principais motivações para o estudo efetuado, bem como os objetivos do trabalho. Em seguida, **Mecanismos biofísicos da fotossíntese** fala sobre os diversos aspectos do processo fotossintético que subsidiaram a pesquisa. O modelo desenvolvido por Peter Korpiun para a difusão do oxigênio é apresentado e analisado em **Teoria do sinal fotoacústico em folhas**. O quarto capítulo, **Materiais e métodos**, descreve o aparato experimental desenvolvido e utilizado nas diferentes medidas realizadas. A segunda parte se inicia com resultados referentes à difusão do oxigênio em folhas de várias espécies vegetais (**Medidas em função da frequência**). Em **Desempenho fotossintético**, trata-se da indução fotossintética em mudas de eucalipto: primeiro, é feita a comparação entre mudas obtidas por semeadura e aquelas produzidas por enraizamento de estacas (clones); em seguida, estuda-se os efeitos do estresse radicular (danos à atividade fotossintética e ao desenvolvimento das mudas causados pelo crescimento limitado da raiz). Uma análise global da pesquisa é feita em **Conclusões**, enquanto o capítulo final, **Perspectivas**, sugere como a pesquisa pode ter sequência.

ÍNDICE

PARTE I

1. Introdução 4

- O que é a fotossíntese ? 5
- Por que estudar fotossíntese ? 6
- Objetivos deste trabalho 7

2. Mecanismos biofísicos da fotossíntese 9

- Morfologia 9
- Os tilacóides 10
- Como as plantas absorvem luz ? Os pigmentos da fotossíntese 10
- Transferência de energia até os centros de reação 12
- Vias de decaimento da clorofila 14
- Fotoproteção – o mecanismo de *quenching* 15
- Onde ocorrem as reações fotoquímicas ? Os centros de reação fotossintética 16
- Os dois fotossistemas e o *Efeito Emerson* 18
- Esquema Z 19
- A separação espacial entre os dois fotossistemas 21
- As duas fases da fotossíntese 22
- A fase fotoquímica 22
- Gradiente eletroquímico 23
- Separação e transporte de elétrons 23
- Do *PS II* ao *PS I*, através dos citocromos 24

- Resumo: a cadeia eletrônica 25
- A evolução de oxigênio: um relógio 25
- Eficiência da conversão da energia luminosa absorvida em energia química armazenada 27
- Fase enzimática 28
- Do CO_2 à glicose 28
- Resumo: a cadeia enzimática 30
- A fotorrespiração 30

3. Teoria do sinal fotoacústico em folhas 31

- Definições 33
- Componente térmica do sinal fotoacústico 33
- A evolução de oxigênio e o sinal fotoacústico 34
- Difusão do oxigênio 36
- Condições de contorno 38
- Por que a absorção de CO_2 não é observada ? 41
- Considerações sobre o modelo 42

4. Materiais e Métodos 43

- A Célula Fotoacústica Aberta 43
- Montagem experimental 45
- Teoria da OPC 46

OPC e o estudo da atividade fotossintética *in vivo* 46

- Indução fotossintética 46
- Saturação da fotossíntese e efeitos da desidratação 47
- Calibração 49
- Nova célula aberta para medidas em função da frequência 49

- Medidas de fluorescência modulada 52
- Determinando o coeficiente de absorção ótica β 53
- A projeção em fase nas curvas de indução fotossintética 54

PARTE II

5. Medidas em função da frequência 56
- Análise comparativa das medidas efetuadas 69
- Comentários sobre os parâmetros de ajuste 71

6. Desempenho fotossintético 75

I. Estudo da indução fotossintética 75
em mudas de *Eucalyptus urograndis*: semeado x clone

- Notas históricas sobre o desenvolvimento 76
de *E.urograndis*
- Por que estudar clones de eucalipto ? 77
- Indução fotossintética e tempo de adaptação ao escuro 78
- Medidas complementares 81
- Resultados 81

II. Estresse radicular: restrição mecânica de raiz 93

7. Conclusões 109

8. Perspectivas 111

– Apêndice: O coeficiente c_3^+ da (Eq.33) 113

– Bibliografia 115

1. INTRODUÇÃO

“ Quando crianças, temos medo do escuro.
Ironicamente, é nosso destino viver no escuro.”
(Carl Sagan)

Há mais de trezentos anos, Isaac Newton escreveu que “a transformação dos corpos em luz e da luz em corpos é muito cômoda para a Natureza, que parece alegrar-se com esta mudança” [citado em Hatch e Boardman, 1981]. Na época, pouco se sabia a respeito da conversão de energia luminosa em matéria orgânica através da fotossíntese. Com o passar dos séculos, apesar das muitas pesquisas sobre o assunto, ainda temos dificuldade em compreender plenamente os processos fotossintéticos. Avanços neste campo têm ocorrido a partir de observações experimentais envolvendo diversas técnicas como espectroscopia, fotoacústica e fluorescência, entre outras. A realização destas medidas – bem como a interpretação dos dados obtidos – tem envolvido físicos, biólogos, agrônomos e químicos.

Esta tese apresenta medidas fotoacústicas – realizadas principalmente em mudas de eucalipto – que permitiram analisar tópicos relacionados à fotossíntese em plantas. O presente trabalho contribui no estudo da difusão do oxigênio fotossinteticamente evoluído e em investigações relacionadas à indução da atividade fotossintética em mudas. Em particular, observamos os efeitos da chamada restrição mecânica da raiz, um sério fator de estresse imposto às mudas cultivadas comercialmente em recipientes pequenos (outros fatores de estresse, como baixa temperatura e alta intensidade luminosa, foram estudados em minha tese de mestrado).

O QUE É A FOTOSSÍNTESE ?

Fotossíntese é o processo físico-químico pelo qual determinados organismos usam energia luminosa para sintetizar compostos orgânicos. Em plantas, algas e certos tipos de bactérias, a fotossíntese resulta na evolução de oxigênio, enquanto gás carbônico é removido da atmosfera e usado na síntese de carboidratos. Essa é a fotossíntese oxigênica, tema deste trabalho e doravante chamada simplesmente de fotossíntese. Este processo é, na verdade, composto por uma cadeia de reações de óxido-redução que pode ser resumida através da reação

$$n\ CO_2 + n\ H_2O + \textit{energia luminosa} \rightarrow C_nH_{2n}O_n + n\ O_2$$

Assim, as plantas convertem gás carbônico e água em matéria orgânica (carboidratos) e oxigênio. Este processo pode ser dividido em duas séries de reações. A primeira depende da absorção de luz e compreende a divisão da molécula de água e a produção de oxigênio e compostos armazenadores de energia, entre eles o ATP (trifosfato de adenosina) e o NADPH. Na etapa seguinte, estes compostos são usados para produzir carboidratos, proteínas e lipídios a partir do gás carbônico atmosférico.

O sol fornece a radiação utilizada pelas plantas na fotossíntese. Este processo é vital para o homem e os animais, que consomem o oxigênio produzido fotossinteticamente. No entanto, a característica fundamental da fotossíntese não é a liberação de oxigênio, e sim a produção de energia química pelas plantas, enquanto os demais seres vivos a convertem em outras formas de energia (calor, energia mecânica etc). A principal característica da energia química é justamente sua estabilidade: plantas armazenam energia sob a forma de compostos químicos - os combustíveis fósseis - que podem ser conservados por milhões de anos.

POR QUE ESTUDAR FOTOSSÍNTESE ?

A fotossíntese é importante por diversas razões. Em primeiro lugar, através da fotossíntese os vegetais convertem energia solar em energia química, garantindo assim a subsistência dos animais (que se alimentam de plantas ou de outros animais que são herbívoros). Os animais dependem do ***oxigênio*** para transformar carboidratos em energia útil - e o "efeito colateral" da fotossíntese é o fornecimento desse oxigênio.

Entre os ***materiais*** utilizados pelo homem e produzidos a partir da fotossíntese estão a madeira, o carvão, o petróleo e seus derivados, o papel (celulose) e diversas fibras naturais, como o algodão. O etanol (álcool utilizado como combustível ou adicionado à gasolina para diminuir a emissão de poluentes pelos veículos) é produzido a partir da fermentação de açúcares gerados fotossinteticamente. O etanol também pode ser convertido em etileno, bastante utilizado na indústria petroquímica.

Na ***agricultura***, a adaptabilidade de uma planta ao campo pode ser avaliada pelo desempenho fotossintético das mudas. É necessário estudar a fotossíntese para que, interferindo nos processos bioquímicos com o auxílio da biologia molecular, possamos melhorar a eficiência fotossintética das plantas. Conhecer as etapas da fotossíntese também é vital na criação de herbicidas (que agem na cadeia química da fotossíntese). O desenvolvimento de espécies vegetais transgênicas resistentes a certos herbicidas permite que a pulverização destes afete apenas culturas específicas.

Reflexos do estudo da fotossíntese podem ser encontrados mesmo na ***medicina***, uma vez que para desenvolver métodos de combate ao câncer de pele estuda-se os mecanismos de reação à luz apresentados por organismos fotossintetizantes. Além disso, o conhecimento de que substâncias similares à clorofila situam-se naturalmente em tecidos cancerosos permite iluminar um tumor com luz capaz de causar danos fotoquímicos a estas substâncias, matando-o sem afetar o tecido saudável.

Entre outros assuntos que podem direta ou indiretamente se associar ao estudo da fotossíntese, podemos citar a busca por componentes eletrônicos cada vez menores e mais eficientes. A ***eletrônica*** se baseia em mecanismos chaveadores, e os centros de reação fotossintética nada mais são que "chaves naturais" de dimensões moleculares. Essas e outras motivações para o estudo da fotossíntese são comentadas pelo prof. Devens Gust [1996].

OBJETIVOS DESTE TRABALHO

Este trabalho teve dois objetivos principais: estudar a difusão do oxigênio evoluído no processo fotossintético e avaliar a atividade fotossintética em mudas de eucalipto produzidas por diferentes métodos. Para atingir tais objetivos, foi planejada uma série de medidas fotoacústicas. Por ser não-invasiva e não-destrutiva, a técnica fotoacústica é apropriada a estudos em sistemas biológicos.

No que se refere à difusão do oxigênio, estudamos a aplicação do modelo desenvolvido pelo prof. Peter Korpiun para a difusão do oxigênio em folhas vegetais. Chamamos de *Korpiun 1D* este modelo unidimensional, que ainda não se encontra publicado. Nossos objetivos, aqui, foram os seguintes:

1) verificar a validade do modelo proposto para a difusão do O_2 à luz de medidas fotoacústicas realizadas *in vivo* e *in situ*;

2) através de simulações e medidas em função da frequência de modulação, descobrir quais os parâmetros mais relevantes no processo difusivo;

3) mostrar que, a partir do modelo de difusão apresentado, as medidas fotoacústicas realizadas em função da frequência de modulação configuram-se potencialmente como uma ***nova forma de caracterização de espécies vegetais***.

Quanto às medidas de indução fotossintética, nosso objetivo foi avaliar a indução de mudas semeadas e mudas produzidas por enraizamento de estacas (os chamados "clones") de eucalipto. No plantio comercial de eucalipto, as mudas semeadas vêm sendo progressivamente substituídas por clones. Assim, nosso interesse era utilizar a técnica fotoacústica para responder à seguinte pergunta: por que substituir mudas semeadas por clones ?

Outro objetivo de nosso trabalho foi monitorar, através da fotoacústica, a fotossíntese de mudas de eucalipto submetidas ao estresse radicular (restrição mecânica ao crescimento da raiz). Este estudo permitiu também comparar as técnicas fotoacústica e fluorescência na avaliação do desempenho fotossintético de mudas.

2. MECANISMOS BIOFÍSICOS DA FOTOSSÍNTESE

O objetivo deste capítulo é mostrar a compreensão atual dos aspectos biofísicos e bioquímicos da fotossíntese em plantas. Esse conhecimento serve como ponto de partida para o planejamento de experiências úteis ao estudo das reações fotossintéticas e dos diversos fatores que podem influir nesses processos.

MORFOLOGIA

A fotossíntese ocorre dentro das células vegetais, nos *cloroplastos*. Estas organelas variam bastante em tamanho e forma, mas apresentam-se tipicamente como elipsóides com cerca de 5 μm de comprimento. Cada célula vegetal contém até 1000 cloroplastos. Os cloroplastos possuem uma membrana externa altamente permeável e uma membrana interna impermeável separadas por um fino espaço; ambas são formadas por bicamadas de lipídios, como as paredes celulares. A membrana interna envolve o *estroma*, uma solução concentrada de enzimas, DNA, RNA e ribossomos. O estroma, por sua vez, envolve um compartimento membranoso denominado *tilacóide*, enquanto o espaço interno aos tilacóides recebe o nome de *lúmem*. As membranas do tilacóide servem para aumentar a área da região onde podem ocorrer reações com determinadas proteínas (que ficam ligadas a essas membranas).

Os diferentes compartimentos do cloroplasto e as membranas que os separam servem para isolar diferentes etapas da fotossíntese. A chamada "fase clara" da fotossíntese (reações químicas realizadas sob incidência de luz) ocorre nas membranas do tilacóide, que possuem pigmentos responsáveis pela absorção da energia luminosa. Os tilacóides liberam ATP e substâncias redutoras para o estroma, onde se realiza a "fase escura": enzimas atuam na conversão de gás carbônico em carboidratos.

OS TILACÓIDES

São membranas formadas por proteínas e lipídios originários de reentrâncias da membrana interna dos cloroplastos. Apresentam-se como sacos em forma de discos, normalmente empilhados. Cada pilha de tilacóides constitui um *granum*. Um cloroplasto contém de 10 a 100 *grana* interligados.

Várias proteínas essenciais à fotossíntese encontram-se nas membranas tilacoidais: os centros de reação fotossintética, os pigmentos e várias enzimas responsáveis pelo transporte de elétrons são constituídos por proteínas situadas nos tilacóides. Em muitos casos, partes destas proteínas se estendem às regiões aquosas de ambos os lados do tilacóide. Tais proteínas têm uma extremidade voltada para o *estroma* e a outra para o *lúmem*, possuindo assim orientação definida na membrana.

COMO AS PLANTAS ABSORVEM LUZ ?

OS PIGMENTOS DA FOTOSSÍNTESE

Para que a fotossíntese ocorra, é necessária a absorção de luz. Nas plantas, as membranas do tilacóide possuem uma série de moléculas que absorvem fortemente fótons na região visível do espectro eletromagnético. Estas moléculas (ou pigmentos) são as clorofilas e os carotenóides e formam o chamado “sistema de antenas”. A energia solar coletada por este sistema é transmitida aos centros de reação fotossintética, onde ocorrem as transferências primárias de elétrons. A distância entre os pigmentos e sua orientação relativa seguem um arranjo geométrico fixo que otimiza a transferência de energia no sistema captador de luz e a transferência de elétrons nos centros de reação.

Os pigmentos mais importantes para a fotossíntese são as clorofilas, grandes moléculas cujo íon central é o Mg^{+2}. As clorofilas são os principais absorvedores da radiação solar. A clorofila *a*, encontrada em todos os vegetais, possui picos de absorção nas regiões de 430 nm e 670 nm. Atua como antena (captando luz solar) ou componente dos centros de reação onde ocorrem as reações fotossintéticas. Em transferências de elétrons, pode atuar como receptora (na região do Magnésio central) ou doadora (na região dos grupos *carbonil*). A clorofila *b*, encontrada em vegetais superiores e algas, apresenta picos de absorção em 480 nm e 640 nm e atua basicamente nos sistemas coletores de luz para a fotossíntese (antenas).

Os carotenóides servem como captadores de energia na região espectral em que as clorofilas absorvem pouco. Apresentam picos de absorção entre 400 nm e 500 nm, podendo transferir a energia absorvida para as clorofilas, e destas para os centros de reação fotossintética. Carotenóides como o α-caroteno e β-caroteno também atuam na proteção (via *quenching*) contra danos por incidência excessiva de luz.

A Figura 1, na página seguinte, mostra o espectro de absorção para uma folha de eucalipto. A partir desta figura, podemos observar que a existência de um sistema coletor de luz constituído por diversos pigmentos absorvedores permite que ocorra absorção de luz em toda a região visível do espectro eletromagnético. Não é necessário um centro de reação e um sistema de transferência eletrônica para cada pigmento. A energia luminosa é captada por pigmentos que a transferem sucessivamente para outros pigmentos, até que a energia absorvida encontre o destinatário final: um centro de reação fotossintética. Esse sistema coletor de luz maximiza a eficiência da captação evitando danos ao organismo vegetal.

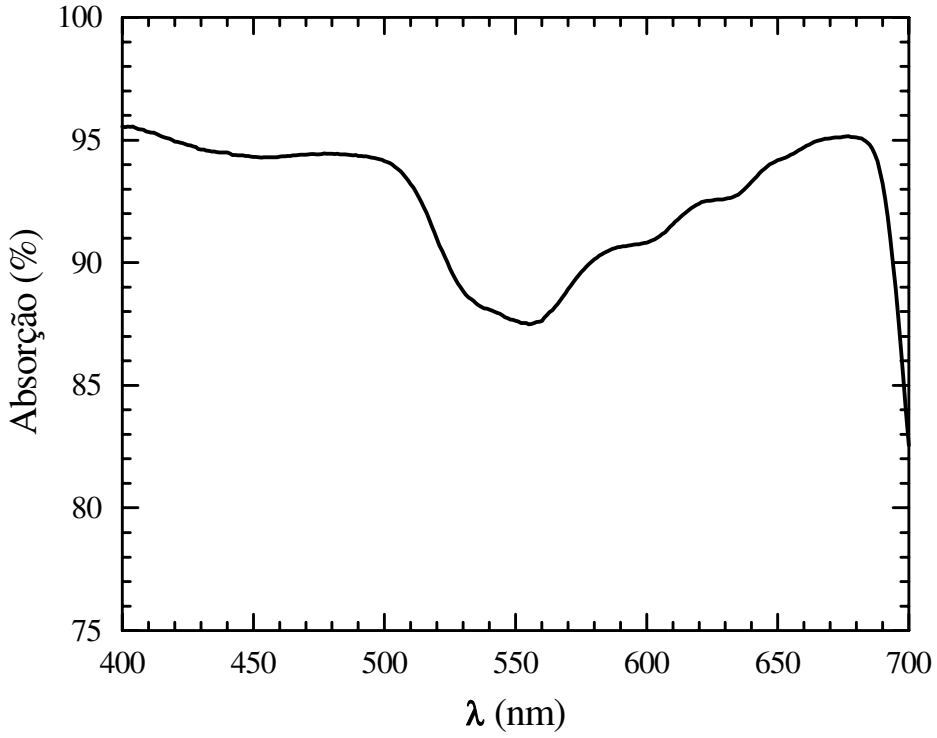


Figura 1 – Espectro de absorção para folha de *Eucalyptus urograndis*.

TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA ATÉ OS CENTROS DE REAÇÃO

Como acabamos de ver, vários pigmentos presentes no cloroplasto atuam como antenas que captam a energia luminosa a ser utilizada nas reações fotossintéticas. A transferência de energia entre as clorofilas-antenas e até o centro de reação se dá através do mecanismo conhecido como "ressonância indutiva" ([Borisov, 1989]; teoria desenvolvida em [Förster, 1960]). A proximidade entre as moléculas do sistema de antenas possibilita a transferência da excitação molecular (primeiro singleto excitado) de um pigmento a outro pigmento, que passa ao estado excitado análogo e transmite a energia adiante, até atingir um centro de reação.

Quando a distância entre moléculas adjacentes de clorofila é menor do que 15 Ä, pode-se tratar o primeiro singleto excitado como um éxciton delocalizado sobre poucas moléculas, devido à superposição dos orbitais moleculares mais externos. A transferência fotossintética de energia ocorre justamente através da interação desses orbitais externos. O acoplamento entre moléculas de clorofila corresponde tipicamente a um espaçamento intermolecular entre 10 e 15 Ä [Borisov, 1989].

A transferência de energia de molécula para molécula é comprovada por medidas de fluorescência (desexcitação por emissão de luz). Quando uma solução de clorofilas *a* e *b* é iluminada com luz que só pode ser absorvida pela clorofila *b*, o espectro de fluorescência mostra que também moléculas de clorofila *a* fluorescem, indicando que há transferência de energia entre moléculas de clorofila *a* e *b*.

O processo de transferência por ressonância indutiva é mais eficiente do que a transferência de energia por meio de fótons sucessivamente absorvidos e emitidos. O resultado da transferência por ressonância é que mais de 95% da energia dos fótons absorvidos por pigmentos da antena chega a um centro de reação, dando início à cadeia de transferências eletrônicas da fotossíntese.

A fração de energia que se perde no processo de transferência de um pigmento a outro é dissipada na forma de calor. Ao contrário do que possa parecer, isso não é um problema, pois o estado excitado possui energia menor nos pigmentos mais próximos ao centro de reação do que nos mais distantes. Em outras palavras, há um gradiente de energia que induz a transferência no sentido do centro de reação, tornando muito difícil a reversão do processo. Por exemplo, a excitação de uma molécula de clorofila *b* (que tem absorção máxima a 650 nm) tem probabilidade muito maior de ser transferida para uma molécula de clorofila *a* (pico de absorção em 670 nm) do que para um carotenóide (com absorção abaixo de 600 nm). A energia térmica sozinha não é suficiente para cobrir o déficit energético entre a clorofila *b* e o carotenóide. Em resumo, a perda de energia em cada quantum absorvido permite que praticamente todos os quanta sejam transmitidos até o centro de reação.

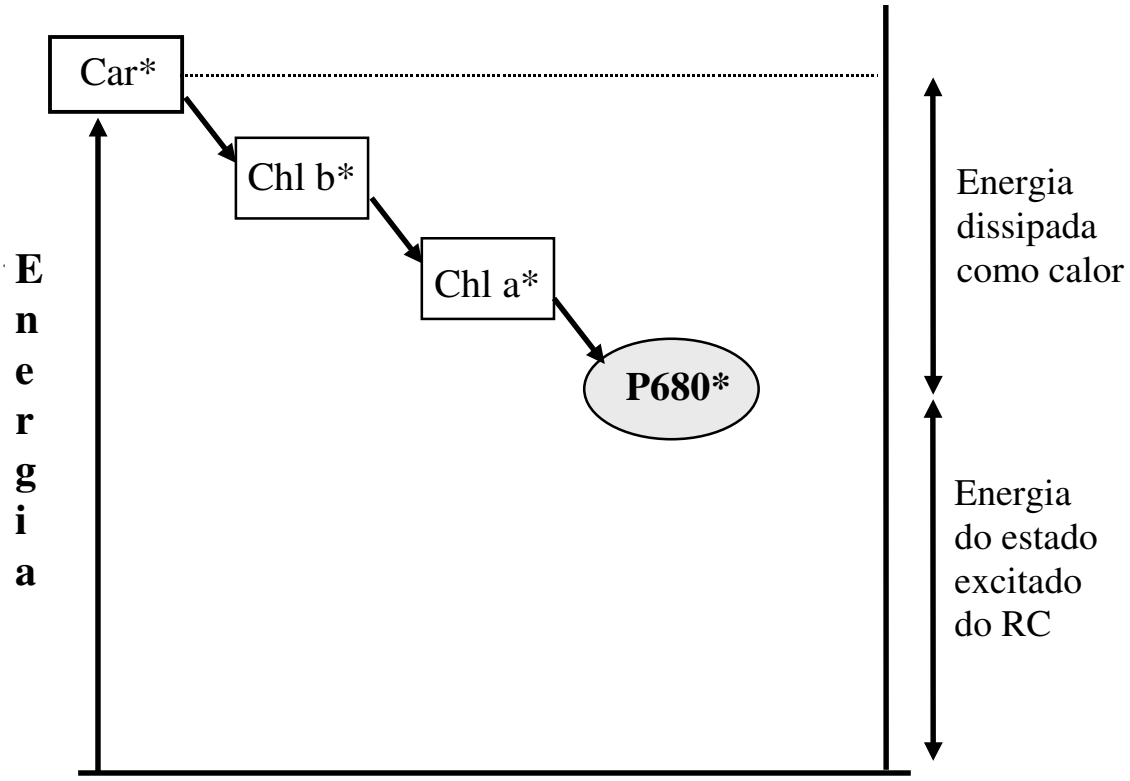


Figura 2 – Diagrama da transferência de energia dos pigmentos até o centro de reação P680.

VIAS DE DECAIMENTO DA CLOROFILA

Moléculas de clorofila absorvem fortemente fótons das regiões azul e vermelha do espectro eletromagnético. Os estados excitados da clorofila que correspondem à absorção de luz azul são muito instáveis, decaindo rapidamente ($\tau \leq 10^{-12}$ s) por geração de calor ao estado excitado mais baixo (primeiro singleto excitado, correspondente à absorção de luz vermelha). A clorofila se mantém nesse estado por vários nanossegundos, podendo decair até o estado fundamental por diversas vias:

- ***Fluorescência*** – retorno ao estado fundamental por emissão de um fóton de energia sempre menor que a do fóton absorvido – esta diferença na energia se deve à dissipação térmica parcial que ocorre antes da emissão do fóton;

- ***Térmica*** – decaimento por conversão direta de parte da energia absorvida em calor;

- ***Fotoquímica*** – decaimento com liberação da energia para reações químicas. Como as etapas iniciais do armazenamento fotossintético de energia estão entre as reações mais rápidas conhecidas, o decaimento por esta via é significativo.

FOTOPROTEÇÃO - O MECANISMO DE *QUENCHING*

Quando uma planta sofre incidência de luz muito intensa, a energia absorvida pelos pigmentos satura a via fotoquímica e se torna necessário dissipar o excesso de energia. Se não desexcitadas rapidamente, as moléculas de clorofila reagem com oxigênio molecular formando o chamado *oxigênio singleto*, altamente reativo, que danifica vários componentes celulares pela produção de radicais livres.

Os carotenóides protegem a planta contra o excesso de luz incidente. Estes pigmentos são responsáveis pelo chamado *quenching* (diminuição) de estados excitados da clorofila, absorvendo rapidamente a energia desses estados excitados. A seguir, voltam ao estado fundamental emitindo na forma de calor a energia absorvida. Como as plantas produzem oxigênio, precisam dos carotenóides para impedir a formação de oxigênio singleto.

O *quenching* permite à planta ajustar-se a diferentes condições; por exemplo, sob alta irradiância, uma taxa significativa de moléculas de clorofila sofre desexcitação antes de transferir a energia aos centros de reação. Isso se justifica por ser mais prático dissipar energia antes de iniciar os processos fotossintéticos do que reparar os danos estruturais causados às células fotossintetizantes pelo acúmulo de radicais livres produzidos pela radiação excessiva [Krause e Weiss, 1991].

Um importante mecanismo utilizado na dissipação do excesso de energia no sistema de pigmentos é o chamado *Ciclo de Xantofilas* [Hall e Rao, 1995]. Sob alta intensidade luminosa, enzimas convertem o carotenóide violaxantina em zeaxantina, outro carotenóide [Demmig-Adams e Adams, 1992]. Este processo de conversão é chamado de *desepoxidase* e ocorre à medida que o pH na região dos tilacóides se torna ácido. Trabalha-se com a hipótese de a molécula de violaxantina apresentar uma energia de estado excitado pouco acima do nível energético excitado da clorofila, agindo como doadora de energia, enquanto a zeaxantina (assim como o *beta-caroteno*) teria um nível excitado pouco abaixo do nível da clorofila, agindo como dissipadora do estado excitado e posteriormente sofrendo desexcitação pela via térmica [Frank *et al*, 1994]. O complexo de antenas LHC II (que contém clorofilas *a* e *b*) é a provável sede principal das reações de *quenching*.

ONDE OCORREM AS REAÇÕES QUÍMICAS ?

OS CENTROS DE REAÇÃO FOTOSSINTÉTICA

As reações fotoquímicas da fotossíntese ocorrem nos centros de reação fotossintética (RCs), proteínas-pigmentos que ocupam um espaço limitado nas membranas do tilacóide. É nesses centros de reação que a energia luminosa absorvida é utilizada para

iniciar reações de transferência de elétrons. Os RCs são formados por moléculas de clorofila *a* especializadas; no entanto, para cada molécula de clorofila presente em um RC, há cerca de 300 outras no cloroplasto. Assim, a grande maioria das clorofilas atua no sistema captador de luz, e não como parte de centros de reação.

Emerson e Arnold obtiveram a primeira evidência experimental do mecanismo de cooperação entre as clorofilas das antenas e dos centros de reação incidindo *flashes* rápidos de luz (10^{-5} s) na alga *Chlorella pyrenoidosa* e medindo o oxigênio evoluído [Emerson e Arnold, 1932]. Variando a energia dos *flashes* (emitidos a cada 0,1 s), notaram que, a partir de uma certa intensidade luminosa, a taxa de produção do oxigênio se tornava constante. A taxa máxima atingida era de aproximadamente uma molécula de O_2 para cada 2500 moléculas de clorofila. Este valor se explica pela associação de um sistema captador de luz com centenas de clorofilas a um único centro de reação. Além disso, como veremos a seguir, cada centro de reação é acionado quatro vezes para a produção de uma molécula de O_2.

Após excitação por incidência de luz, as moléculas de clorofila *a* dos RCs agem como doadoras primárias de elétrons. Para que este processo fotoquímico seja eficiente, deve ser mais rápido que o decaimento natural não-radiativo do sistema de antenas isolado, que ocorre em até 5 ns. O tempo necessário para que a excitação do sistema de antenas seja transferida a RCs e gere a doação primária de elétrons é de apenas 20 ps, por isso a eficiência desta etapa fotossintética é próxima a 100%. Experimentalmente, observa-se que a fluorescência da clorofila é bem menor quando ela se encontra no cloroplasto do que quando se encontra em solução, ou seja, os RCs captam a energia absorvida pelas moléculas de clorofila antes que ocorra uma desexcitação significativa por fluorescência.

OS DOIS FOTOSSISTEMAS E O EFEITO EMERSON

Cada uma das reações fotossintéticas básicas (evolução de O_2 e formação de NADPH) requer um sistema pigmentar próprio para captar a energia luminosa necessária. Estes são os chamados *fotossistemas I* e *II*. A existência dos fotossistemas foi descoberta em 1957: o fisiologista Ralph Emerson notou que, na extremidade vermelha do espectro de absorção do cloroplasto, não só a absorção como também *a eficiência quântica da luz absorvida* caía. Assim, luz com $\lambda > 680$ nm parecia pouco eficiente fotossinteticamente. No entanto, Emerson também observou que a incidência simultânea de luz com dois comprimentos de onda distintos era mais eficiente que a soma da incidência isolada de cada comprimento de onda, *mesmo quando um dos comprimentos incidentes ficava na região de $\lambda > 680$ nm*. Emerson concluiu que a fotossíntese envolvia a cooperação de dois conjuntos diferentes de pigmentos, cada um dos quais possuindo um espectro de absorção próprio [Emerson, 1958].

A fotossíntese é naturalmente favorecida pelo espectro da luz solar, que excita igualmente ambos os fotossistemas. Em plantas cultivadas sob incidência de luz com distribuição espectral diferente da luz solar, a concentração dos diversos pigmentos varia de modo a otimizar o aproveitamento da radiação incidente [Myers, 1971]. Vejamos as características desses fotossistemas:

- ***FOTOSSISTEMA II (PS II)*** - Possui clorofila *a* e *b* em quantidades semelhantes, captando comprimentos de onda mais curtos que os captados pelo fotossistema I. Possui o centro de reação P680 (assim chamado por apresentar pico de absorção em 680 nm). É responsável pela dissociação de moléculas de água, liberando oxigênio, prótons e iniciando a cadeia de transporte eletrônico da fotossíntese. Transfere elétrons excitados ao PS I;

- ***FOTOSSISTEMA I (PS I)*** - Tem alta concentração de clorofila *a*, captando essencialmente radiações de comprimento de onda longo. O doador primário de elétrons neste fotossistema é o P700, molécula de clorofila especializada com pico de absorção em 700 nm. O PS I pode usar a energia luminosa para sintetizar ATP. Além disso, utiliza os elétrons transferidos pelo PS II para formar o NADPH.

ESQUEMA Z

Hill e Bendall observaram experimentalmente a atuação distinta dos dois fotossistemas a partir da oxidação de *citocromos*, proteínas que contêm ferro e são transportadoras de elétrons na fotossíntese, sendo encontradas nos cloroplastos [Hill e Bendall, 1960]. Citocromos de uma alga sofriam oxidação sob incidência de luz com comprimento de onda longo, enquanto a incidência simultânea de luz com comprimento de onda curto revertia parcialmente o processo. Verificou-se assim que um dos fotossistemas era responsável pela oxidação do citocromo e o outro, pela sua redução.

A colaboração entre os fotossistemas se dá conforme o que hoje chamamos de "esquema-Z" de transferência eletrônica, segundo o qual receptores reduzidos da reação no fotossistema II são doadores de elétrons para as reações no fotossistema I. Na transferência de elétrons em cadeia, um elemento recebe um elétron e é reduzido, sendo reoxidado com a doação deste elétron ao elemento seguinte da cadeia.

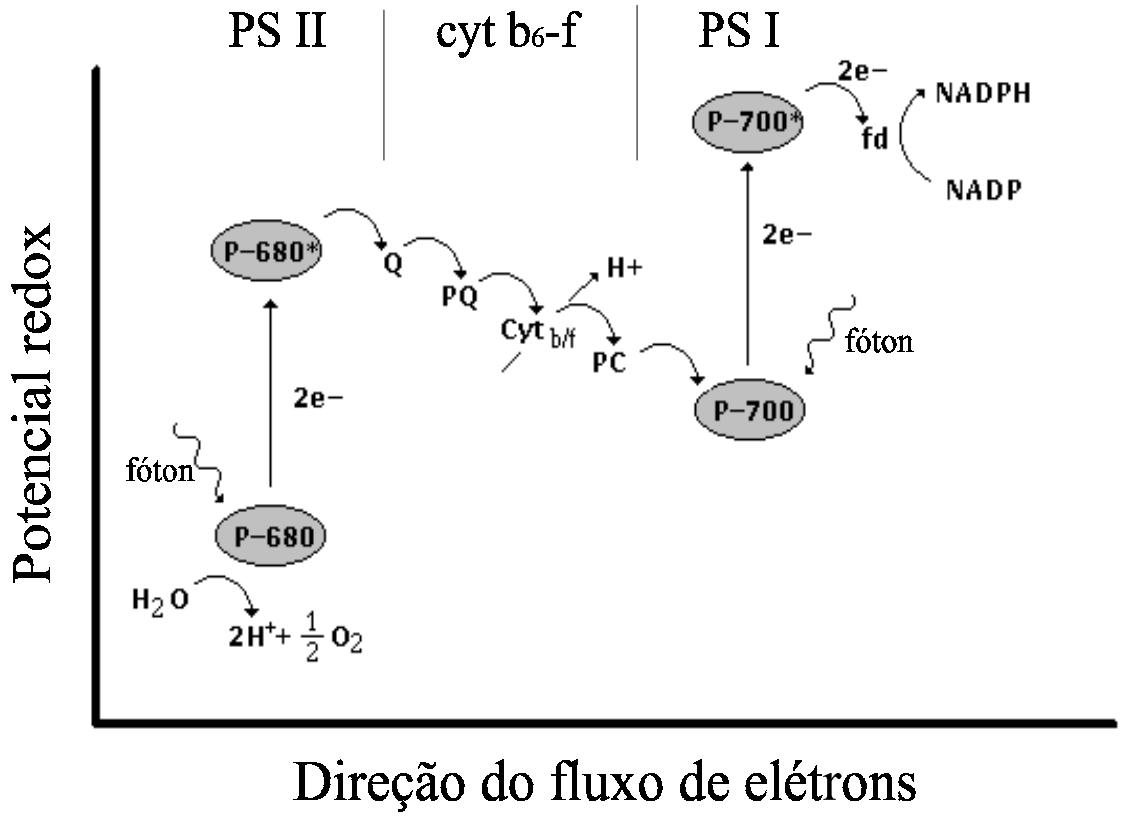


Figura 3 – Representação esquemática da transferência eletrônica entre os fotossistemas I e II. Este processo é conhecido como ***fotofosforilação não-cíclica***.

A SEPARAÇÃO ESPACIAL ENTRE OS FOTOSSISTEMAS

Enquanto os pigmentos e proteínas do PS II se concentram na região interna dos *grana*, os do PS I estão situados na região do *estroma* ou nas extremidades das pilhas de *grana*. O complexo de citocromos b_6-*f* pode ser encontrado em ambas as regiões. Assim, a transferência de elétrons do PS II ao PS I ocorre através da difusão de portadores de elétrons da região dos *grana* até a região do *estroma*. Prótons liberados na oxidação da água também se difundem ao estroma, onde ocorre a síntese de ATP.

A separação espacial de dezenas de nanometros entre os diferentes fotossistemas explica porque a proporção entre estes complexos não é necessariamente de 1 para 1. Os RCs do PS II fornecem agentes redutores (*reducing equivalents*) a uma reserva comum de plastoquinona, que transporta elétrons; os RCs do PS I retiram os agentes redutores daí, não de nenhum PS II específico.

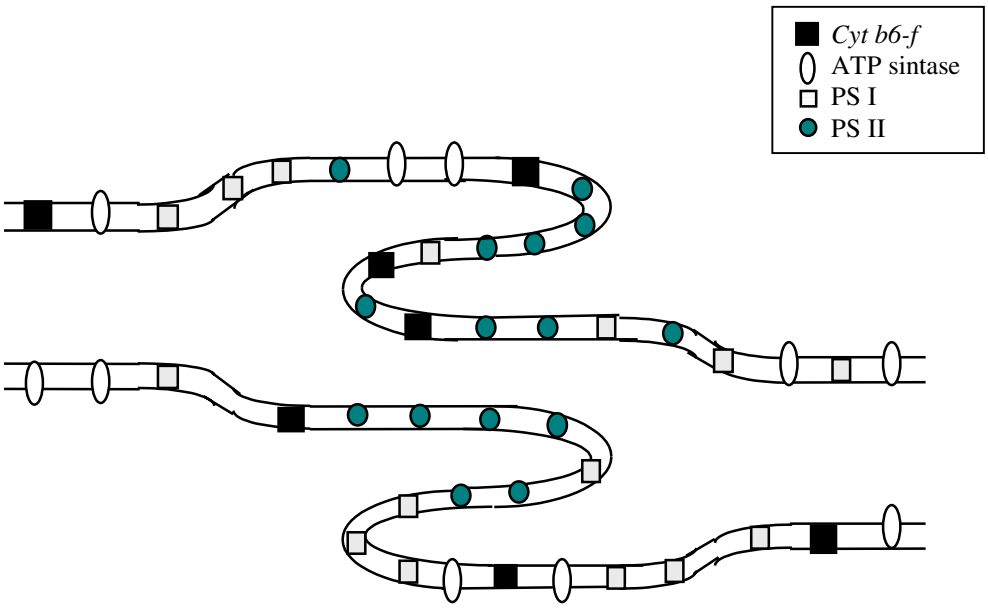


Figura 4 – Representação da membrana tilacoidal, mostrando a concentração de ATP sintase, do complexo de citocromos b_6-*f* e dos fotossistemas nas diferentes regiões [Taiz e Zeiger, 1991].

AS DUAS FASES DA FOTOSSÍNTESE

A fotossíntese é usualmente dividida nas chamadas fases fotoquímica e enzimática. A *fase fotoquímica* ocorre nas membranas tilacoidais e consiste de uma longa cadeia de reações de óxido-redução (composta por até 50 etapas). Esta fase engloba a evolução de oxigênio a partir da quebra de moléculas de água, redução de NADP e formação de ATP. A *fase enzimática*, por sua vez, envolve as reações de redução de carbono.

É importante salientar que somente as reações fotoquímicas, que ocorrem nos centros de reação, dependem da incidência de luz. Todas as reações de transferência de elétrons, consideradas como parte da chamada fase fotoquímica, também podem ocorrer no escuro.

A FASE FOTOQUÍMICA: TRANSPORTE DE ELÉTRONS

Após a absorção de luz e excitação do P680 (centro de reação do fotossistema II), o transporte de elétrons na fotossíntese tem início com a quebra da molécula de água, descrita pela reação abaixo:

$$2\ H_2O + \textit{energia luminosa} \rightarrow O_2 + 4\ H^+ + 4\ e^- \quad (V = -\ 0{,}815\ V)$$

onde o valor entre parênteses é o potencial de redução correspondente. Esta é a chamada reação de *foto-oxidação* da água: energia luminosa dissocia moléculas de água, liberando oxigênio para a atmosfera.

GRADIENTE ELETROQUÍMICO

Enquanto cada elétron liberado passa por uma cadeia de reações até o PS I, íons de hidrogênio (prótons) são transferidos do estroma para o espaço tilacoidal interno. Isso ocorre da seguinte forma: uma *plastoquinona* recebe o elétron excitado na região intermediária da membrana tilacoidal, retirando um próton da região do estroma para se manter neutra. Tal elétron é então transferido a um transportador eletrônico (*citocromo f*) localizado junto ao espaço tilacoidal interno (*lúmem*); assim, o próton que havia sido capturado é agora libertado nesse espaço.

O acúmulo de íons H^+ no lúmem gera um gradiente eletroquímico na membrana tilacoidal: além da diferença de potencial elétrico, o espaço tilacoidal interno se torna 1000 vezes mais ácido (pH 5) que a região do estroma (pH 8). Esse forte gradiente produz uma descarga de íons H^+ que atravessam a membrana de volta ao estroma através da ATP-sintase, proteína situada nos tilacóides. No processo, há síntese de ATP.

SEPARAÇÃO E TRANSPORTE DE ELÉTRONS

No PS II, cada quantum de energia capturado pelo centro de reação gera a extração de um elétron do doador P680[1]. O elétron extraído do P680 passa sucessivamente pela *feofitina* [2] (PHEO) e pela *quinona A* (QA) até atingir a *quinona B* (QB) [3]. Enquanto QA só aceita um elétron por vez, QB aceita dois elétrons. Assim, a doação consecutiva de dois elétrons por parte do P680 forma QB^{-2}; este composto incorpora dois prótons do estroma,

---

[1] Este pigmento volta a seu estado reduzido recebendo um elétron da cadeia Z da proteína D1 (integrante do centro de reação). Esta, por sua vez, recebe o elétron que a reduz novamente do *sistema de evolução de oxigênio*.

[2] *feofitina*: molécula de clorofila *a* em que o Mg^{+2} central é substituído por 2 íons H^+.

[3] As quinonas QA e QB estão ligadas a dois polipeptídeos do centro de reação do PS II, os dímeros D1 e D2.

sendo liberado como *hidroquinona* (PQH_2, também chamada de *plastoquinol*). Esta primeira etapa da cadeia de transferência eletrônica ocorre num tempo da ordem de 10^{-10} s.

DO *PS II* AO *PS I*, ATRAVÉS DOS CITOCROMOS

O complexo de citocromos *cyt* b_6-*f* oxida a hidroquinona formada na cadeia de reações fotoquímicas, transferindo íons de hidrogênio ao espaço tilacoidal interno (o que gera o gradiente eletroquímico responsável pela síntese de ATP); em seguida, reduz a *plastocianina* [4] (PC). Esta proteína, por sua vez, transfere elétrons ao pigmento P700 (do PS I) que, excitado por energia luminosa, repassa-os a uma nova série de receptores. O receptor primário A_0 é uma clorofila *a* e o seguinte, A_1, a quinona conhecida como *vitamina K1*. Em seguida, os elétrons são transmitidos por proteínas da membrana tilacoidal (FeS_X, FeS_B e FeS_A, todas contendo ferro e enxofre [5]) até chegar à ferredoxina (Fd).

Os elétrons que passam pela ferredoxina (no chamado *transporte eletrônico não-cíclico*) fazem com que a ferredoxina-NADP-redutase (Fp) forme NADPH a partir de $NADP^+$. O composto NADPH atua como armazenador de energia e agente redutor, pois pode ser facilmente oxidado. É utilizado na redução de CO_2, no chamado Ciclo de Calvin. A reação de redução que forma o composto NADPH é dada por:

$$NADP^+ + H^+ + 2\ e^- \rightarrow NADPH \qquad (V = -\ 0{,}320\ V)$$

---

[4] *plastocianina*: proteína que contém cobre, encontrada em cloroplastos.

[5] As proteínas do tipo FeS podem aceitar elétrons através da transição $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$, realizando a transição inversa quando atuam como agentes redutores. Cada uma dessas proteínas pode absorver (transferir) apenas um elétron por vez, apesar de seus centros apresentarem até 4 íons de ferro.

RESUMO: A CADEIA ELETRÔNICA

O PS II recebe energia luminosa e dissocia moléculas de água, produzindo elétrons e uma molécula de oxigênio a cada duas de água dissociadas. Os elétrons passam por uma cadeia de reações de óxido-redução (esquema Z) e os prótons se acumulam no lúmem, gerando através da membrana tilacoidal um gradiente eletroquímico responsável pela formação de ATP. Os elétrons liberados na dissociação da molécula de água são transferidos ao PS I através do complexo *cyt* b_6-*f*. O plastoquinol e a plastocianina são as proteínas móveis que atuam como portadores de elétrons conectando respectivamente o PS II ao complexo *cyt* b_6-*f* e este ao PS I. O PS I – também excitado por irradiância – é responsável pela formação de NADPH.

A reação que resume os processos de quebra da molécula de água e formação de NADPH envolve a transferência de 4 elétrons e é dada por:

$$2\ NADP^+ + 2\ H_2O \rightarrow 2\ NADPH + O_2 + 2\ H^+ \qquad (V = -\ 1{,}135\ V)$$

A energia necessária para que esta reação ocorra corresponde a um fóton na região ultravioleta; assim, ainda que fosse 100% eficiente, a fotossíntese necessitaria de mais de um fóton na região do visível para realizar esta reação.

A EVOLUÇÃO DE OXIGÊNIO: UM RELÓGIO

Expondo as membranas fotossintéticas a sucessivos pulsos luminosos e observando a evolução de oxigênio em função do número de pulsos, Forbush, Kok e McGloin [Forbush et al., 1971] observaram que os picos de rendimento ocorrem a cada 4 pulsos. Esta dependência se deve ao mecanismo de oxidação da água. No processo de formação de uma molécula de oxigênio, 4 elétrons devem ser removidos de duas moléculas de água.

Este processo cíclico fornece elétrons ao doador primário oxidado, $P680^+$. Depois de um pulso, $P680^+$ é formado, e um elétron é transferido através da tirosina Yz do complexo de manganês $(Mn)_4$. Os três pulsos seguintes repetem sucessivamente três processos análogos de oxidação no grupo $(Mn)_4$, até que este acumule 4 cargas positivas. Isso permite ao complexo oxidar 2 H_2O, liberando oxigênio molecular e 4 íons H^+. Este processo é conhecido como "*relógio de oxigênio*" [Govindjee e Whitmarsh, 1997] e já foi estudado através da técnica fotoacústica pulsada [Mauzerall et al., 1988].

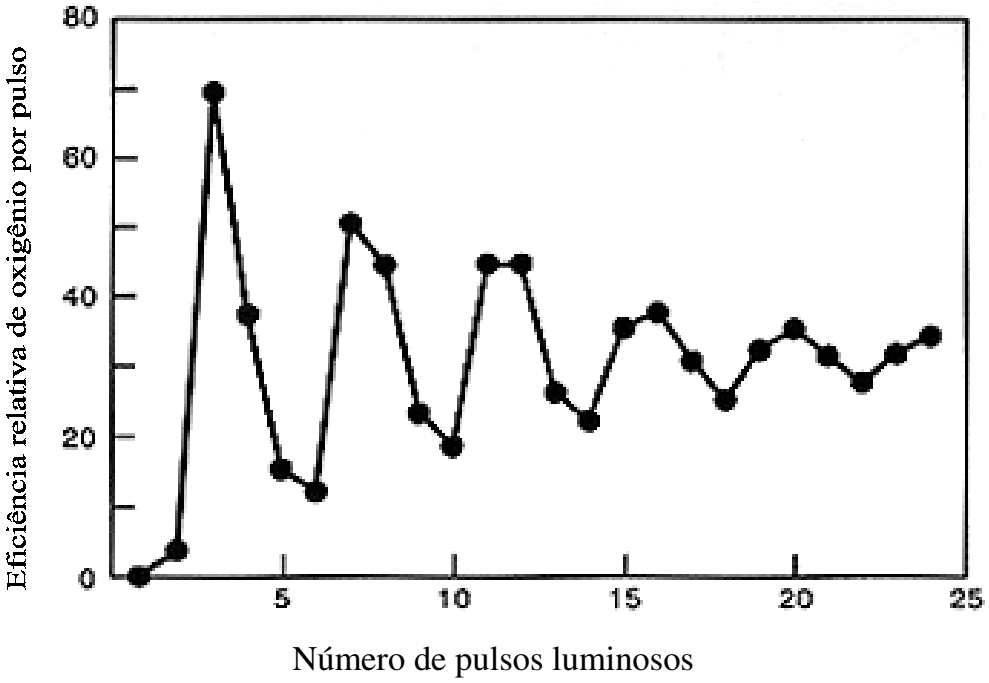


Figura 5 – Evolução de oxigênio em função do número de pulsos de luz nas membranas tilacoidais (medida em cloroplastos de espinafre adaptados ao escuro). Nota-se a ocorrência de picos a cada 4 pulsos até que a curva é atenuada e a eficiência medida passa a representar um valor médio [Forbush et al., 1971].

A periodicidade na evolução de O_2 mostra que este é produzido por um único centro de evolução de oxigênio (OEC) *que atravessa ciclicamente vários estados de oxidação*. O OEC é constituído pelo grupo $(Mn)_4$ e íons Ca^{2+} e Cl^-.

EFICIÊNCIA DA CONVERSÃO DA ENERGIA LUMINOSA ABSORVIDA EM ENERGIA QUÍMICA ARMAZENADA

De acordo com o esquema Z, para formar uma molécula de oxigênio é preciso transferir 4 elétrons da água até um receptor final, passando pelos dois fotossistemas. Como cada um dos fotossistemas deve absorver um fóton na região do vermelho numa transferência eletrônica, a máxima eficiência quântica corresponde a um mínimo de 8 fótons absorvidos para cada O_2 produzido. Na verdade, porém, o número de fótons necessários é maior, pois alguns dos elétrons ejetados pelo PS I podem fluir de volta ao *pool* de plastoquinonas e destas ao complexo citocrômico *cyt* b_6-*f*, realimentando assim o gradiente eletroquímico (processo de *fotofosforilação cíclica*).

Assumindo a razão de 8 fótons por O_2 evoluído, pode-se estimar a máxima eficiência da ***conversão energética da fotossíntese*** (energia armazenada na forma de carboidratos/energia luminosa absorvida). Como 8 moles de fótons na região do vermelho equivalem a 1400 kJ, e cada mol de CO_2 reduzido equivale a 480 kJ, a eficiência máxima da conversão energética da luz absorvida em carboidratos é de aproximadamente 33%. Em condições normais, a performance das plantas fica muito abaixo destes valores teóricos, sendo limitada pelas próprias reações bioquímicas na planta [6] e pelas condições ambientais. Uma das plantas mais eficientes é a cana de açúcar, capaz de armazenar até 1% da energia recebida [Govindjee e Whitmarsh, 1997].

[6] Sob plena luz solar, a máxima absorção luminosa de uma clorofila é da ordem de 10 fótons/s; como há cerca de 300 clorofilas por centro de reação, cada um destes pode receber, em tese, até 3000 fótons/s. Por outro lado, o tempo necessário para se completar a cadeia fotossintética fica em torno de 10 ms [Emerson e Arnold, 1932]; logo, são transferidos cerca de 100 elétrons/s através do ciclo fotossintético. Essa conta rápida indica uma eficiência de aproximadamente 3% na conversão de fótons em "elétrons fotoquímicos". O produto deste resultado pelo termo de 33% explicitado acima (eficiência da conversão de energia dos 8 fótons efetivamente aproveitados em energia armazenada) fornece um limite superior próximo a 1% na conversão de energia total incidente em energia química armazenada.

FASE ENZIMÁTICA: CICLO DE CALVIN E SÍNTESE DE CARBOIDRATOS

O último receptor da cadeia fotossintética é o dióxido de carbono, que no processo é reduzido a carboidratos. Este processo ocorre na fase aquosa do cloroplasto (estroma) e envolve uma série de reações enzimáticas (razão pela qual esta fase é também conhecida como "fase enzimática"). Esta série de reações constitui o chamado ***Ciclo de Calvin***. Para desvendar este ciclo metabólico, Melvin Calvin e colaboradores estudaram os produtos fotossintéticos de algas expostas a $^{14}CO_2$ por tempos que variavam de poucos segundos a um minuto. As reações enzimáticas eram interrompidas por imersão em álcool fervente. Na descrição do Ciclo de Calvin, a seguir, a notação entre parênteses indica a nomenclatura usual e o número de carbonos dos compostos da fase enzimática.

DO CO_2 À GLICOSE: UM CICLO DE CARBONOS

Ao ser absorvido, o CO_2 se combina com o açúcar ribulose 1,5-bifosfato (RuBP, 5C). Esta reação é catalizada pela enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (*RuBisCO* [7]) e gera duas moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (PGA, 3C). As moléculas de PGA sofrem fosforilação através de reação com ATP. As duas moléculas de ácido difosfoglicérico (DPGA, 3C) assim geradas são a seguir reduzidas por NADPH, o que forma dois fosfogliceraldeídos (*triose-fosfato*). O fosfogliceraldeído é a matéria-prima utilizada na síntese de glicose e frutose (6C). Parte das moléculas de PGAL formadas é convertida em ribulose fosfato (RuP, 5C) e parte é usada na formação de glicose ou frutose. Esses açúcares são transportados, em solução, a várias partes da planta. As moléculas de RuP, por sua vez, geram RuBP, realimentando o ciclo de carbono.

---

[7] ***RuBisCO*** - Proteína-enzima *D-ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase*. Esta é a proteína mais abundante da Terra. Na verdade, a abundância da proteína compensa sua baixa eficiência na etapa inicial do *Ciclo de Carbono* (*Ciclo de Calvin*).

A energia necessária às reações do Ciclo de Calvin é fornecida essencialmente pelos compostos químicos armazenados na fase clara da fotossíntese: ATP é usado na fosforilação de compostos e NADPH atua como agente redutor. O conjunto de reações do Ciclo de Calvin (ilustrado na Figura 6) utiliza um total de 13 enzimas como catalisadores.

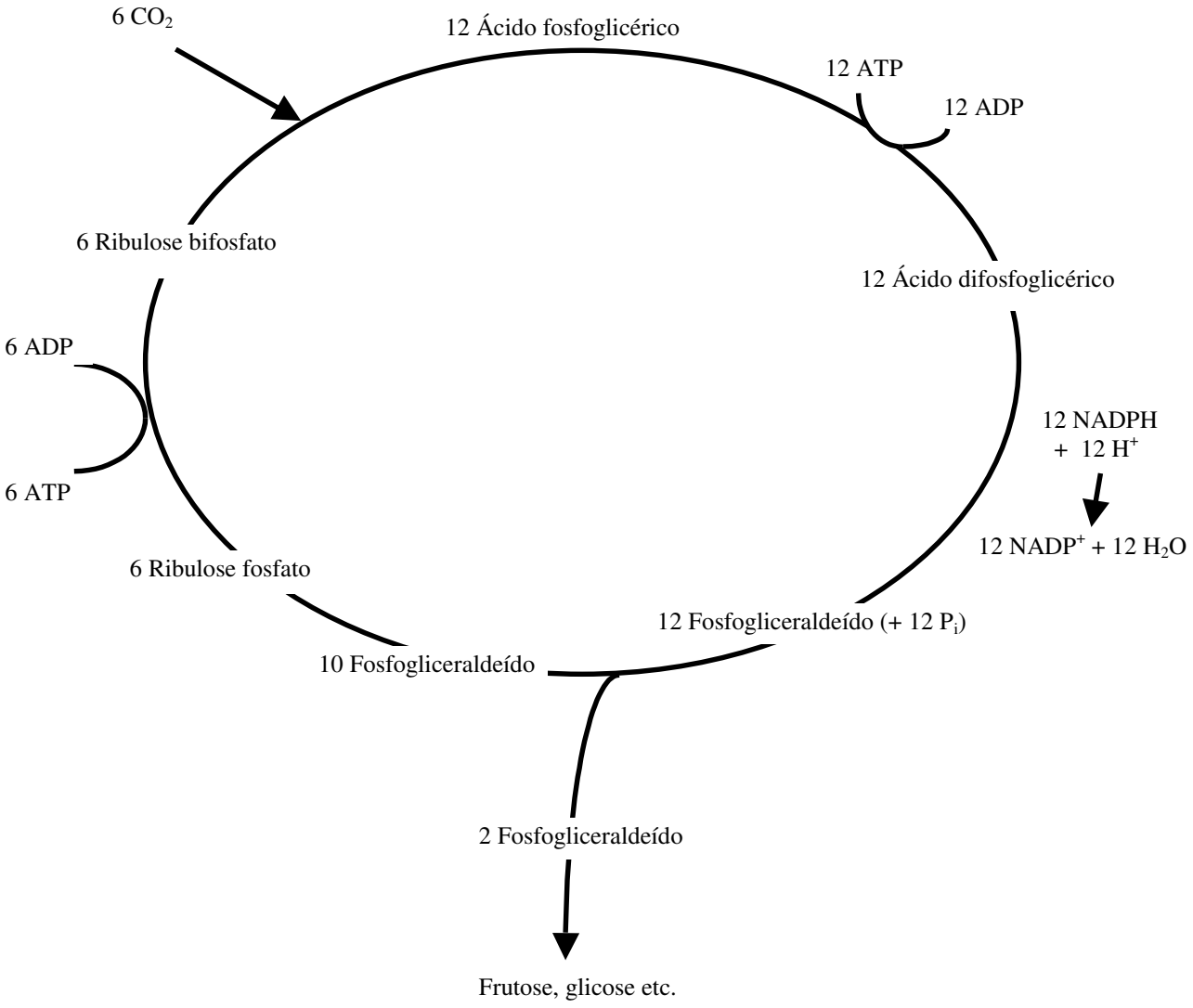


Figura 6 – O *Ciclo de Calvin* ou Ciclo de Carbono: sequência de reações no sentido horário.

RESUMO: A CADEIA ENZIMÁTICA

O primeiro passo do Ciclo de Calvin (ciclo de absorção de carbono) envolve a proteína RuBisCO, que cataliza a transformação do açúcar ribulose-5-bifosfato (RuBP, 5C) e do CO_2 em dois 3-fosfogliceratos (3PG, 3C). Reações subsequentes envolvem diversas enzimas que reduzem carbono por transferência de átomos de hidrogênio e rearranjam compostos carbônicos e energia química para produzir carboidratos.

A eficiência de conversão energética no Ciclo de Calvin é próxima a 90%. As reações envolvem basicamente o rearranjo de energia química. Cada CO_2 reduzido a açúcar $[CH_2O]_n$ requer a "queima" de 2 moléculas de NADPH e 3 moléculas de ATP (compostos armazenadores de energia).

A FOTORRESPIRAÇÃO

A fotorrespiração ocorre quando a enzima RuBisCO, em vez catalisar a reação de CO_2 com RuBP (ação de *carboxilase*), oxida este açúcar (ação de *oxigenase*), reduzindo desta forma o número de moléculas de RuBP disponíveis para as reações fotossintéticas. A fotorrespiração é diretamente proporcional à temperatura e à concentração atmosférica de O_2, diminuindo com o aumento da concentração atmosférica de CO_2.

À medida que a temperatura ultrapassa os 20^oC, a influência dos processos de respiração celular e fotorrespiração se torna cada vez mais importante no cálculo da fotossíntese líquida. Chama-se de ***ponto de compensação luminoso*** a intensidade de luz para a qual a fotossíntese líquida é igual a zero. Em geral, o de ***ponto de compensação luminoso*** é maior para temperaturas maiores.

3. TEORIA DO SINAL FOTOACÚSTICO EM FOLHAS

O sinal fotoacústico das folhas é proporcional a variações de pressão nos espaços intercelulares. Tais variações se devem a dois fatores: 1) trocas gasosas da fotossíntese; e 2) perdas térmicas ocorridas nas várias etapas da cadeia de transferência eletrônica. O calor e o oxigênio gerados nos cloroplastos próximos à superfície das células do mesófilo se difundem até a fase gasosa intercelular, mudando a densidade e consequentemente a pressão neste meio. Quando se incide sobre a folha vegetal luz fotossinteticamente ativa com uma determinada frequência de modulação, a geração das ondas de calor e oxigênio ocorre nesta frequência, podendo ser detectada através da técnica fotoacústica.

Parte do calor gerado nos processos fotossintéticos é liberada nanossegundos após a absorção da luz. No entanto, a longa cadeia de transferências eletrônicas da fotossíntese faz com que a evolução de calor persista em intervalos mais longos de tempo. Já o processo de evolução do oxigênio apresenta uma constante de tempo da ordem de milissegundos. Somando isso ao problema da difusão do oxigênio no meio aquoso celular, conclui-se que a evolução de oxigênio é defasada no tempo em relação à evolução de calor. A técnica fotoacústica permite estudar esta diferença de fase, que depende da estrutura da folha analisada e varia conforme a frequência de modulação.

Considerando a taxa de evolução fotossintética de oxigênio e sua difusão nas células do mesófilo, é possível calcular a contribuição das trocas gasosas para o sinal fotoacústico resolvendo a equação de difusão para quatro meios: cloroplasto, citoplasma, parede celular e espaço intercelular. Este é o princípio do modelo que apresentaremos sob o nome de *Korpiun 1D*, por ser um modelo unidimensional [8] proposto pelo prof. Peter Korpiun (Universidade Técnica de Munique).

---

[8] A aproximação unidimensional é válida se o diâmetro dos cloroplastos é bem maior que a distância destes à parede celular, o que se verifica na prática.

As soluções obtidas [Korpiun e Malkin, 1992] para este modelo são ondas de concentração de oxigênio parcialmente refletidas em cada interface. Em primeira aproximação, desconsidera-se efeitos de cinética de estômatos no sinal fotoacústico supondo que o tecido epidérmico vegetal transmita elasticamente as ondas de gás e calor do meio intercelular até a câmara fotoacústica. Pode-se assim estudar a difusão do oxigênio a partir do esquema a seguir.

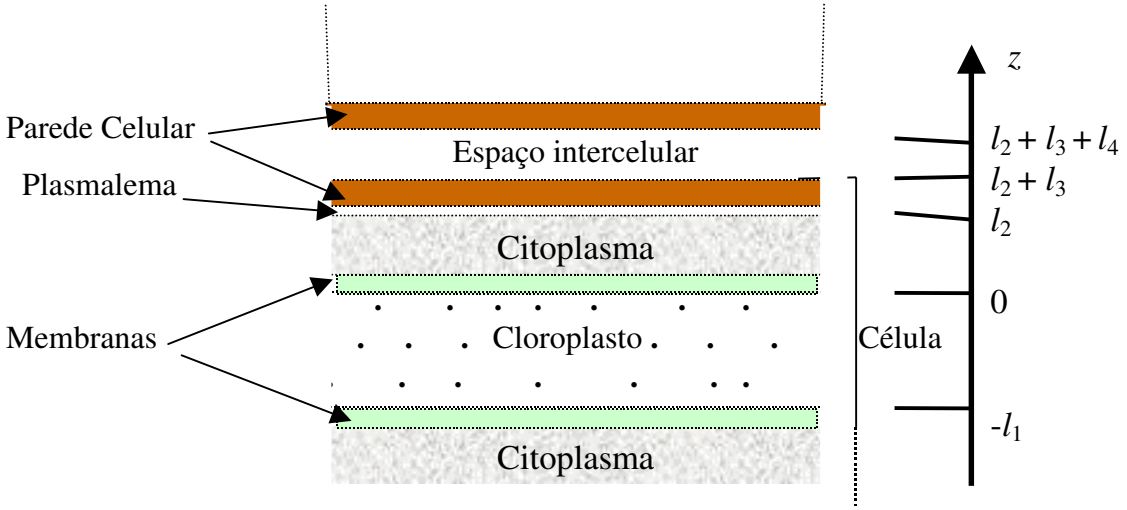


Figura 7 – Seção transversal esquemática de célula do mesófilo (figura fora de escala). O cloroplasto tem espessura l_1, o citoplasma l_2, a parede celular l_3 e o espaço intercelular l_4 (despreza-se a espessura das membranas celulares e da plasmalema).

A epiderme das superfícies adaxial e abaxial das folhas é transparente à região fotossinteticamente ativa do espectro eletromagnético; assim, a luz incidente chega aos cloroplastos. O oxigênio ali evoluído se difunde pelo estroma e passa pelas membranas, atravessando o citoplasma, o plasmalema e a parede da célula até o espaço intercelular, onde muda o número de moléculas e, consequentemente, a pressão neste meio. A representação esquemática da Figura 7 vale para frequências nas quais os comprimentos de difusão sejam menores que o menor diâmetro de células do mesófilo ($f \bullet$ 1 Hz). Assim, a onda de concentração que se propaga no sentido z negativo (de l_1 para baixo) não atinge a parede celular do outro lado da célula, podendo ser desprezada.

DEFINIÇÕES

O modelo desenvolvido neste capítulo utiliza as seguintes definições:

η_M**A** - Área superficial total das células dos mesófilos para uma área foliar A;

é a área assumida para a extensão lateral da estrutura acima no plano *XY*. O fator η_M varia de 10 a 40 dependendo da espécie vegetal [Nobel, 1991].

η_C - Razão entre a área formada pela projeção dos cloroplastos no plano das paredes celulares e a área total (η_MA) destas; é o fator definido para levar em conta que os cloroplastos não formam uma camada homogênea e ininterrupta, como o esquema unidimensional assume.

$\mathbf{V_G}$ - volume do gás na câmara fotoacústica.

$\mathbf{V_I}$ - volume do espaço intercelular correspondente à área foliar A.

COMPONENTE TÉRMICA DO SINAL FOTOACÚSTICO

Assumindo que as oscilações de pressão no espaço intercelular sejam transmitidas sem atenuação até o gás da câmara fotoacústica, a variação de pressão P(t) detectada pelo microfone será a mesma no volume total $V_T = V_G + V_I$ [Korpiun *et al*, 1991]. O sinal fotoacústico S é proporcional ao valor de P(t), dado pela soma das componentes térmica (P_T) e de evolução fotossintética de O_2 (P_{O2}):

$$S \propto P(t) = P_T + P_{O2} \qquad \text{(Eq.1)}$$

As ondas térmicas são geradas nos cloroplastos próximos à superfície da célula do mesófilo [Korpiun e Büchner, 1999]. Destas, as ondas que se propagam do cloroplasto até a parede celular mais próxima são menos defasadas do que aquelas que atravessam todo o diâmetro da célula até atingir sua extremidade oposta. Estes caminhos geram contribuições

com diferentes ângulos de fase, que se sobrepõem. Como as fontes de calor (cloroplastos) ficam próximas à interface célula – gás, para obter a variação de pressão no espaço intercelular basta resolver a equação de difusão térmica sem fontes para as regiões do mesófilo e do gás, introduzindo como condição de contorno a descontinuidade no fluxo de calor na interface. Assim, encontra-se

$$P_T(t) \propto \mu_m \mu_{ar} \frac{(1-e^{ik_{ar}l})(1+e^{ik_m d})}{(1+e^{ik_{ar}l})(1-e^{ik_m d})} e^{i(\omega t-\pi/2)} \quad , \qquad \text{(Eq.2)}$$

com

$$k_n = (1 - i)/\mu_n \quad \text{(número de onda térmica)} \quad , \qquad \text{(Eq.3)}$$

onde μ_{ar} e μ_m são respectivamente os comprimentos de difusão térmica do ar e da célula do mesófilo ($\mu = \sqrt{2\alpha/\omega}$; α é a difusividade térmica e $\omega = 2\pi f$, onde f é a frequência de modulação), l a espessura do gás intercelular e d, o diâmetro médio das células do mesófilo.

A EVOLUÇÃO DO OXIGÊNIO E O SINAL FOTOACÚSTICO

Segundo o modelo desenvolvido por Korpiun *et al* [1991], a evolução de oxigênio provoca a expansão isobárica do espaço intercelular (pistão de Rosencwaig-Gersho) com subsequente compressão adiabática do gás na câmara fotoacústica. Assim, a componente fotossintética P_{O2} da variação de pressão é dada por

$$P_{O_2} = \gamma_T R T_0 \psi(t) \quad , \qquad \text{(Eq.4)}$$

onde R é a constante dos gases e ψ(t) é a oscilação média da concentração molar em torno do valor P_0/RT_0. Esta variação da concentração se relaciona ao fluxo modulado de oxigênio j_3 na interface ($z = l_2 + l_3$) entre a parede celular e o espaço intercelular por

$$\psi(t) = -i \frac{\eta_c \eta_m A j_3(t)}{\omega V_T} \quad , \qquad \text{onde } i = \sqrt{-1}. \qquad \text{(Eq.5)}$$

Depois que as clorofilas absorvem a luz incidente, o oxigênio é formado após uma sequência de reações de oxi-redução a partir do fotossistema II. A etapa mais lenta de tal sequência reativa ocorre a uma taxa *k* da ordem de 10^3 s^{-1}, e o processo pode ser estudado através da dependência da fase do sinal fotoacústico com a frequência. Podemos simplificar o cálculo do ângulo de fase reduzindo o processo a reações limitadas no tempo unicamente pela etapa

$$S_3 \xrightarrow{h\nu} S_3^+ \xrightarrow{k} S_4 \xrightarrow{+2H_2O} S_0 + O_2, \qquad \text{(Eq.6)}$$

onde S_n representa o estado *n* de oxidação do complexo de manganês. O estado 4 reage prontamente com água na formação de O_2, voltando ao estado 0 (não-oxidado).

Em medidas realizadas a baixa intensidade luminosa (tipicamente 10 W/m^2, ou seja, longe dos níveis de saturação luminosa), o número de centros de reação (RCs) em cada estado S_n é o mesmo; assim, cada estado responde pela absorção de 1/4 da luz total absorvida. Consideremos agora o modelo da seção transversal (Figura 7). Seja C a concentração molar dos RCs na região do cloroplasto. A luz incidente na superfície superior possui intensidade modulada na forma

$$I(t) = \frac{I_0}{2}\left(1 + e^{i\omega t}\right) \qquad \text{(Eq.7)}$$

e é absorvida conforme a Lei de Beer[9]. O coeficiente de absorção ótica (por unidade de comprimento dos cloroplastos) é dado por $\beta(\lambda) = \varepsilon C'$, onde ε é o coeficiente de extinção molar das clorofilas e C' a concentração molar desses pigmentos. Vemos em (Eq.6) que a produção fotossintética de oxigênio está ligada ao ciclo oxidativo do complexo de manganês, que evolui segundo a equação

$$\frac{d\left[S_3^+\right]}{dt} = \frac{\phi\beta I_0 C e^{\beta z + i\omega t}}{2.4} - k\left[S_3^+\right] \quad , \qquad \text{(Eq.8)}$$

[9] Segundo a *Lei de Beer*, se I_0 é a intensidade da radiação incidente em z = 0, a intensidade na posição z é dada por $I(z) = I_0 e^{-\beta(\lambda).z}$, onde $\beta(\lambda)$ é o coeficiente de absorção ótica da amostra.

onde ϕ é a eficiência quântica da separação de cargas por um centro de reação aberto. O termo em I_0 (proporcional a dI/dz) representa uma "fonte de separação de cargas". O termo $k[S_3^+]$ é igual à taxa de evolução de oxigênio $d[O_2]/dt$. Resolvendo-se (Eq.8) para a evolução modulada de oxigênio, obtemos

$$\frac{d[O_2]}{dt} = \frac{\phi\beta I_0 C e^{\beta z}}{8} \frac{e^{i(\omega t - \chi)}}{\sqrt{1+(\omega/k)^2}} \quad , \qquad \text{(Eq.9)}$$

onde χ = arctg (ω/k) é o ângulo de fase. Esta evolução modulada gera o sinal fotoacústico de oxigênio.

DIFUSÃO DO OXIGÊNIO

O fluxo de oxigênio é calculado resolvendo-se a equação de difusão para as regiões esquematizadas na Figura 7. Devemos observar que, para as frequências de modulação utilizadas experimentalmente, o comprimento de difusão de massa[10] κ_n do oxigênio na água tem a mesma ordem de grandeza que as espessuras do cloroplasto, citoplasma e parede celular, sendo bem maior que as espessuras das membranas intracelulares e do plasmalema. A equação de difusão unidimensional para o oxigênio formado fotossinteticamente apresenta a forma geral

$$D_n \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} - \frac{\partial \psi}{\partial t} = -\frac{d[O_2]}{dt} \quad , \qquad \text{(Eq.10)}$$

onde o termo $d[O_2]/dt$ dá a taxa de moléculas de O_2 geradas por unidade de volume e só é diferente de zero na região do cloroplasto; ψ_n é a concentração de oxigênio e D_n, o coeficiente de difusão do oxigênio no meio *n*.

[10] A 20 Hz, $\kappa_{O2\text{-ÁGUA}} \sim 3\ \mu m$ (valor 10^3 vezes superior à espessura das membranas intracelulares).

O modelo apresentado assume evolução de oxigênio em toda a região dos cloroplastos ($-l_1 \le z \le 0$). A solução de (Eq.10) nesta região é

$$\psi_1(z,t) = c_\beta e^{\beta z + i\omega t} + c_1^+ e^{-i(\xi_1 z - \omega t)} + c_1^- e^{i(\xi_1 z + \omega t)} \quad (-l_1 \le z \le 0) \quad \text{(Eq.11)}$$

O primeiro termo, que decresce exponencialmente, representa a mudança na concentração devida à absorção de Beer. Os dois termos adicionais correspondem a duas ondas de concentração, uma onda no sentido z positivo e outra no sentido oposto. Na (Eq.11), temos

$$c_\beta = \frac{\phi\beta I_0 C e^{-i\chi}}{8\omega\left[i - (\beta\kappa_1)^2/2\right]\sqrt{1+(\omega/k)^2}} \quad \text{(Eq.12)}$$

e

$$\xi_1 = (1-i)/\kappa_1 \quad \text{(número de onda de concentração)} \quad , \quad \text{(Eq.13)}$$

onde

$$\kappa_1 = \sqrt{2D_1/\omega} \quad \text{(Eq.14)}$$

é o comprimento de difusão do O_2 na região dos cloroplastos. As expressões (Eq.13) e (Eq.14) definem os parâmetros ξ_n, κ_n e D_n para qualquer meio n. Resolvendo a equação de difusão para as regiões que não comportam o termo de fonte, ficamos com

$$\psi_0(z,t) = c_0^- e^{-i(\xi_2 z - \omega t)} \qquad (z \le -l_1) \qquad \text{(Eq.15)}$$

para o citoplasma abaixo dos cloroplastos, solução esta que é simplesmente uma onda de concentração no sentido z negativo (em direção aos vacúolos). No citoplasma acima dos cloroplastos e na parede celular, a solução tem que incluir as ondas de concentração refletidas, e assim temos

$$\psi_2(z,t) = \left(c_2^+ e^{-i\xi_2 z} + c_2^- e^{i\xi_2 z}\right) e^{i\omega t} \qquad (0 \le z \le l_2) \qquad \text{(Eq.16)}$$

para o citoplasma superior e

$$\psi_3(z,t) = \left(c_3^+ e^{-i\xi_3 (z-l_2)} + c_3^- e^{i\xi_3 (z-l_2)}\right) e^{i\omega t} \quad (l_2 \le z \le l_2 + l_3) \quad \text{(Eq.17)}$$

na região da parede celular.

Considerando agora o valor típico D_{AR} = 0,175 cm^2/s, observamos que o comprimento de difusão do O_2 no ar (a 20 Hz, $\kappa_{O2\text{-}AR}$ ~ 500 μm; a 1KHz, $\kappa_{O2\text{-}AR}$ ~ 75 μm) é bem maior que a espessura l_4 das camadas de ar entre células do mesófilo. Assim, o gradiente de concentração nos espaços intercelulares é tão pequeno que a concentração neste meio pode ser considerada independente de *z*, sendo expressa simplesmente por

$$\psi(t) = ce^{i\omega t} \quad , \qquad \text{(Eq.18)}$$

que corresponde à variação de concentração média definida em (Eq.5).

CONDIÇÕES DE CONTORNO

Os coeficientes c_n^+ e c_n^- em (Eq.11), (Eq.15), (Eq.16) e (Eq.17) podem ser determinados a partir das condições impostas à concentração e ao fluxo difusivo. Os cloroplastos são separados do citoplasma por membranas. Se as concentrações $\psi_1(0,t)$ e $\psi_2(0,t)$ forem diferentes, haverá fluxo de oxigênio através das membranas. A densidade deste fluxo j_m^+ é proporcional à diferença nas concentrações e à permeabilidade P_L da membrana. Assim,

$$j_m^+ = P_L\left[\psi_1(0,t) - \psi_2(0,t)\right] = P_L\left(c_\beta^+ + c_1^+ + c_1^- - c_2^+ - c_2^-\right)e^{i\omega t} \qquad \text{(Eq.19)}$$

Este fluxo deve ser igual aos fluxos j_1 nos cloroplastos e j_2 no citoplasma causados pelos gradientes de concentração nas fronteiras com as membranas em z = 0 (condição de continuidade do fluxo nas interfaces). De (Eq.11) e (Eq.16), obtemos

$$j_1 = -D_1\nabla\psi_{1(z=0)} = -D_1\left[\beta c_\beta - i\xi_1\left(c_1^+ - c_1^-\right)\right]e^{i\omega t} \qquad \text{(Eq.20)}$$

e

$$j_2 = -D_2\nabla\psi_{2(z=0)} = -D_2\xi_2\left(c_2^+ - c_2^-\right)e^{i\omega t} \quad ; \qquad \text{(Eq.21)}$$

para z = 0,

$$j_m^+ = j_1 = j_2 \quad . \qquad \text{(Eq.22)}$$

As mesmas considerações de continuidade valem para a membrana em z = $-l_1$. Usando (Eq.11) e (Eq.15), ficamos com

$$j_1^- = P_L\left[\psi_1(-l_1,t) - \psi_0(-l_1,t)\right] = P_L\left(c_\beta e^{-\beta l_1} + c_1^+ e^{i\xi_1 l_1} + c_1^- e^{-i\xi_1 l_1} - c_0^-\right)e^{i\omega t} \qquad \text{(Eq.23)}$$

para o fluxo através da membrana e, para as regiões dos cloroplastos e do citoplasma,

$$j_1 = -D_1\left[\beta c_\beta e^{-\beta l_1} - i\xi_1\left(c_1^+ e^{i\xi_1 l_1} - c_1^- e^{-i\xi_1 l_1}\right)\right]e^{i\omega t} \qquad \text{(Eq.24)}$$

e

$$j_0 = -iD_2\xi_2 c_0^- e^{i\omega t} \quad , \qquad \text{(Eq.25)}$$

enquanto a condição de continuidade em z = $-l_1$ implica em

$$j_m^- = j_0 = j_1 \qquad . \qquad \text{(Eq.26)}$$

Desenvolvimento análogo para a região da plasmalema permite obter, para z = l_2,

$$j_p^+ = P_p\left(c_2^+ e^{-i\xi_2 l_2} + c_2^- e^{i\xi_2 l_2} - c_3^+ - c_3^-\right)e^{i\omega t} \quad , \qquad \text{(Eq.27)}$$

$$j_2 = iD_2\xi_2\left(c_2^+ e^{-i\xi_2 l_2} - c_2^- e^{i\xi_2 l_2}\right)e^{i\omega t} \quad , \qquad \text{(Eq.28)}$$

$$j_3 = iD_3\xi_3\left(c_3^+ - c_3^-\right)e^{i\omega t} \qquad \text{(Eq.29)}$$

e

$$j_p^+ = j_2 = j_3 \qquad . \qquad \text{(Eq.30)}$$

Na fronteira parede celular – espaço intercelular (z = $l_2 + l_3$), a concentração de oxigênio no gás está em equilíbrio com o oxigênio dissolvido no interior da parede celular. De (Eq.17) e (Eq.18):

$$c_3^+ e^{-i\xi_3 l_3} + c_3^- e^{i\xi_3 l_3} = Sc \quad , \qquad \text{(Eq.31)}$$

onde S é a solubilidade do oxigênio na parede celular. O fluxo de O_2 em z = $l_2 + l_3$ é

$$j_3 = -D_3\nabla\psi_{3(z=l_2+l_3)} = iD_3\xi_3\left(c_3^+ e^{-i\xi_3 l_3} - c_3^- e^{i\xi_3 l_3}\right)e^{i\omega t} \qquad . \qquad \text{(Eq.32)}$$

Eliminando c_3^- de (Eq.32) com o auxílio de (Eq.31) e inserindo na (Eq.5) a expressão obtida para j_3, obtém-se a variação da concentração de oxigênio (Eq.18) nos espaços intercelulares [11]:

$$\psi(t) = \frac{2\eta_c\eta_m A D_3 \xi_3}{\omega V_T} c_3^+ e^{-i(\xi_3 l_3 + \omega t)} \quad . \qquad \text{(Eq.33)}$$

Ainda falta determinar c_3^+ nesta expressão. As equações (Eq.19) a (Eq.33) levam a oito relações linearmente independentes que precisam ser resolvidas para que se encontre os oito coeficientes c_n^+, c_n^- e c. Resolver este sistema é uma tarefa bastante trabalhosa. Uma aproximação feita para simplificar este trabalho consiste em assumir D_n, κ_n e ξ_n respectivamente iguais a $D_{ÁGUA}$, $\kappa_{ÁGUA}$ e $\xi_{ÁGUA}$ para as regiões dos cloroplastos, do citoplasma e da parede celular.

Partindo de (Eq.33) e resolvendo o sistema de equações, podemos escrever a componente fotossintética P_{O2} da variação de pressão (Eq.4) na forma

$$P_{O_2} = \frac{\gamma_T R T_0 \eta_c \eta_m A \phi \beta C I_0}{8\omega^{3/2} V_T \sqrt{1 + (\omega/k)^2}} F e^{i(\varphi + \omega t)} \quad , \qquad \text{(Eq.34)}$$

onde o termo complexo $Fe^{i\varphi}$ depende da constante de tempo k de evolução de O_2 (Eq.6), das permeabilidades das membranas e também das espessuras l_1, l_2 e l_3.

Da expressão obtida para P_{O2}, podemos estudar a dependência do ângulo de fase φ da atividade fotossintética com a frequência de modulação e, tomando valores típicos para alguns dos parâmetros envolvidos [12], obter valores e relações para os demais parâmetros. Esse trabalho foi realizado para medidas em diferentes espécies vegetais; os resultados se encontram no Capítulo 5.

A seguir, discutiremos algumas questões referentes ao modelo aqui apresentado para o sinal fotoacústico em folhas.

---

[11] Partindo dos valores típicos dos parâmetros, utiliza-se $[1 + S\eta_c\eta_m A(2D_3/\omega V_T^2)^{1/2}] \sim 1 + 10^{-4} \sim 1$.

[12] $\eta_c.\eta_m \sim 25$; $A/V_T \sim 10\ cm^{-1}$; $S \sim S_{O2\text{-}Água} = 0{,}026\ cm^3\ O_2/\ cm^3\ H_2O$; $D_n \sim D_{ÁGUA} \sim 10^{-5}\ cm^2/s$.

POR QUE A ABSORÇÃO DE CO_2 NÃO É OBSERVADA ?

A questão acima é pertinente e deve, portanto, ser esclarecida. Os argumentos que apresento aqui provêm, na sua essência, da discussão efetuada por Bults e colaboradores [Bults *et al*, 1982]. Em primeiro lugar, observemos que reações fotoquímicas envolvendo ATP e NADPH fazem variar os níveis dos compostos atuantes no Ciclo de Calvin, podendo – em tese – gerar absorção modulada de CO_2. Esta modulação seria afetada particularmente pela reação de fosforilação da ribulose 5-fosfato por ATP, que é a etapa imediatamente anterior à carboxilação. A concentração estacionária da ATP é da ordem de 10^{-3} M. Uma intensidade luminosa de 10 W/m^2 (típica nas medidas de indução fotossintética) pode levar a uma oscilação de aproximadamente 10^{-6} M no nível de ATP, ou seja, 0,1% do valor estacionário de ATP.

Quando se discute o efeito da modulação luminosa no processo fotossintético de assimilação de CO_2, é necessário levar em conta que a carboxilação é a etapa final de uma longa cadeia reativa – e cada reação da cadeia tende a atenuar ainda mais a modulação. Quanto às constantes de tempo dessas reações, enquanto a formação de O_2 é limitada por uma taxa reativa da ordem de 10^3 s^{-1}, a assimilação do CO_2 passa por pelo menos duas etapas [13] com constante reativa de 10 s^{-1}. Levando em conta ainda a modulação do NADPH, limitada por uma constante reativa de 30 s^{-1}, verifica-se que a absorção modulada de CO_2 para uma frequência de 17 Hz é atenuada em aproximadamente 99%.

Além das constantes de tempo significativamente maiores para a absorção de CO_2 que para a evolução de O_2, o maior peso molecular (e forma) da molécula de CO_2 faz com que seu coeficiente de difusão em meio aquoso seja menor que o do O_2 por um fator próximo a 2 [Parkhurst, 1994]. Isto também faz com que as ondas de CO_2 modulado sejam mais atenuadas que as ondas de O_2.

---

[13] Segundo [Bults *et al*, 1982], as etapas que envolvem glicerol-3-fosfato dehidrogenase e FDPase.

Por todas as razões expostas, conclui-se que o sinal de atividade fotossintética (trocas gasosas) monitorado através da técnica fotoacústica não deve incluir absorção de CO_2. Mesmo para luz incidente modulada a baixas frequências (alguns Hertz), a absorção de CO_2 será essencialmente contínua, pois sua modulação é fortemente atenuada.

No entanto, como veremos adiante, resultados experimentais mostram que em determinadas circunstâncias a técnica fotoacústica de fato detecta a absorção de gases pela folha. Os processos de absorção se caracterizam por apresentar um ângulo de fase oposto ao da evolução de oxigênio. Atribuímos tais processos à absorção de oxigênio, que pode estar relacionada a diversos fatores, como discutiremos posteriormente.

CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO

O modelo desenvolvido trata a difusão do O_2 até os espaços intercelulares. Em seguida, supõe a transmissão elástica das ondas de pressão até a atmosfera da câmara fotoacústica. Uma observação que pode ser feita diz respeito à abertura dos estômatos, não considerada no modelo apresentado. No entanto, este modelo ***prescinde*** da abertura de estômatos justamente por assumir que as ondas de O_2 só precisam atingir a fase gasosa intercelular para que o sinal fotoacústico correspondente seja produzido. Tal hipótese é confirmada pelas observações experimentais, que mostram sinal fotoacústico de atividade fotossintética mesmo para frequências de modulação superiores a 100 Hz. O comprimento de difusão do O_2 em meio aquoso para tais frequências atinge valores próximos a 1 μm, o que no mínimo dificultaria muito a transmissão das ondas de O_2 até a interface epiderme foliar–câmara fotoacústica sem que houvesse transmissão elástica das ondas de pressão de O_2.

Deste modo, é válido assumir que as variações da pressão intercelular são transmitidas à atmosfera da câmara fotoacústica sem atenuação significativa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo descreve o arranjo experimental utilizado no presente trabalho, detendo-se particularmente nos modelos de célula aberta empregados, e apresenta as medidas mais comuns que podem ser efetuadas em plantas com esta montagem.

A CÉLULA FOTOACÚSTICA ABERTA

A célula fotoacústica aberta (OPC) usada neste trabalho já se encontra descrita e caracterizada em detalhe na literatura [Marquezini *et al*, 1991; Pereira *et al*, 1992; Barja e Mansanares, 1998]. Perondi e Miranda [1987] haviam concebido inicialmente a célula para medir a difusividade térmica de sólidos; mais tarde, Bento *et al* [1989] usaram a OPC para detectar raios-X. Ainda no campo da espectroscopia, a OPC foi utilizada para estudar a resposta de plantas de milho à ação tóxica do alumínio [Marquezini *et al*, 1990] e para mostrar as diferenças espectrais entre folhas de milho de diferentes linhagens [Pereira *et al*, 1994]. Nos últimos anos, a OPC começou a ser aproveitada para pesquisas relacionadas à fotossíntese, como o estudo da desidratação em folhas de soja [Pereira *et al*, 1992], a evidência da heterose em híbridos de milho [Silva *et al*, 1995] e a determinação da energia química armazenada em folhas vegetais [Barja e Mansanares, 1998].

A OPC consiste de um microfone comercial de eletreto cuja câmara cilíndrica é usada como célula acústica (Figura 8). A câmara não possui uma tampa – por isso o nome "célula aberta" – , sendo fechada pela própria amostra no momento das medições. Para selar hermeticamente a câmara, aplica-se graxa de silicone em torno do orifício do microfone de eletreto. Não é necessário cortar um disco da folha nem destacá-la da planta

para realização das medidas; assim, a OPC permite monitorar *in vivo* e *in situ* a atividade fotossintética nas plantas, evitando a desidratação da amostra. Parte da folha sob estudo permanece exposta ao exterior, captando CO_2 externo, o que minimiza mudanças na atmosfera interna da câmara.

O microfone usado como detetor na OPC tem sensibilidade de 10 mV/Pa. É composto por um diafragma de eletreto metalizado e uma placa de metal separados por uma camada de ar e conectados por um resistor. Oscilações de pressão na câmara defletem a membrana, gerando uma voltagem através do resistor. Esta voltagem alimenta um pré-amplificador FET na cápsula do microfone.

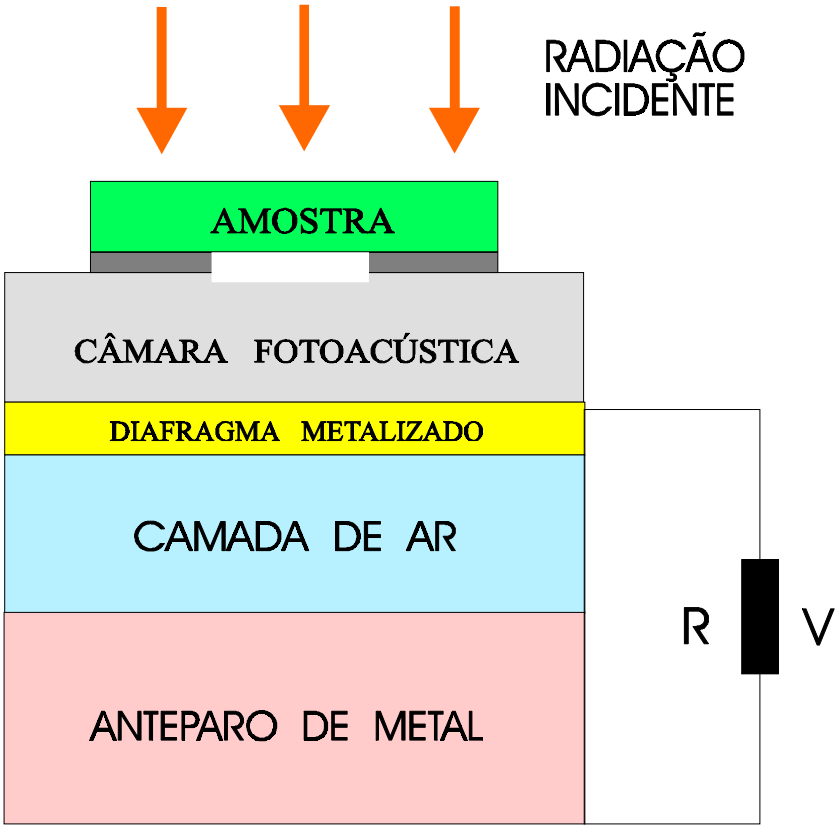


Figura 8 – A Célula Fotoacústica Aberta (OPC).

MONTAGEM EXPERIMENTAL

A montagem fotoacústica utilizada nas medições de atividade fotossintética com a OPC é basicamente a mesma usada para medir o espectro de absorção da folha (Figura 9). Há duas fontes de luz: uma lâmpada de arco de Xenônio e uma lâmpada de Tungstênio. À frente da lâmpada de Xenônio, coloca-se um modulador mecânico e um monocromador para obter luz modulada com um comprimento de onda fixo. A lâmpada de Tungstênio é usada para saturar a fotossíntese e tem seu espectro de emissão limitado por filtros ópticos à região visível. Um cabo ótico bifurcado leva cada feixe de luz até a OPC. O modulador e o microfone da célula fotoacústica estão ligados a um amplificador síncrono que mede amplitude e fase do sinal fotoacústico.

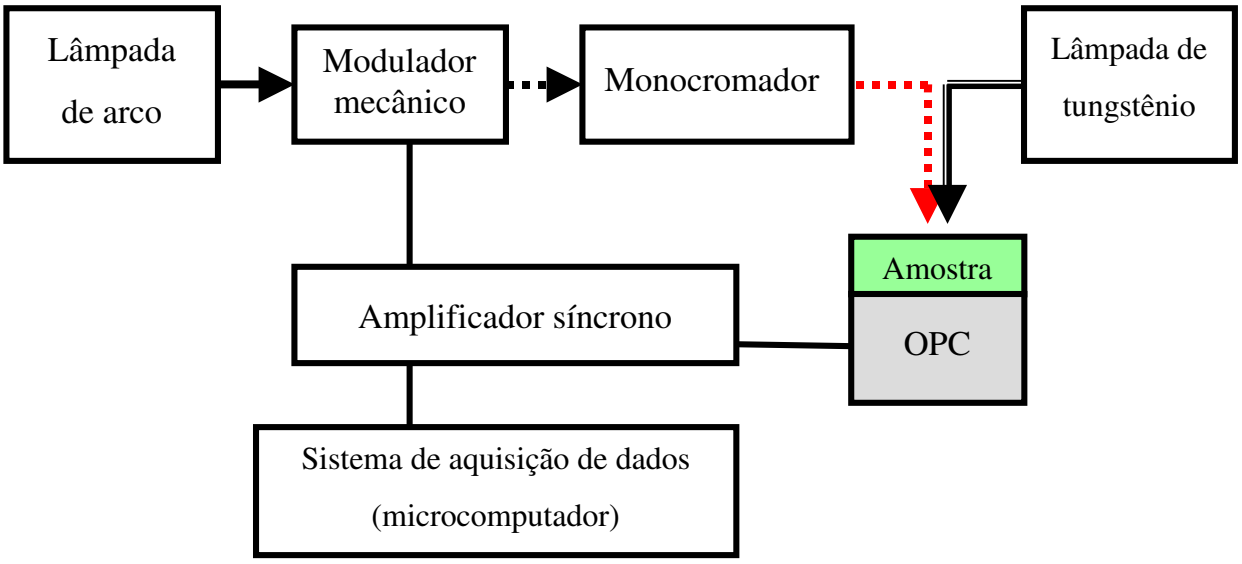


Figura 9 – Diagrama da montagem experimental para medidas com a OPC.

TEORIA DA OPC

Marquezini *et al.* [1991] apresentam a teoria da OPC considerando que, para amostras opticamente transparentes, há duas fontes de sinal, uma vez que parte da luz é absorvida pela amostra e parte é transmitida, sendo absorvida pelo diafragma metalizado do microfone. Usando a Lei de Gauss, estes autores mostram a equivalência entre o microfone de eletreto e um circuito RC em paralelo com uma fonte de corrente proporcional à taxa de variação da deflexão do diafragma. Esta taxa se relaciona com o fluxo de calor pelo Modelo de Rosencwaig-Gersho [Rosencwaig e Gersho, 1976], de modo que a voltagem da OPC pode ser expressa como função da flutuação de temperatura obtida através da equação de difusão térmica. Para amostras termicamente espessas, o sinal da OPC tem uma dependência do tipo f^{-1} e é proporcional à densidade de potência transmitida, $I_0 e^{-\beta l}$, onde β é o coeficiente de absorção ótica. Marquezini *et al.* estudaram folhas vegetais com espessura de 150 μm, opticamente transparentes e termicamente espessas para frequências de modulação f acima de 1,7 Hz. Medindo a dependência do sinal fotoacústico com a frequência, esses autores obtiveram o coeficiente de absorção ótica da folha.

OPC E O ESTUDO DA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA *IN VIVO*

INDUÇÃO FOTOSSINTÉTICA

Se uma planta fica no escuro por muito tempo, sua capacidade fotossintética decresce até ser totalmente suprimida. Após a adaptação ao escuro, a incidência luminosa dá origem à retomada dos processos fotossintéticos, a ***indução fotossintética***. O estado estacionário da atividade fotossintética é atingido após um período de transição que depende de diversos fatores, como tempo de adaptação ao escuro, temperatura, concentração de CO_2 na atmosfera e disponibilidade de nutrientes, entre outros.

SATURAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE E EFEITOS DA DESIDRATAÇÃO

Quando a fotossíntese é induzida por incidência de luz modulada, se a frequência de modulação é baixa (inferior à frequência de corte para a difusão de oxigênio, da ordem de 10^2 Hz), o sinal fotoacústico apresenta uma componente relacionada à evolução de gás pela amostra. Esta é a chamada contribuição fotobárica, que se sobrepõe às componentes térmicas da amostra e da membrana do microfone. É possível eliminar a atividade fotossintética modulada através da incidência simultânea de luz intensa não-modulada. Sob luz contínua fotossinteticamente saturante, a eficiência de conversão da luz modulada em energia química se anula e o oxigênio produzido pela folha passa a ser liberado de modo contínuo. A mudança observada no ângulo de fase do sinal fotoacústico quando se elimina a fotossíntese modulada mostra que o sinal total é uma soma das componentes fototérmica e fotobárica.

Na verdade, além de eliminar a componente fotobárica (atividade fotossintética) do sinal fotoacústico, a incidência de luz contínua saturante também aumenta a contribuição fototérmica (calor). A frequências suficientemente baixas, o efeito líquido assim produzido é chamado de ***efeito negativo*** [Bults *et al*, 1982]: o sinal fotoacústico decresce quando a luz saturante é adicionada. À medida que a frequência de modulação aumenta, a difusão de gases é atenuada mais rapidamente que a das ondas de calor, de modo que a redução da componente fotobárica é mais pronunciada que a da componente térmica. Assim, em medidas realizadas a altas frequências de modulação (acima de 10^2 Hz), a componente fotobárica é eliminada ou se torna tão reduzida que a adição de luz saturante à luz modulada passa a produzir um ***efeito positivo***: o sinal fotoacústico aumenta devido à conversão total da luz modulada em calor. A Figura 10 ilustra um efeito negativo, como observado para medidas a baixas frequências de modulação.

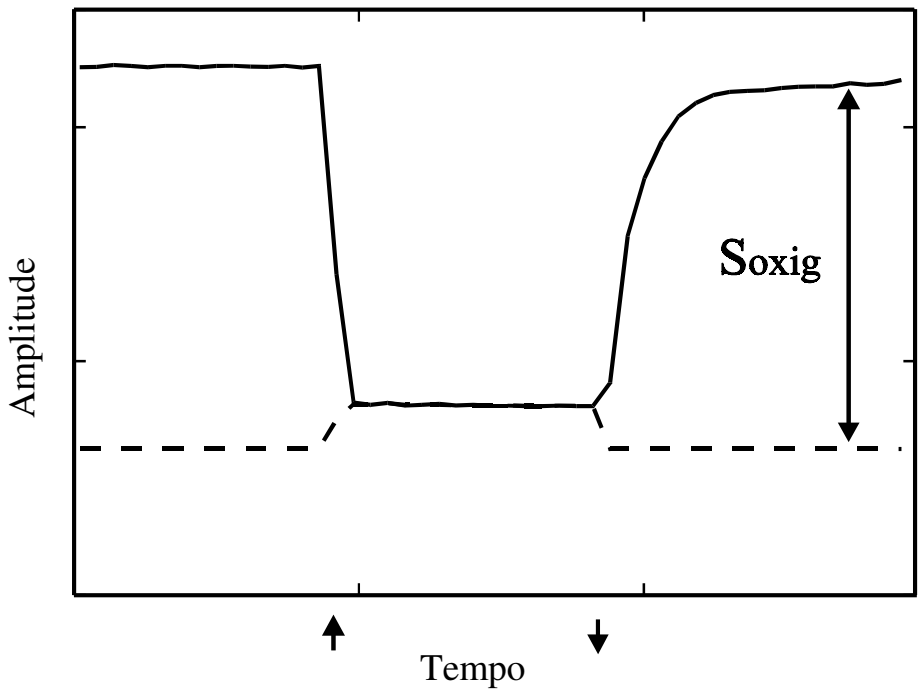


Figura 10 – Efeito negativo líquido, observado para medidas fotoacústicas a baixas frequências. A linha cheia representa o sinal fotoacústico total. Seta para cima indica adição de luz contínua intensa; seta para baixo, sua supressão. A adição da luz contínua amplia a componente fototérmica (linha tracejada, estimativa) e elimina a contribuição bárica (S_{oxig}) do sinal fotoacústico. Para frequências de modulação altas, o efeito líquido se torna positivo.

Em 1992, Pereira e colaboradores mostraram que a OPC permitia observar tanto o efeito negativo quanto o positivo esperados, respectivamente, a baixas e altas frequências de modulação [Pereira *et al*, 1992]. Estes autores também observaram os efeitos da desidratação na atividade fotossintética de uma folha destacada do pecíolo, verificando que a possibilidade de realizar medidas com a folha ainda ligada à planta era uma característica essencial da OPC. Em 1994, Pereira e colaboradores utilizaram a OPC para comparar a performance fotossintética de folhas de milho verdes, listadas e albinas [Pereira *et al*, 1994], mostrando a correlação entre atividade fotossintética e concentração de clorofila encontrada para os genótipos do milho. As taxas de O_2 evoluído indicaram, para incidência luminosa bem abaixo do nível de saturação, que folhas verdes chegam a apresentar atividade fotossintética até três vezes superior à de folhas deficientes em clorofila.

CALIBRAÇÃO

As medidas de atividade fotossintética efetuadas com a OPC fornecem valores relativos de oxigênio evoluído, úteis quando se deseja estudar a cinética da indução e comparar o comportamento de plantas de diferentes espécies ou sujeitas a diferentes condições. Para obter resultados quantitativos (isto é, valores absolutos de O_2 evoluído), é necessário calibrar a célula fotoacústica. Esta calibração pode ser feita com o auxílio de um eletrodo de Clark, conforme o procedimento descrito em [Pereira *et al*, 1994 b]. Para estabelecer a correlação entre as medidas com a OPC e aquelas efetuadas com o eletrodo, Pereira *et al.* aplicaram radiação fotossinteticamente ativa em folhas de milho e esperaram o estabelecimento de uma taxa de atividade fotossintética estacionária. Em seguida, mediram o O_2 evoluído sucessivamente com o eletrodo de Clark e a OPC, repetindo o procedimento em diferentes intensidades luminosas para encontrar uma relação entre os dois métodos.

Medidas recentes indicam que, quando se compara espécies vegetais muito diferentes em morfologia (que pode afetar a amplitude do sinal fotoacústico), esta calibração deve ser feita para cada espécie separadamente.

NOVA CÉLULA ABERTA PARA MEDIDAS EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA

Para frequências de modulação f superiores a 30 Hz, a amplitude do sinal na OPC (para incidência direta de luz no diafragma metalizado) decresce com f^{-1} (Figura 11). Este é o comportamento esperado para a variação de pressão na câmara nestas condições. Para frequências inferiores a 30 Hz, o microfone de eletreto da OPC não apresenta resposta plana em função da frequência. Assim, para medir a variação do sinal fotoacústico com a frequência, foi necessário construir uma nova célula fotoacústica aberta que utilizasse um microfone de resposta plana na região desejada.

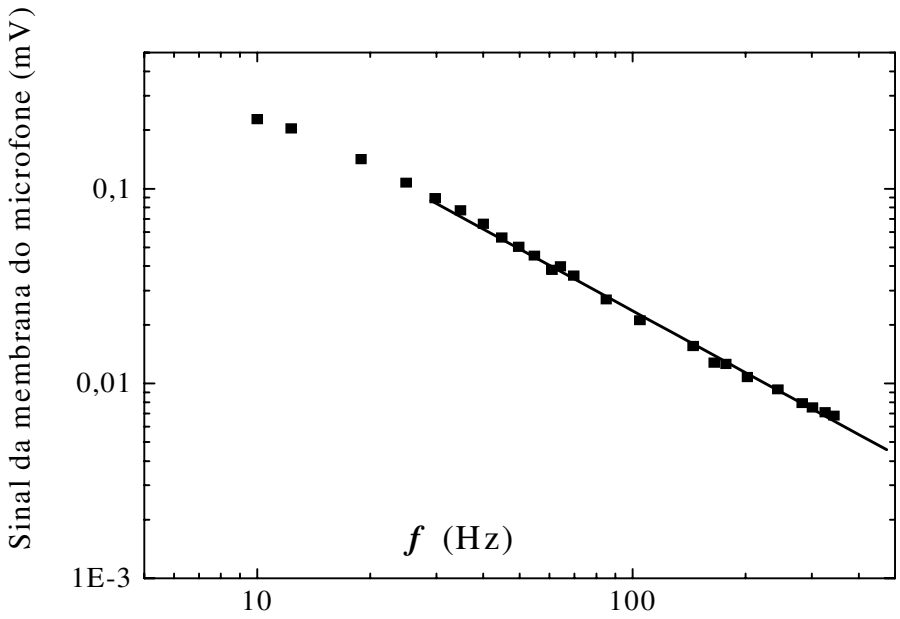


Figura 11 – Resposta do microfone de eletreto em função da frequência f de modulação.

Projetou-se então a célula fotoacústica da Figura 12, construída na oficina mecânica do IFGW. Esta célula utiliza como detetor um microfone condensador (B&K 4166), que possui resposta plana em função da frequência.

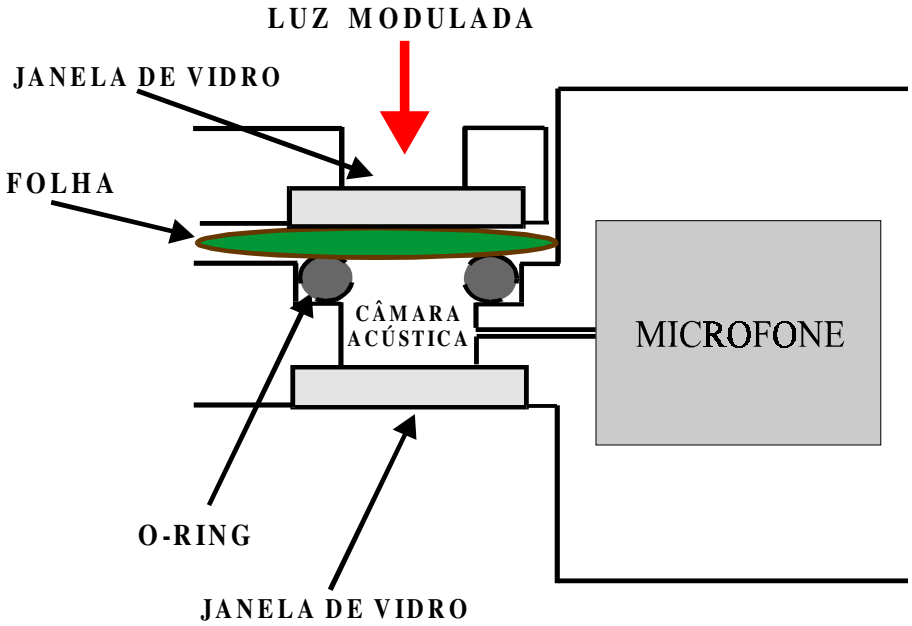


Figura 12 – Célula fotoacústica para medidas em função da frequência de modulação.

Na construção do novo modelo de célula fotoacústica, é importante destacar que o duto que liga a câmara ao microfone deve ser o mais estreito e curto possível. Isso porque a resposta do sistema de medidas depende do volume total da câmara, incluindo o duto. Quanto menor o volume total, maior a sensibilidade do aparato.

Utilizando a célula da Figura 12, foram feitas varreduras de frequência em folhas de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*), café (*Coffea arabica*), jequitibá (*Cariniana legalis*) e copaúba (*Copaifera trapezifolia*). O procedimento adotado foi o seguinte: uma folha não-destacada da planta é posicionada sobre a cavidade aberta da célula fotoacústica e pressionada contra um *o-ring* para impedir vazamento do sinal. A parte superior da célula é fechada por uma janela de vidro com 1 mm de espessura, permitindo a iluminação da superfície da folha. Depois de fixar a amostra na montagem, inicia-se o experimento com incidência de luz modulada. Para cada valor da frequência de modulação, deve-se produzir o *efeito negativo* adicionando luz fotossinteticamente saturante para separar a componente térmica da componente de gás evoluído. Assim, embora nossa atenção no presente trabalho esteja restrita à componente de atividade fotossintética, devemos destacar a possibilidade de estudar simultaneamente a variação (com a frequência) de ambas as componentes do sinal fotoacústico.

Uma última observação sobre as varreduras de frequência: nesse tipo de medida, o que nos interessa é medir a atividade fotossintética estacionária. Assim, em vez de adaptar a planta ao escuro por várias horas antes das medidas (como se faz no estudo da *indução fotossintética* – ver Capítulo 6), a planta agora deve ser previamente adaptada à luz, para que se observe o sinal estacionário da atividade fotossintética a cada frequência.

MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA MODULADA

Sob incidência de luz fotossinteticamente ativa, parte da energia luminosa absorvida é utilizada pela planta nas reações fotoquímicas da fotossíntese, parte é dissipada como energia térmica e parte é reemitida em comprimentos de onda mais longos que os absorvidos. Este último processo é a chamada fluorescência. A montagem fotoacústica apresentada na Figura 9 para medidas com a OPC permite avaliar as componentes fotoquímica e térmica deste balanço de energia – fica faltando, no entanto, medir a fluorescência da clorofila. Na Fisiologia Vegetal, medidas de fluorescência da clorofila *a* em resposta a pulsos curtos de luz saturante permitem obter a razão Fv/Fm (Fluorescência Variável / Fluorescência Máxima), que indica a máxima capacidade fotoquímica das plantas. Em nosso caso, o interesse era adaptar a montagem experimental de modo que fosse possível monitorar *simultaneamente* as três vias da energia nas folhas: atividade fotossintética, dissipação térmica e fluorescência modulada.

Para possibilitar a realização das medidas simultâneas mencionadas acima (ver Capítulo 8, *Perspectivas*), a montagem descrita para a OPC foi adaptada trocando-se o cabo ótico bifurcado por um cabo trifurcado. O ramo ótico adicional coleta a luz refletida pela folha e também a luz reemitida em comprimentos de onda maiores que o da luz incidente. Ambas as componentes (reflexão e fluorescência) são conduzidas através do cabo ótico até um fotodiodo usado para registrar a intensidade do feixe luminoso. O filtro RG695, do tipo escada, é colocado à frente do fotodiodo para bloquear a luz refletida, permitindo apenas a passagem de luz com $\lambda \geq 695$ nm (parcela correspondente à fluorescência da clorofila). A Figura 13 esquematiza a montagem experimental adaptada para medidas simultâneas de atividade fotossintética, sinal térmico e fluorescência modulada.

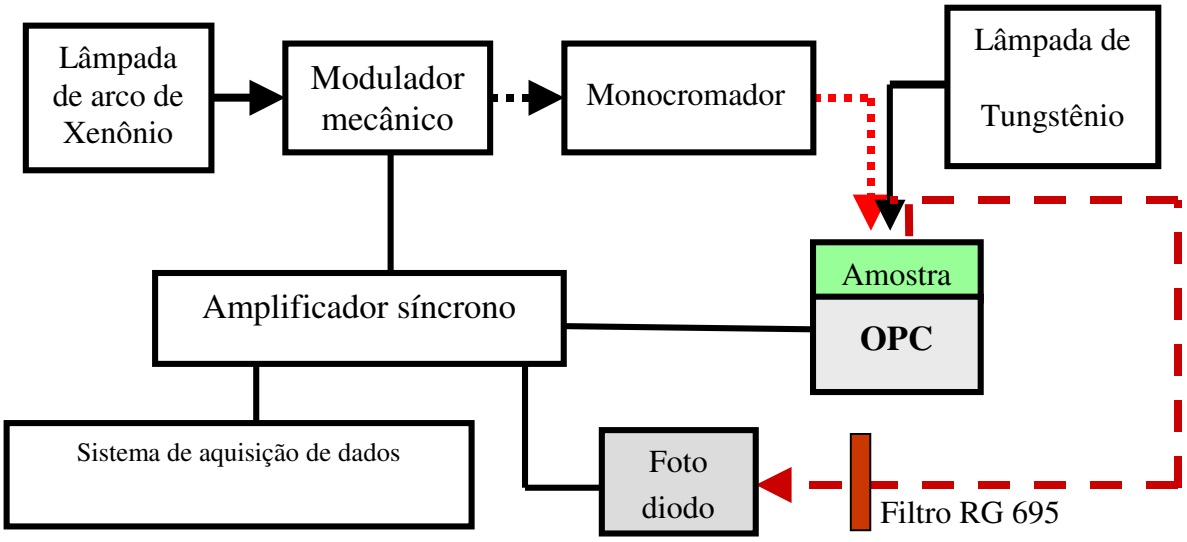


Figura 13 – Montagem experimental para medidas simultâneas de atividade fotossintética (com a OPC) e fluorescência (fotodiodo).

DETERMINANDO O COEFICIENTE DE ABSORÇÃO ÓTICA β

O cálculo de β é bastante simples. Primeiramente, devemos lembrar que o coeficiente de absorção ótica varia em função do comprimento de onda incidente sobre a amostra. Como nossas medidas de atividade fotossintética foram realizadas para luz incidente de comprimento de onda igual a 680 nm, calcularemos β para este comprimento de onda. Para tanto, incide-se perpendicularmente luz deste comprimento de onda e com intensidade conhecida I_0 sobre a superfície da amostra. Em seguida, mede-se a intensidade luminosa I que atravessa a amostra ($I = T.I_0$, onde T é a *transmitância*) bem como a fração de luz por ela refletida ($R.I_0$, onde R é a *refletância* da amostra). As medidas da intensidade refletida e transmitida foram feitas com um espectrofotômetro de esfera integradora (LiCor, modelo LI 1800). Da Lei de Beer (Capítulo 3), temos então

$$\frac{TI_0}{I_0(1-R)} = e^{-\beta L} \qquad \text{(Eq.35)}$$

onde L é a espessura da amostra. Tirando o logaritmo desta expressão, ficamos com

$$\beta = \frac{\ln[(1-R)/T]}{L} \qquad \text{(Eq.36)}$$

Conhecendo a espessura da amostra, obtém-se o valor de β. O valor obtido para medidas realizadas em amostras de *Eucalyptus urograndis* é $\beta_{680} = 152\ cm^{-1}$. Para efeito de comparação, Marquezini *et al* [1991] obtiveram $\beta_{680} = 236\ cm^{-1}$ para folhas de milho.

A PROJEÇÃO EM FASE NAS CURVAS DE INDUÇÃO FOTOSSINTÉTICA

Nas medidas fotoacústicas em folhas, quando se elimina a componente de atividade fotossintética (através do ***efeito negativo***), as diferenças entre a difusão térmica e a difusão das moléculas de O_2 fazem com que se observe uma mudança no ângulo de fase do sinal. Assumindo que a componente térmica do sinal fotoacústico permanece essencialmente constante durante o período de indução fotossintética, ela pode ser facilmente subtraída do sinal total. O sinal remanescente é então proporcional a processos de troca gasosa que ocorrem na folha sob incidência de luz.

Se a componente de troca gasosa observada corresponde unicamente à evolução *ou* à absorção de O_2, espera-se que o ângulo de fase permaneça constante no tempo – desde que a folha não sofra alterações significativas em sua morfologia durante as medidas (pois isso poderia afetar os processos de difusão). Por outro lado, um sinal composto por processos simultâneos de absorção *e* evolução de O_2 possibilita que se observe uma transição no ângulo de fase à medida que se passe de uma situação com absorção maior que evolução para a situação oposta. Como absorção e evolução se constituem em processos opostos de difusão, é razoável supor que a transição observada nesse caso para o ângulo de fase seja próxima a 180 graus:

$\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1 \approx 180^0 \rightarrow$ diz-se que φ_2 e φ_1 estão em oposição de fase.

Nas medidas de indução fotossintética, para estudar a competição entre esses processos difusivos opostos, projetamos o sinal complexo da atividade fotossintética no valor do ângulo de fase atingido após o período de indução (θ_{FINAL}). Este processo é ilustrado na Figura 14. Sabemos que, após a indução, a componente predominante no sinal fotoacústico é a evolução de O_2; assim, se num determinado instante a projeção do ângulo de fase em θ_{FINAL} é positiva, o sinal de atividade fotossintética representa evolução de gás maior que absorção. Se, ao contrário, esta projeção é negativa (como no caso da Figura 14), temos absorção maior que evolução naquele instante.

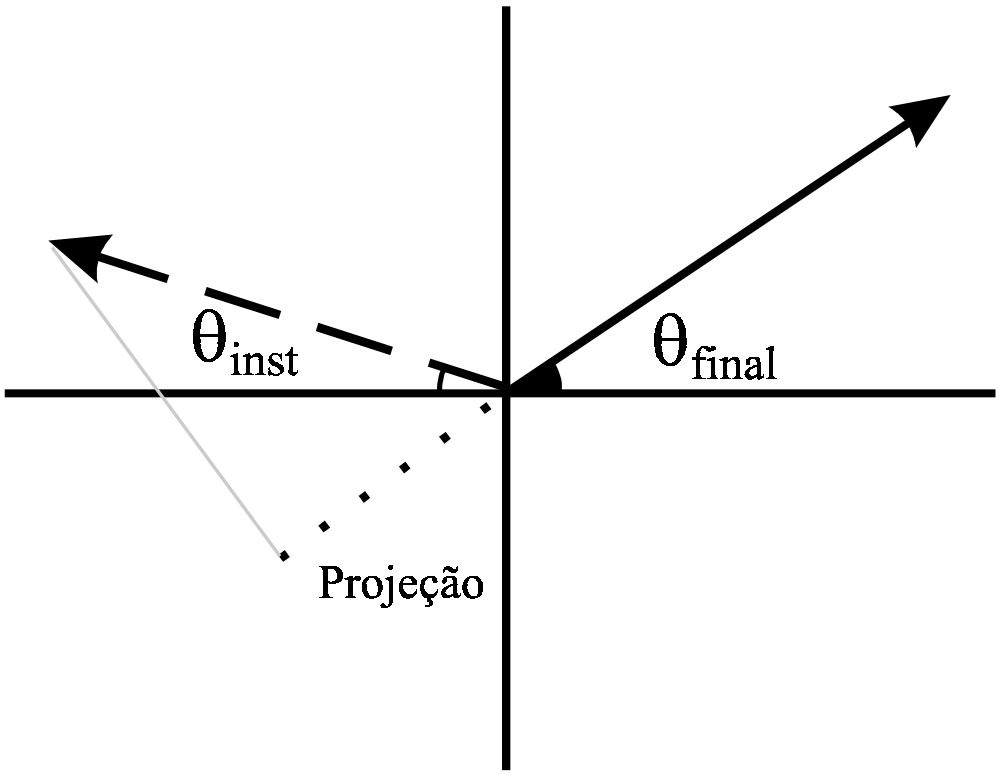


Figura 14 – Projeção do ângulo de fase: a linha cheia indica o valor estacionário do ângulo de fase (θ_{final}, após a indução); a linha tracejada mostra o ângulo de fase num instante *t* durante a indução (θ_{inst}). A linha pontilhada indica a projeção de θ_{inst} no eixo de θ_{final}. Como a projeção está em oposição de fase com θ_{final}, o processo dominante no instante *t* é a absorção de O_2.

5. MEDIDAS EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA

Antes de apresentar os resultados experimentais propriamente ditos, vamos recapitular brevemente o modelo para a difusão do oxigênio dentro da folha. Como vimos no Capítulo 2, as clorofilas se concentram nos cloroplastos; estes, por sua vez, ficam imersos em células do mesófilo, que formam a maior parte do tecido celular da folha. Oxigênio e calor gerados por incidência de luz modulada se difundem como ondas de concentração e temperatura desde os cloroplastos até o espaço intercelular, fazendo oscilar densidade e temperatura deste meio. Ambas as componentes levam à oscilação de pressão no volume gasoso intercelular. Esta oscilação é transferida, por deformação elástica da epiderme, até a atmosfera interna da câmara fotoacústica, onde é detectada pelo microfone. Pode-se estudar separadamente cada uma dessas contribuições (variação de pressão devida ao O_2 evoluído e fluxo de calor) adicionando-se luz contínua fotossinteticamente saturante para eliminar a evolução modulada de oxigênio.

O ângulo de fase do sinal fotoacústico de O_2 reflete a defasagem das ondas de oxigênio evoluído em relação à luz modulada incidente. Esta diferença de fase depende de diversas características da folha estudada, como permeabilidade das membranas celulares, diâmetro dos cloroplastos, distância destes às paredes celulares, solubilidade de O_2 nestas paredes e a espessura destas (como vimos no Capítulo 3). Além desses fatores, a constante de tempo k de evolução de O_2 interfere na variação do ângulo de fase. Assim, quando se analisa o sinal fotoacústico de atividade fotossintética para diferentes frequências de modulação, a dependência do ângulo de fase com a frequência fornece informação sobre as várias partes da estrutura celular que governam a difusão do O_2 na folha.

No decorrer deste trabalho, foram feitas medidas *in vivo* em função da frequência para folhas de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*), café (*Coffea arabica*), jequitibá

(*Cariniana legalis*) e copaúba (*Copaifera trapezifolia*). Todas as amostras apresentavam altura entre 40 cm e 50 cm e foram cultivadas na estufa do Instituto de Biologia (UNICAMP), sob temperatura ambiente e tela de sombrite que limitava a luz solar incidente a 50% do valor em campo aberto. O objetivo de realizar medidas em diferentes sistemas vegetais era verificar a possibilidade de caracterizar amostras em função dos parâmetros envolvidos no processo difusivo. Nas medidas aqui apresentadas, utilizou-se luz de 680 nm com intensidade de 18 W/m^2. Amplitude e fase do oxigênio evoluído foram medidas para frequências de modulação entre 7 Hz e 55 Hz. Em todas as medidas efetuadas, o ângulo de fase do sinal de O_2 diminui (indicando aumento na defasagem da produção de O_2) à medida que a frequência aumenta. A seguir, vamos interpretar a variação com a frequência do ângulo de fase do O_2 evoluído e, utilizando o modelo desenvolvido no Capítulo 3, obter informações sobre os parâmetros de ajuste das medidas experimentais.

Para estudar o comportamento do ângulo de fase φ da atividade fotossintética partindo da expressão obtida para P_{O2} (Eq.34), inicialmente foi necessário resolver o sistema de equações e condições de contorno apresentado no Capítulo 3, a fim de obter uma expressão em que a dependência da fase com os diversos parâmetros aparecesse explicitamente. Isto foi feito utilizando-se o programa *Mathematica* 3.0™. A expressão obtida é bastante extensa e complicada (ver Apêndice); assim, é mais ilustrativo mostrar simulações feitas a partir desta expressão para diferentes valores dos parâmetros envolvidos. Deste modo, assumindo valores típicos para alguns dos parâmetros [14], fizemos variar os parâmetros restantes, utilizando o programa *Mathematica* 3.0™ para gerar as curvas correspondentes do ângulo de fase φ. Como o ângulo de fase varia linearmente com a raiz quadrada da frequência de modulação f em algumas regiões, as curvas estão representadas na forma φ x $f^{1/2}$.

[14] $\eta_c.\eta_m \sim 20$; $A/V_T \sim 10\ cm^{-1}$; $S \sim S_{O2\text{-}Água} = 0{,}026\ cm^3\ O_2/\ cm^3\ H_2O$.

Para entender melhor a dependência do ângulo de fase com a frequência de modulação, apresentaremos a seguir algumas simulações com os parâmetros relevantes do modelo assumindo diversos valores. Cada uma dessas simulações representa uma situação idealizada em que um dos parâmetros é o fator que limita a difusão do oxigênio dentro da folha (ver no Apêndice as expressões para esses casos). Após as simulações, passaremos à análise e ajuste dos dados experimentais obtidos para as espécies vegetais estudadas.

Inicialmente, vamos mostrar uma curva correspondente ao que podemos chamar de "difusão ideal". Na construção desta curva, adotamos para as variáveis do modelo de difusão valores que minimizam a dependência do ângulo de fase com a frequência de modulação. Assim, tomando espessuras típicas para a camada de citoplasma e a parede celular (0,3 μm) e para a camada de cloroplastos (2 μm), assumimos valores bastante elevados para a difusividade D (1 cm^2/s), a constante de reação k ($10^6/s$) e a permeabilidade P (1000 cm/s).

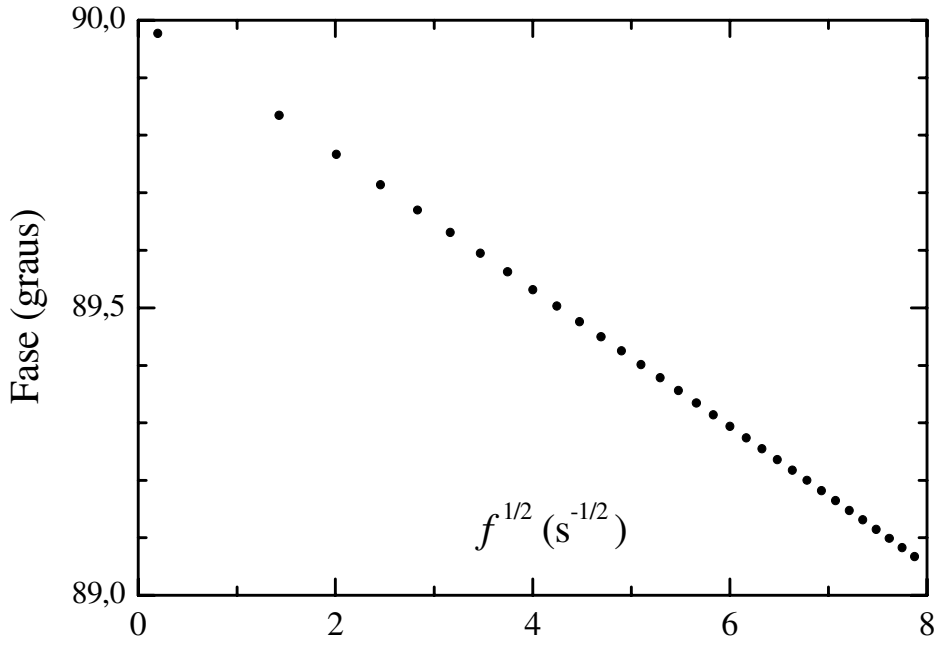


Figura 15 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. A simulação acima representa uma difusão "ideal" com D = 1 cm^2/s, k = $10^6/s$, P = 1000 cm/s, l_1 = 2 μm e $l_2 = l_3$ = 0,3 μm.

A curva da Figura 15 mostra que, nesse caso extremo, o ângulo de fase varia menos de um grau num intervalo de frequência de aproximadamente 60 Hz.

Vamos agora observar o efeito causado quando se limita a difusão assumindo um valor baixo para a constante de reação k. Para tanto, construímos a curva da Figura 16 tomando k = 10/s, o que corresponderia a reações de evolução extremamente lentas (tempo de 0,1 s). Os demais parâmetros assumidos na construção desta curva são: D = 1 cm^2/s, P = 1000 cm/s, l_1 = 2 μm e $l_2 = l_3$ = 0,3 μm.

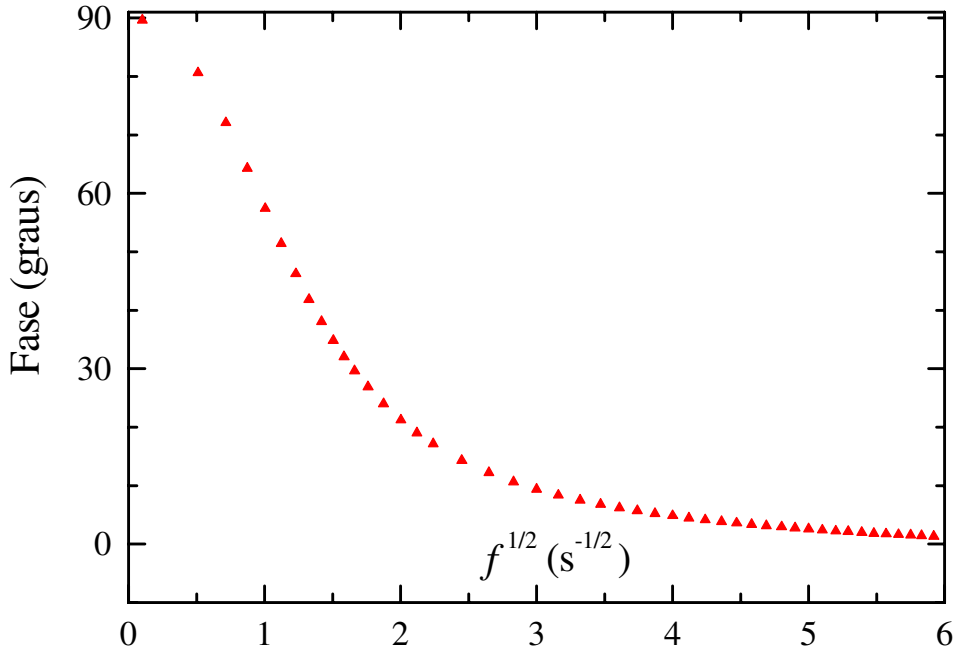


Figura 16 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. Na simulação acima, o parâmetro que limita a difusão é a constante de reação k. Os valores assumidos para os parâmetros são: D = 1 cm^2/s, k = 10/s, P = 1000 cm/s, l_1 = 2 μm e $l_2 = l_3$ = 0,3 μm.

A curva acima é aproximadamente linear no intervalo 1 Hz ≤ f ≤ 3 Hz e, para frequências maiores, a fase φ tende a um valor constante defasado 90^0 em relação ao valor no limite $f \rightarrow 0$. Este comportamento corresponde a uma dependência do tipo -Arctg ($2\pi f$/k), que aparece no termo $Fe^{i\varphi}$ do modelo apresentado para a difusão (Capítulo 3 e

Apêndice). Para valores maiores de k, a curva se mantém no regime linear para toda a região de frequências das medidas experimentais (6 Hz ≤ f ≤ 60 Hz). Neste caso, quanto maior o valor de k, menor a inclinação da curva.

O próximo parâmetro a ser investigado como fator limitante para a difusão é a difusividade D. Construímos então a curva da Figura 17 com D = 10^{-7} cm^2/s (valor 100 vezes menor que o normalmente assumido para a difusividade do O_2 em tecido foliar). Os demais parâmetros para esta curva são: k = 10^6/s, P = 1000 cm/s, $l_1 = 2$ μm e $l_2 = l_3 = 0{,}3$ μm.

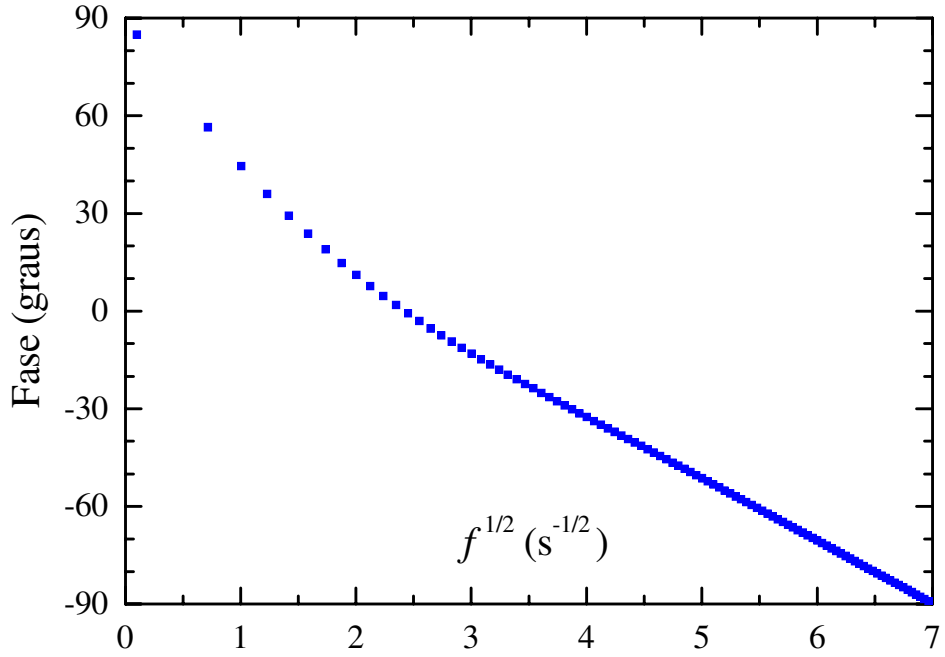


Figura 17 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. Na simulação acima, o fator limitante é a difusividade D. Parâmetros: D = 10^{-7} cm^2/s, k = 10^6/s, P = 1000 cm/s, $l_1 = 2$ μm e $l_2 = l_3 = 0{,}3$ μm.

A curva acima apresenta inclinação bastante acentuada; além disso, é linear na faixa de frequências correspondente às medidas experimentais. Nesse intervalo, os termos que dominam a oscilação da concentração de O_2 apresentam uma dependência da fase φ com a frequência f do tipo $\varphi \propto -\sqrt{f/D}$.

Passemos agora ao estudo do caso em que a difusão é limitada essencialmente pelas espessuras (camada de cloroplastos, citoplasma e parede celular). A curva da Figura 18 foi construída para l_1 = 20 μm e $l_2 = l_3$ = 3 μm. Os demais parâmetros assumidos para esta curva são: D = 1 cm^2/s, k = $10^6/s$ e P = 1000 cm/s.

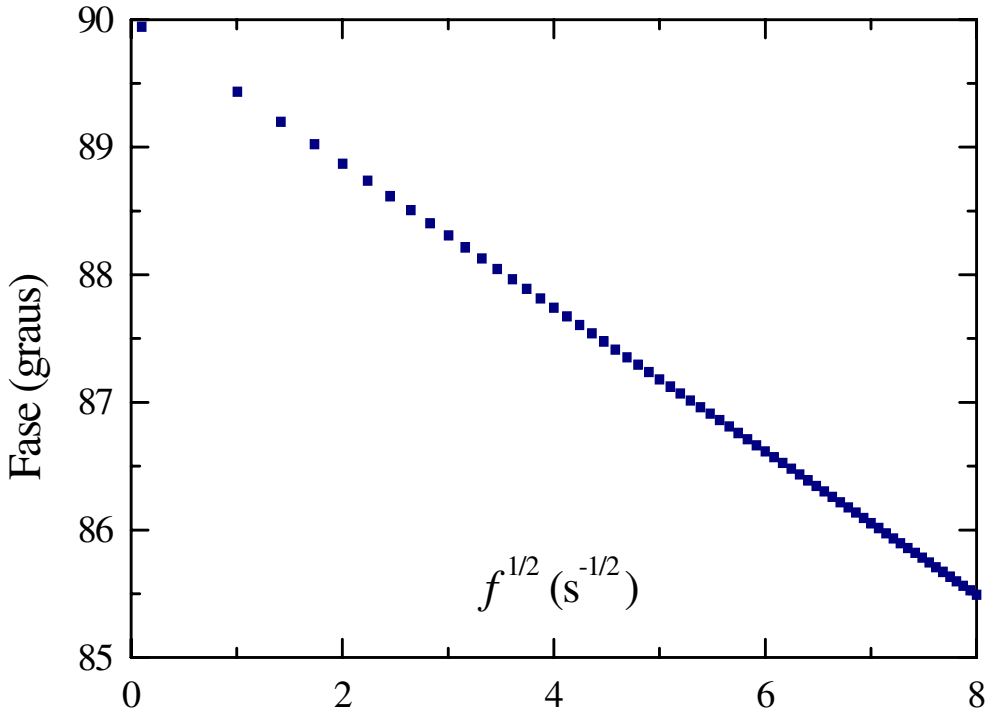


Figura 18 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. Na simulação acima, a difusão é limitada pelos parâmetros de espessura. Parâmetros: D = 1 cm^2/s, k = $10^6/s$, P = 1000 cm/s, l_1 = 20 μm e $l_2 = l_3$ = 3 μm.

Nesse caso, o ângulo de fase varia pouco com o aumento da frequência. A fase da concentração modulada de O_2 apresenta uma dependência com *f* essencialmente do tipo $\varphi \propto -l_n\sqrt{f}$, com l_n representando cada um dos parâmetros de espessura mencionados.

O último parâmetro cuja influência sobre as curvas φ x $f^{1/2}$ deve ser verificada é a permeabilidade P das membranas. Para analisar a limitação imposta à difusão do O_2 por um baixo valor de P, fizemos a simulação da Figura 19 para os seguintes valores dos parâmetros: D = 10^{-5} cm^2/s, k = 10^6/s, l_1 = 2 μm, $l_2 = l_3$ = 0,3 μm e P = 0,005 cm/s.

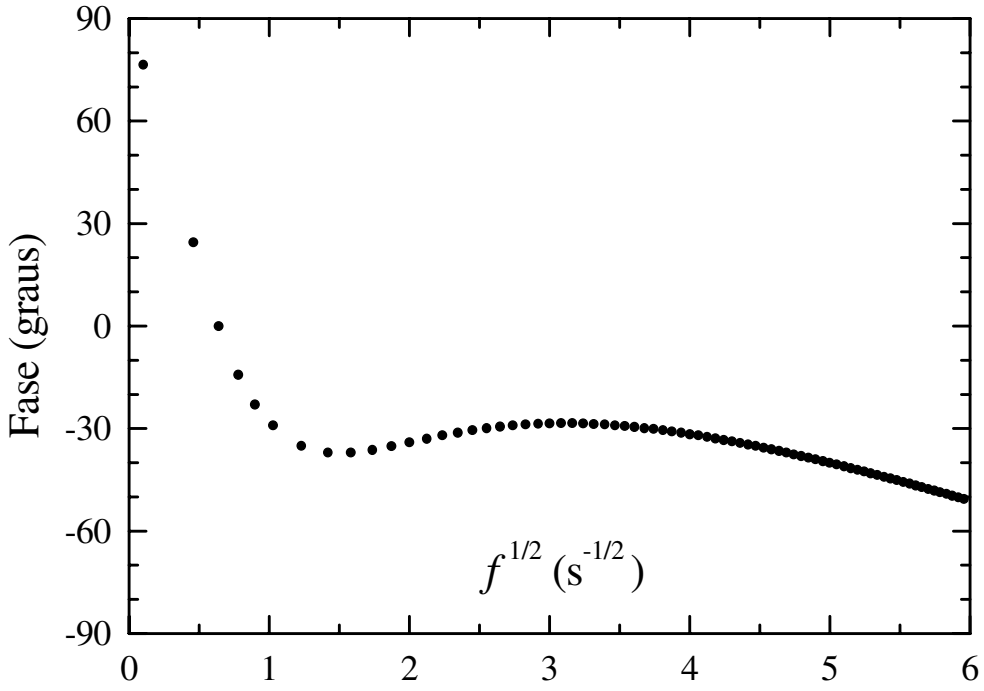


Figura 19 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. A simulação acima apresenta a difusão limitada em decorrência de um baixo valor para a permeabilidade P das membranas (P = 0,005 cm/s). Demais parâmetros para esta simulação: D = 10^{-5} cm^2/s, k = 10^3/s, l_1 = 2 μm e $l_2 = l_3$ = 0,3 μm.

A figura acima pode ser dividida em regiões distintas: para baixas frequências de modulação (aqui, inferiores a 1 Hz), a curva φ x $f^{1/2}$ é uma reta em que a fase atrasa fortemente com o aumento da frequência; para valores de *f* progressivamente maiores, a variação de φ passa por uma transição, observando-se inclusive um mínimo na curva; finalmente, para $f \geq 15$ Hz, φ volta a variar linearmente com a raiz quadrada de f (porém com inclinação bem menor).

O comportamento observado se deve à interferência entre as ondas de concentração de oxigênio que se propagam nos sentidos positivo e negativo do eixo z (ver Figura 7, no início do Capítulo 3) e são refletidas nas membranas. Simulações adicionais mostram que, à medida que se aumenta a permeabilidade, a transição entre os dois regimes lineares ocorre a frequências mais altas.

Após estudar a influência dos diversos parâmetros nas curvas φ x $f^{1/2}$, passemos aos resultados experimentais obtidos para folhas de diferentes plantas. Para simplificar a análise das curvas de fase em função da frequência, todas as medidas desta etapa do trabalho foram efetuadas utilizando-se a célula fotoacústica cujo detetor é o microfone B&K, pois esta célula apresenta resposta plana com a frequência na região de interesse (ver Capítulo 4). Os gráficos a seguir mostram os dados experimentais para cada uma das quatro espécies vegetais estudadas, acompanhados respectivamente pelas simulações que melhor descrevem cada espécie.

Algumas das curvas de ajuste apresentadas nesses gráficos foram transladadas com a soma ou subtração de uma fase constante para facilitar a comparação entre curvas, evitando superposição de curvas dispostas no mesmo gráfico. Este recurso visa apenas facilitar a identificação visual das diferentes simulações. Devemos lembrar que, em nossa análise, não é importante o valor absoluto da fase, e sim sua variação com a frequência.

Foram feitas várias tentativas de ajuste para as medidas em eucalipto (*E.urograndis*), variando diferentes parâmetros para verificar a influência de cada um deles. Avaliando os resultados preliminares obtidos, fixamos a espessura da camada de cloroplastos (l_1) em 2 μm e passamos a variar os demais parâmetros utilizando os seguintes valores:

- Difusividade (D): $3{,}7.10^{-6}$ cm^2/s [Poulet *et al*, 1983] ou 10^{-5} cm^2/s [Bults *et al*, 1982];
- Constante de reação (k): 500/s [Govindjee, 1995] ou 1000/s [Poulet *et al*, 1983];
- Permeabilidade das membranas (P): de 0,02 cm/s a 0,1 cm/s.

Fixando D = $3{,}7.10^{-6}$ cm^2/s, l_1 = 2 μm e $l_2 = l_3$ = 0,3 μm, estudamos a influência da constante de reação k e da permeabilidade P na fase do sinal fotoacústico de evolução de O_2. A Figura 20 mostra os dados experimentais para amostras de eucalipto (*E.urograndis*, mudas com 5 meses de idade) acompanhados de simulações construídas a partir do modelo de difusão e que representam diferentes tentativas de ajuste dos dados. Observa-se que a mudança no valor da permeabilidade interfere particularmente na inclinação da curva para baixas frequências de modulação. Para $f \geq 10$ Hz, a inclinação se mantém aproximadamente igual para ambos os valores de P utilizados (mantendo-se fixos os demais parâmetros). Quanto à constante k, observa-se que seu valor interfere claramente na variação da fase com a frequência: quanto maior o valor de k, menor a inclinação da curva.

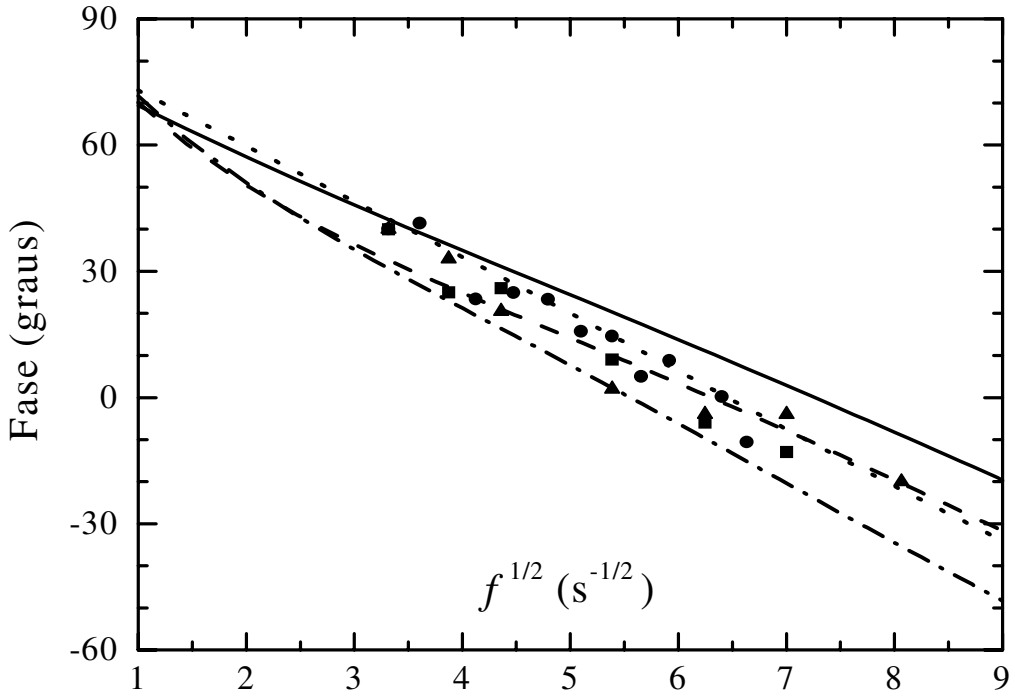


Figura 20 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. Amostra: eucalipto. Círculos, triângulos e quadrados representam três medidas em folhas de plantas diferentes. Em todas as simulações acima, D = $3{,}7.10^{-6}$ cm^2/s, l_1 = 2 μm e $l_2 = l_3$ = 0,3 μm. Linha cheia: k = 1000/s, P = 0,1 cm/s; linha pontilhada: k = 500/s, P = 0,1 cm/s; linha tracejada: k = 1000/s, P = 0,025 cm/s; linha tracejada - pontilhada: k = 500/s, P = 0,025 cm/s.

As curvas da Figura 20 indicam que o melhor ajuste dos dados deve ocorrer para um valor intermediário da permeabilidade – entre P = 0,025 cm/s e P = 0,1 cm/s. Deste modo, as novas simulações foram feitas para P = 0,05 cm/s. Além disso, a inclinação das curvas permite constatar que os melhores ajustes ocorrem para k = 500/s (curvas pontilhadas); foi este o valor utilizado nas simulações seguintes. Quanto aos demais parâmetros, adotamos D = 10^{-5} cm^2/s e mantivemos $l_2 = l_3 = 0{,}3$ µm, variando l_1 (espessura efetiva da camada de cloroplastos) para verificar seu efeito na fase do sinal fotoacústico de evolução de O_2. A Figura 21 (mesmos dados experimentais da Figura 20) mostra as simulações realizadas.

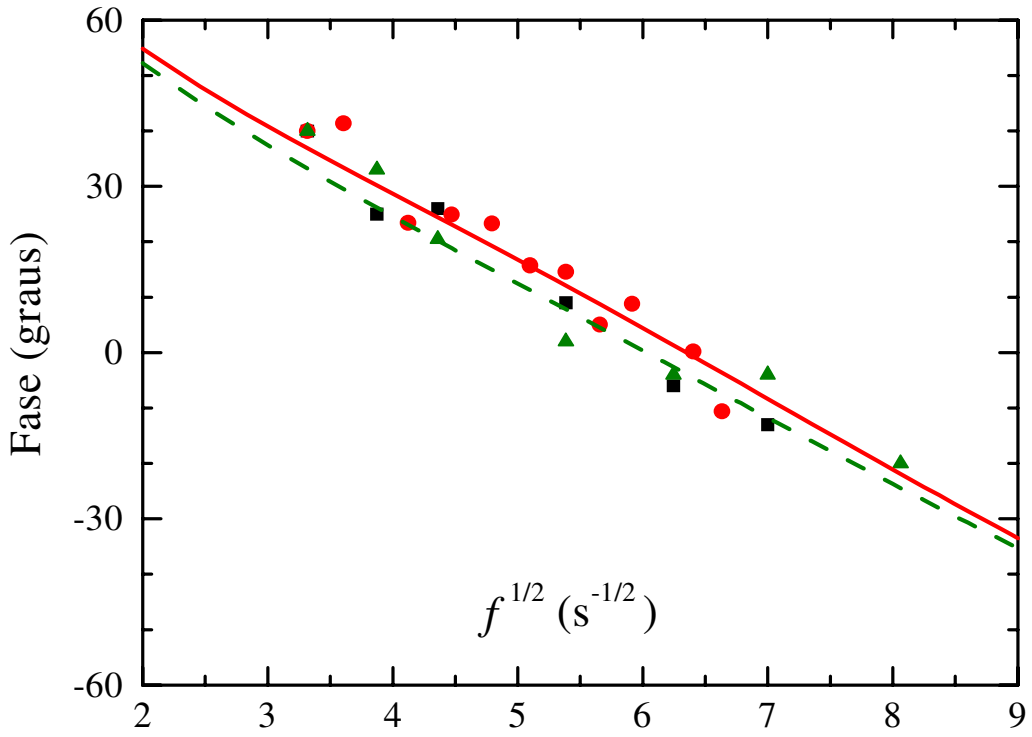


Figura 21 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. Mesmos dados experimentais da figura anterior (amostra: eucalipto). Linha tracejada: $l_1 = 3$ µm; linha cheia: $l_1 = 4$ µm. Valores para ambas as simulações: k = 500/s, D = 10^{-5} cm^2/s, P = 0,05 cm/s e $l_2 = l_3 = 0{,}3$ µm.

As duas simulações da Figura 21 correspondem aos valores de l_1 que melhor ajustam os dados experimentais. A boa concordância de ambas as curvas com os dados experimentais mostra a consistência dos valores assumidos para os demais parâmetros. Estes ajustes indicam uma espessura efetiva de 3 μm a 4 μm para a camada de cloroplastos.

Observemos agora a difusão do O_2 em folhas de café. A Figura 22 apresenta os dados experimentais juntamente com as simulações que correspondem aos melhores ajustes.

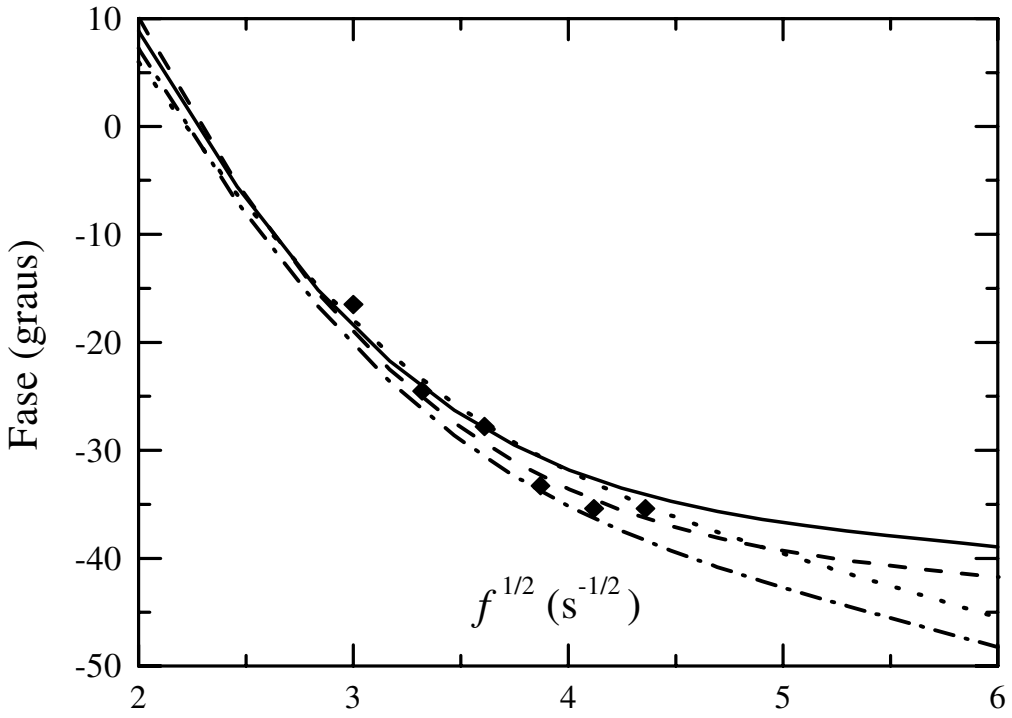


Figura 22 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. Amostra: café. Os pontos experimentais representam a média de três medidas em folhas diferentes da mesma planta. Para todas as simulações nesta figura: P = 0,018 cm/s, D = 10^{-5} cm^2/s, l_2 = 0,1 μm e l_3 = 0,3 μm. Linha cheia: k = 1000/s, l_1 = 1,5 μm; linha tracejada: k = 1000/s, l_1 = 1 μm; linha tracejada - pontilhada: k = 500/s, l_1 = 2 μm; linha pontilhada: k = 500/s, l_1 = 3 μm.

Nas medidas em folhas de café, a forte atenuação do sinal de oxigênio evoluído com o aumento da frequência de modulação confinou as medições a frequências entre 5 Hz e 19 Hz. Percebe-se claramente que os resultados obtidos para a amostra de café nesse intervalo de frequências não podem ser ajustados por uma reta. Isto caracteriza uma difusão limitada pela baixa permeabilidade das membranas. De fato, a maior concordância com os dados ocorre para P = 0,018 cm/s. Os valores assumidos para as espessuras l_2 e l_3 foram respectivamente de 0,1 μm e 0,3 μm. Quanto à constante de reação k, foi possível encontrar bons ajustes para ambos os valores utilizados (500/s e 1000/s), ajustando a espessura l_1 de acordo com cada caso.

Passemos à análise da difusão em folhas de jequitibá. A Figura 23 mostra os dados experimentais e as simulações que melhor se ajustam às medidas efetuadas.

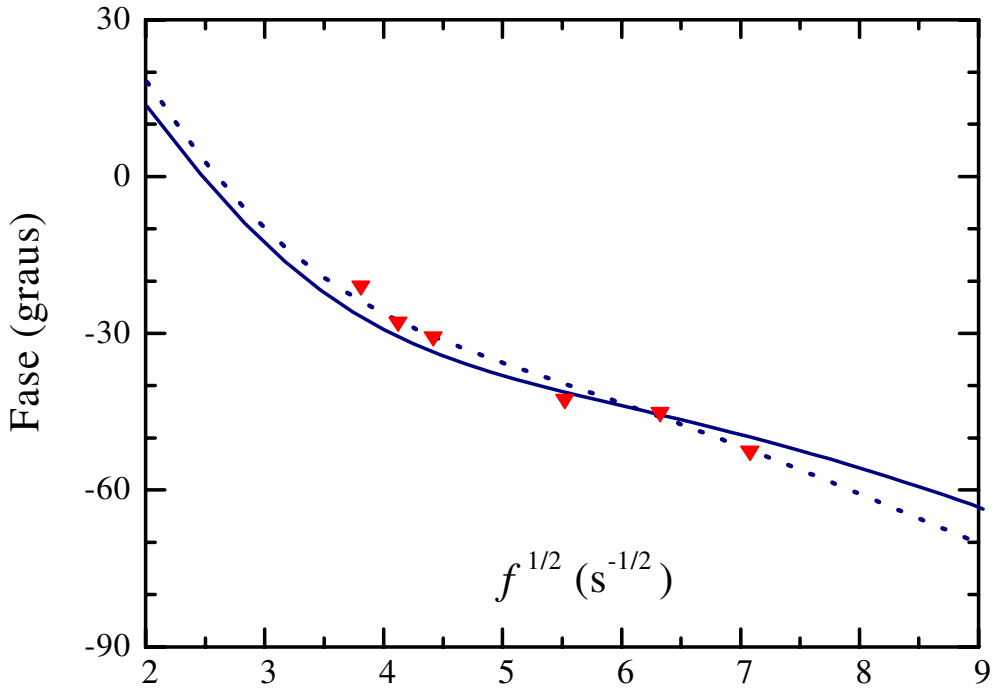


Figura 23 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. Amostra: jequitibá. Pontos experimentais representam a média de três medidas em folhas diferentes da mesma planta. Para as duas simulações: $l_1 = 2\,\mu m$, $l_2 = l_3 = 0{,}3\,\mu m$,

D = 10^{-5} cm^2/s. Linha cheia: k = 1000/s e P = 0,02 cm/s; linha pontilhada: k = 500/s e P = 0,018 cm/s.

Os resultados apresentados na Figura 23 caracterizam uma difusão semelhante à observada em folhas de café, com a curvatura – um pouco menos acentuada – indicando limitação da difusão pela baixa permeabilidade das membranas.

Encerrando a etapa experimental do trabalho, estudamos a difusão do oxigênio em folhas de copaúba. A Figura 24 mostra os dados experimentais e os melhores ajustes obtidos através das simulações efetuadas.

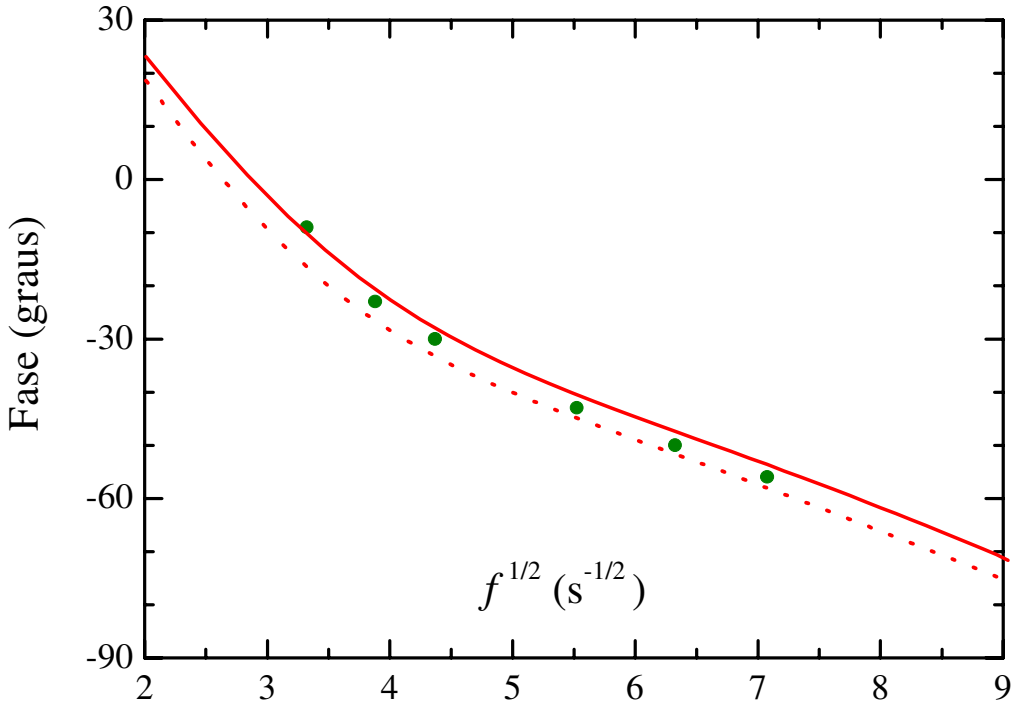


Figura 24 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. Amostra: copaúba. Pontos experimentais correspondem à média de três medidas em folhas diferentes da mesma planta. Valores para ambas as simulações: D = 10^{-5} cm^2/s, l_1 = 2 μm. Linha pontilhada: k = 500/s, l_2 = l_3 = 0,3 μm, P = 0,02 cm/s; linha cheia: k = 1000/s, l_2 = l_3 = 0,5 μm, P = 0,022 cm/s.

Nas medidas em folhas de copaúba, observa-se que a curva φ x $f^{1/2}$ é não-linear na região 10 Hz $\leq f \leq$ 25 Hz; a existência desta região de transição é também aqui atribuída à baixa permeabilidade das membranas.

ANÁLISE COMPARATIVA DAS MEDIDAS EFETUADAS

O objetivo deste trabalho não é caracterizar as quatro espécies vegetais estudadas quanto aos parâmetros de ajuste do modelo de difusão de oxigênio. Para atingir tal objetivo, seria necessário realizar um número maior de medidas em diversas plantas de cada espécie, fazendo em seguida uma análise estatística adequada. No entanto, uma comparação dos resultados obtidos para as diferentes amostras indica como alguns dos parâmetros podem variar de uma espécie para outra. Além disso, ilustra o potencial do modelo em caracterizar sistemas diferentes, abrindo perspectiva para estudos futuros.

Comparando as simulações executadas com k = 500/s para medidas em folhas de café com aquelas referentes às folhas de eucalipto e efetuadas para mesmo valor de k (Figura 21), verificamos que a distinção mais importante entre essas amostras é o valor da permeabilidade (P = 0,05 cm/s para eucalipto, P = 0,018 cm/s para café). A pequena diferença em l_2 não justifica a diferença na difusão de oxigênio para os dois tipos de amostras. Mais significativa é a diferença na espessura efetiva da camada de cloroplastos: para as folhas de eucalipto, temos 3 μm $\leq l_1 \leq$ 4 μm, enquanto as folhas de café apresentam 2 μm $\leq l_1 \leq$ 3 μm.

Por outro lado, comparando os parâmetros obtidos para as amostras de jequitibá com aqueles obtidos para o café, observa-se que:

a) para os ajustes com k = 500/s, a permeabilidade encontrada para ambas as amostras é P = 0,018 cm/s, as espessuras das camadas l_2 e l_3 giram em torno de 0,3 μm e a camada

de cloroplastos l_1, cuja espessura encontrada fica entre 2 μm e 3 μm para as folhas de café, assume o valor de 2 μm para as folhas de jequitibá;

b) para os ajustes com k = 1000/s, as camadas l_2 e l_3 apresentam espessura de 0,3 μm para ambas as amostras; enquanto a permeabilidade encontrada para as folhas de café é P = 0,018 cm/s, para as folhas de jequitibá o valor no melhor ajuste é P = 0,02 cm/s; já a camada de cloroplastos, com espessura entre 1 μm e 1,5 μm para as folhas de café, assume o valor de 2 μm para as folhas de jequitibá.

Quanto aos melhores ajustes efetuados para copaúba (Figura 24), verifica-se que estes são semelhantes àqueles obtidos para as amostras de jequitibá (Figura 23); a diferença entre as amostras aparece na permeabilidade (maior para as folhas de copaúba).

A Figura 25, a seguir, mostra a simulação que melhor ajusta os dados experimentais para cada espécie vegetal estudada.

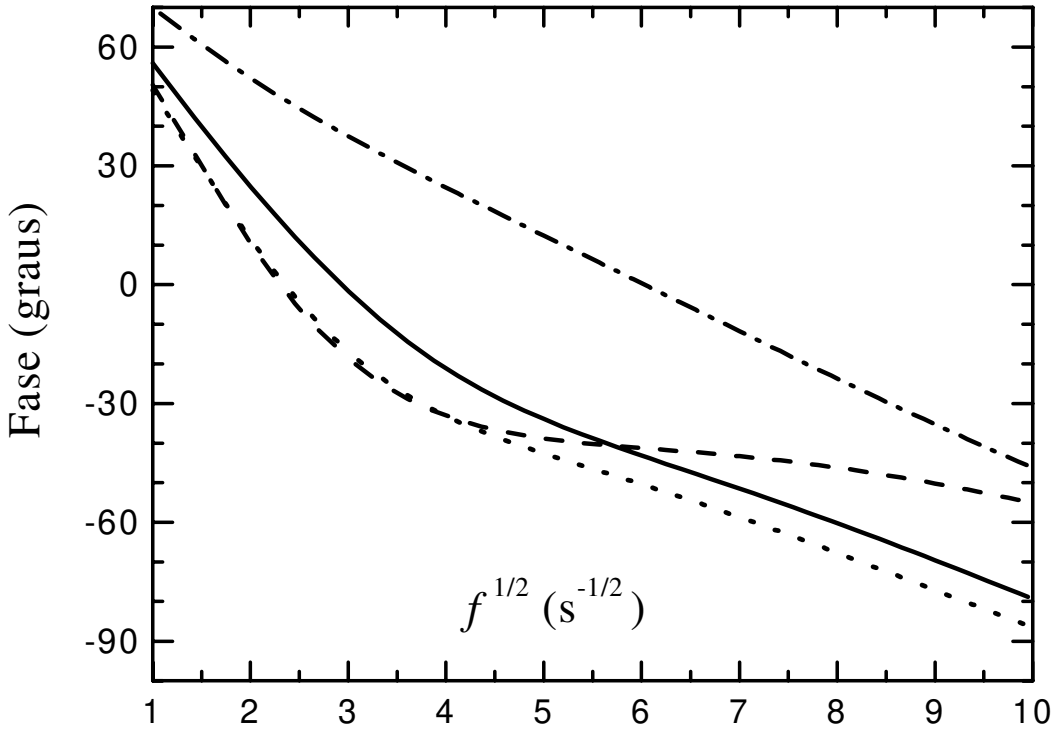


Figura 25 – Fase do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação *f*. Comparação entre as simulações que melhor se ajustam aos dados de cada espécie vegetal estudada. Para todas as curvas: D = 10^{-5} cm^2/s. Linha tracejada-pontilhada: eucalipto (k = 500/s, l_1 = 3 μm, $l_2 = l_3$ = 0,3 μm, P = 0,05 cm/s); linha cheia: copaúba (k = 1000/s, l_1 = 2 μm, $l_2 = l_3$ = 0,3 μm, P = 0,022 cm/s); linha tracejada: café (k = 1000/s, l_1 = 1 μm, l_2 = 0,1 μm, l_3 = 0,3 μm, P = 0,018 cm/s); linha pontilhada: jequitibá (k = 500/s, l_1 = 2 μm, $l_2 = l_3$ = 0,3 μm, P = 0,018 cm/s).

Estas curvas permitem notar que a transição entre duas inclinações diferentes ocorre a frequências tanto mais altas quanto mais alto é o valor da permeabilidade. Nas curvas referentes ao café e ao jequitibá (mesma permeabilidade), a distinção observada para f > 20 Hz se deve principalmente ao menor valor de k na curva do jequitibá, que também apresenta espessuras l_1 e l_2 maiores que o café.

COMENTÁRIOS SOBRE OS PARÂMETROS DE AJUSTE

Os ajustes dos resultados experimentais para as várias plantas estudadas refletem a diversidade estrutural das amostras. É importante ressaltar que a dependência do ângulo de fase com a frequência é uma dependência conjugada, no sentido de que muitas vezes há mais de um ajuste possível (isto pode ser observado nas curvas das Figuras 20 a 24). Lembremos, por exemplo, que o comportamento da fase φ em função da frequência de modulação *f* apresenta uma dependência conjugada com o coeficiente D e cada uma das espessuras l_n (espessura do meio *n*); tal relação é do tipo

$$\varphi \propto l_n \sqrt{\frac{f}{D}}$$

(ver comentários sobre as Figuras 17 e 18 e Apêndice). Assim, quanto menor a difusividade do O_2 ou quanto maior o valor de l_n em uma amostra, maior a variação da fase com a frequência. Deste modo, um ajuste feito para um valor menor de difusividade tende a apresentar valores menores para os parâmetros de espessura l_n.

Realizar medidas num intervalo de frequências maior é uma proposta natural para minimizar o problema da dependência conjugada. É necessário considerar, no entanto, que a componente modulada de oxigênio evoluído só pode ser observada em medidas para frequências inferiores a 100 Hz (conforme mencionado no Capítulo 4). Já a limitação para medidas a frequências de modulação muito baixas deve-se normalmente ao sistema experimental. Em nosso caso, por exemplo, o modulador mecânico utilizado só apresenta estabilidade satisfatória para $f \geq 7$ Hz.

Outra observação que deve ser feita diz respeito ao significado dos parâmetros de espessura. Na verdade, trata-se de "espessuras efetivas", ou seja, o valor de l_1 pode não corresponder exatamente à espessura típica de um cloroplasto da amostra investigada. Isto porque: *a)* pode haver várias camadas de cloroplastos para uma determinada área foliar A; e *b)* os cloroplastos não formam uma camada homogênea e ininterrupta, como o modelo unidimensional assume [15].

As medidas e simulações efetuadas mostram que o ângulo de fase da componente de atividade fotossintética (principalmente a baixas frequências) depende fortemente da permeabilidade das membranas ao oxigênio. Quanto menores as espessuras l_n , maior a importância da permeabilidade como fator limitante da difusão. Curvas correspondentes a baixos valores de permeabilidade (P < 0,025 cm/s, por exemplo) normalmente apresentam uma transição entre uma região de inclinação mais forte (frequências mais baixas) e outra de inclinação menor [16]. Conforme podemos visualizar na Figura 25, quanto menores os valores da permeabilidade, mais baixa a frequência em que se observa essa mudança de inclinação.

Devemos observar que a permeabilidade das membranas pode apresentar uma variação temporal governada pelo *fitocromo*, uma proteína capaz de assumir dois

[15] Os fatores η_c e η_m foram definidos no Capítulo 3 para dar conta disso.

[16] Isto é claramente verificado na simulação da Figura 19, podendo também ser comprovado por uma observação cuidadosa das Figuras 23 a 25.

diferentes estados absorvedores conforme a radiação incidente [Taiz e Zeiger, 1991]. O processo de indução de mudanças comandado pelos fitocromos no sistema vegetal chama-se *fotomorfogênese* e está relacionado com o *ciclo circadiano* das plantas (do latim *circa diem*, ou seja, que possui período de um dia). Como a permeabilidade das membranas pode variar ao longo do dia, estudos futuros visando caracterizar uma determinada espécie vegetal através de medidas fotoacústicas em folhas devem verificar a ocorrência e magnitude dessa variação na permeabilidade.

Avaliando o efeito da constante de tempo k nos ajustes, verifica-se que os dados experimentais são compatíveis com valores de k entre 500/s e 1000/s, correspondendo a tempos de reação da ordem de milissegundos, o que está em ótimo acordo com o tempo global da cadeia reativa de evolução de oxigênio (ver, por exemplo, [Govindjee, 1995]). De modo geral, ajustes feitos para valores menores de k levam à obtenção de valores maiores para as espessuras l_n (quando a permeabilidade das membranas é mantida fixa).

A partir da análise efetuada, concluímos que a técnica fotoacústica permite estudar a dependência do ângulo de fase da atividade fotossintética com a frequência de modulação, o que representa uma nova forma de caracterização das amostras – até onde sabemos, ainda pouco utilizada. A análise fotoacústica dos parâmetros relacionados à produção e difusão do oxigênio nas folhas pode ainda ser apurada através da associação com outros métodos, como a microscopia eletrônica e o estudo da fase térmica do sinal fotoacústico em função da frequência [Barja *et al*, 1999; Korpiun e Büchner, 1999].

Sobre o efeito dos diversos parâmetros na amplitude do sinal fotoacústico, os dados experimentais – bem como diversas simulações realizadas – mostram que o sinal é mais atenuado com o aumento da frequência à medida que: *i)* a permeabilidade das membranas é menor; *ii)* a taxa k é menor; *iii)* os parâmetros de espessura assumem valores maiores. No entanto, apesar da influência desses fatores no valor absoluto da amplitude, a dependência da amplitude com a frequência de modulação é pouco sensível aos

parâmetros avaliados pelas curvas de fase. Isto pode ser verificado na Figura 26, que apresenta os dados de amplitude para amostras de café (*C.arabica*) e eucalipto (*E.urograndis*, mudas semeadas). Observamos uma clara distinção entre as amplitudes do sinal para eucalipto e café, o que reflete as diferenças significativas entre as duas espécies. No entanto, assumindo valores intermediários para os parâmetros, pode-se gerar uma simulação satisfatória para ambos os conjuntos de dados, a menos de uma constante multiplicativa (ver as curvas da Figura 26).

Essa constante, por sua vez, depende de vários outros parâmetros além daqueles que afetam o comportamento da fase. Assim, para analisar a permeabilidade P das membranas, a difusividade D ou os parâmetros de espessura l_1, l_2 e l_3 através da amplitude do sinal, é necessário conhecer com precisão o coeficiente de absorção β, o coeficiente de reflexão da amostra, a intensidade luminosa incidente, a espessura da folha e as áreas efetivas definidas no Capítulo 3. Isso faz com que seja inviável obter os parâmetros de espessura e a permeabilidade através das medidas de amplitude. No capítulo seguinte, a comparação da atividade fotossintética de mudas semeadas e mudas produzidas por estaquia (clones) pode ser baseada em medidas de amplitude porque os sistemas estudados não apresentam diferenças significativas nos parâmetros citados.

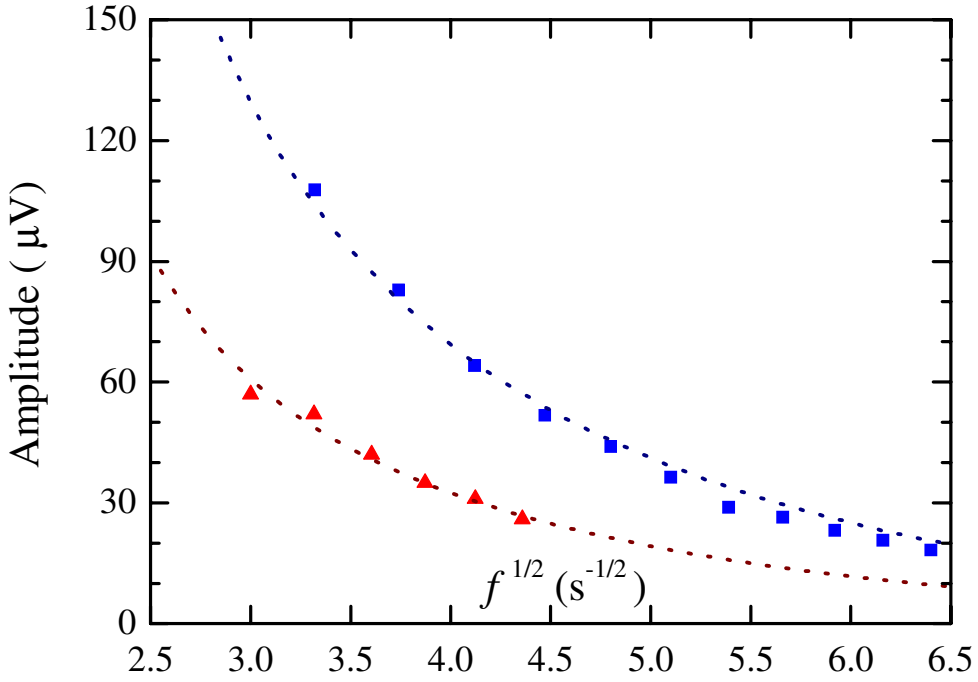


Figura 26 – Amplitude do sinal fotoacústico de atividade fotossintética em função da raiz quadrada da frequência de modulação. Triângulos: dados para amostra de café (*C.arabica*). Quadrados: dados para mudas semeadas de eucalipto (*E.urograndis*). As duas curvas pontilhadas representam o mesmo ajuste, a menos de uma constante multiplicativa.

6. DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO

Neste capítulo, apresentamos a atividade fotossintética em folhas de *Eucalyptus urograndis* utilizando a célula fotoacústica aberta (OPC), já descrita no Capítulo 4. Em primeiro lugar, analisamos as diferenças entre o desempenho fotossintético de mudas semeadas e clonadas de *E.urograndis*. A seguir, estudamos a resposta das mudas à restrição mecânica de raiz.

I. ESTUDO DA INDUÇÃO FOTOSSINTÉTICA EM MUDAS DE *Eucalyptus urograndis*: SEMEADO X CLONE

Nesta seção, trataremos de medidas comparativas da atividade fotossintética entre mudas de *Eucalyptus urograndis* produzidas por semeadura ou estaquia (clones). O estudo foi realizado com o objetivo de investigar possíveis diferenças nos processos fotossintéticos dessas amostras, utilizando para isso a técnica fotoacústica. As medidas efetuadas registram a indução fotossintética – retomada da atividade fotossintética nas folhas após adaptação prévia das amostras ao escuro.

Os resultados experimentais para o sinal fotoacústico de troca gasosa são interpretados de acordo com o método de projeção das curvas na fase do sinal. Conforme as considerações feitas no fim do Capítulo 4, um sinal fotoacústico de *absorção* de oxigênio teria um ângulo de fase aproximadamente oposto àquele correspondente à *evolução* de oxigênio. Deste modo, nosso estudo investiga a competição entre componentes de absorção e evolução de oxigênio durante a indução fotossintética.

NOTAS HISTÓRICAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *E. urograndis*

Para melhor situar o leitor no contexto do assunto estudado, fornecemos aqui algumas informações gerais sobre as espécies *E.grandis* e *E.urophylla* e as razões que levaram ao cruzamento dessas espécies para desenvolvimento do híbrido *E.urograndis*.

Eucalyptus grandis Hill ex Maiden – esta espécie é uma das principais fontes de matéria prima para celulose e papel, ocorrendo naturalmente na Austrália, em regiões onde a precipitação pluviométrica anual pode chegar a 1700 mm e a estação seca não ultrapassa três meses. A temperatura da área de ocorrência natural oscila entre 5^{o}C e 32^{o}C. Segundo Ferreira [1979], a intensidade da deficiência hídrica nas áreas de cultivo de *E.grandis* pode favorecer o surgimento do *cancro do eucalipto* (fungo *Diaporthe cubensis* Bruner).

Eucalyptus urophylla S.T. Blake – sua área de ocorrência natural é a Indonésia, onde a precipitação pluviométrica anual fica entre 1000 e 1500 mm e o período seco atinge quatro meses. A temperatura na área de ocorrência natural fica entre 8^{o}C e 29^{o}C.

As espécies de eucalipto *E.grandis* e *E.urophylla* estão entre as mais cultivadas no território brasileiro, onde o plantio de eucaliptos se iniciou na década de 20. Enquanto *E.grandis* caracteriza-se pelo rápido crescimento, *E.urophylla* cresce mais lentamente, porém apresenta maior tolerância à seca [Blake, 1977; Pryor *et al.*, 1995]. Para obter uma planta capaz de combinar a resistência à seca de uma espécie ao rápido desenvolvimento da outra, efetuou-se o cruzamento entre essas espécies. O híbrido assim produzido foi chamado de *E.urograndis* [Inoue e Oda, 1988; Blake *et al*, 1988] e seu cultivo disseminou-se rapidamente entre indústrias de papel e celulose no Brasil. Devido a seu desenvolvimento recente, este híbrido ainda não foi completamente caracterizado, o que explica nosso interesse em estudá-lo.

Informações adicionais sobre a atividade fotossintética de *E.grandis*, *E.urophylla* e *E.urograndis* (saturação da fotossíntese e inibição por alta irradiância ou adaptação a baixas temperaturas) podem ser encontradas em minha tese de mestrado [Barja, 1996].

POR QUE ESTUDAR CLONES DE EUCALIPTO ?

A proposta de caracterizar o comportamento fotossintético de uma linha de clones (C041) de *E.urograndis* se justifica pelo fato de que estes vêm substituindo gradualmente as mudas semeadas na prática de reflorestamento comercial. A técnica de produção dos clones estudados neste trabalho é a estaquia, em que se produz mudas a partir de ramos da planta original (também chamada de *doadora*). A produção de clones (ou *propagação vegetativa*) já ocorre no Brasil há quase vinte anos; entre os vários motivos que explicam esta substituição progressiva de mudas semeadas por clones está o crescimento mais

rápido destes após o plantio [17]. Se a madeira oriunda de árvores com crescimento rápido pode eventualmente apresentar problemas de empenamento e rachaduras [Ferreira, 1979], por outro lado os clones de eucalipto demonstram maior adaptabilidade às condições ambientais. Além disso, a produção de clones pode acelerar ganhos de produtividade, uma vez que o melhoramento por seleção de indivíduos e a produção de híbridos são processos lentos, que normalmente demandam muitos anos até atingir resultados significativos.

Outro fator que deve ser analisado é a variabilidade das amostras. Conforme mencionado por Higashi e Silveira [1999], amostras de eucalipto "se destacam por sua grande variabilidade intraespecífica" na avaliação de parâmetros como taxa de crescimento, resistência ao estresse hídrico e outros. Esses mesmos autores afirmam que "uma forma de manter as características favoráveis, evitando a variabilidade encontrada em árvores obtidas a partir de sementes, é recorrer à propagação vegetativa". Como a produção por estaquia gera mudas geneticamente idênticas, espera-se que o desempenho fotossintético dessas mudas apresente menor variabilidade que a verificada em conjuntos de mudas semeadas [18].

Para avaliar o desempenho fotossintético de mudas semeadas e clonadas, utilizamos a técnica fotoacústica, buscando estabelecer uma possível correlação entre os parâmetros da indução fotossintética e o desenvolvimento das plantas no campo.

INDUÇÃO FOTOSSINTÉTICA E TEMPO DE ADAPTAÇÃO AO ESCURO

Já mencionamos que plantas adaptadas ao escuro por várias horas têm desativada a cadeia eletrônica da fotossíntese. Nas medidas de indução fotossintética, à medida que o

[17] O termo "plantio", aqui, se refere ao momento em que a muda é retirada do recipiente em que era mantida na estufa e replantada em campo aberto.

[18] Isso não impede que se observe variabilidade entre clones gerados a partir da mesma matriz; nesse caso, a variabilidade se deve principalmente a fatores ambientais e condições de cultivo.

sistema (centros de reação, cadeia eletrônica e conjunto de enzimas) se readapta à incidência de luz, o sinal fotoacústico passa a apresentar, além da componente térmica (devida à conversão de parte da energia incidente em calor), uma contribuição relacionada à evolução fotossintética de oxigênio.

Medidas fotoacústicas efetuadas em mudas de eucalipto submetidas a diferentes períodos de adaptação ao escuro mostram que o tempo típico para a desativação fotossintética nessas amostras é de aproximadamente três horas. Isto pode ser verificado através das Figuras 27 e 28, que ilustram medidas feitas em mudas de *Eucalyptus urophylla*: as curvas de indução fotossintética para amostras adaptadas ao escuro por três e seis horas são semelhantes entre si – e significativamente diferentes das curvas obtidas para tempos menores de adaptação. Isso indica a importância de se adotar um período de adaptação longo o bastante para que se elimine a influência desta variável nas curvas de indução fotossintética. Em nosso estudo, estabelecemos um tempo mínimo de adaptação ao escuro de 10 horas antes das medidas de indução fotossintética. Após este período, as mudas eram posicionadas na montagem experimental, com uma folha [19] sendo fixa à OPC e exposta à luz modulada.

[19] Todas as medidas foram efetuadas em folhas do segundo par totalmente desenvolvido (conta-se a partir do ápice do caule).

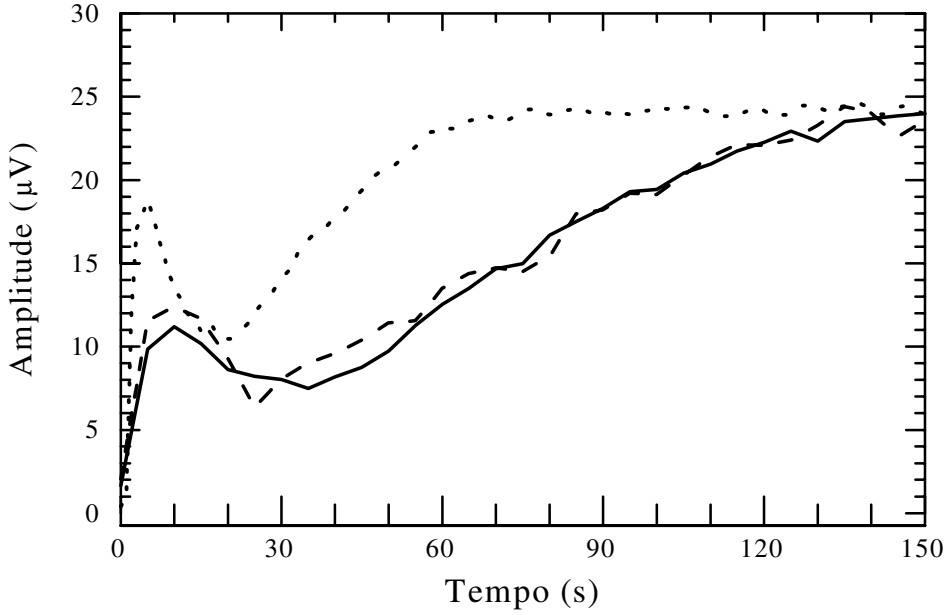


Figura 27 – Curvas de indução fotossintética para diferentes tempos de adaptação ao escuro. Linha pontilhada: 5 min; linha tracejada: 30 min; linha cheia: 1 hora. Luz: f = 17 Hz, λ = 680 nm, I = 10 W/m^2.

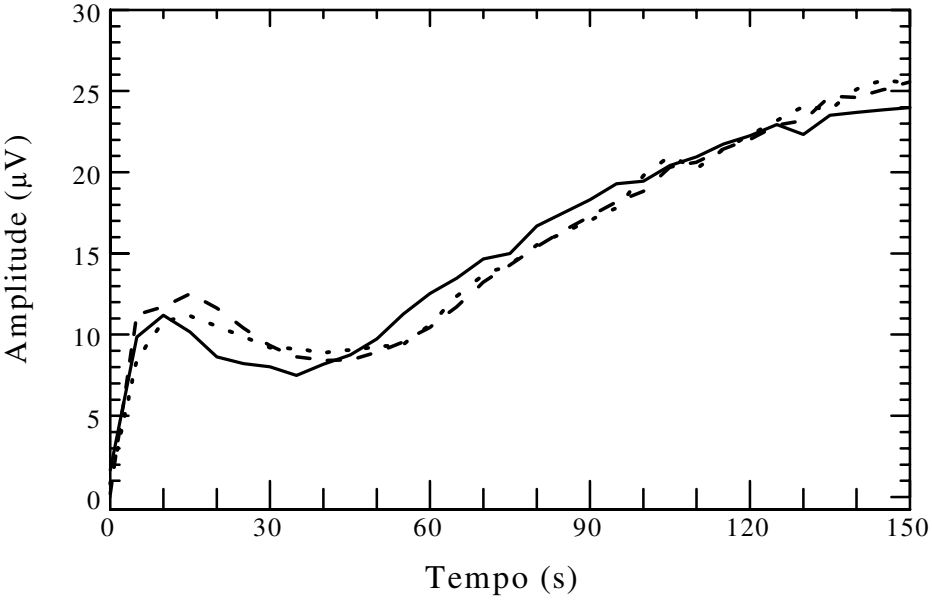


Figura 28 – Curvas de indução fotossintética para diferentes tempos de adaptação ao escuro. Linha cheia: 1 hora; linha pontilhada: 3 horas; linha tracejada: 6 horas. Mesmas condições experimentais da Figura 27.

Utilizamos a montagem experimental descrita no Capítulo 4: a lâmpada de arco de xenônio foi empregada para gerar luz modulada a 17 Hz, com intensidade igual a 10 W/m^2 e $\lambda = (680 \pm 10)$ nm – pois o sistema de clorofilas é fortemente absorvedor nessa região do espectro eletromagnético. A lâmpada de tungstênio foi usada como fonte de radiação capaz de saturar a atividade fotossintética modulada: luz contínua, 400 nm < λ < 700 nm e intensidade de 350 W/m^2 (valor correspondente à incidência plena da luz solar no campo). Subtraindo do sinal fotoacústico total a componente térmica, avaliada através da adição dessa luz fotossinteticamente saturante, podemos analisar a atividade fotossintética das amostras.

Na verdade, quando apenas a luz modulada incide sobre a folha, o sinal térmico é menor que aquele observado com a incidência adicional da luz contínua usada para saturar a fotossíntese. Esta diferença relativa entre a componente térmica do sinal respectivamente com e sem luz de saturação é chamada de *perda fotoquímica* e corresponde à fração de energia utilizada nas reações da fotossíntese. Levar em conta a perda fotoquímica típica observada em plantas de eucalipto [Barja e Mansanares, 1998] implicaria numa correção próxima a 3% do sinal fotoacústico total, o que não afeta nossa análise no presente estudo. Por esta razão, o efeito da perda fotoquímica não é considerado neste trabalho.

Depois da subtração da componente térmica, o sinal fotoacústico expressa a troca gasosa fotossintética. Amplitude e fase deste sinal remanescente variam no tempo, refletindo a retomada dos processos da fotossíntese. Como o sinal estacionário após a indução fotossintética representa essencialmente evolução de oxigênio, podemos estudar a competição entre componentes de evolução e absorção projetando o sinal fotoacústico no valor final da fase. Quando esta projeção é positiva, o sinal é dominado pela evolução de oxigênio; processos de absorção predominam quando a projeção é negativa (conforme Figura 14).

Os resultados que mostraremos aqui se referem à média sobre cerca de 10 medidas para cada tipo de amostra (mudas semeadas e clonadas). Tanto as mudas semeadas como aquelas produzidas por estaquia (clones C041) foram cultivadas sob tela de sombrite (limitando a incidência luminosa nas plantas a 50% da radiação solar), em pequenos recipientes (tubetes de 50 ml), sendo irrigadas e fertilizadas diariamente. Esses recipientes são usados rotineiramente pelas companhias de reflorestamento. As medidas foram feitas cerca de 120 dias após a semeadura das mudas, em folhas não destacadas da planta.

MEDIDAS COMPLEMENTARES

Para possibilitar uma análise mais completa das medidas fotoacústicas, outras técnicas foram utilizadas para realizar medidas adicionais nas amostras de eucalipto. As medidas complementares incluíram a determinação das concentrações de clorofila *a* e *b*, segundo o método proposto por Arnon [1949]. Além disso, medições da fluorescência da clorofila *a* foram feitas *in vivo* e *in situ* para se obter a razão Fv/Fm (fluorescência máxima / fluorescência variável), que indica a máxima capacidade fotoquímica das plantas [Govindjee, 1995]. Estas medidas utilizaram um detetor Hansatech, modelo PEA (Plant Efficiency Analyser). Espessura de folhas e densidade estomática na epiderme inferior também foram determinadas.

RESULTADOS

As Figuras 29 e 30 mostram respectivamente amplitude e fase de uma curva típica de indução (componente de atividade fotossintética) para mudas semeadas de *E.urograndis*. A incidência de luz modulada ocorre a partir de t = 0, momento em que se inicia o registro do sinal fotoacústico em função do tempo. Para mudas semeadas de *E.urograndis*, observa-se inicialmente um rápido aumento na amplitude da atividade fotossintética ($t < 20$ s), seguido por uma queda e posterior crescimento até atingir o estado estacionário após cerca de 4 minutos.

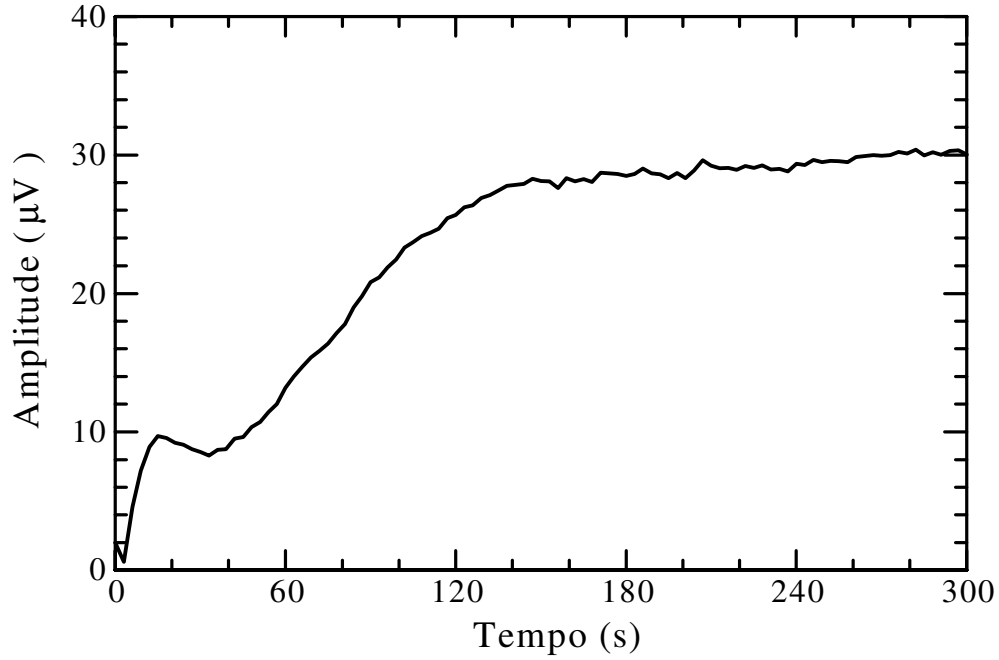


Figura 29 – Curva típica de indução da atividade fotossintética (amplitude) para mudas semeadas de *E.urograndis*. Luz modulada: f = 17 Hz, λ = 680 nm, I = 10 W/m^2.

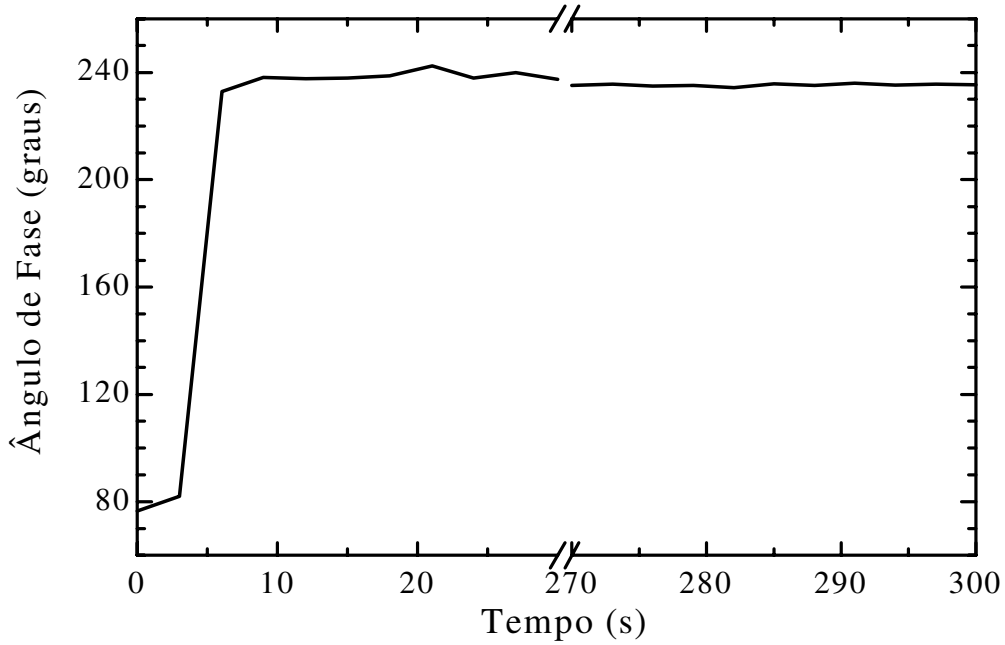


Figura 30 – Ângulo de fase da componente de atividade fotossintética para a curva de indução mostrada na Figura 29.

Para entender melhor o início da indução fotossintética, vamos olhar para o ângulo de fase na Figura 30. O que nos interessa é a variação do ângulo de fase no tempo, uma vez que valores absolutos da fase dependem da configuração experimental e não possuem significado particular. A Figura 30 mostra o comportamento habitual da fase nas medidas em amostras de *E.urograndis*: há um salto de quase 180^0 em t ~ 3s, e depois a fase permanece aproximadamente constante. Esta mudança abrupta na fase sugere a ocorrência de um pico de absorção de gás no início da indução fotossintética. O fato de o salto na fase ser de 160^0, e não de 180^0, indica que a constante de tempo para a absorção difere daquela para a evolução (a taxa *k* mencionada nos Capítulos 3 e 5). Após este pico inicial de absorção, a *produção* de oxigênio passa a dominar o processo de trocas gasosas.

Vejamos agora as medidas em mudas de *E.urograndis* produzidas por estaquia. A Figura 31 exibe a amplitude da componente de atividade fotossintética para uma medida típica de indução em clones C041 de *E.urograndis*. Vemos duas curvas nesta figura [20]: a linha cheia corresponde à amplitude da atividade fotossintética – que tem sua fase apresentada na Figura 32. A linha tracejada representa a projeção da amplitude no valor final da fase (fase da evolução de oxigênio), assumindo valores negativos quando a absorção modulada é maior que a evolução.

Comparando as Figuras 29 e 31, percebemos que as curvas de indução fotossintética evidenciam diferenças entre as mudas semeadas e aquelas produzidas por estaquia: enquanto a taxa de fotossíntese em mudas semeadas atinge estado estacionário em até quatro minutos, a indução fotossintética em mudas produzidas por estaquia mostra evolução líquida [21] de oxigênio apenas para tempos superiores a 20 minutos, levando cerca de uma hora para atingir estado estacionário.

---

[20] A queda observada no sinal para t ~ 3200 s na Figura 31 corresponde ao momento em foi efetuada a saturação da fotossíntese (o chamado *efeito negativo*) por incidência de luz saturante não-modulada. A Figura 32 não apresenta os valores de fase correspondentes pois um sinal de amplitude nula – ou muito próxima a zero – apresenta fase aleatória, sem sentido físico.

[21] O termo "evolução líquida" significa evolução de gases maior que absorção.

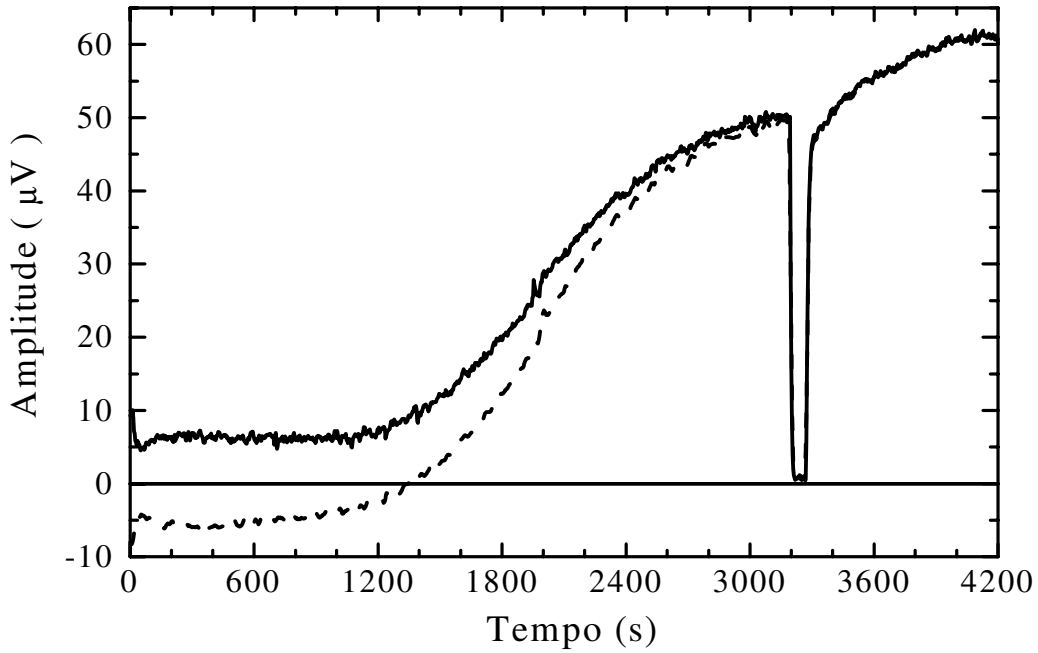


Figura 31 – Linha cheia: curva típica de indução da atividade fotossintética (amplitude) para mudas de *E.urograndis* produzidas por estaquia. Linha tracejada: projeção da amplitude no valor estacionário do ângulo de fase. Mesmas condições experimentais das Figuras 29 e 30.

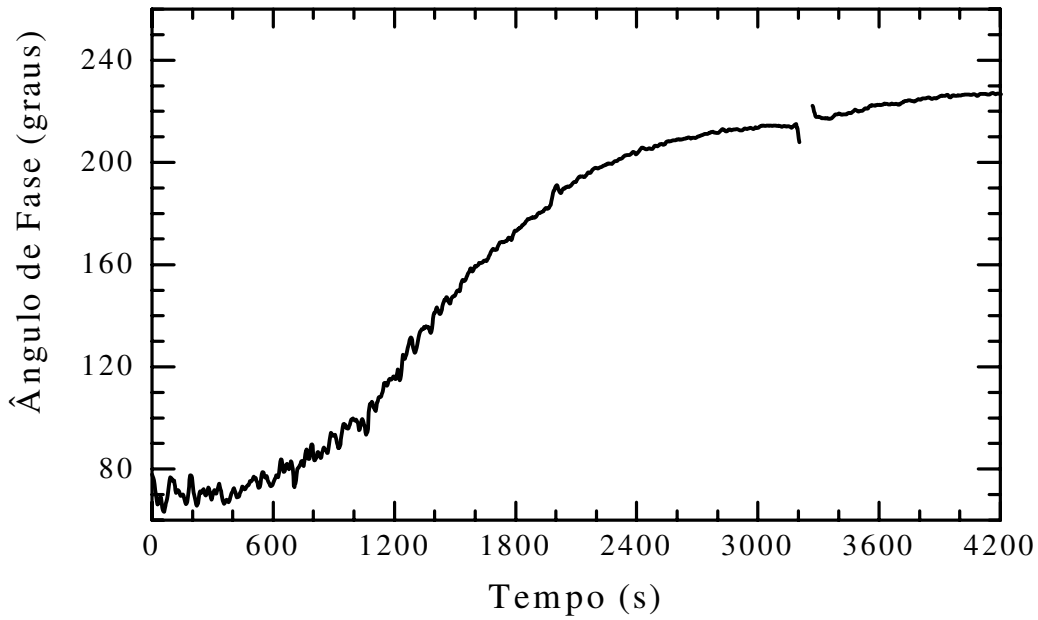


Figura 32 – Ângulo de fase da componente de atividade fotossintética para a curva de indução (linha cheia) mostrada na Figura 31.

O ângulo de fase da atividade fotossintética na curva de indução das mudas produzidas por estaquia mostra uma larga transição desde o início da curva até o momento em que o estado estacionário é atingido (ver Figura 32). A ocorrência desta inversão de fase indica uma competição entre absorção de gás e evolução de oxigênio em que a componente dominante é, inicialmente, a absorção (para $0 < t < 1200s$), posteriormente superada pela evolução de oxigênio (para $t \geq 1200s$).

Comparando as Figuras 29 e 31, podemos verificar que a taxa de atividade fotossintética obtida no estado estacionário (ou seja, após a indução) para as mudas de *E.urograndis* clonadas é aproximadamente o dobro daquela observada para as mudas semeadas. Assim, podemos resumir da seguinte forma as diferenças entre as amostras: com o início da indução fotossintética, as mudas semeadas apresentam evolução líquida de oxigênio antes daquelas produzidas por estaquia, mas estas últimas atingem uma atividade fotossintética bem maior no estado estacionário.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros que caracterizam as principais diferenças observadas entre os dois tipos de amostras: valores médios para o tempo característico de indução t_0 (tempo para o qual a taxa de evolução de O_2 atinge 50% do valor no estado estacionário); a componente fotoacústica de troca gasosa (evolução/absorção) no período inicial da indução fotossintética ($t \leq 30$ s) e a mesma componente após ser atingido o estado estacionário. Como na Figura 30, valores negativos indicam absorção líquida de gases pelas mudas clonadas.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos nas medidas complementares, ou seja: concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total (por unidade de área), razão entre as concentrações de clorofila *a* e clorofila *b*, fluorescência (Fv/Fm), densidade estomática e espessura da folha. Podemos observar que a concentração total de clorofila é a mesma para ambos os tipos de amostras. A razão entre as clorofilas *a* e *b*, no entanto, é bem maior para as mudas produzidas por estaquia. A densidade estomática e a espessura foliar não variam significativamente entre os dois tipos de mudas; já a relação Fv/Fm é maior para clones.

Também foi medido o espectro de absorção das folhas, que mostrou equivalência entre mudas semeadas e mudas produzidas por estaquia.

TABELA 1

Tempo característico de indução t_0 , componente fotoacústica de troca gasosa no início da indução fotossintética ($t \leq 30$ s) e no estado estacionário (após o período de indução) para mudas de *E.urograndis* produzidas por semeadura e estaquia. Média sobre cerca de 10 medidas (± desvio padrão σ_{n-1} dividido por $n^{1/2}$).

Forma de obtenção das mudas	**Semeadura**	**Estaquia**
Tempo de indução t_0 (s)	90 ± 6	2180 ± 60
Troca gasosa inicial (μV)	3,2 ± 0,7	− 6,3 ± 0,7
Troca gasosa final (μV)	32 ± 2	67 ± 5

TABELA 2

Espessura da folha, densidade estomática, fluorescência (razão Fv/Fm), concentração de clorofilas *a* e *b* e razão entre as concentrações de clorofila (relação *a/b*) para mudas de *E.urograndis* produzidas por semeadura e estaquia. Média sobre cerca de 10 medidas (± desvio padrão σ_{n-1} dividido por $n^{1/2}$).

Forma de obtenção das mudas	**Semeadura**	**Estaquia**
Espessura da folha (μm)	276 ± 18	303 ± 21
Nº de estômatos/0.01mm^2	8 ± 1	7,6 ± 1,1
Razão Fv/Fm	0,804 ± 0,008	0,861 ± 0,004
Clorofila *a* (mg/cm^2)	0,0095 ± 0,0005	0,011 ± 0,001
Clorofila *b* (mg/cm^2)	0,0057 ± 0,0009	0,004 ± 0,001
Clorofila Total (mg/cm^2)	0,0152 ± 0,0014	0,015 ± 0,002
Relação *a/b* (/cm^2)	1,7 ± 0,2	2,7 ± 0,3

O tempo característico de indução mostra ampla diferença entre mudas semeadas e mudas produzidas por estaquia. Mudas semeadas já apresentam evolução líquida de oxigênio três segundos após o início do experimento, enquanto clones mostram absorção líquida durante os primeiros 20 minutos. Este atraso das mudas estaqueadas na liberação fotossintética de oxigênio se sobrepõe à já mencionada diferença de tempo para atingir o estado estacionário (tipicamente uma hora para clones, contra menos de cinco minutos para as mudas semeadas). Lembremos que a "evolução de gás negativa" observada nas medidas não representa absorção de CO_2, uma vez que esta é fortemente atenuada pela modulação [22] e não pode, assim, contribuir para o sinal fotoacústico [Bults *et al*, 1982].

Além das diferenças discutidas acima, a indução fotossintética apresenta uma componente transitória rápida no primeiro minuto da indução fotossintética que é vista claramente nas medidas em mudas semeadas mas não pode ser detectada na indução para os clones C041. É possível que a ocorrência de uma componente transitória similar nos clones esteja sendo mascarada pela troca gasosa negativa observada para estas amostras. Na verdade, a observação de um pico de oxigênio evoluído no primeiro minuto de iluminação já foi relatada para folhas de outras espécies vegetais (ver, por exemplo, [Prinsley e Leegood, 1986] e [Malkin, 1987]).

Segundo Edwards e Walker [1983], o estágio inicial da indução fotossintética é limitado essencialmente por dois fatores: *a*) baixos níveis metabólicos de compostos atuantes na cadeia fotossintética de transferência eletrônica (como a reserva de quinonas, plastoquinonas, ADP e ATP); e *b*) ativação de enzimas atuantes no Ciclo de Calvin (como a enzima RuBisCO). Destes, o fator mais importante para explicar a demora no início da indução seria a recomposição dos níveis metabólicos, relacionada à concentração de fosfato inorgânico disponível no meio intercelular; ambos os fatores, no entanto, podem estar interligados.

[22] Conforme discutido no final do Capítulo 3.

Interpretar o período inicial da indução fotossintética relacionando-o à recomposição dos níveis metabólicos de substratos está de acordo com o trabalho de Prinsley e Leegood [1986], que atribuem a componente transitória observada à rápida foto-redução de glicerato-3-P e fosfato inorgânico armazenados durante o período de adaptação ao escuro (embora nem todas as espécies vegetais respondam desta maneira). Além do mais, Sassenrath-Cole e Pearcy [1994] afirmam que o primeiro minuto de indução é influenciado pela regeneração de ribulose 1,5-bifosfato (RuBP).

De acordo com estas observações, o que poderia atrasar a indução fotossintética (ou prolongar a absorção modulada de O_2 no tempo) ? Como vimos, a ativação dos processos fotossintéticos é promovida pelo acúmulo de determinados compostos. Dentre esses compostos que agem cataliticamente, os principais são aqueles que atravessam mais facilmente as membranas do cloroplasto, como a triose-fosfato e o ácido fosfoglicérico (PGA). A indução tende a se completar à medida que as concentrações de triose-fosfato, PGA e RuBP atingem valores de equilíbrio.

Além da regulação de compostos catalíticos, outro fator que pode explicar a prolongada absorção de oxigênio é a ocorrência de fotorrespiração, ou seja, a utilização de O_2 (e não CO_2) como substrato para a enzima RuBisCO – a chamada "ação oxigenase" (ver Capítulo 2). Este processo é diretamente proporcional à concentração atmosférica de O_2. Deste modo, a taxa de fotorrespiração tende a aumentar no decorrer da indução fotossintética (responsável pelo acúmulo de O_2 na atmosfera vizinha à amostra). Na verdade, o tempo de ativação da RuBisCO é tipicamente de alguns minutos, enquanto as medidas fotoacústicas detectam absorção de O_2 já durante o primeiro minuto de indução. Deste modo, a fotorrespiração sozinha não pode explicar os resultados experimentais.

Outra diferença marcante no comportamento de mudas semeadas e clonadas por estaquia é a amplitude do sinal no estado estacionário: para mudas clonadas, a amplitude é aproximadamente o dobro da verificada para mudas semeadas (Tabela 1). O problema é

que – ao contrário do tempo característico de indução e da competição entre absorção e evolução de oxigênio – esta amplitude pode ser afetada pela morfologia da folha. Assim, é necessário investigar até que ponto a maior amplitude do sinal fotoacústico em clones reflete uma atividade fotossintética superior destes.

De acordo com o Capítulo 3, a amplitude da componente de troca gasosa no sinal fotoacústico é proporcional: *i*) às áreas efetivas dos cloroplastos e paredes celulares, envolvidos nos processos de troca gasosa; *ii*) ao coeficiente de absorção ótica β (relacionado à concentração molar de clorofila); *iii*) à concentração molar dos centros de reação; e *iv*) à eficiência quântica para separação de cargas por um centro de reação aberto. Além disso, como vimos no Capítulo 5, a amplitude do sinal também depende das características de difusão do oxigênio no meio fotossintético. No entanto, simulações efetuadas mostram que um aumento de 100% na amplitude do sinal de atividade fotossintética implicaria, por exemplo, em uma permeabilidade de membranas cerca de cinco vezes maior ou uma taxa de reação duas a três vezes maior para os clones, em comparação com as mudas semeadas *da mesma espécie*, o que é muito pouco provável.

Analisando na Tabela 2 a espessura da folha e a densidade estomática, concluímos que estes parâmetros morfológicos não poderiam ser responsáveis pela distinção entre as mudas semeadas e os clones C041. Segundo a tabela, mudas clonadas e semeadas apresentam folhas de mesma densidade estomática e espessuras semelhantes.

Vamos agora avaliar a influência das áreas efetivas (ver item *i* acima) no sinal fotoacústico. Para isso, nos reportaremos aos resultados obtidos por Blake *et al* [1988], com um analisador de gás infravermelho (IRGA), para folhas de *E.grandis*. Estes resultados mostram a clara superioridade dos clones quando comparados às mudas semeadas de *E.grandis*. Como as medidas com o sistema IRGA foram realizadas sob iluminação contínua, a concentração de gás determinada corresponde à produção total de gás – independente das áreas efetivas de cloroplastos e paredes celulares, uma vez que todo o gás produzido e consumido tem que atravessar as membranas para ser detectado.

Assumindo correspondência entre as medidas efetuadas com a técnica IRGA em *E.grandis* e as medidas fotoacústicas em *E.urograndis*, rejeitamos as áreas efetivas como fonte da distinção observada no sinal fotoacústico.

Por outro lado, a Tabela 2 mostra diferenças significativas entre clones e mudas semeadas na relação Fv/Fm e na relação de concentrações clorofila *a*/clorofila *b*. A relação Fv/Fm é um indicador da máxima eficiência fotoquímica do sistema de transporte de elétrons; os valores encontrados para ambos os tipos de amostra (próximos a 0,8) estão dentro do esperado para mudas em condições normais de desenvolvimento. Já a diferença na relação clorofila *a/b*, claramente superior para clones, mostra que essas amostras apresentam um menor sistema coletor de luz (LHCII) em comparação com as mudas semeadas [23]. Esta diferença no sistema de antenas pode estar relacionada ao fato de que estes clones foram gerados por estaquia a partir de árvores com até quatro anos de idade. Em princípio, estas árvores adultas são sistemas adaptados a trabalhar sob alta intensidade luminosa (como em campo aberto), prescindindo de um sistema de coleta de luz tão desenvolvido como o das mudas semeadas (cultivadas sob condições limitantes de luz). Por esta razão, clones responderiam mais lentamente à baixa irradiância – apresentando, no entanto, maior capacidade para transporte de elétrons.

Chegamos assim à conclusão de que as diferenças observadas no sinal fotoacústico devem-se às diferenças no sistema coletor de luz e representam uma superioridade genuína dos clones. Em outras palavras, o maior sinal fotoacústico dos clones realmente reflete a maior taxa fotossintética deste tipo de amostra.

É importante ressaltar que os resultados e conclusões aqui apresentados para mudas produzidas por estaquia correspondem à linha particular C041 estudada e não refletem necessariamente o comportamento geral dos clones de *E.urograndis*. Realizando

[23] A maior parte da clorofila nas plantas está associada ao sistema de antenas LHCII, que possui clorofilas *a* e *b* em quantidades semelhantes, e ao centro de reação do fotossistema II (PSII), que não apresenta clorofila *b*. Assim, uma razão *a/b* maior indica um menor sistema de antenas por RC do PSII.

algumas medidas fotoacústicas em outras linhas de clones (C219 e C031), pudemos observar diferenças em relação à linha C041, em particular no período de indução fotossintética. Todos os clones estudados, no entanto, apresentaram sinal de amplitude significativamente superior à das mudas semeadas.

Um comentário adicional sobre os resultados obtidos: mudas estaqueadas (clones) apresentam menor dispersão dos dados para t_0 e para a componente de trocas gasosas no início da indução fotossintética. Esta menor dispersão está de acordo com a hipótese de menor variabilidade entre clones que entre mudas semeadas: esta é, de fato, uma das motivações para a produção de mudas por estaquia.

Um fator que pode ter afetado tanto o desempenho fotossintético dos clones como o das mudas semeadas é a restrição imposta ao crescimento das raízes pelo volume limitado do recipiente em que as mudas são cultivadas. O prejuízo no desenvolvimento das raízes pode gerar deficiências na absorção de água e nutrientes. O chamado *estresse radicular por restrição mecânica de raiz* terá sua importância demonstrada na seção seguinte do presente capítulo, dedicada a este tópico. Clones poderiam ser mais afetados por esse estresse radicular do que mudas semeadas, devido a diferenças na estrutura radicular. A relevância do presente estudo está no fato de que, para a metodologia padrão de cultivo comercial (tubetes de 50 ml), a técnica fotoacústica permite discriminar os dois tipos de material quanto à indução e ao estado estacionário da atividade fotossintética.

A análise dos dados obtidos revela diferenças significativas entre mudas de *E.urograndis* geradas a partir de dois procedimentos: estaquia (clones C041) e semeadura. No que se refere à indução fotossintética, a competição entre evolução e absorção de gás é verificada para ambos os tipos de amostras; no entanto, a evolução líquida de oxigênio é observada alguns segundos após o início da iluminação para mudas semeadas, enquanto para clones C041 isto só ocorre a partir de 20 minutos sob iluminação. Por outro lado, enquanto as mudas semeadas apresentaram uma indução mais rápida, os clones C041 atingiram uma taxa fotossintética estacionária bastante superior.

Quanto ao desenvolvimento das plantas, a maior atividade fotossintética estacionária dos clones é mais vantajosa que a indução mais rápida verificada para as mudas semeadas. Isto porque, como afirmam Edwards e Walker [1983], não se observa indução fotossintética após breves interrupções de iluminação no campo (como a passagem de uma nuvem sobre a área de cultivo, por exemplo). Por outro lado, a variação natural da irradiância no campo durante o dia pode ser considerada quase-estática em relação à atividade fotossintética.

A superioridade fotossintética verificada para mudas produzidas por estaquia ainda não havia sido demonstrada através da técnica fotoacústica. O resultado obtido é importante no planejamento de uma cultura economicamente vantajosa do eucalipto. Como perspectiva para estudos futuros nesta área, um próximo passo seria a análise da performance fotossintética desses dois tipos de mudas em campo aberto.

II. ESTRESSE RADICULAR:

RESTRIÇÃO MECÂNICA DE RAIZ

Como as empresas produtoras de papel e celulose no Brasil cultivam as mudas de eucalipto em tubetes plásticos de apenas 50 ml, é importante avaliar o crescimento dessas mudas em resposta ao limitado volume de substrato disponível. Esta restrição mecânica imposta ao crescimento das raízes pode dificultar a absorção de água e nutrientes, sujeitando as mudas ao estresse. A técnica fotoacústica foi utilizada, ao lado das medidas de fluorescência (relação Fv/Fm) [8], para monitorar a fotossíntese das mudas em medidas quinzenais a partir dos 45 dias após a semeadura e até os 120 dias. Os objetivos do estudo foram: *a)* investigar uma possível correlação entre a atividade fotossintética e a restrição nutricional imposta pelo volume do recipiente; e *b)* confrontar os resultados obtidos através da técnica fotoacústica com as medidas de fluorescência, técnica de uso consagrado entre os fisiologistas.

Além do monitoramento descrito acima, as avaliações quinzenais efetuadas incluíram características de crescimento das plantas, como a altura da parte aérea, área foliar, teor de clorofilas total, e matéria seca de raízes, caule e folhas. Este estudo foi efetuado em mudas semeadas de *Eucalyptus grandis* e *E.urophylla*. Todos os resultados apresentados correspondem à média de pelo menos três repetições.

A Figura 33 mostra a evolução temporal da altura das mudas *E.grandis* e *E.urophylla*. Para ambas as espécies, o crescimento ocorre a uma taxa aproximadamente constante até os 75 dias após a semeadura; depois de atingida essa idade, observa-se uma queda na taxa. Em particular, as mudas de *E.grandis* apresentam estabilização da altura entre 105 e 120 dias após a semeadura. Avaliação de área foliar (Figura 34) indica um comportamento análogo para as amostras, com as mudas de ambas as espécies interrompendo o crescimento a partir dos 90 dias após a semeadura.

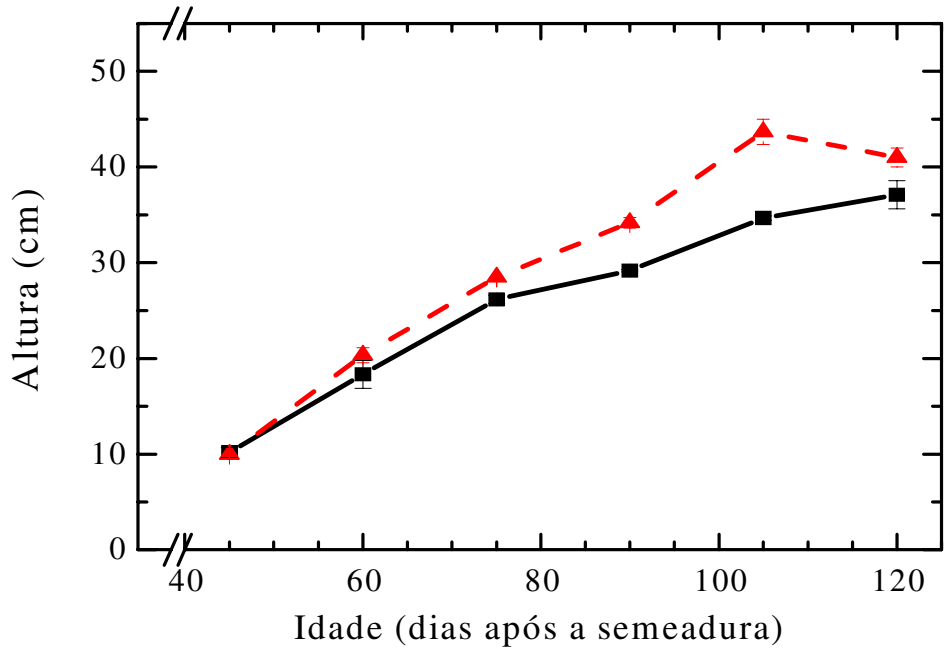
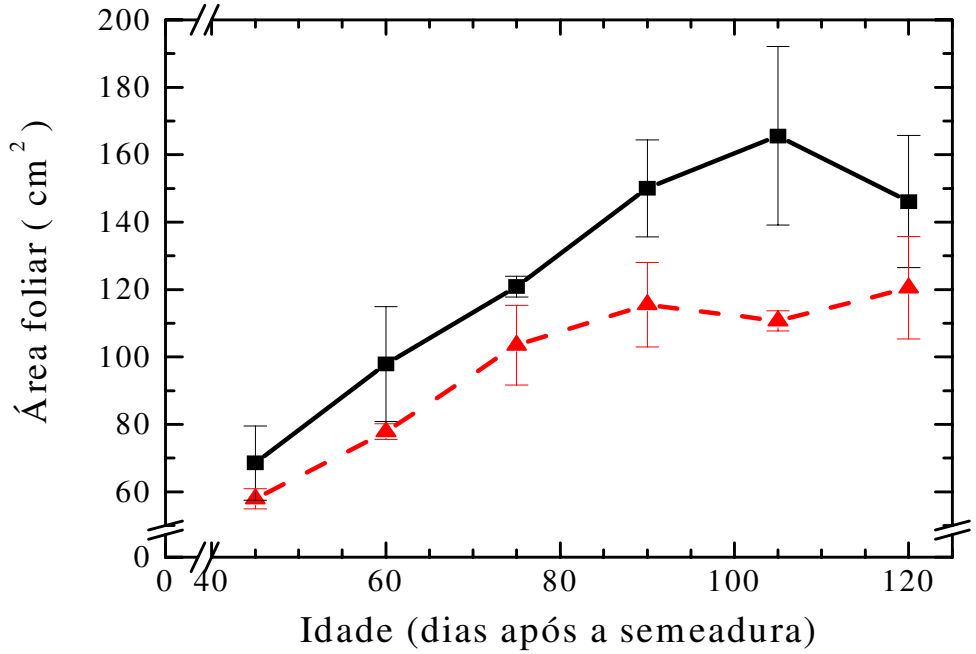


Figura 33 – Altura das mudas em função da idade após a semeadura. Linha pontilhada: *E.grandis*; linha cheia: *E.urophylla*.



[8] Ambas as medidas foram efetuadas *in vivo* e *in situ*, no segundo par de folhas totalmente expandidas.

Figura 34 – Área foliar em função da idade após a semeadura. Linha pontilhada: *E.grandis*; linha cheia: *E.urophylla*.

A etapa seguinte foi avaliar o desenvolvimento do sistema radicular das mudas. Com esse objetivo, foram feitas medidas para determinar a massa seca das raízes em função da idade após a semeadura. Os resultados se encontram na Figura 35.

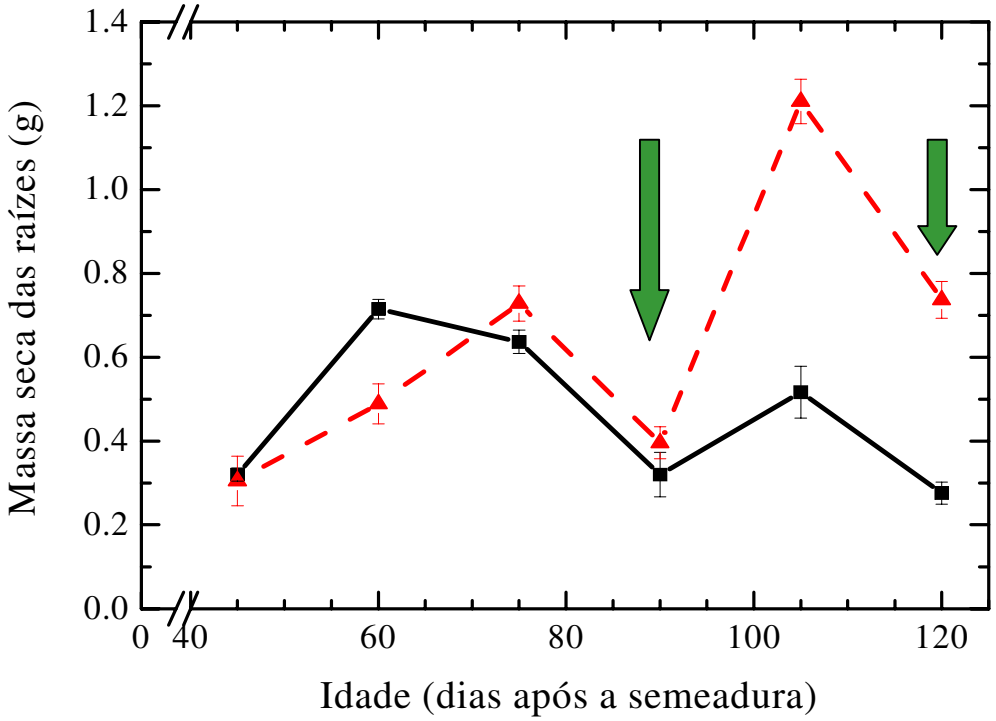


Figura 35 – Massa seca das raízes em função da idade após a semeadura. Linha pontilhada: *E.grandis*; linha cheia: *E.urophylla*. As setas indicam as quedas mais pronunciadas na massa do sistema radicular das mudas.

Analisando a figura acima, verificamos que tanto as mudas de *E.grandis* como as de *E.urophylla* apresentam queda significativa na massa seca das raízes para as medidas efetuadas 90 dias após a semeadura. O efeito é mais pronunciado em *E.grandis*, enquanto *E.urophylla* apresenta dos 75 aos 90 dias uma queda mais acentuada que aquela observada dos 60 aos 75 dias. Esta queda na massa das raízes é observada novamente aos 120 dias

após a semeadura e indica a diminuição do sistema radicular devida ao pequeno volume do tubete que limita o crescimento da raiz.

Depois de medida também a massa seca da chamada "parte aérea" das mudas (caule e folhas), o efeito de estresse por restrição mecânica de raiz pode ser visualizado na Figura 36, que mostra a relação entre as massas secas da parte aérea (PA) e do sistema radicular (SR) das plantas. Observa-se que o comportamento é semelhante para mudas de ambas as espécies.

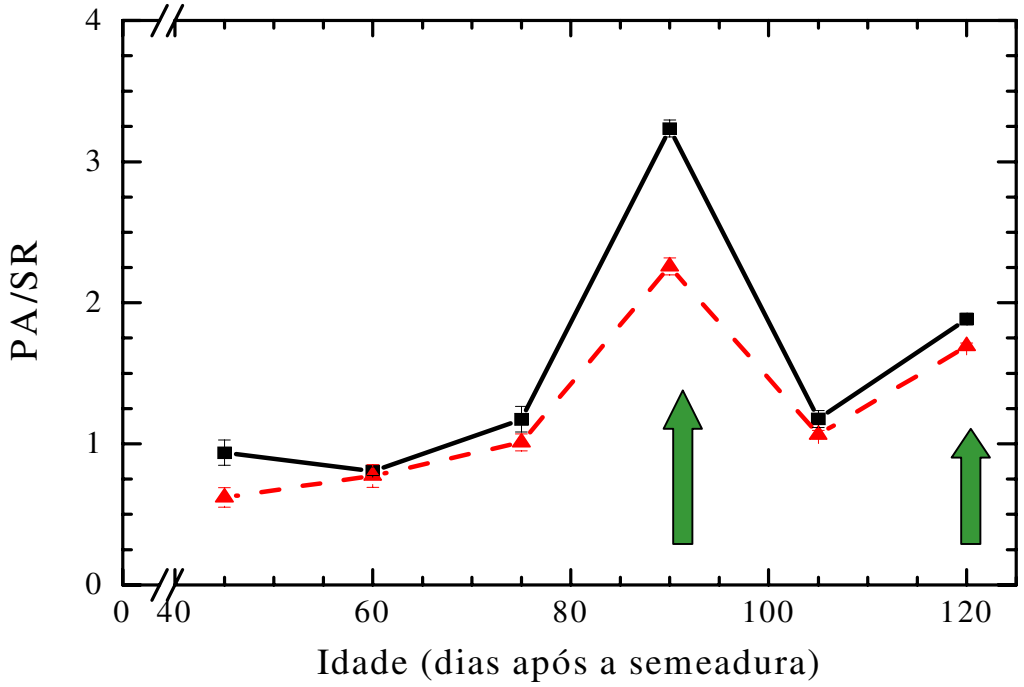


Figura 36 – Razão entre as massas da parte aérea e do sistema radicular em função da idade após a semeadura. Linha pontilhada: *E.grandis*; linha cheia: *E.urophylla*. As setas indicam as medições correspondentes às maiores quedas na massa do sistema radicular (comparar com Figura 35).

Uma vez caracterizado o desenvolvimento das plantas, vamos agora analisar a atividade fotossintética (medida através da técnica fotoacústica) e a eficiência fotoquímica do fotossistema II (medida através da fluorescência). Inicialmente, observemos a

correlação entre a eficiência fotoquímica do fotossistema II (dada por Fv/Fm) e a massa seca das raízes (MSR), apresentada nas Figuras 37 (*E.grandis*) e 38 (*E.urophylla*). Como se pode observar, há uma queda na razão Fv/Fm após a verificação do estresse radicular aos 90 dias.

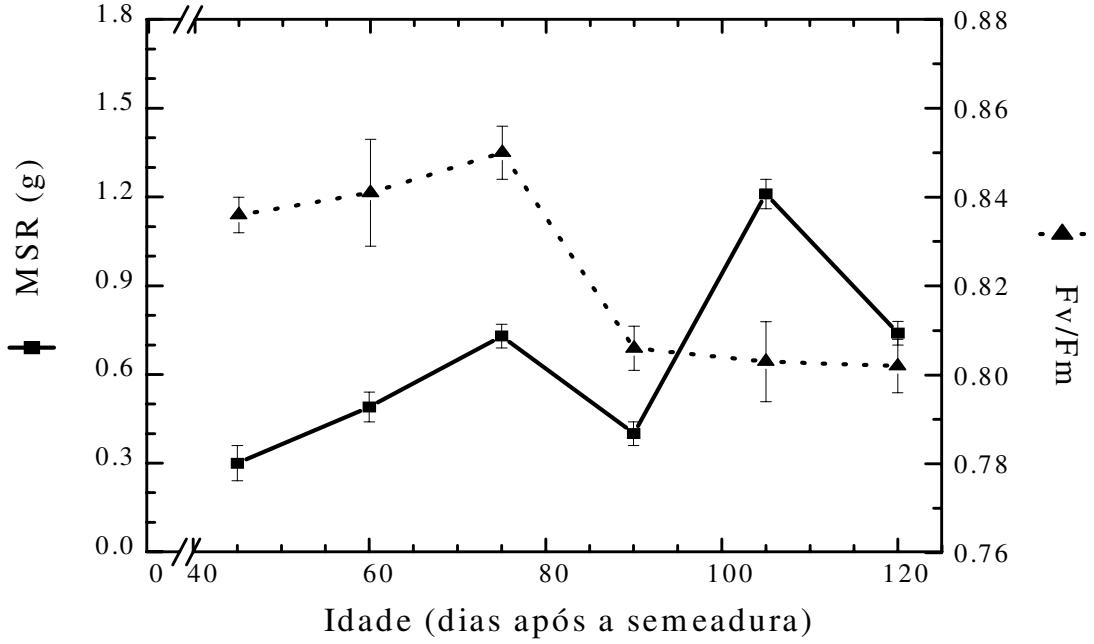


Figura 37 – Massa seca das raízes (MSR) e relação fluorescência variável / fluorescência máxima (Fv/Fm) para mudas de *E.grandis* em função da idade após a semeadura.

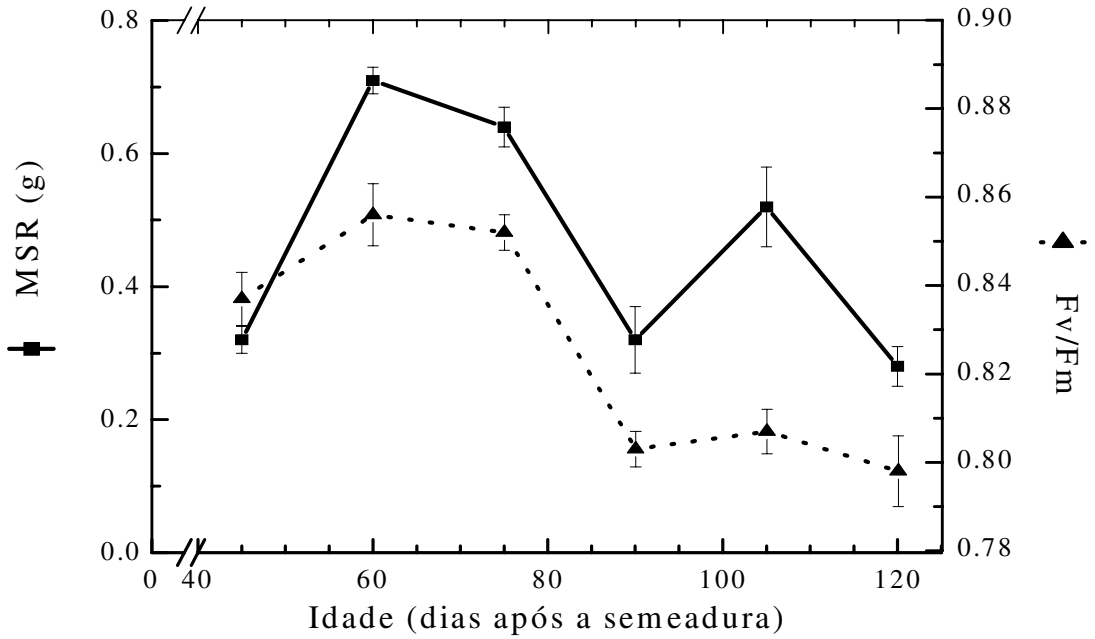


Figura 38 – Massa seca das raízes (MSR) e relação fluorescência variável / fluorescência máxima (Fv/Fm) para mudas de *E.urophylla* em função da idade após a semeadura.

Para estudar a relação entre a massa seca das raízes e a razão Fv/Fm, construímos então o gráfico da Figura 39.

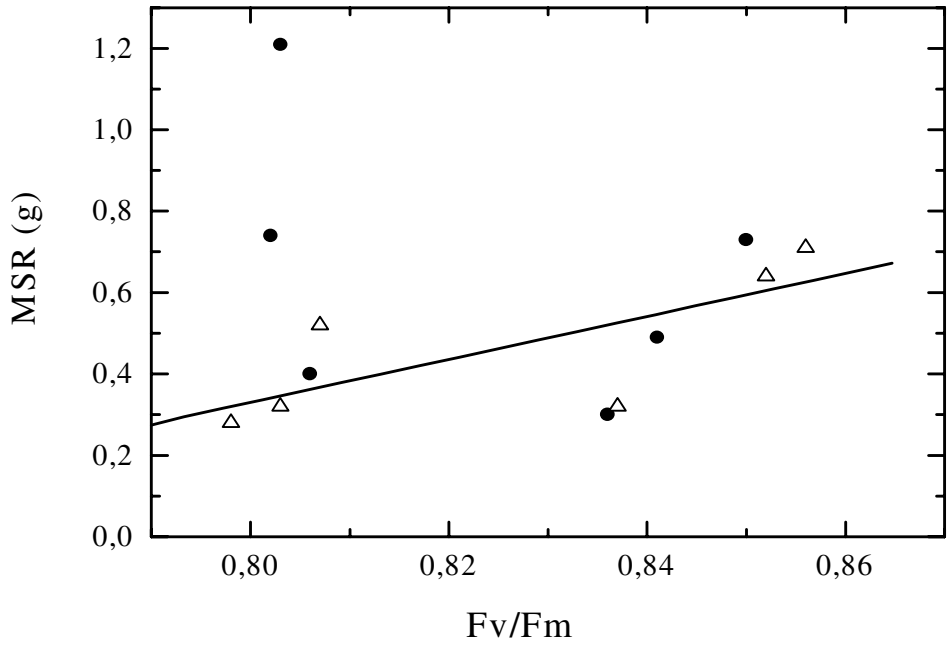


Figura 39 – Correlação entre a massa seca das raízes e a razão Fv/Fm para mudas de *E.grandis* (círculos) e *E.urophylla* (triângulos). A reta mostra a relação linear encontrada entre MSR e Fv/Fm para *E.urophylla*.

A Figura 37 mostra uma correspondência entre a massa seca das raízes e a relação Fv/Fm para as mudas de *E.grandis*, mas o gráfico acima não permite encontrar uma relação linear entre esses parâmetros, o que será discutido mais adiante. Os dados obtidos para mudas de *E.urophylla*, no entanto, apresentam a seguinte relação linear:

$$\text{MSR (g)} = -3{,}9 + 5{,}3\ \text{Fv/Fm} \qquad (r = 0{,}74)$$

onde r é o coeficiente de correlação encontrado.

Observemos agora a correlação entre a atividade fotossintética estacionária (PA, medida fotoacústica) e a massa seca das raízes, ilustrada nas Figuras 40 (*E.grandis*) e 41 (*E.urophylla*). Em particular, note-se que, para ambas as espécies, a atividade fotossintética aos 90 dias é cerca de 50% menor do que a verificada para mudas de 75 dias.

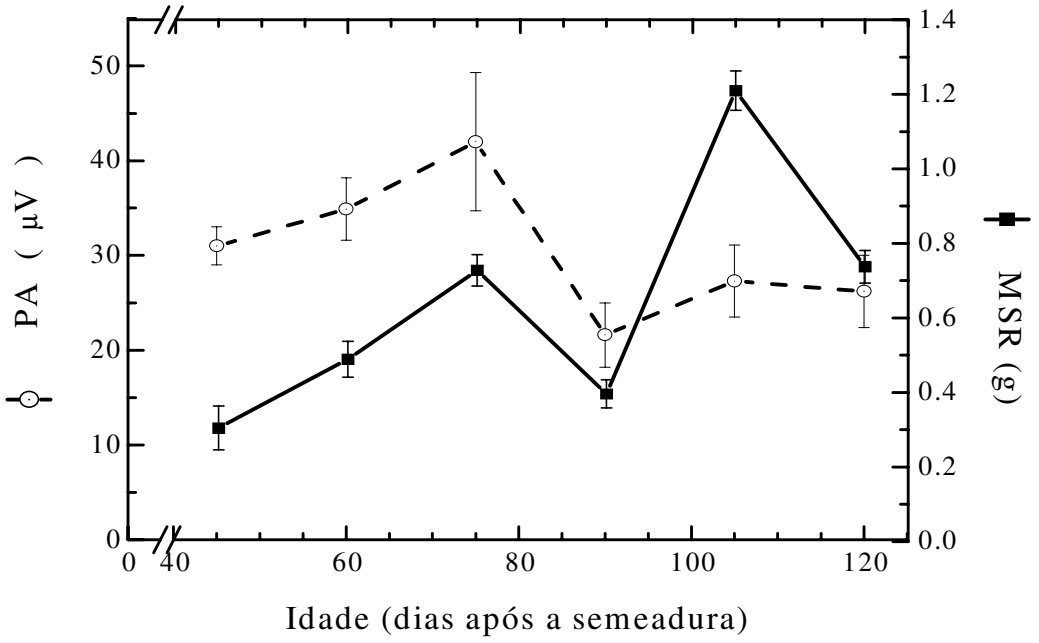


Figura 40 – Massa seca das raízes (MSR) e sinal fotoacústico de atividade fotossintética (PA) para mudas de *E.grandis* em função da idade após a semeadura.

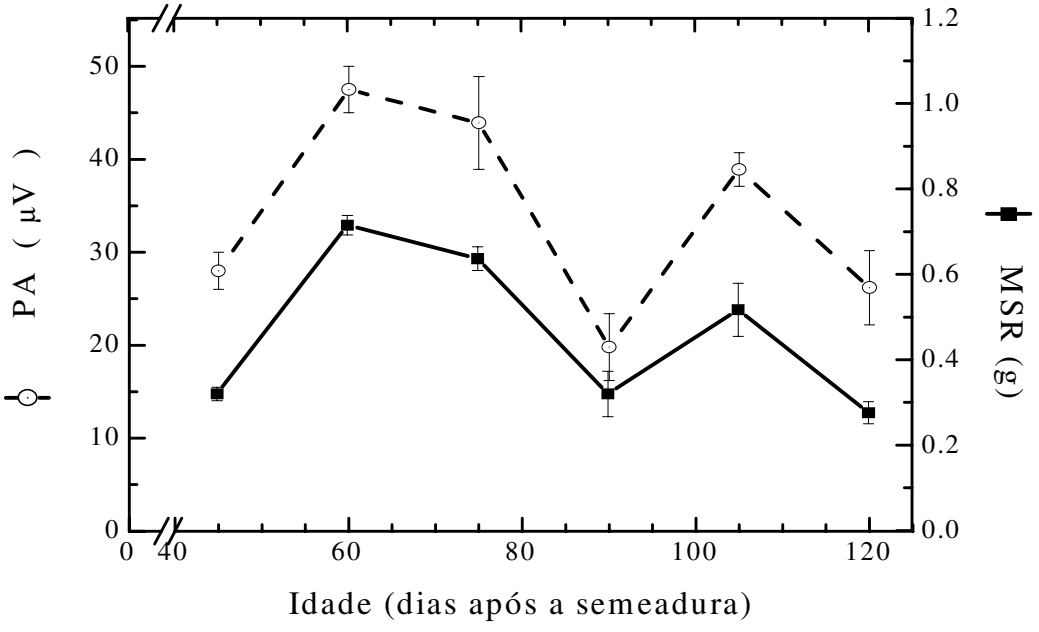


Figura 41 – Massa seca das raízes (MSR) e sinal fotoacústico de atividade fotossintética (PA) para mudas de *E.urophylla* em função da idade após a semeadura.

A relação entre a massa seca das raízes e a atividade fotossintética medida através da fotoacústica pode então ser analisada através da Figura 42.

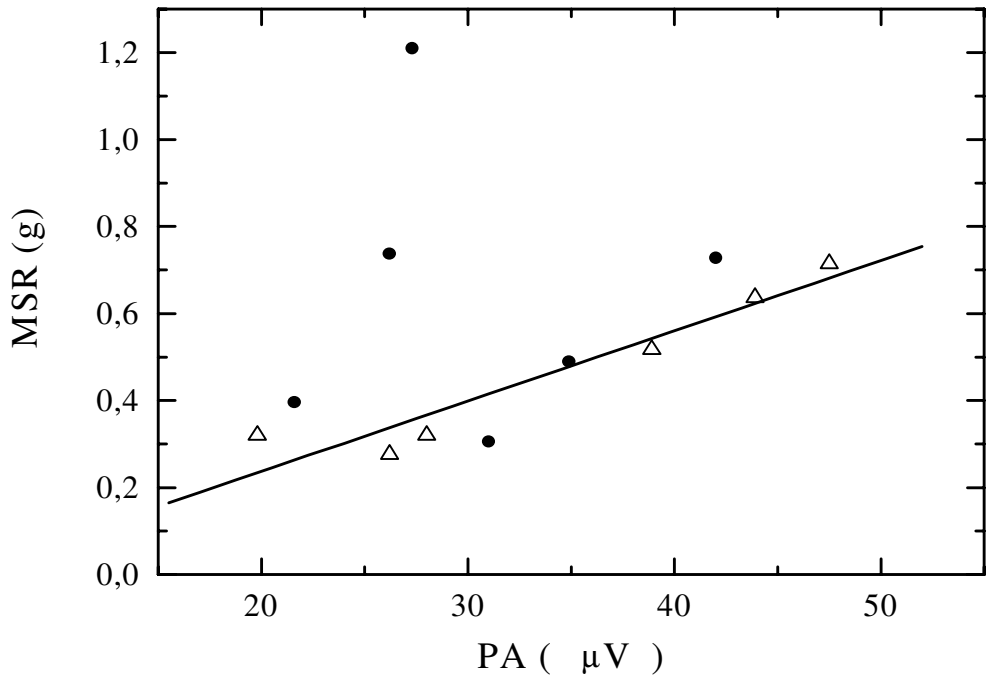


Figura 42 – Correlação entre a massa seca das raízes e a atividade fotossintética (PA) para mudas de *E.grandis* (círculos) e *E.urophylla* (triângulos). A reta mostra a relação linear encontrada entre MSR e PA para *E.urophylla*.

Novamente, não se pode estabelecer uma relação linear entre a massa seca das raízes e a atividade fotossintética para as mudas de *E.grandis*, embora a Figura 40 indique uma correspondência entre esses parâmetros. Por outro lado, para as mudas de *E.urophylla* encontramos uma relação linear com alto coeficiente de correlação:

$$\text{MSR (g)} = -0{,}086 + 0{,}016\ \text{PA}\ (\mu\text{V}) \qquad (r = 0{,}95)$$

Vamos agora verificar a correspondência entre as duas técnicas utilizadas para avaliar o desempenho fotossintético das mudas. As próximas duas figuras comparam os resultados das medidas de fotoacústica e fluorescência em função da idade para as mudas de *E.grandis* e *E.urophylla*.

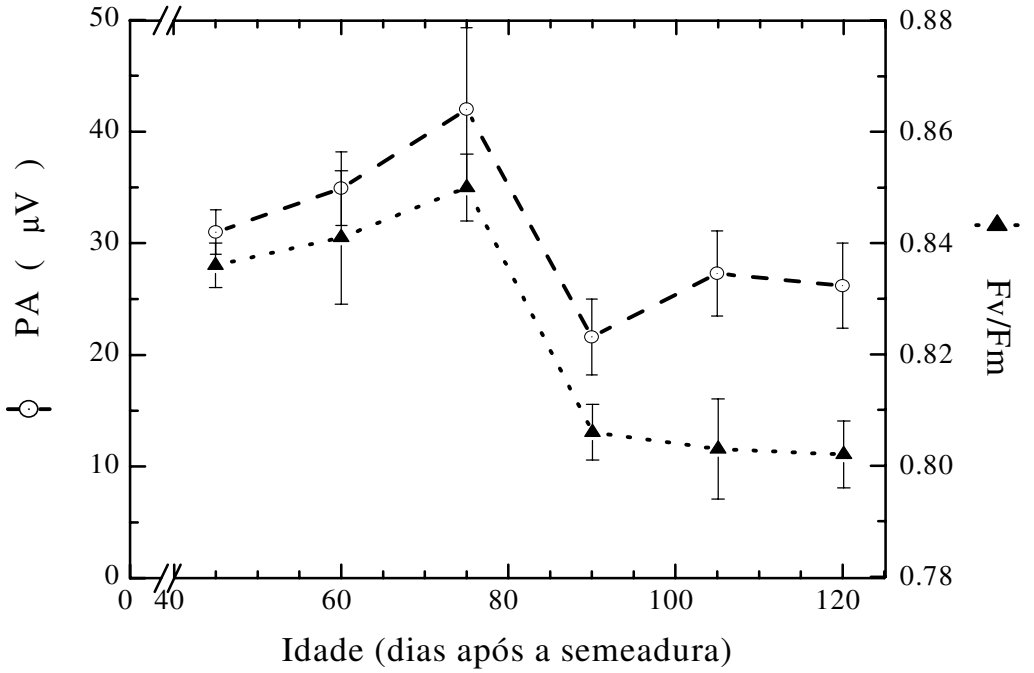


Figura 43 – Sinal fotoacústico de atividade fotossintética (PA) e relação Fv/Fm para mudas de *E.grandis* em função da idade após a semeadura.

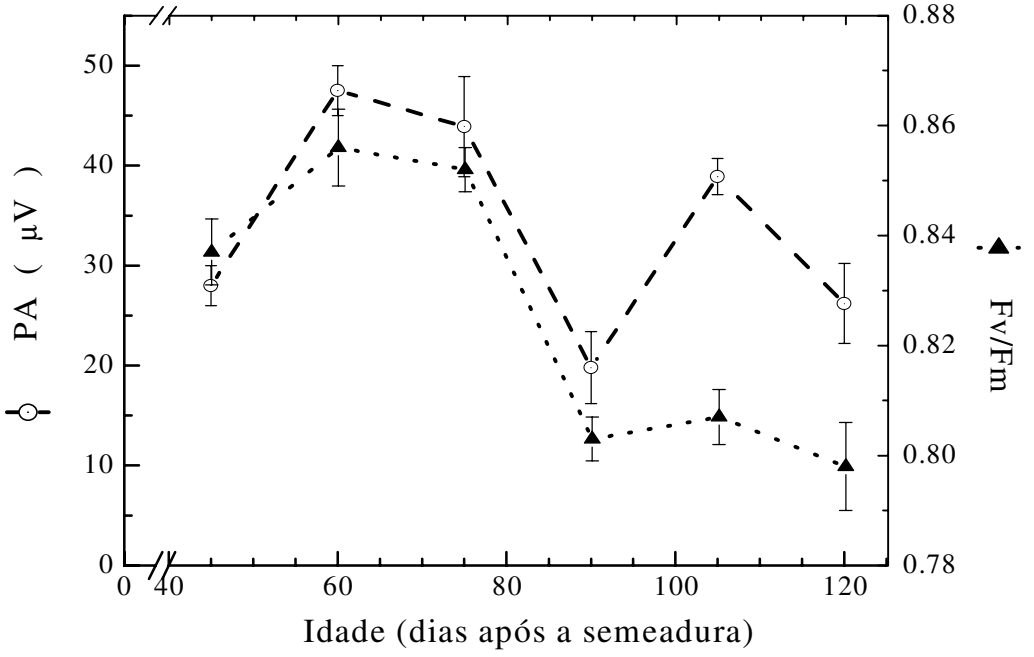


Figura 44 – Sinal fotoacústico de atividade fotossintética (PA) e relação Fv/Fm para mudas de *E.urophylla* em função da idade após a semeadura.

A seguir, a Figura 45 mostra a relação entre as medidas fotoacústicas e as medidas de fluorescência para as duas espécies de eucalipto estudadas.

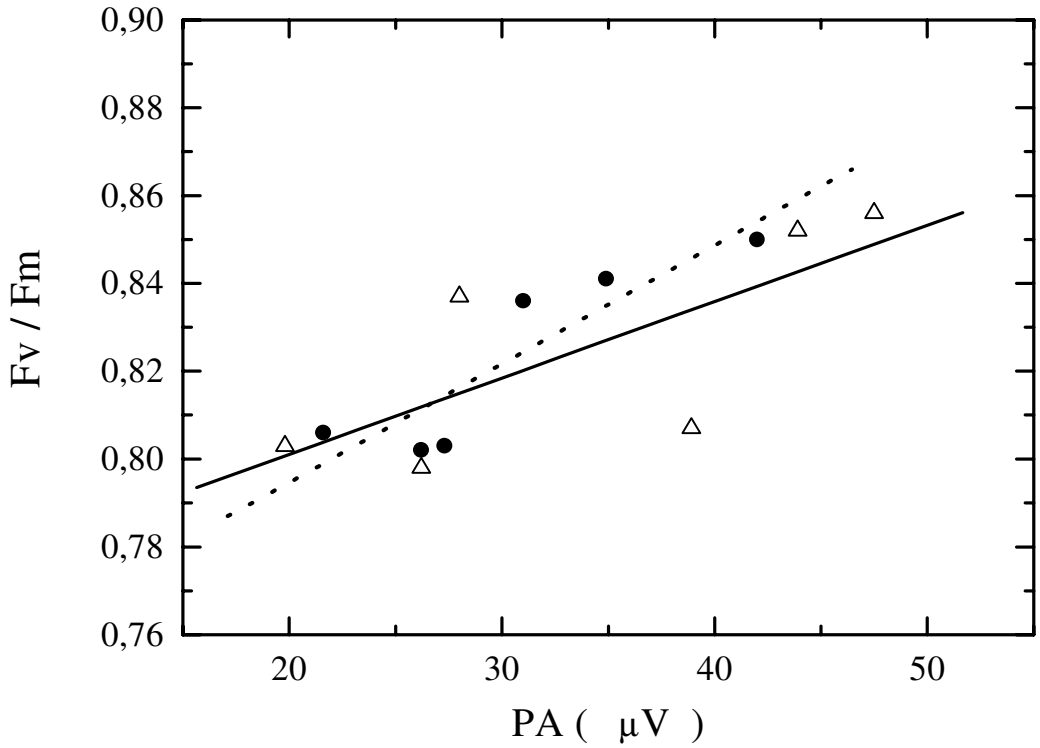


Figura 45 – Correlação entre Fv/Fm e a atividade fotossintética (PA) para mudas de *E.grandis* (círculos, linha pontilhada) e *E.urophylla* (triângulos, linha cheia).

Na Figura 45, vemos claramente a correspondência entre as duas técnicas usadas na caracterização das mudas de eucalipto. A relação linear encontrada entre o sinal de atividade fotossintética (PA) e Fv/Fm para *E.grandis* é:

$$Fv/Fm = 0{,}74 + 0{,}0027\ PA\ (\mu V) \qquad (r = 0{,}90)$$

Para as mudas de *E.urophylla*, temos:

$$Fv/Fm = 0{,}77 + 0{,}0017\ PA\ (\mu V) \qquad (r = 0{,}74)$$

Os gráficos apresentados e as relações acima corroboram a conclusão de que a fotoacústica permite um estudo eficiente do desempenho fotossintético em plantas.

O conjunto das medidas efetuadas em função do tempo após a semeadura mostra que, para mudas de ambas as espécies estudadas, a matéria seca das raízes diminuiu acentuadamente aos 90 e 120 dias após a semeadura, em decorrência da limitação de espaço e substrato necessários para o desenvolvimento do sistema radicular. As medições fotoacústicas registram quedas correspondentes na atividade fotossintética, principalmente aos 90 dias após a semeadura. A razão Fv/Fm medida por fluorescência apresenta uma boa correspondência com as medições fotoacústicas. Assim, vemos que a diagnose do estado do sistema radicular pode ser feita através do monitoramento fotoacústico da atividade fotossintética.

Analisando os resultados encontrados, devemos levar em conta que qualquer medição *in vivo* e *in situ* em mudas vegetais apresenta uma variabilidade intrínseca devida aos inúmeros parâmetros que influenciam no desenvolvimento das plantas. Mesmo cultivando as mudas em casas de vegetação, é difícil garantir que todas as amostras foram submetidas exatamente às mesmas condições de temperatura e luz, por exemplo. Mais ainda: pequenas diferenças em parâmetros como a espessura das folhas introduzem uma variabilidade adicional mesmo entre mudas de uma única espécie. Com base nestas considerações, podemos afirmar que os coeficientes de correlação encontrados para as medidas em amostras de *E.urophylla* são bastante significativos.

Para explicar a não-linearidade da relação entre a massa seca das raízes e o desempenho fotossintético em mudas de *E.grandis*, lembremos que uma característica fundamental desta espécie é seu desenvolvimento rápido (ver *Notas históricas sobre o desenvolvimento de E.urograndis*, no início do capítulo). Assim, é possível que mudas de *E.grandis* apresentem uma rápida recomposição do sistema radicular após a primeira manifestação de estresse, que é observada 90 dias após a semeadura no tubete. Isso explicaria o pronunciado aumento na massa seca das raízes aos 105 dias (Figura 35 e subsequentes). Os dados também indicam, no entanto, que o estresse radicular volta a se manifestar aos 120 dias.

Independentemente da espécie estudada, nosso trabalho mostra que a condução das mudas em tubetes de 50 ml por tempo igual ou superior a três meses leva à mortalidade das raízes, prejudicando o desenvolvimento das plantas.

Dando sequência ao estudo do estresse radicular em mudas de eucalipto, planejamos uma nova série de medidas para avaliar o efeito do volume do recipiente no desenvolvimento e na atividade fotossintética de mudas de eucalipto. As três espécies monitoradas nesse caso foram *E.grandis, E.urophylla* e *E.urograndis*, e a semeadura foi realizada em recipientes com duas capacidades volumétricas: 50 ml (tubete padrão) e 300 ml (tubetão). As medidas efetuadas consistiram de avaliações quinzenais das plantas de 45 até 120 dias após a semeadura. Apresentamos aqui as medidas de altura e área foliar das mudas, para caracterizar seu desenvolvimento. Em seguida, passamos ao monitoramento fotoacústico da atividade fotossintética de mudas com 60 dias de idade.

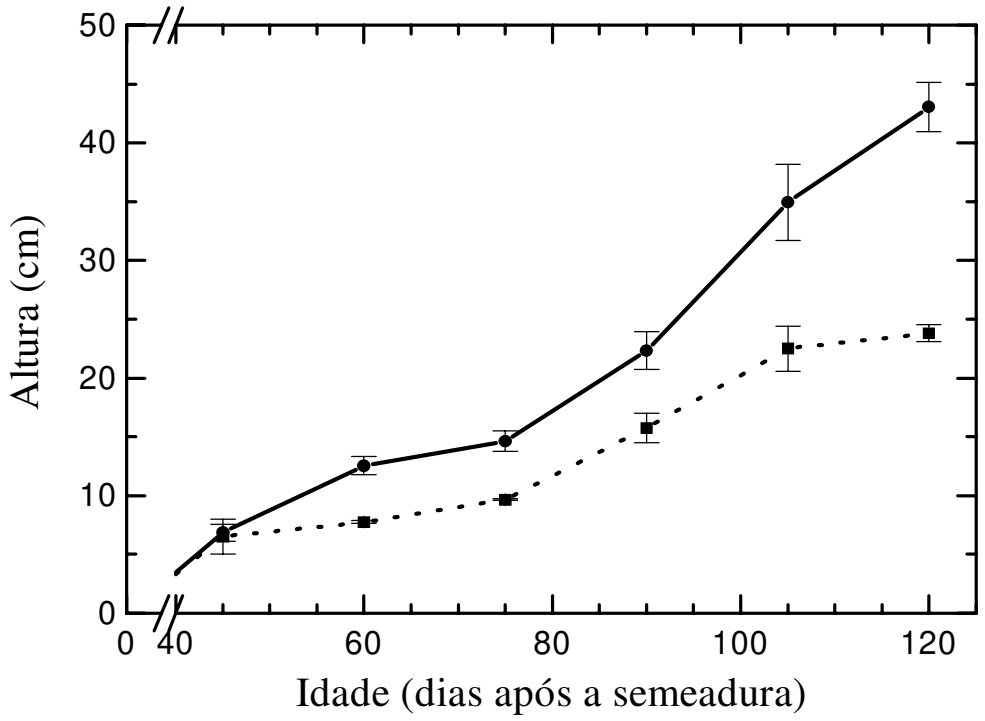


Figura 46 – Altura das mudas de eucalipto em função do tempo após a semeadura. Linha pontilhada: semeadura em tubete (50 ml); linha cheia: semeadura em tubetão (300 ml).

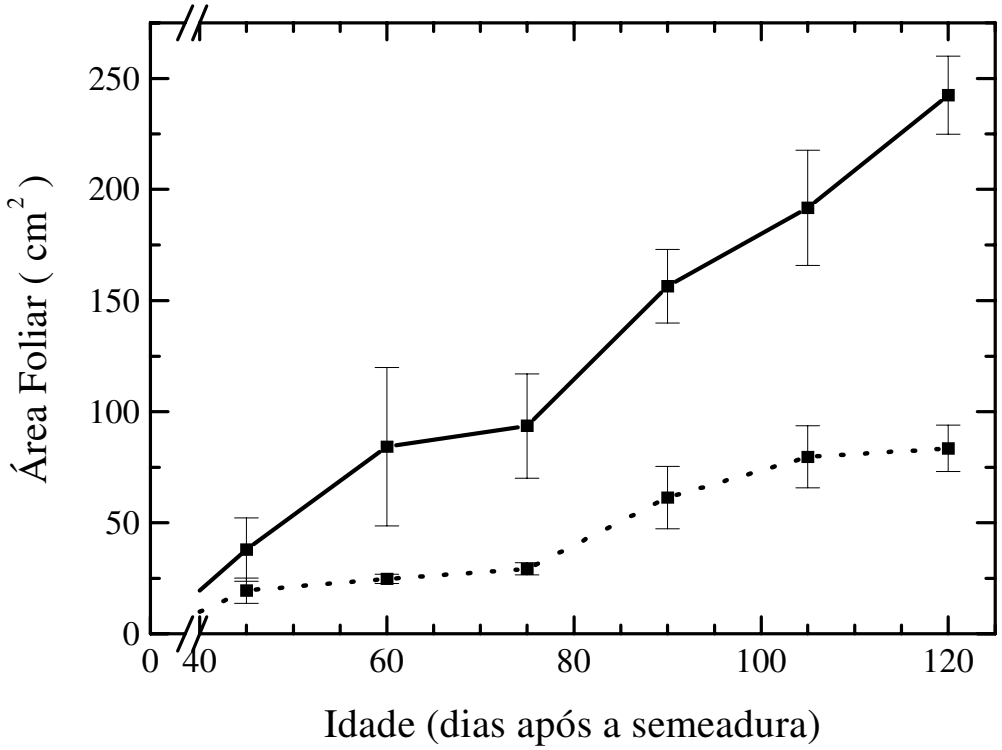


Figura 47 – Área foliar das mudas de eucalipto em função do tempo após a semeadura. Linha pontilhada: semeadura em tubete (50 ml); linha cheia: semeadura em tubetão (300 ml).

A Figura 46 mostra que as mudas cultivadas no tubetão (recipiente de 300 ml) atingem altura maior que aquelas cultivadas no tubete (50 ml), com essa superioridade aparecendo a partir dos 60 dias após a semeadura. A partir dessa mesma idade, podemos observar que a área foliar das mudas crescidas no tubetão é superior àquela medida para as mudas cultivadas no tubete (Figura 47).

As mudas cultivadas no tubetão também se mostraram superiores às dos tubetes em todas as demais características medidas (massa seca de raiz, caule e folhas), com essa superioridade se verificando a partir dos 60 dias após a semeadura. Além disso, as mudas cultivadas no tubetão não apresentam efeitos de estresse radicular em nenhuma etapa do período de avaliação – ao contrário do que se havia observado no estudo anterior para mudas de *E.grandis* e *E.urophylla* cultivadas no tubete padrão.

Da análise do desenvolvimento das mudas, concluímos que o efeito do recipiente já é significativo 60 dias após a semeadura[10]. Assim, o passo seguinte foi realizar as medidas fotoacústicas de indução fotossintética para mudas com 60 dias de idade cultivadas em recipientes de 50 ml e 300 ml. Tais medidas foram feitas para pelo menos três amostras de cada espécie de eucalipto estudada, para cada tipo de recipiente. As curvas obtidas são semelhantes àquela mostrada na Figura 29 (muda de *E.urograndis*). A Tabela 3 apresenta os valores médios obtidos para a amplitude do sinal fotoacústico de atividade fotossintética e para o tempo característico de indução t_0 (tempo necessário para atingir 50% da atividade fotossintética estacionária).

TABELA 3

Tempo característico de indução t_0 e atividade fotossintética estacionária medida em mudas de eucalipto (*E.grandis*, *E.urophylla* e *E.urograndis*, 60 dias após a semeadura) cultivadas em recipientes de 50 ml (tubete) e 300 ml (tubetão). Média sobre cerca de 10 medidas (± desvio padrão σ_{n-1} dividido por $n^{1/2}$).

Volume do recipiente	**50 ml**	**300 ml**
Tempo de indução t_0 (s)	110 ± 7	112 ± 3
Atividade fotossintética estacionária (μV)	27 ± 2	34 ± 1

A partir dos resultados da tabela acima, observamos que o tempo de indução não é afetado pelo volume do recipiente, 60 dias após a semeadura das mudas. No entanto, as plantas cultivadas no recipiente de 300 ml apresentam desempenho fotossintético superior ao das plantas cultivadas no recipiente de 50 ml, atingindo atividade fotossintética estacionária maior. Assim, a técnica fotoacústica é capaz de determinar o "ganho fotossintético" das mudas cultivadas no recipiente maior.

[10] Embora o estresse radicular se evidencie a partir dos 75 dias (para mudas cultivadas no recipiente de 50 ml, conforme o estudo em *E.grandis* e *E.urophylla*).

Uma vez obtido este diagnóstico, a pergunta que se coloca é a seguinte: será que o comportamento das mudas tem reflexos na produtividade do eucalipto ? Para completar a avaliação do desenvolvimento das plantas, restava portanto observar o desempenho destas após o transplante para o campo. Com este objetivo, estudamos a taxa de mortalidade no campo e a altura atingida por mudas de eucalipto cinco meses após o transplante para campo aberto. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos (médias para as três espécies).

TABELA 4

Altura e taxa de mortalidade no campo para mudas de 5 meses (*E.grandis*, *E.urophylla* e *E.urograndis*) cultivadas em recipientes de 50 ml e 300 ml. Média sobre cerca de 10 medidas ($\pm$ desvio padrão σ_{n-1} dividido por $n^{1/2}$).

Volume do recipiente	**50 ml**	**300 ml**
Altura (m)	$1,1 \pm 0,1$	$1,35 \pm 0,05$
Taxa de mortalidade (%)	12,3	2,7

A altura maior atingida pelas plantas oriundas de recipiente com 300 ml indica a superioridade destas em comparação com as plantas vindas do tubete padrão, de 50 ml. Já a taxa de mortalidade de plantas originárias do tubete de 50 ml é bem superior àquela apresentada por plantas semeadas no recipiente maior (300 ml), o que se verifica para as três espécies estudadas. A menor variação da taxa de mortalidade ocorre para *E. urophylla* (de 10% para 5%); a maior diferença é observada para *E.grandis* (de 7% para zero).

Estes resultados confirmam o estudo apresentado anteriormente, ou seja, indicam que *o tubete pequeno induz danos à planta* quando o transplante para o campo (ou para um recipiente maior) é feito mais de 60 dias após a semeadura. Por outro lado, mostram que a utilização do recipiente de 300 ml resulta em mudas de eucalipto mais vigorosas, conferindo maior resistência às condições de campo e desenvolvimento mais rápido após o transplante.

A partir dos estudos efetuados, apontamos duas alternativas para melhorar a produtividade da cultura de eucalipto e pelo menos minimizar o efeito de estresse radicular na fase inicial do desenvolvimento das plantas: pode-se realizar a semeadura no tubete maior ou antecipar a idade de transplante para o campo. Devido aos custos do recipiente de 300 ml, o transplante antecipado é mais vantajoso economicamente. Assim, a empresa que forneceu as amostras mudou seu esquema de produção de mudas após a realização deste trabalho, antecipando o transplante para o campo em pelo menos 30 dias.

7.CONCLUSÕES

Atingidos os objetivos iniciais (estudar a difusão fotossintética de oxigênio e avaliar diferentes métodos de cultivo e produção de mudas através de sua atividade fotossintética), o trabalho desenvolvido comprova a eficiência da técnica fotoacústica na realização deste tipo de estudo.

No que se refere à difusão do oxigênio na folha, verificamos a utilidade do modelo Korpiun 1D através de medidas fotoacústicas realizadas *in vivo* e *in situ*. Estas medidas permitem discriminar espécies vegetais quando se analisa a dependência do ângulo de fase da atividade fotossintética com a frequência de modulação. Os resultados obtidos e simulações efetuadas mostram como os vários parâmetros do modelo afetam a difusão, apresentando uma dependência conjugada. Em particular, verificamos a forte dependência do ângulo de fase com a permeabilidade das membranas ao oxigênio, sendo que a importância deste parâmetro como fator limitante da difusão é tanto mais evidente quanto menores são os parâmetros de espessura l_n. Os valores obtidos para a taxa de reação k confirmam dados apresentados na literatura. Em resumo, nosso trabalho apresenta o estudo do ângulo de fase fotoacústico em função da frequência como um método útil – e ainda pouco utilizado – na caracterização das amostras.

A indução fotossintética foi estudada em mudas de *Eucalyptus urograndis* produzidas de duas formas: por semeadura e por enraizamento de estacas (clones C041). Os resultados experimentais permitem constatar a ocorrência de uma competição entre evolução e absorção de oxigênio para os dois tipos de amostras. Observa-se evolução líquida de oxigênio mais rapidamente para mudas semeadas, que demoram menos que os clones para atingir atividade fotossintética estacionária. Clones, no entanto, apresentam

uma taxa fotossintética superior à das mudas semeadas. Isto se explica pelo fato de que os dois tipos de amostras constituem-se em sistemas adaptados a diferentes intensidades luminosas e que, por esta razão, apresentam diferenças no sistema de captação de luz.

Do ponto de vista da produtividade, a maior taxa fotossintética estacionária observada para os clones é mais vantajosa que a indução mais rápida verificada para as mudas semeadas. Esta superioridade fotossintética das mudas produzidas por estaquia ainda não havia sido demonstrada através da técnica fotoacústica. O resultado obtido permite concluir que a substituição de mudas semeadas por clones, no plantio comercial, está relacionada à maior atividade fotossintética apresentada por estes clones.

O acompanhamento da atividade fotossintética de mudas de eucalipto em função do tempo após a semeadura permitiu diagnosticar os efeitos da restrição imposta ao crescimento da raiz. O estresse observado resulta do pequeno volume dos recipientes em que as mudas são cultivadas – os tubetes de 50 ml, de uso largamente difundido. As medidas fotoacústicas mostram que o cultivo nesses recipientes por tempo igual ou superior a três meses leva à queda na taxa fotossintética, que reflete os danos causados ao sistema radicular das mudas. O estudo efetuado mostrou correspondência entre a avaliação obtida através da técnica fotoacústica e as medidas de fluorescência.

Comparando mudas cultivadas em recipientes de 300 ml com aquelas conduzidas nos tubetes de 50 ml, observamos que as mudas cultivadas nos recipientes maiores apresentam melhor performance fotossintética, desenvolvimento mais rápido e menor taxa de mortalidade após o transplante ao campo. A partir destes resultados, a empresa que forneceu as amostras passou a antecipar a idade de transplante das mudas para o campo, minimizando assim os efeitos do estresse radicular.

8. PERSPECTIVAS

Esta tese mostra algumas das muitas possibilidades de associação entre a técnica fotoacústica e o estudo da fotossíntese em plantas. Na verdade, o trabalho efetuado nos últimos quatro anos gerou diversas idéias sobre novas investigações a fazer. Indico a seguir linhas de pesquisa promissoras que podem ter sequência no Laboratório de Fototérmica do IFGW/Unicamp:

a) É interessante trabalhar em um modelo matemático para o ajuste das **curvas de indução fotossintética**. Uma vez desenvolvido, este modelo ajudará particularmente a interpretar o período inicial da curva de indução. Uma primeira etapa deste trabalho foi feita em paralelo à tese. Busca-se atualmente um produto de funções capaz de dar conta das componentes de absorção e evolução de O_2 que se sobrepõem nas curvas de indução;

b) Pode-se também estudar a influência da **composição espectral da luz incidente** (por exemplo, *680 nm x luz branca* ou *680 nm x 470 nm*) na indução fotossintética, o que seria feito *in vivo* e *in situ* através de medidas fotoacústicas;

c) O uso de técnicas de **microscopia** associadas à fotoacústica possibilita a avaliação dos parâmetros de espessura envolvidos no modelo de difusão, permitindo analisar o efeito da *permeabilidade P* e da *taxa de reação k* na fase do sinal fotoacústico;

d) Recentemente, uma montagem para medidas piroelétricas foi implantada no Laboratório de Fototérmica. A **técnica piroelétrica** mede sinal térmico, mas não detectaria o sinal de evolução de oxigênio relacionado à atividade fotossintética das folhas vegetais. Esta característica permite que se utilize a técnica para estudar a chamada *Perda Fotoquímica* (energia armazenada para a fotossíntese) a baixas frequências de modulação;

e) O estudo simultâneo das três vias da energia nas folhas (**dissipação térmica, fotossíntese e fluorescência**) pode ajudar a explicar o melhor desempenho fotossintético de determinadas espécies e clones vegetais, inclusive sob diferentes condições de estresse (deficiência hídrica, alta irradiância, baixa temperatura etc). Conforme mencionado no Capítulo 4 desta tese, a montagem experimental existente no Laboratório de Fototérmica foi adaptada, durante meu período de doutorado, para possibilitar este tipo de determinação. Essas medidas simultâneas já começaram a ser realizadas, em plantas de café e eucalipto, demonstrando a viabilidade do estudo;

f) O estudo da **fluorescência durante a desidratação** da folha é promissor, na medida em que a evolução do sinal no tempo pode ser utilizada para caracterizar a cinética da queda na atividade fotossintética (queda na eficiência do fotossistema II);

g) Tenho particular interesse em utilizar a **espectroscopia fotoacústica** para avaliar o efeito de **mutações genéticas induzidas** nas plantas; esta técnica pode também ser utilizada para comparar o espectro de absorção de uma folha saudável com o de uma folha sob ação de **herbicidas**.

APÊNDICE: O coeficiente c_3^+ da (Eq.33)

Vimos no Capítulo 3 que a componente fotossintética P_{O2} da variação de pressão é dada por

$$P_{O_2} = \gamma_T R T_0 \psi(t) \quad ,$$

onde R é a constante dos gases e ψ(t) é a oscilação média da concentração de oxigênio nos espaços intercelulares.

Por sua vez, ψ(t) foi escrita em função de um coeficiente que chamamos de c_3^+ e que pode ser determinado a partir das condições de contorno para a difusão do oxigênio na folha.

Utilizamos o programa Mathematica 3.0™ para obter a expressão analítica de c_3^+ a partir do sistema de equações referentes às condições de contorno, explicitadas no Capítulo 3. As próximas páginas apresentam a expressão encontrada para o coeficiente c_3^+, seguida pelas expressões para ψ(t) nos casos especiais em que um dos parâmetros do modelo é o fator limitante para a difusão.

OS CASOS – LIMITE

As expressões abaixo mostram formas simplificadas da dependência de ψ(t) com a frequência de modulação para cada caso em que um dos parâmetros do modelo Korpiun 1D é o fator limitante (note-se que, nessas expressões, a dependência da amplitude com os diversos parâmetros do modelo está incluída em *A*). Os termos C_n são constantes.

- Fator limitante: CONSTANTE DE REAÇÃO

$$-Aif^{-1}\left[e^{-iARCTAN\left(\frac{2\pi f}{K}\right)}\right]$$

- Fator limitante: DIFUSIVIDADE

$$A(1+i)Df^{-2}\left[e^{-C_1(1+i)\sqrt{\frac{f}{D}}}-e^{-C_2(1+i)\sqrt{\frac{f}{D}}}\right]$$

- Fator limitante: ESPESSURAS

$$-A(1+i)Df^{-1}\left[e^{-C_1(1+i)L_1\sqrt{\frac{f}{D}}}+e^{-C_2(1+i)(L_1+L_2)\sqrt{\frac{f}{D}}}+e^{-C_3(1+i)(L_1+L_3)\sqrt{\frac{f}{D}}}+e^{-C_4(1+i)(L_2+L_3)\sqrt{\frac{f}{D}}}\right]$$

- Fator limitante: PERMEABILIDADE

$$Aif^{-1}\left[e^{-iARCTAN\left(\frac{2\pi f}{K}\right)}g(P)\right]$$

onde g(P) é uma função polinomial da permeabilidade com coeficientes do tipo

$$e^{-(1+i)L_n\sqrt{\frac{f}{D}}}$$

BIBLIOGRAFIA

Alves, P.L.C.A. 1998. Comportamento fotossintético de duas espécies de eucalipto sob condições fotoinibitórias: alterações fotoquímicas em resposta a alta irradiância e baixa temperatura. *Tese de Doutorado*, IB / Unicamp.

Arnon, D. I. 1949. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in Beta *Vulgaris*. *Plant Physiology* **24**, 1.

Barja, P. R. 1996. Estudo da indução fotossintética através da técnica fotoacústica: efeitos de saturação e fotoinibição. *Tese de Mestrado*, IFGW / Unicamp.

Barja, P. R. e Mansanares, A. M. 1998. Photosynthetic energy storage and oxygen evolution determined through an Open Photoacoustic Cell technique. *Instrum. Sci. Technol.* **26/2&3**, p.209-219.

Barja, P. R., Cella, N., Korpiun, P., Magalhães, A. C. N., Mansanares, A. M., Silva, E. C. e Vargas, H. 1999. Transport of oxygen and heat in leaves during photosynthesis studied photoacoustically on in vivo samples at low modulation frequencies. In: *Photoacoustic and Photothermal Phenomena: 10th International Conference*, p.588-590, Scudieri e Bertolotti (editores), The American Institute of Physics.

Bento, A. C., Aguiar, M. M. F., Vargas, H., Silva, M. D. da, Bandeira, I. N. e Miranda, L. C. M. 1989. Open Photoacoustic Cell X-ray detection. *Appl. Phys. B* **48**, p.269-272.

Bonner e Varner, editores. 1978. *Plant Biochemistry*, cap.25, 3^{a} ed.

Borisov, A.Y. 1989. Transfer of excitation energy in photosynthesis: some thoughts. *Photosynth.Res.* **20**, p.35-58.

Bults, G., Horwitz, B. A., Malkin, S. e Cahen D. 1982. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves: photochemistry and gas exchange. *Biochimica et Biophysica Acta* **679**, 452-465.

Demmig-Adams, B. e Adams, W. W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **43**, p.599-626.

Edwards, G. e Walker, D. 1983. *C3,C4: Mechanisms, and cellullar and environmental regulation, of photosynthesis*. Chapter 7: Induction (p.156-200). Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Emerson, R. e Arnold, W. 1932. *J.Gen.Physiol.* **16**, p.191.

Emerson, R. 1958. *Ann.Rev.Plant Physiol.* **9**, p.1.

Ferreira, M. 1979. Escolha de espécies de eucalipto. *Circular Técnica IPEF* **47**, p.1-30.

Forbush, B., Kok., B. e McGloin, M.P. 1971. Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution - II. Damping of flash yield oscillation, deactivation. *Photochem. Photobiol.* **14**, p.309-321.

Förster, T. Excitation transfer. 1960. In: *Comparative effects of radiation*, Burton M., Kirby-Smith J.S. e Magee J.L., editores, John Wiley and Sons Inc.

Frank, H.A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D. e Wasielewski, M.R. 1994. Photophysics of the carotenoids associated with the xantophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth. Res.* **41**, p.389.

Govindjee. 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* **22**, 131-160.

Govindjee e Whitmarsh, J. 1997. *The Photosynthetic Process*, Arizona University Press, 1ª edição.

Gust D. (1996) Why study photosynthesis ? Texto consultado na Internet: http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/ (Photosynthesis Center Home Page), Arizona State University (data da consulta: Setembro/1998)

Hall, D. O. e Rao, K. K. 1995. *Photosynthesis*, Cambridge University Press, 5ª edição (primeira reimpressão).

Hatch e Boardman, editores. 1981. *The Biochemistry of Plants*, vol.8 (Photosynthesis), Academic Press.

Higashi, E. N. e Silveira, R. L. V. A. S/data. Produção de mudas de eucalipto. Texto consultado na Internet: *http://www.florestal.ipef.br/especies/prodmudaseuca.html* (data da consulta: Setembro/1999)

Hill, R. e Bendall, F. 1960. *Nature* **186**, 136.

Korpiun, P., Osiander, R., Schmitt, H. e Micheler, W. 1991. Heat and mass transport in the photoacoustic effect on liquids. *Appl. Phys.* **A52**, p.223-233.

Korpiun, P. e Malkin, S. 1992. Interpretation of the photoacoustic effect on leaves by evolution and transport of heat and oxygen. In: *Photoacoustic and Photothermal Phenomena III* (ed. D. Bicanic), p.59-61. Springer Series in Optical Science, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Korpiun, P. e Büchner, B. 1999. Frequency dependence of the photothermal signal on mesophyll cell sizes of leaves. In: *Photoacoustic and Photothermal Phenomena: 10th International Conference*, p.603-605, Scudieri e Bertolotti (editores), The American Institute of Physics.

Krause, G.H. e Weiss, E. 1991. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, p.313.

Malkin, S. 1987. Fast photoacoustic transients from dark-adapted intact leaves: oxygen evolution and uptake pulses during photosynthetic induction - a phenomenology record. *Planta* **171**, 65-72.

Malkin, S. e Canaani, O. 1994. The use and characteristics of the photoacoustic method in the study of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 493-526.

Marquezini, M. V., Cella, N., Silva, E. C., Serra, D. B., Lima, C. A. S. e Vargas, H. 1990. Photoacoustic assessment of the *in vivo* genotypical response of corn to toxic Aluminium. *Analyst* **115**, p.341-343.

Marquezini, M. V., Cella, N., Mansanares, A.M., Vargas, H. e Miranda, L. C. M. 1991. Open Photoacoustic Cell spectroscopy. *Meas. Sci. Technol.* **2**, p.396-401.

Mauzerall, D., Canaani, O. e Malkin S. 1988. Observation of the cyclical-S states of oxygen formation in intact leaves by pulsed photoacoustics. *Biophys. J.* **53(2)**, A268.

Myers, J. 1971. *Ann.Rev.Plant Physiol.* **22**, p.289.

Nobel, P. S. 1991. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press, San Diego.

Pereira, A. C., Zerbetto, M., Silva, G. C., Silva, W. J., Vargas, H., Neto, G. de O., Cella, N. e Miranda, L. C. M. 1992. OPC technique for in vivo studies in plant photosynthesis research. *Meas. Sci. Technol.* **3,** p.931-934.

Pereira, A. C., Prioli, L. M., Silva, W. J. da, Neto, G. O., Vargas, H., Cella, N. e Alvarado-Gil, J. 1994. In vivo and in situ measurements of spectroscopic and photosynthetic properties of undetached maize leaves using the open photoacoustic cell technique. *Plant Science* **96**, p.203-209.

Pereira, A. C., Neto, G. de O., Vargas, H., Cella, N. e Miranda, L.C.M. 1994 b. On the use of the Open Photoacoustic Cell Technique for studying photosynthetic O_2 evolution of undetached leaves: comparison with Clark-type O_2 electrode. *Rev. Sci. Instrum.* **65**, p.1512-1516.

Perondi, L. F. e Miranda, L. C. M. 1987. Minimal-volume photoacoustic cell measurement of thermal diffusivity: effect of the thermoelastic sample bending. *J. Appl. Phys.* **62**, p.2955-2959.

Poulet, P., Cahen, D. e Malkin, S. 1983. Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves – quantitative-analysis by phase and amplitude measurements. *Biochimica et Biophysica Acta* **724**, 433-446.

Prinsley, R. T. e Leegood, R. C. 1986. Factors affecting photosynthetic induction in spinach leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* **849**, 244-253.

Rosencwaig, A. e Gersho, A. 1976. Theory of the photoacoustic effect with solids. *J. Appl. Phys.* **47** (1), p.64-69.

Taiz e Zeiger. 1991. *Plant Physiology*, Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.