

“Medidas Sistemáticas da Atividade Fotossintética de Espécies Vegetais utilizando o Sistema Compacto para Monitoramento “in vivo” e “in situ” da Fotossíntese desenvolvido no LAS / INPE”

**RELATÓRIO FINAL DE PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
(PIBIC/CNPq/INPE)**

**João Henrique Ferreira Pires (UNITAU, Bolsista PIBIC/CNPq)
E-mail: jpires@las.inpe.br**

**Dr. Marcos Dias da Silva (LAS/CTE/INPE, Orientador)
E-mail: marcos@las.inpe.br**

COLABORADORES

Eng. Manuel Francisco Ribeiro (LAS/CTE/INPE)

Junho de 2002

Agradecimentos

Ao,

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível o desenvolvimento desta pesquisa;

Ao,

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, pelo apoio pedagógico e o excelente ambiente de trabalho;

Ao,

Dr. Germano de Souza Kienbaum pela organização e paciência;

Ao,

Dr. Marcos Dias da Silva, pela sabedoria e orientação.

SUMÁRIO

Capítulo I	Introdução	pág. 01
Capítulo II	Fotossíntese	pág. 02
Capítulo III	Espectroscopia no infravermelho	pág. 07
Capítulo IV	Analisador de gases	pág. 09
Capítulo V	O monitoramento da evolução de O ₂ e a técnica fotoacústica	pág. 11
Capítulo VI	Materiais e métodos	pág. 14
VI.1	Construção do viveiro	pág. 15
VI.2	Modificações mecânicas no sistema	pág. 16
VI.3	Cultivo de amostras e procedimento de medidas	pág. 17
VI.4	Medidas de calibração em amostras de alumínio utilizando o Laser de Diodo	pág. 18
VI.5	Medidas de evolução de O ₂ em folhas de palmito doce e milho híbrido, utilizando o Laser de Diodo para excitação da fotossíntese	pág. 19
Capítulo VII	Comentários e conclusões	pág. 24
Capítulo VIII	Referências Bibliográficas	pág. 25
APÊNDICE A	Cronograma das atividades	pág. 27

Capítulo I -) Introdução

O monitoramento da fotossíntese, baseado nas medidas de consumo de CO_2 e evolução de O_2 , é de fundamental importância para os fisiologistas e geneticistas de vegetais. É a partir do estudo da atividade fotossintética¹, em resposta à absorção de nutrientes e poluentes, intensidade luminosa e condições do ar e temperatura, que novas variedades, fertilizantes, pesticidas e herbicidas são avaliados.

Uma das grandes dificuldades com as quais os biólogos e agrônomos se deparam frequentemente é a baixa disponibilidade de dispositivos confiáveis e de simples manuseio para medidas da fotossíntese “in vivo e in situ”. A disponibilidade de tais equipamentos para medidas em campo em muito aceleraria, por exemplo, os trabalhos de desenvolvimento de híbridos, apontando as variedades com maior atividade fotossintética.

O objetivo desta pesquisa é o de dar continuidade no projeto Sistema Compacto para Monitoramento “in vivo e in situ” da Fotossíntese que está sendo desenvolvido no LAS.

No que concerne aos métodos científicos de medida, este sistema emprega a técnica fotoacústica para monitoramento da evolução de O_2 e espectroscopia de gases para o monitoramento do consumo de CO_2 durante a realização da fotossíntese pela planta.

Neste relatório final apresentamos um resumo das atividades realizadas, de acordo com o cronograma de trabalho do projeto, que inclui os seguintes itens: estudo bibliográfico sobre fotossíntese e técnicas de monitoramento; construção de um “viveiro” para cultivo controlado das espécies em estudo; testes com o analisador de CO_2 ; testes com o sistema fotoacústico de detecção de O_2 ; comentários e conclusões parciais.

Capítulo II-) Fotossíntese

A fotossíntese é constituída de uma longa cadeia de eventos físico-químicos a qual se inicia pela absorção de luz através de uma molécula receptora que se encontra nos cloroplastos, a clorofila. Neste processo há absorção de luz, água e dióxido de carbono. A densidade de fluxo irradiante que atinge a atmosfera terrestre, a constante solar, é cerca de 1360 Wm^{-2} (2). A irradiação solar, absorvida por uma folha exposta é freqüentemente metade desta durante um dia. A concentração média de dióxido de carbono na atmosfera é de 360 ppm próximo à superfície da Terra.

O processo fotossintético tem grande importância mundial. Uma parte considerável do que os economistas chamam de riqueza se deve, diretamente e indiretamente, a fotossíntese. As espécies animais e vegetais dependem deste simples processo para sua existência; ademais, por consequência dos estudos realizados sobre a fotossíntese, novas variedades, pesticidas e fertilizantes são desenvolvidos.

Ao começo da iluminação de uma planta, sua atividade fotossintética é baixa havendo um aumento gradativo, que varia de planta para planta, até atingir seu valor máximo. Este período de indução é de 1 a 3 minutos, podendo ser mais curto ou mais duradouro devido as condições preliminares e ambientais das plantas.

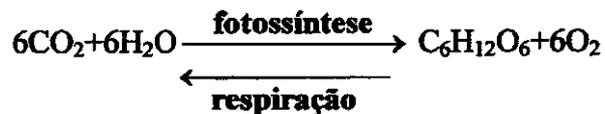
Desta forma, existem alguns fatores limitantes na fotossíntese. Estes fatores podem ser externos ou internos ao organismo. Como fatores internos podem ser citados as estruturas das folhas e dos cloroplastos, teor de pigmentos, acúmulo de produtos da fotossíntese no interior dos cloroplastos, a concentração de enzimas e a presença de nutrientes. Como fatores externos podem ser citados intensidade de luz, a temperatura, a salinidade, o grau de hidratação e a concentração de CO_2 .

Quanto ao grau de hidratação, a essencialidade da água para as plantas deve-se a sua contribuição na manutenção e preservação de suas funções vitais. A água participa de inúmeras reações químicas ocorrentes nos protoplasmas, agindo como solvente, além de estabilizar termicamente a planta permitindo que as folhas absorvam quantidades consideráveis de radiação sem alterar sua temperatura. Qualquer fonte radiante, seja através de fontes artificiais, luz elétrica ou fontes naturais, de longitudes de ondas compreendidas dentro dos limites do espectro visível, provocará o processo fotossintético, proporcionalmente à intensidade luminosa.

A absorção de luz incidente resulta em uma excitação elétrica na molécula de clorofila, capaz de iniciar e alterar a taxa de reações químicas. A energia luminosa

absorvida pela clorofila causa fosforização (união de um radical fosfato a um composto orgânico); tal energia então é utilizada para quebrar fortes ligações entre o oxigênio e outros elementos. Açúcares são sintetizados a partir de dióxido de carbono e água por células clorofílicas, e os átomos de oxigênio se unem em pares formando o gás oxigênio(O₂) que é expelido para a atmosfera. Do ponto de vista da química fundamental, a fotossíntese é uma reação de óxido-redução entre o gás carbônico e a água, onde o gás carbônico é reduzido e a água é oxidada.

A atividade fotossintética¹⁻⁷ é um processo complexo onde ocorre simultaneamente uma série de fenômenos como, abertura e fechamento de estômatos, transpiração e respiração (processo inverso ao da fotossíntese) conforme mostra a equação reduzida a seguir:



Esta equação, acima, não mostra com detalhes o complexo mecanismo da fotossíntese, mas sintetiza a reação química envolvida. A influência do processo da respiração se dá como resultado de uma oxidação de parte dos carboidratos que são sintetizados na fotossíntese. Quando se mede a quantidade de produtos formados pela fotossíntese em um determinado tempo, os resultados são menores que os valores esperados, devido a quantidade de carboidratos consumidos durante a respiração, sendo qualificada como a quantidade aparente da fotossíntese (intensidade da fotossíntese menos a intensidade respiratória).

O cloroplasto é uma unidade fotossintética completa contendo sistemas multienzimáticos divididos em três grupos principais: fotólise da água, fosforilação e fixação de CO₂. Os pigmentos encontrados nos cloroplastos, como clorofila e os carotenóides, são de fundamental importância para a fotossíntese atuando como agentes catalizadores em uma fase do processo fotossintético. A clorofila, pigmento que dá a coloração verde na planta, pode ser encontrada na forma de diferentes isômeros, **a**, **b**, **c** e **d**, cada qual com espectros de absorção diferentes. Os mais importantes tipos são do tipo **a** e **b**. Os coeficientes molares de absorção nos picos das clorofilas **a** e **b** são os mais altos observados em compostos orgânicos. Os picos de absorção se encontram entre 400 nm. e 500 nm. e entre 600 nm. e 700 nm. A clorofila é utilizada para realizar reações fotoquímicas, enquanto que outros pigmentos, como os carotenóides, auxiliam na absorção da luz e na transferência de energia radiante para centros de reação.

A fig. II.1 apresenta os espectros de absorção das clorofilas a e b dissolvidas em éter. Os picos de absorção entre 600 e 700 nm são os mais importantes para a fotossíntese na maioria das plantas.

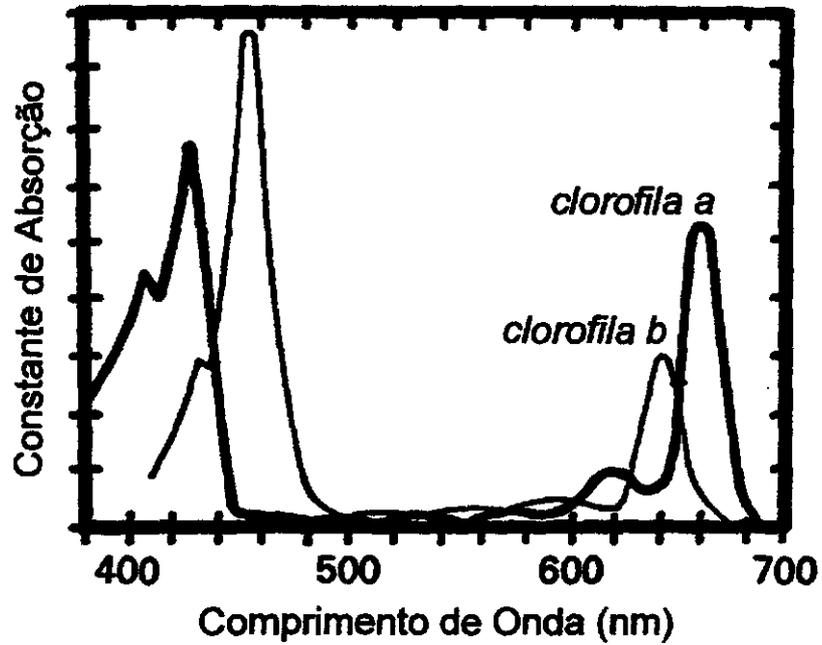


Figura II.1: Espectros de absorção das clorofilas a e b dissolvidas em éter dietílico. (de F.B. Salisbury e C. Ross¹⁰)

Existem vários métodos para monitorar a evolução de O₂ e consumo de CO₂ :

Métodos para evolução de O₂ :

1. Método da contagem das bolhas, no qual as bolhas de O₂ produzidas na água por uma planta aquática, como a Elodea (Egeria Densa), são contadas e uma taxa de produção de bolhas é determinada.
2. Métodos manométricos comumente utilizados nas medições da pressão parcial de um gás.
3. Método da corrente contínua. A planta é posta em uma câmara fechada e a corrente de gases que entra ou sai é analisada.

Métodos para consumo de CO₂ :

1. Mesmo método utilizado no item 3 citado acima.
2. Mudança de pH da água que circunda uma planta aquática, devido à mudança na concentração de CO₂.
3. Absorção do infravermelho. Utiliza-se o fato de o CO₂ absorver radiação infravermelha (4,26 μm) para medir variações em sua concentração.

O método utilizado em nosso sistema para monitorar a concentração de CO₂ é o de absorção no infravermelho; o método fotoacústico utilizado para monitorar a evolução de O₂ é do tipo que mede a pressão parcial do gás. Neste caso, o sinal fotoacústico é devido à flutuação periódica da pressão parcial de O₂ na câmara fotoacústica.

A planta libera a mesma quantidade de O₂ que consome de CO₂. Sob condições típicas de iluminação, uma planta consome cerca de $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($2 \mu\text{g cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ ou $1 \text{mm}^3 \text{cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ nas CNTP) de CO₂^(1,2); é evidente que estamos falando em termos de ordem de grandeza, uma vez que o consumo depende da espécie vegetal e das condições ambientais. Considerando que a concentração padrão de CO₂ no ar, nas CNTP, é de 340 ppm, o fluxo de ar estimado, por cm² de folha exposta, para repor a quantidade de CO₂ consumida durante a fotossíntese numa câmara fechada, deve ser da ordem de 3 ml/min. ou 3000 mm³/min. Esses números também indicam que é desejável uma sensibilidade melhor que 10 ppm para um equipamento destinado à medidas de consumo de CO₂. Outro fenômeno importante para o estudo quantitativo da fotossíntese é o efeito Emerson^(1,2), que mostra que a fotossíntese realizada com absorção de luz em torno de 700 nm é incrementada se o vegetal em estudo for suprido com radiação adicional em torno de 650 nm. Esse é mais um fator que torna evidente a dependência da fotossíntese

em relação ao espectro da luz utilizada. Estudos em “chlorella” mostram que o incremento nas taxas de fotossíntese é de cerca de 30 a 40% em relação à soma das taxas obtidas utilizando os dois comprimentos de onda em separado.

Outro aspecto importante a considerar é o que diz respeito às intensidades de radiação envolvidas. A região do espectro entre 400 e 700 nm, na qual a maioria dos pigmentos absorvem radiação para promover reações relacionadas com fotossíntese, é chamada de Radiação Fotossinteticamente Ativa-PAR (photosynthetically active radiation). Da radiação solar que atinge a superfície terrestre, em um dia claro com o sol a pino, cerca de 400W/m^2 corresponde à PAR¹.

Dependendo do mecanismo de assimilação do CO_2 , as plantas são classificadas como C3 e C4. Nas plantas do tipo C3 (por exemplo: trigo, cevada, aveia), a saturação da fotossíntese ocorre para intensidades de PAR abaixo de 120W/m^2 , enquanto que as plantas do tipo C4 (por exemplo: milho, sorgo, cana de açúcar) podem atingir níveis de 400W/m^2 ⁽¹⁾.

Considerando uma banda de 30nm centrada no pico de 680nm, numa aproximação grosseira, a intensidade da radiação nesse intervalo corresponde a 10% da PAR, o que, tomando o valor de 400W/m^2 , equivale a 40W/m^2 ou 4mW/cm^2 , intensidades de radiação essas compatíveis com as utilizadas por Miranda, Vargas e co-autores⁽⁸⁻¹⁴⁾, e que serão utilizados por nós na detecção fotoacústica da evolução do O_2 . Durante a fotossíntese a abertura dos estômatos, para a captura de CO_2 , ocasiona uma inevitável perda de água. Em plantas do tipo C3 são comuns taxas da ordem de $8\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ de CO_2 fixado para taxas de $5\ \text{mmol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ de H_2O transpirada por mol de CO_2 fixado. Esses valores chamam a atenção para a necessidade de um estudo sobre a sua influência em métodos de medidas de consumo de CO_2 e O_2 . Os estômatos, tem movimentos com amplitude da ordem de $10\ \mu\text{m}$, com tempos de abertura e fechamento da ordem de 5 a 20 min. Embora os tempos de resposta sejam relativamente grandes, a amplitude desses movimentos é significativa para a detecção fotoacústica; dessa maneira esses movimentos podem induzir ruídos em medidas utilizando a técnica fotoacústica, bem como podem influenciar medidas em função do tempo.

Capítulo III-) Espectroscopia no infravermelho :

A radiação infravermelha pertence a uma região do espectro eletromagnético, cujo comprimento de onda é da ordem de micrômetros. Quando um feixe de radiação eletromagnética interage com a matéria podem ocorrer vários tipos de fenômenos como: reflexão, transmissão, espalhamento, absorção e outros. A interação mais comum da radiação infravermelha com a matéria é a sua absorção por modos de vibrações moleculares^(15,16).

A matéria é composta por átomos com organização molecular segundo arranjos bem definidos. Os elétrons ocupam órbitas definidas, num átomo ou numa molécula, que possuem diferentes níveis de energia. Da mesma forma, as ligações entre átomos em uma molécula possuem energias características. Um fóton de radiação eletromagnética também é definido por uma energia característica e um comprimento de onda característico. Quando um átomo é atingido por um fóton de radiação eletromagnética, se a energia do fóton for suficiente para provocar um salto energético de um elétron num estado fundamental para um estado excitado, pode ocorrer absorção desse fóton pela camada eletrônica do átomo. Esse processo é bastante comum para radiações ultravioleta e visível, cujos comprimentos de onda são da ordem de centenas de nanômetros e as energias dos fótons da ordem de unidades de elétron-volt ($1 \text{ eV} = 1,6 \times 10^{-19} \text{ J}$). Uma molécula formada por vários átomos possui modos de vibrações elásticas entre os átomos que a constituem, que podem ser excitados por um campo elétrico quando existe polarização elétrica entre os átomos na molécula. A radiação infravermelha, cujos comprimentos de onda são da ordem de micrometros e as energias dos fótons da ordem de décimos de eV, pode interagir com as moléculas excitando esses modos de vibração. A molécula de CO_2 possui modos de vibração entre o átomo de Carbono e os átomos de Oxigênio, dentre os quais um de estiramento assimétrico que absorve radiação infravermelha no comprimento de onda de $4,26 \mu\text{m}$, efeito esse que utilizamos em nosso trabalho para monitorar a concentração de CO_2 .

Neste trabalho utilizamos uma fonte de radiação infravermelho construída de um “bastão de carborundum” (cerâmica de carbeto de silício) de aproximadamente 60 mm de comprimento e 6 mm de diâmetro, denominada “globar”. Esta fonte emite radiação infravermelha em vários comprimentos de onda. Para selecionar o comprimento de onda desejado utilizamos um filtro de interferência fixado na frente do detetor. Este filtro possui uma banda passante estreita (50 nm) em torno de $4,26 \mu\text{m}$.

Quantitativamente, a absorção de radiação pela matéria pode ser descrita pela Lei de Beer⁽¹⁵⁻¹⁶⁾, que relaciona a radiação transmitida com a espessura e as propriedades do material. A transmitância T, é a razão entre a potência radiante P transmitida através de uma amostra e a potência da radiação incidente P₀, tendo-se em conta somente a absorção da amostra : $T = P / P_0$

Pela Lei de Beer temos: $P = P_0 \times \exp(- a.b.c)$ onde

a = absorção de uma radiação de frequência específica ν .

b = espessura da amostra em cm.

c = concentração de volume da amostra em g/l.

Dessa forma : $T = \exp(- a.b.c)$ e $\log(1/T)$ define a absortância : $A = a.b.c$

A absorção da amostra de uma substância é efetivamente maior, quanto maior for sua espessura, e maior for o seu coeficiente de absorção para o comprimento de onda em questão. No nosso caso, a absorção depende da concentração de CO₂ no ar.

Capítulo IV-) Analisador de gases (CO₂) :

O analisador compacto de CO₂ para monitoramento da fotossíntese é um analisador de gases^(17,18) convencional, adaptado para este tipo de aplicação, levando-se em conta a sensibilidade exigida, custo e simplicidade de manuseio para o experimento em questão.

O sistema de medição utilizado (vide Fig. IV.1) funciona através da absorção do infravermelho e tem, basicamente, em sua estrutura uma fonte de infravermelho do tipo “globar”, duas câmaras de gases, as quais são seladas por janelas ópticas de safira, sendo uma câmara ativa, onde circula o ar com concentrações variadas do gás carbônico em contato com a planta em estudo, e uma câmara de referência, onde circula o N₂ puro; um par de detetores de radiação infravermelho (foto-condutores de PbSe), fixados após cada câmara; um par de filtros de interferência centrados em 4,26μm (pico de absorção do CO₂) com uma banda passante de 10nm; um chopper que modula a radiação infravermelho, possibilitando que sinais com frequências diferentes daquela oriunda do chopper sejam eliminados quando processados eletronicamente, melhorando a relação sinal- ruído.

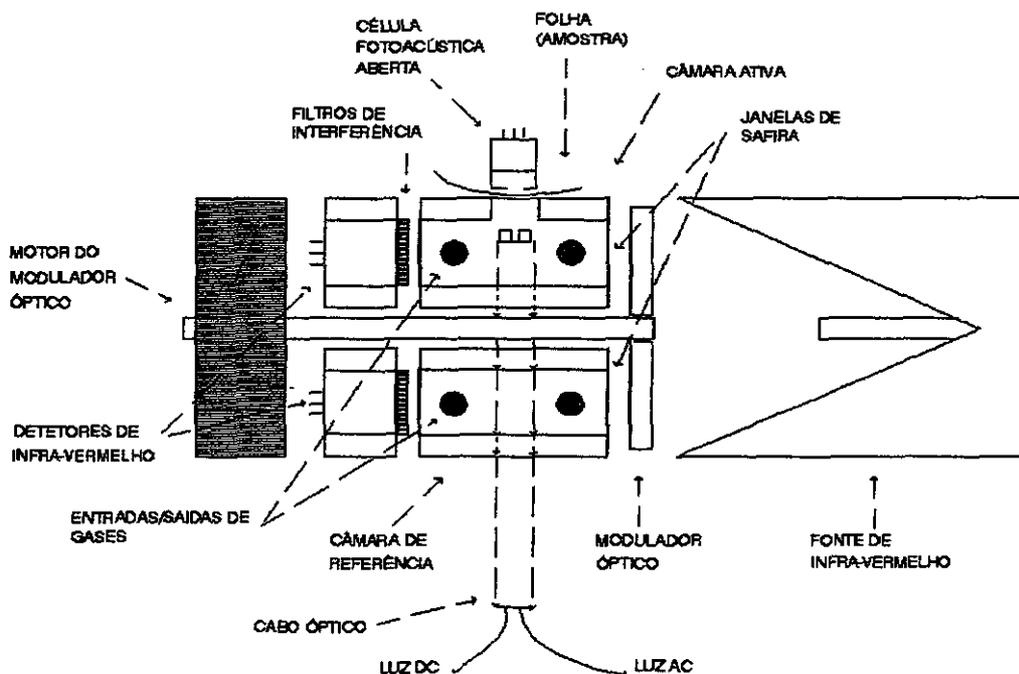


Fig. IV.1 : Analisador de CO₂ acoplado à uma câmara fotoacústica aberta.

Quando a fotossíntese é realizada, a concentração de CO_2 diminui na câmara ativa gerando um decréscimo de absorção do infravermelho, resultando no aumento do sinal do detector. O sinal do detector da câmara ativa é normalizado pelo sinal da câmara de referência e os dados são processados, armazenados em disquetes (os equipamentos são interfaceados com um microcomputador) e mostrados na tela na forma de gráfico.

- **Equipamento baseado na eletrônica dedicada desenvolvida no LAS:**

No caso da eletrônica dedicada, mostrada na Fig. IV.2, são utilizados pré-amplificadores com ganho de trinta e quatro vezes após os detectores. Logo em seguida o sinal passa por filtros tipo passa-faixa centrados em 150Hz que além de limitar a banda de frequências do sinal, fazem uma ampliação suplementar de dezesseis vezes; então os dois sinais estão prontos para serem digitalizados pela interface DaqBook/100 da IOtech e processados em um microcomputador conforme descrito no procedimento de calibração.

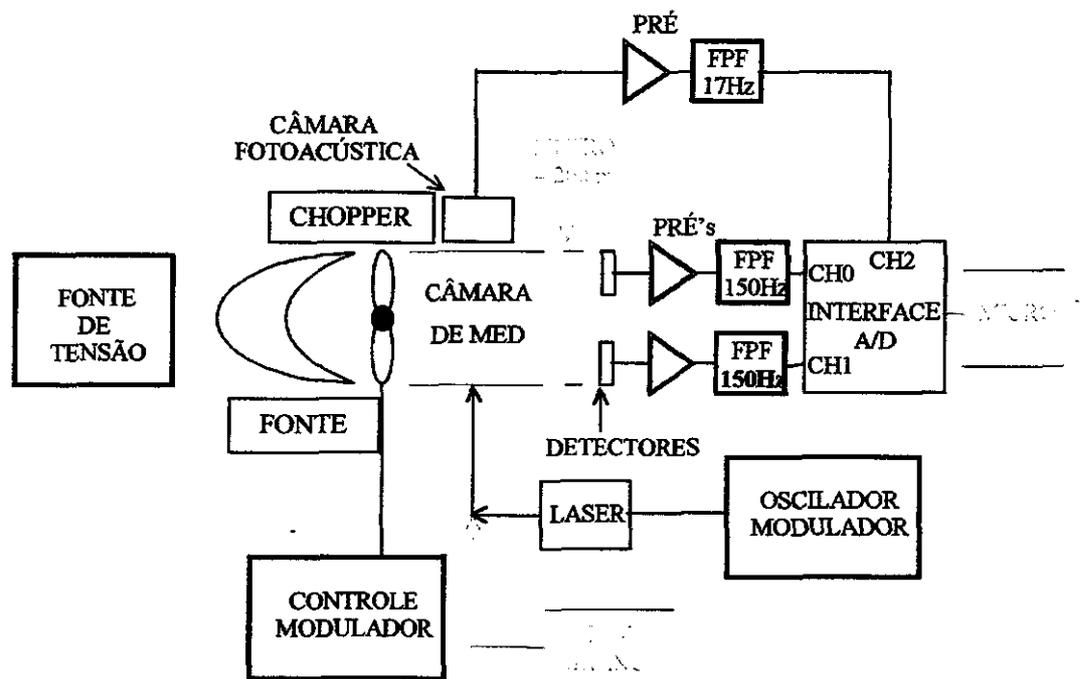


Fig. IV.2 : Analisador de gás CO_2 com a eletrônica dedicada desenvolvida no LAS.

Capítulo V-) O monitoramento da evolução de O_2 e a técnica fotoacústica

O monitoramento da evolução de O_2 é baseado na técnica fotoacústica⁽¹⁸⁻²⁷⁾. Este efeito consiste na geração de ondas de pressão em uma câmara fechada (Câmara Fotoacústica), devido a absorção de luz modulada por uma amostra. A luz incidente, proveniente de uma fonte pulsada ou modulada por um modulador de feixe luminoso, é absorvida pela amostra gerando pulsos de calor que causam uma flutuação periódica de temperatura na camada de gás adjacente a amostra (geralmente ar a pressão ambiente) com a mesma frequência de modulação que a do feixe de luz incidente. A flutuação de temperatura causa a expansão e compressão dessa camada de ar, dando origem a ondas de pressão dentro da câmara, que são detectadas pelo microfone.

O sinal gerado pelo microfone dependerá diretamente do coeficiente de absorção da amostra e da transmissão e geração de calor do ar para a amostra e posteriormente para a câmara fechada. A fig.V.1 mostra uma câmara fotoacústica convencional.

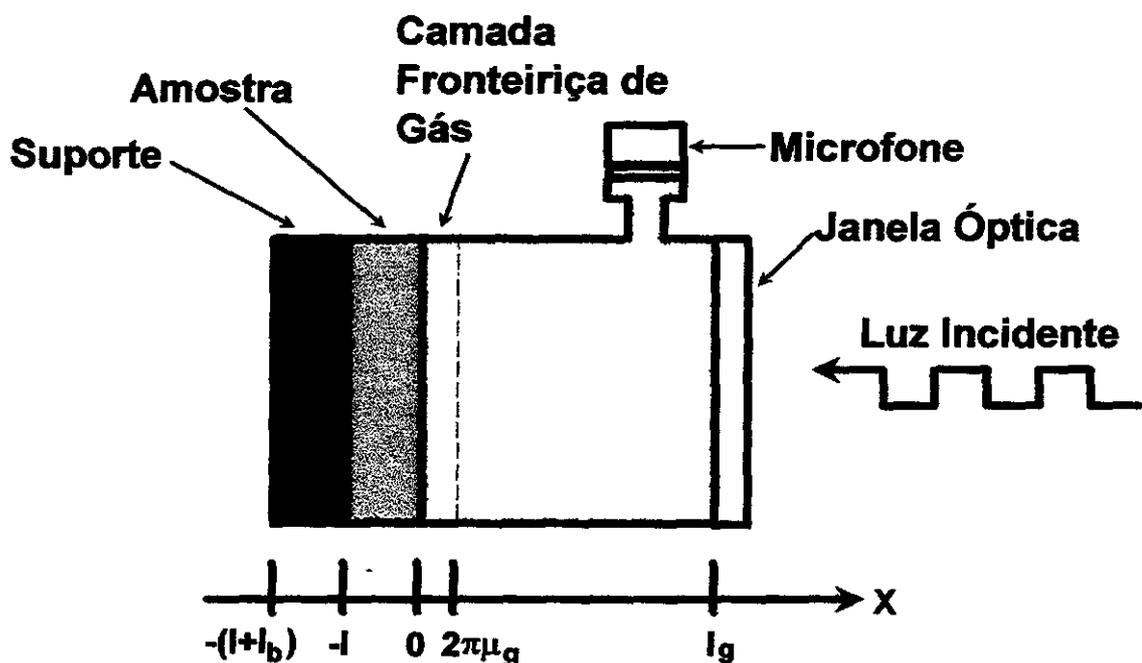


Figura V.1 : Câmara fotoacústica convencional.

Neste trabalho a evolução de O_2 é baseado em uma célula fotoacústica aberta, acoplada sobre a folha vegetal em estudo que é deixada no escuro por aproximadamente

uma hora, para que haja relaxamento do sistema fotossintético. A fotossíntese é iniciada com um feixe de luz modulado formando pulsos de O_2 no interior da câmara fotoacústica onde as ondas de pressão geradas são “ouvidas” pelo microfone.

Uma luz monocromática em torno de 680nm (pico de absorção da clorofila) é guiada através de um cabo óptico excitando a fotossíntese. Dois casos serão apresentados; em um deles, a folha vegetal em estudo é acoplada entre o orifício da câmara ativa do analisador de gases e o microfone de eletreto conforme a figura V. 2 .

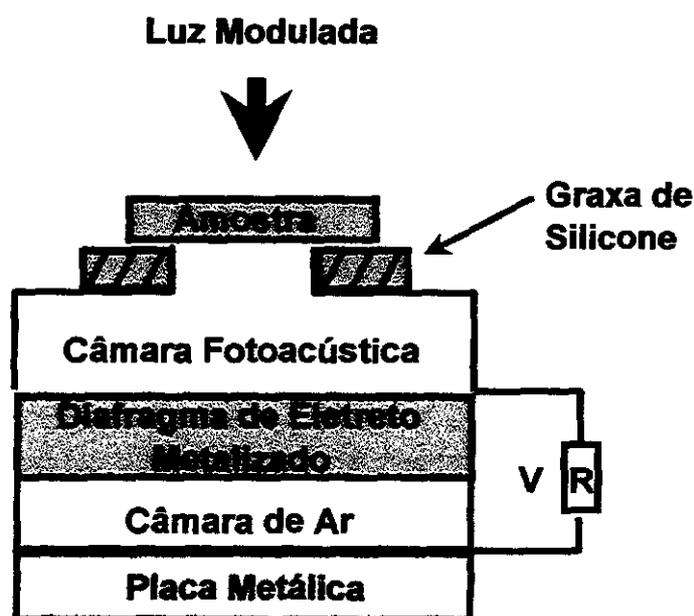


Figura V. 2 : Célula fotoacústica aberta (microfone de eletreto).

Em outro, a folha é acoplada a um microfone de eletreto ligado diretamente à eletrônica do sistema desenvolvida no LAS, recebendo luz modulada diretamente do cabo óptico. Em determinados intervalos de tempo, incidi-se luz branca não modulada (DC), através de um segundo ramo do mesmo cabo óptico, sobre a amostra, saturando a absorção da clorofila, cessando a fotossíntese modulada e, assim, diminuindo o sinal fotoacústico. Quando a luz modulada (AC) incide sobre a amostra, ocorrem dois fenômenos importantes: o primeiro é a absorção da luz gerando calor e induzindo sinal fotoacústico; esta é a componente "fototérmica" do sinal total gerado. O segundo é a absorção de luz modulada pela folha vegetal efetuando a fotossíntese e liberando pulsos de O_2 para o interior da câmara fotoacústica, responsáveis pela componente

"fotobárica", a qual queremos medir. Quando a luz branca (DC) incide na amostra, a fotossíntese é saturada e a componente "fotobárica" é eliminada, o que permite a discriminação das duas componentes.

O tempo de resposta da evolução do O_2 é da ordem de 5 ms, sendo então utilizadas frequências baixas de modulação neste processo.

A seguir é descrito em linhas gerais o sistema utilizado para o monitoramento do O_2 na prática.

- **Monitoramento do gás O_2 com a eletrônica dedicada**

Com a eletrônica dedicada, mostrada em blocos na Fig. V.1, o monitoramento do O_2 é realizado também com uma câmara fotoacústica, mas sem os amplificadores "lock-in"; no lugar destes foram implementados pré-amplificadores com ganho de trezentos e setenta e cinco vezes após os detectores; posteriormente o sinal passa por um filtro tipo passa-faixa centrado em 23,7Hz que, além de limitar a banda de frequências do sinal, também faz uma ampliação suplementar de cento e setenta e oito vezes; desta forma o sinal do microfone com apenas alguns microvolts é ampliado até alcançar alguns volts, possibilitando a sua digitalização com a interface DaqBook/100. O microcomputador pode então adquirir os dados para o armazenamento e cálculos.

Os componentes básicos do monitor de O_2 são:

- Microfone de Eletreto comercial (célula fotoacústica aberta) : diâmetro do orifício de entrada da câmara $\varnothing = 3$ mm; diâmetro externo do microfone $\varnothing = 10$ mm (como o microfone foi adquirido em lojas de componentes eletrônicos não se tem uma especificação mais completa; na carcaça existe a inscrição 90Y, e é similar ao modelo EM60 da Primo Company - Japão).
- Fonte de Luz Modulada (luz AC): diodo laser de AsGaAl, $\lambda_p = 660$ nm, $P = 4$ mW (15 W / m² na superfície da folha vegetal em estudo acoplada no equipamento (o laser utilizado foi retirado de um "laser pointer", cujo custo unitário é bastante reduzido - R\$ 10,00 - e apresenta uma boa estabilidade quando alimentado com fonte externa de 4,5V).

- Fonte de luz branca contínua (luz DC): lâmpada OSRAM Xenophotde 36V e 400W. A luz branca foi filtrada por um filtro de calor de vidro KG1 da Melles Griot e colimada através de lentes convergentes na entrada do cabo óptico utilizado.
- Cabo óptico bifurcado para guiagem dos feixes de laser e luz branca até a amostra (tipo A53,045 da Edmund Scientific).

Capítulo VI-) Materiais e Métodos :

Nesta seção descrevemos os trabalhos realizados na prática, tais como:

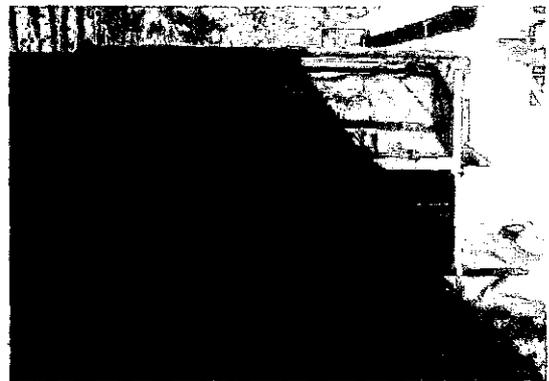
- Construção do “viveiro”;
- Modificações no sistema;
- Cultivo das amostras e procedimento de medidas;
- Medidas de evolução de O₂ em células de alumínio, utilizando o Laser de Diodo para excitação da fotossíntese;
- Medidas de evolução de O₂ em folhas de palmito doce e milho híbrido, utilizando o Laser de Diodo para excitação da fotossíntese.

VI.1) Construção do “Viveiro” :

Foi construído um “viveiro” (vide figura VI.1) para o cultivo das espécies vegetais a serem estudadas. Neste, as espécies foram condicionadas num ambiente natural, sofrendo influências diretas dos fatores limitantes externos. Para sua construção foram utilizados: 4 toras de bambu nativo; 2 tábuas de madeira(1,10m x 0,80m); 1 tela de sombreamento 50% (2,50m x 1,00m) com o objetivo de filtrar a ação da radiação solar .



Vista lateral



Vista frontal



Amostras de milho híbrido



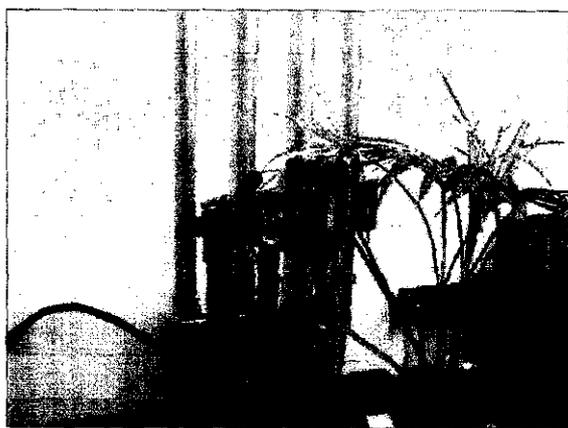
Amostras de palmito doce

Figura VI.1 : Fotos do “viveiro” construído, em diferentes ângulos.

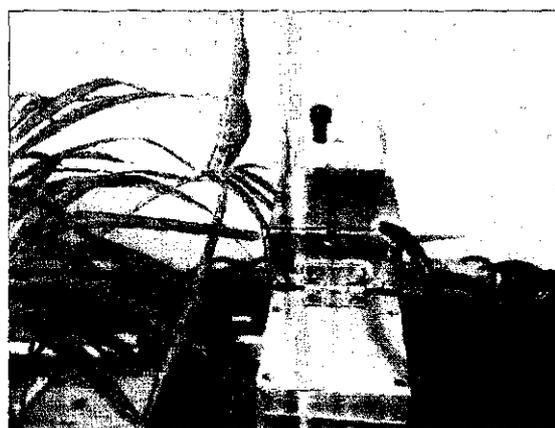
VI.2-) Modificações mecânicas no sistema :

Foram feitas algumas modificações no sistema. Para explicarmos melhor essas mudanças, resolvemos dividi-lo em: sistema antigo²⁸ e sistema atual.

No sistema antigo, utilizava-se uma espécie de elástico para acoplar o conjunto pré-amplificador e analisador na espécie vegetal em estudo, já no sistema atual, foi instalada uma dobradiça entre o pré-amplificador e o analisador tornando-lhe mais eficiente e sistêmico. Uma outra modificação que tornou o sistema mais prático foi a implementação de um parafuso para ajuste da pressão do pré-amplificador na região do orifício do microfone, obtendo, uma melhoria na vedação. A figura VI.2 a seguir ilustra o sistema antigo e o sistema atual:



Sistema antigo



Sistema atual

Figura VI.2 : Modo de acoplamento da amostra no sistema antigo e no atual.

VI.3-) Cultivo de amostras e Procedimento de Medidas :

As amostras utilizadas foram Milho Híbrido e Palmito Doce. Os palmitos procederam da Fazenda Citra – S.P. Para os milhos híbridos foram utilizadas sementes “Selegran”, lote 085, com validade até 04/02/02, plantadas em vasos de aproximadamente $\frac{1}{2}$ l de terra vegetal. As medidas foram realizadas em folhas de amostras com idade entre 1 e 3 meses após a germinação.

Para obtermos resultados repetitivos ou passíveis de comparação nas medidas de evolução do O₂ da planta em estudo, é necessário trabalhar nas mesmas condições ambientais, ou seja, mesma irradiância, hidratação e temperatura. Para isso, foi estabelecido o seguinte procedimento de medidas:

- as amostras foram mantidas basicamente no “viveiro” (vide Fig. VI. 1) com iluminação natural. Um dia antes da realização de medidas, elas eram colocadas na estufa²¹, localizada dentro do laboratório, cuja iluminação é proveniente de lâmpadas fluorescentes e incandescentes.
- as folhas das amostras, “in vivo”, foram acopladas no equipamento selando o orifício da parte superior da câmara ativa do analisador de CO₂. Por sua vez, a célula fotoacústica aberta foi acoplada sobre a folha em estudo e centrada no orifício da câmara ativa do analisador de CO₂. Desta maneira, a folha em estudo ficava levemente prensada entre o analisador de CO₂ e a célula fotoacústica aberta. Para garantir a vedação completa no sistema foram utilizadas camadas finas de PVC e graxa de silicone.
- as amostras, já acopladas no equipamento, eram mantidas no escuro por cerca de duas horas antes da realização das medidas para relaxar os centros de excitação da clorofila.

VI. 4-) Medidas de calibração em amostras de alumínio utilizando o Laser de Diodo :

Foram feitas medidas com uma amostra de alumínio de 55 μm de espessura e 8 mm de diâmetro, acoplada ao sistema no lugar da folha vegetal, com a finalidade de verificar se o sistema estava calibrado, bem como, apresentar e familiarizar com o aparelho de medidas. A seguir, a figura VI. 4.a, apresenta o gráfico do sinal fotoacústico gerado pela célula de alumínio, comprovando que o sistema estava calibrado para realização de medidas fotoacústicas.

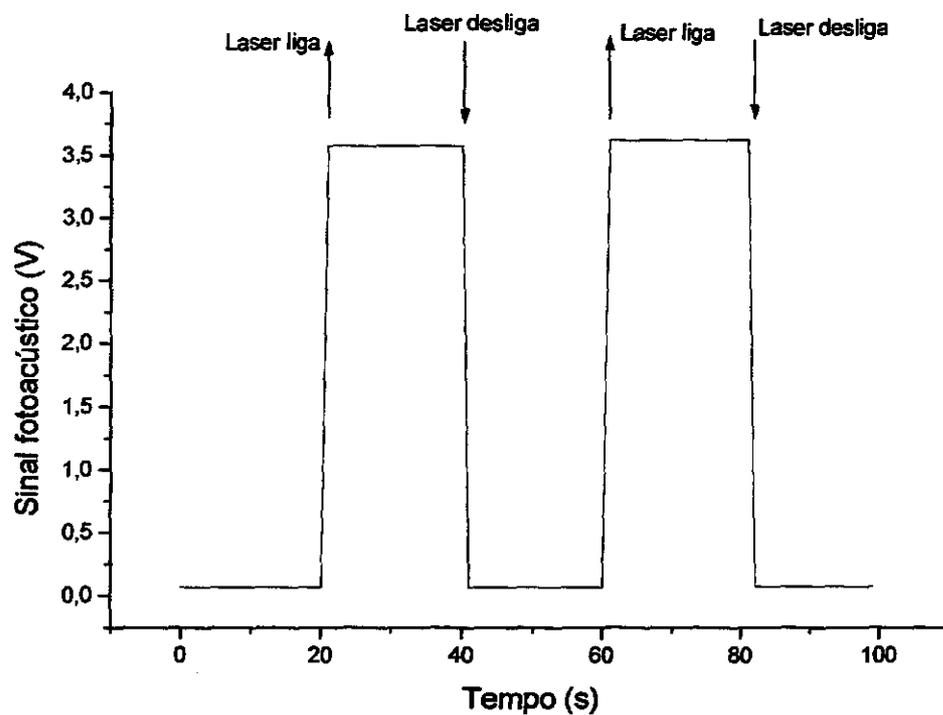


Figura VI. 4.a : Gráfico do sinal fotoacústico gerado por uma célula de alumínio, pintada com uma fina camada de tinta preta (Pilot para retroprojeto).

VI. 5-) Medidas de evolução de O_2 em folhas de palmito doce e milho híbrido, utilizando o Laser de Diodo para excitação da fotossíntese:

Para medidas da evolução de O_2 , a luz modulada (laser, 17 Hz), para a excitação da fotossíntese, permaneceu ligada constantemente. Foram adquiridos 100 pontos, de 2 em 2 segundos cada, num total de 200 segundos. Nos primeiros 20 pontos a luz branca (DC), para a saturação da fotossíntese, permanecia desligada; no 21º ponto a luz branca era ligada; no 40º a luz branca era desligada novamente, e assim sucessivamente, de 20 em 20 pontos, até o final da medida. Foram utilizadas folhas de milho híbrido e de palmito doce.

A figura VI. 5.a abaixo, mostra o gráfico do sinal fotoacústico gerado utilizando-se uma potência de 237 W (LB) para saturação da fotossíntese. Antes do início das medidas, o milho híbrido permaneceu cerca de uma hora no escuro, relaxando o sistema fotossintético da planta. A folha foi acoplada “in vivo” à célula fotoacústica aberta.

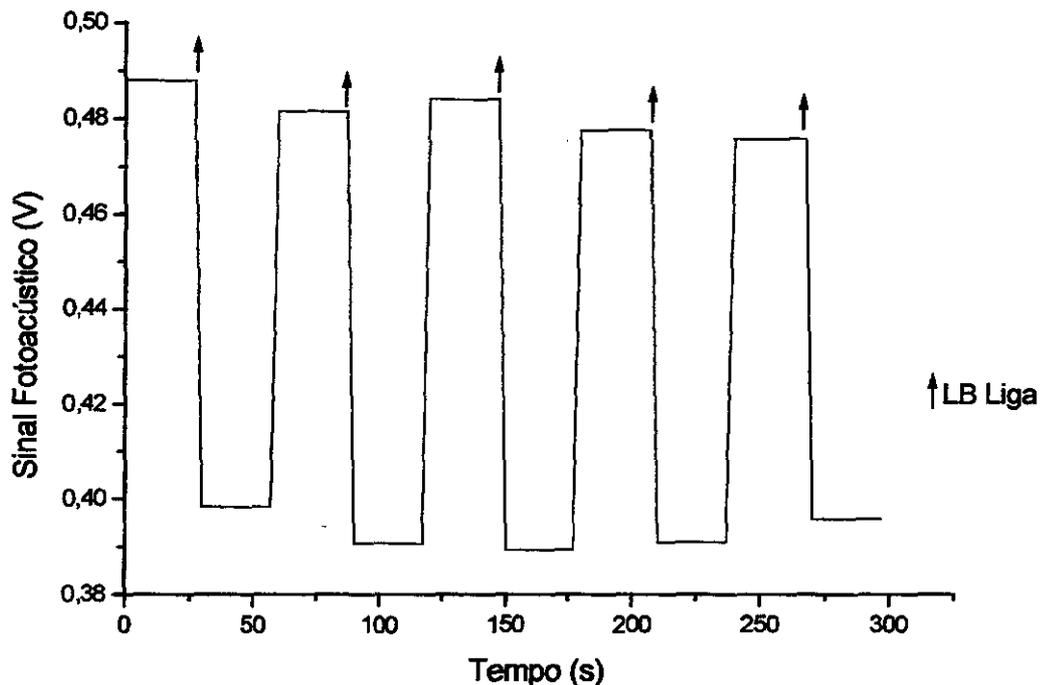


Figura VI. 5.a : Gráfico da evolução de O_2 em uma amostra de milho híbrido com a lâmpada de saturação (LB) nas condições de 25,0V e 9,5A.

A figura VI. 5.b a seguir, apresenta o gráfico do sinal fotoacústico gerado utilizando-se uma potência de 321 W (LB) para saturação da fotossíntese. Antes do início das medidas, o milho híbrido permaneceu cerca de uma hora no escuro, relaxando o sistema fotossintético da planta. A folha foi acoplada “in vivo” à célula fotoacústica aberta.

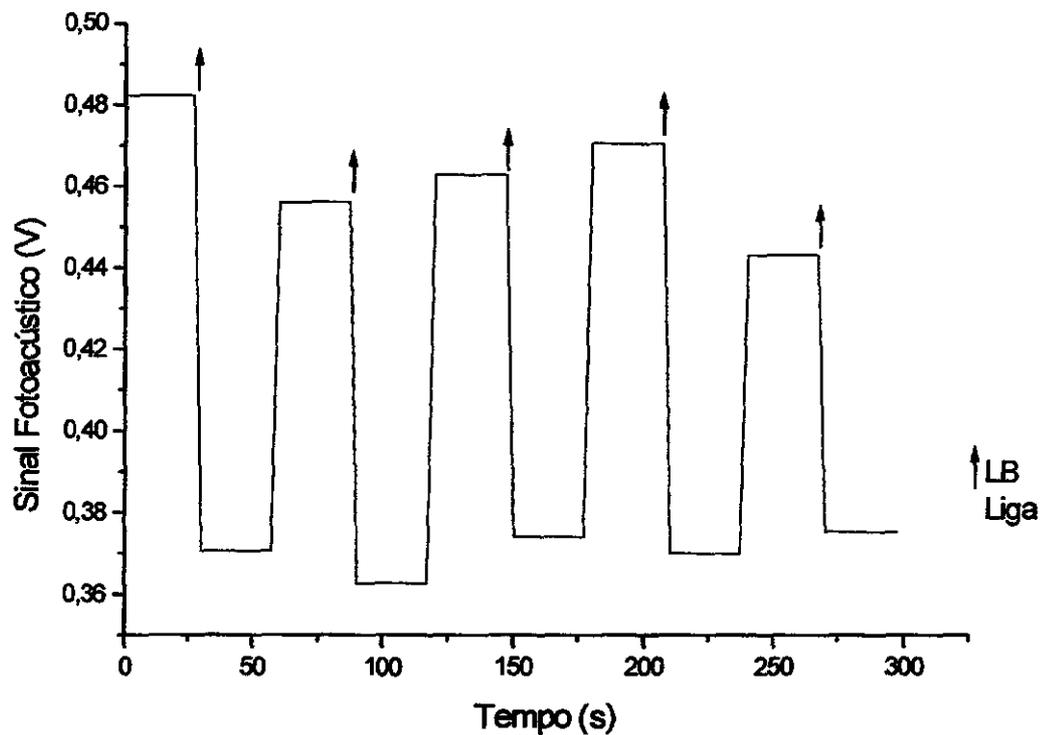


Figura VI. 5.b : Gráfico da evolução de O_2 em uma amostra de milho híbrido com a lâmpada de saturação (LB) nas condições de 30,0V e 10,7A.

A figura VI. 5.c a seguir, apresenta o gráfico do sinal fotoacústico gerado utilizando-se uma potência de 409 W (LB) para saturação da fotossíntese. Antes do início das medidas, o milho híbrido permaneceu cerca de uma hora no escuro, relaxando o sistema fotossintético da planta. A folha foi acoplada “in vivo” à célula fotoacústica aberta.

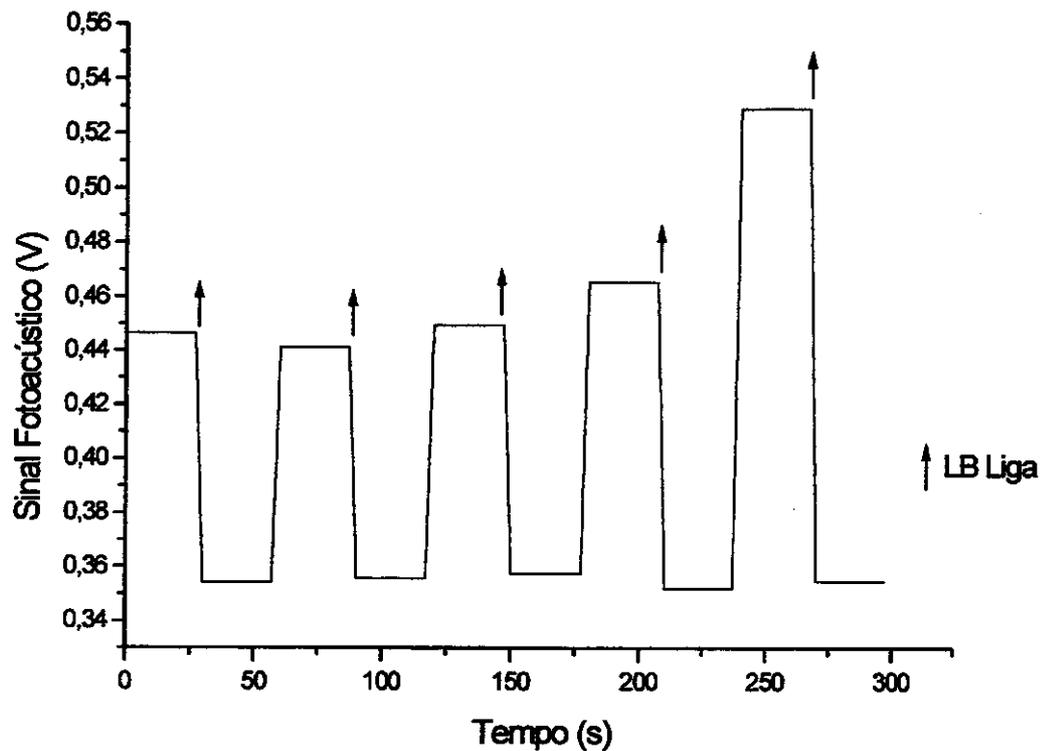


Figura VI. 5.c: Gráfico da evolução de O₂ em uma amostra de milho híbrido com a lâmpada de saturação (LB) nas condições de 35,0V e 11,7A.

Observando os gráficos VI.5.a,b,c, ao se ligar o laser modulado, o sinal fotoacústico encontra-se num patamar mais alto. Quando liga-se a luz branca (DC), de saturação da fotossíntese, o sinal fotoacústico cai para um patamar mais baixo. Essa diferença corresponde ao efeito fotobárico, de evolução de O₂ para o interior de câmara fotoacústica. O sinal correspondente ao patamar mais baixo é a componente fototérmica que independe da saturação da fotossíntese. Quando a luz branca é desligada, a fotossíntese modulada volta a ocorrer e o sinal fotoacústico retorna ao patamar mais alto.

A figura VI.5.d mostra os resultados das médias das diferenças entre os patamares mais altos e os patamares mais baixos (componentes fotobáricas) para cada uma das medidas apresentadas nas figuras VI. 5.a,b,c, para as 3 diferentes potências na lâmpada DC utilizadas : 237 W, 321 W e 409 W respectivamente. Para o gráfico VI.5.c não foi considerado o último patamar no cálculo da média por estar muito fora do padrão.

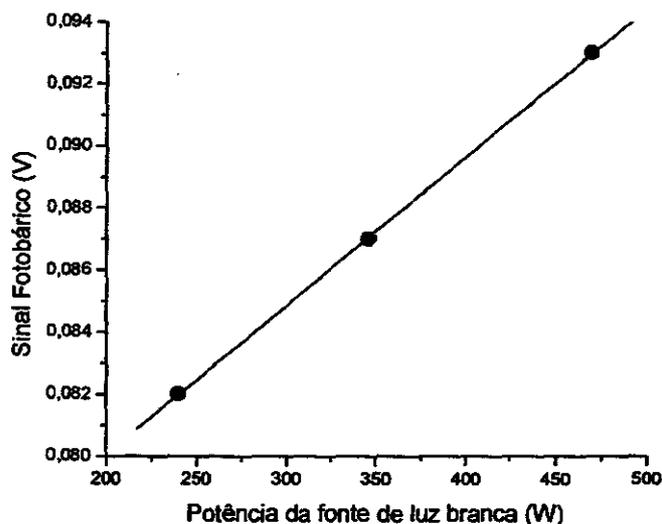


Figura VI.5.d: Gráfico do sinal fotobárico em função da potência da luz branca (DC) utilizada para a saturação da fotossíntese.

A tabela VI.5.1 apresenta os valores das potências utilizadas na lâmpada DC e os respectivos valores das componentes fotobáricas e os desvios (σ). E é instrutivo denotar que o sistema eletrônico amplifica cerca de 5000 vezes o sinal fotoacústico como detectado pelo microfone.

Tabela VI.5.1

Potência da Lâmpada (W)	Componente fotobárica (V)
237	0,082 \pm 0,003
321	0,087 \pm 0,004
409	0,093 \pm 0,004

Os dados acima mostram um comportamento linear com a potência da lâmpada e um desvio da ordem da 5%, no entanto as diferenças entre as componentes fotobáricas para as diferentes potências utilizadas são da ordem de grandeza dos desvios.

O gráfico VI. 5.e abaixo, mostra o sinal fotoacústico gerado utilizando-se um a potência de 430 W (LB) para saturação da fotossíntese. Antes do início das medidas, o palmito doce permaneceu cerca de uma hora no escuro, relaxando o sistema fotossintético da planta. A folha foi acoplada “in vivo” à célula fotoacústica aberta.

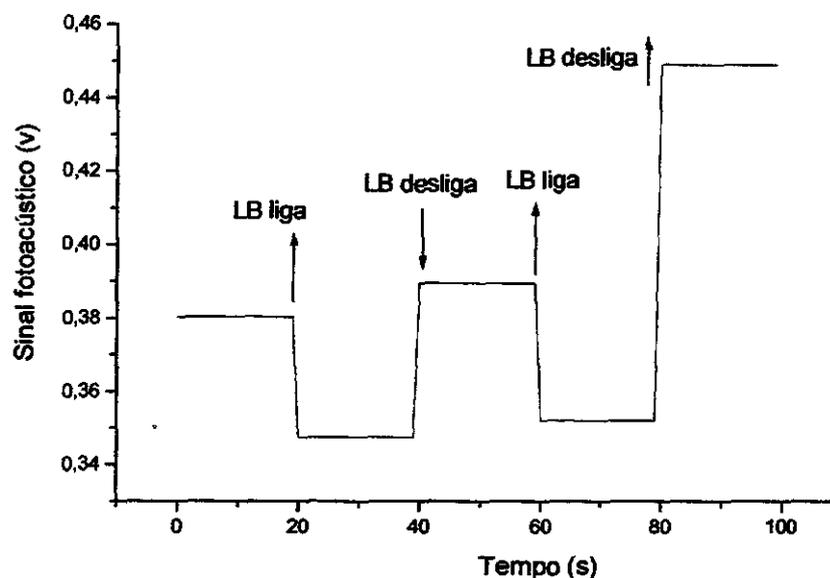


Figura VI. 5.e : Gráfico da evolução de O₂ em uma amostra de palmito doce com lâmpada de saturação (LB) nas condições de 34,5V e 12,46A.

As medidas com folhas de palmito, no entanto, apresentaram resultados ainda muito discrepantes, não permitindo um tratamento estatístico.

Capítulo VII -) Comentários e Conclusões :

No primeiro semestre foi realizada uma revisão bibliográfica e familiarização com o sistema de medidas; foi construído um viveiro para acomodação das plantas utilizadas; foram cultivadas amostras de Palmito doce e de Milho; foi realizada uma modificação no sistema mecânico de acoplamento da amostra, o que facilitou a fixação das amostras no sistema de medidas. No segundo semestre foram realizadas medidas de evolução de O₂.

Os resultados apresentados mostram a viabilidade da técnica fotoacústica para monitoramento da evolução de O₂ durante a fotossíntese. Mostram também que os esforços no sentido de sanar os problemas com a eletrônica dedicada ao sistema, que está sendo desenvolvida no LAS, estão surtindo efeito.

Medidas de consumo de CO₂ não foram apresentadas devido a prioridade na solução dos problemas com a parte da eletrônica dedicada às medidas de O₂. Cabe ressaltar que o desenvolvimento da eletrônica não faz parte do proposto neste projeto PIBIC. O desenvolvimento da eletrônica é tema de tese de mestrado do LAS. Este projeto utiliza o sistema para realizar medidas e, assim, também colaborar no desenvolvimento do sistema como um todo.

Como continuidade do projeto propomos a realização de mais medidas de evolução de O₂ e a realização das medidas de consumo de CO₂ pela espécie em estudo, durante a fotossíntese, medidas estas necessárias para testar o sistema.

Capítulo VIII-) Referências Bibliográficas

1. E.D.Bickford and S.Dunn ; in "*Lighting for Plant Growth* "(The Kent State University Press ,USA,1978.
2. P.S Nobel ; in "*Biophysical Plant Physiology and Ecology*" (W.H.Freeman and Company , USA ,1983.
3. J.A.Balderas-López;G.Gutiérrez-Juárez; J.J.Alvarado-Gil; J.Frías-Hernández; V.Olaide-Portugal; L.C.M.Miranda; M.D.Silva;I.Delgadillo; H.Vargas ; "*A new CO₂ analyser for measuring respiration rates in organic material*". Rev.Sci.Instrum. 67 (9), September 1996.
4. G.Ouzounidou; *Plant Science*.113 (1996) 229-237.
5. Relatório Científico FAPESP, processo N° 1995/9768-9
6. L.F. Perondi, L.C.M. Miranda; *J. Appl. Phys.* 62, 2955 (1987).
7. M.D. Silva, I.N. Bandeira, L.C.M. Miranda; *J. Phys. E* 20, 1476 (1987)
8. A.C.Pereira, M.Zerbetto, G.C.Silva, H.Vargas, W.J.Silva, G.ºNeto, N.Cella and L.C.Miranda; *Meas. Sci. Technol.* 3,931 (1992).
9. A.C.Pereira, L.M.Prioli, W.J.Silva, G.ºNeto, H.Vargas, N.Cella and J.J.Alvarado-Gil; *Plant Science* 96, 203 (1994).
10. A.C.Pereira, G.ºNeto, H.Vargas, N.Cella and L.C.M.Miranda; *Ver. Sci. Instrum.* 65(5), 1512 (1994).
11. W.J.Silva, L.M.Prioli, A.C.N.Magalhães, A.C.Pereira, H.Vargas, A.C Mansanares, N. Cella, L.C.M.Miranda and J.J.Alvarado-Gil; *Plant Science.* 104, 177 (1995).
12. J.Braun-Blanquet; in "*Fitosociologia bases para el estudio de las comunidades vegetales*",Madrid (1979).
13. N.Awad and P.R.C.Castro; "*Introdução à fisiologia vegetal*",1983.
14. B.S.Meyer, D.B.Anderson and R.H.Böhning; "*Introducción a la fisiologia vegetal*"Buenos Ayres, 1966).
15. W.A.Bueno; *Manual de espectroscopia vibracional*, 1989.
16. D.N.Kendall, Ph.D; *Applied Infrared Spectroscopy* (Reinhold Publishing Corporation, N.Y.,1996).
17. J.A.Balderas-López;G.Gutiérrez-Juárez; J.J.Alvarado-Gil; J.Frías-Hernández; V.Olaide-Portugal; L.C.M.Miranda; M.D.Silva;I.Delgadillo; H.Vargas ; "*A new CO₂ analyser for measuring respiration rates in organic material*". Rev.Sci.Instrum. 67 (9), September 1996.

18. G.Ouzounidou; *Plant Science*.113 (1996) 229-237.
19. Relatório Científico FAPESP, processo Nº 1995/9768-9
20. A.Sliwinski; P.Kwiek; A.Markiewicz; “*Acoustooptics and Applications*”, Sprig School (1989).
21. L.Lapointe; N.P.A.Huner; R.M.Leblanc; R.Carpentier; *Biochimica et Biophysica Acta*, 1142 (1993) 43-48.
22. J.Szurkowski; Z.Tukaj; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29 (1995) 406-410.
23. P.R.Barja; A.M.Mansanares; “*Photosynthetic energy storage and oxygen evolution determined through open photoacoustic cell technique*”UNICAMP,13083-970.
24. D.C. Fork and S.K. Herbert, *Photochemistry and Photobiology* **57(1)** ,207 (1993).
25. H.Vargas and L.C.M.Miranda; in “*Photoacoustic and related Photothermal Techniques*”, Phys. Reports **161(2)**, 43 (1988).
26. Y.H.Pao; in “*Opto-acoustic Spectroscopy and Detection*”(Academic Press, N.Y., 1977).
27. A.Rosencwaig; in “*Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*” (John Wiley, N.Y., 1980).
28. S.P. Claudia, Relatório Científico – PIBIC (Julho/ 2001)

APÊNDICE A -) Cronograma das atividades previstas que foram realizadas neste primeiro ano de bolsa.

Cronograma de atividades:												
Atividades	Meses											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	
Cultivo de Amostras no Viveiro	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Realização de Medidas	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	
Relatórios					X	X					X	X