

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caracterização fotoacústica de plantas crescidas sob
diferentes condições de luminosidade

Rickson Coelho Mesquita

Orientador: Prof. Dr. Antonio Manoel Mansanares

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Manoel Mansanares

Prof. Dr. Helion Vargas

Prof. Dr. Maurício Urban Kleinke

Instituto de Física “Gleb Wataghin” - IFGW
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Campinas, São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP

M562c

Mesquita, Rickson Coelho

Caracterização fotoacústica de plantas crescidas sob diferentes condições de luminosidade / Rickson Coelho Mesquita. – Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Antonio Manoel Mansanares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin".

1. Fotossíntese. 2. Espectroscopia fotoacústica.
3. Evolução de oxigênio. 4. Célula fotoacústica aberta.
I. Mansanares, Antonio Manoel. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". III. Título.

(vsv/ifgw)

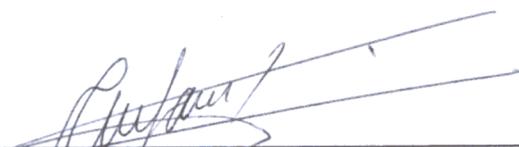
- **Título em inglês:** Photoacoustic characterization of plants adapted to different light intensity conditions
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
 1. Photosynthesis
 2. Photoacoustic spectroscopy
 3. Oxygen evolution
 4. Open photoacoustic cell
- **Área de concentração:** Física da matéria condensada
- **Titulação:** Mestre em física
- **Banca examinadora:**

Prof. Antonio Manoel Mansanares
Prof. Helion Vargas
Prof. Maurício Urban Kleinke
- **Data da defesa:** 10.03.2005

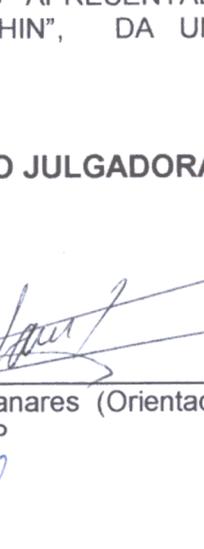


MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE RICKSON COELHO MESQUITA – RA 992399 APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 10 / 03 / 2005.

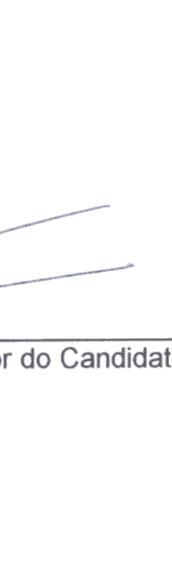
COMISSÃO JULGADORA:



Prof. Dr. Antonio Manoel Marsaneres (Orientador do Candidato) –
DEQ/IFGW/UNICAMP



Prof. Dr. Helion Vargas - UENF



Prof. Dr. Maurício Urban Kleinke – DFA/IFGW/UNICAMP

*“Fácil é sonhar todas as noites.
Difícil é lutar por um sonho.”*

Carlos Drummond de Andrade

Dedico este trabalho à memória de
Luiz Otávio de Moura Andrade,
que desde o início me incentivou a escrevê-lo.
Infelizmente, não poderá mais lê-lo.

Agradecimentos

Quando começo a pensar nos difíceis estágios pelos quais passei neste projeto, não posso deixar de agradecer às pessoas que foram importantes na minha vida nesse período:

Aos meus pais, agradeço a oportunidade de poder chegar onde cheguei até agora. Ao meu avô João, minhas avós Dulce e Maria Luiza, aos meus tios e primos, agradeço a educação e o apoio que recebi. Graças a todos eles, pude navegar em alto-mar, longe de casa, de forma confiante, pois sempre me mostraram que haveria um porto seguro caso houvessem rochedos em meu caminho. Ao mesmo tempo, aprendi com eles que não há obstáculos que não possam ser contornados.

Ao meu orientador, prof. Antonio Manoel Mansanares, ou simplesmente Antonio, pela confiança depositada desde o início do trabalho (que espero ter correspondido) e pela amizade, que me fez admirá-lo e respeitá-lo a cada dia mais. Gostaria de agradecer também pelas discussões e pelos “puxões de orelha”, que foram extremamente úteis e importantes não só para o desenvolvimento do projeto mas também para o crescimento de minha formação como pesquisador.

Ao meu “segundo orientador”, prof. Edson Corrêa da Silva, pelos conselhos e pelo apoio psicológico nos momentos mais críticos, principalmente aos sábados, domingos e feriados que passamos juntos no laboratório. À Dinah pela paciência e apoio, sempre. A todos os meus companheiros de trabalho no Grupo de Fototérmica e Ressonância Magnética (GFRM): Danilo Luchesi, Vagner, André, Manoel, Max, Júlio, Laura e Lázaro, que contribuíram com o desenvolvimento desse projeto, sempre tornando a rotina do laboratório

mais fácil. Em especial, ao Rafael Derradi, sempre solícito, que foi importante com seus conselhos e sua companhia, principalmente durante a parte final do desenvolvimento desta dissertação. A ele também devo toda a ajuda computacional com a manipulação das figuras que estão nas próximas páginas.

Ao Departamento de Genética da ESALQ, pelo fornecimento das plantas de tabaco e pela ajuda no início do trabalho. Em especial, ao prof. Carlos Alberto Labate, ao Juliano e à Karina pela atenção nas inúmeras visitas à Piracicaba. À prof. Sandra M. Carmello-Guerreiro (IB-Unicamp) e Luciana Uehara, pelo fornecimento das plantas congenéricas e suas fotomicroscopias. Ao Fabiano Scarpa, a quem devo técnicas e algumas boas idéias em relação à manipulação com plantas. Ao prof. Paulo Barja, pela atenção e prontas respostas nos meus momentos de dúvidas.

Não posso deixar de agradecer aos grandes amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o meu crescimento moral e intelectual. Aos colegas do futebol de todas as terças e sextas, pela brincadeira e amizade. Ao Lucas, Alexandre Filizola, Raquel, George, Sergio, Rafael e a tantos outros amigos que conheci na APGF, com quem compartilhei alegrias, problemas e dúvidas. Foi esta etapa da vida uma prova difícil, e vocês me ensinaram, a cada dia, que não se pode ser feliz sozinho. Ao Marson e ao Hugo, amigos fiéis e a quem devo realmente dizer “Muito Obrigado” pelo carinho e atenção nestes últimos dois anos. Graças aos dois, aprendi que “um homem não pode se dividir em dois”. Um agradecimento especial à Cris, que esteve ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida durante este tempo, a quem, acima de tudo, considero uma grande amiga.

Por fim, gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

O nível de iluminação das plantas é determinante da estrutura das folhas, em particular no tocante à quantidade e distribuição dos cloroplastos. O objetivo deste projeto é utilizar a técnica fotoacústica para demonstrar as diferenças fisiológicas entre plantas adaptadas a diferentes condições de irradiância. Plantas de tabaco foram cultivadas em dois níveis distintos de irradiância. Plantas congênicas, provenientes de habitats diferentes (cerrado e mata atlântica), crescidas sob o mesmo nível de exposição à luz, também foram estudadas. Como a técnica fotoacústica é sensível ao O_2 produzido na fotossíntese, a resposta dos sistemas fotossintéticos das plantas de diferentes condições foi avaliada por meio de medidas fotoacústicas de indução fotossintética. A quantidade de energia armazenada também foi determinada nessas plantas. A partir da contribuição da evolução de O_2 para o sinal fotoacústico, obtivemos espectros de ação para as diferentes amostras.

Os resultados mostraram que plantas adaptadas a ambientes de sol são menos eficientes em armazenar energia para as reações fotoquímicas. As curvas de indução indicaram que essas plantas demoram um tempo maior para atingir um estado estacionário de produção de O_2 . Experimentos de fotoinibição mostraram que plantas adaptadas a baixas irradiâncias são mais sensíveis ao excesso de luz saturante. Foi observada uma absorção de O_2 após a saturação fotossintética em plantas de tabaco de sol, associada a uma provável competição entre fotossíntese e fotorrespiração. Os espectros de ação, obtidos pela primeira vez a partir de medidas fotoacústicas de produção de O_2 , mostraram uma boa concordância com a literatura (valores obtidos por outras técnicas).

Abstract

Illumination level of plants during its growth is determinant for structure of leaves, specially referring to quantity and distribution of chloroplasts. The aim of this project is to use the photoacoustic technique to show physiological differences among plants adapted to different light intensity conditions. Tobacco plants were grown up under two distinct irradiance levels. Congeneric plants, coming from different habitats (cerrado and florest), grown up under the same light level, were also studied. Since photoacoustic technique is sensitive to O_2 produced by photosynthesis, photosynthetic response of plants from different light conditions were studied through PA measurements of photosynthetic induction. The energy storage was also determined in these plants. From the oxygen component of the photoacoustic signal it was possible to obtain action spectra for all the samples.

Results showed that plants adapted to sunlight present lower efficiency in storing energy to photochemical reactions. The induction curves indicated these plants also take a longer time to reach a steady state of O_2 production, after remaining a period in the dark. Photoinhibition experiments showed that plants grown up under lower light are more susceptible to excess of saturating light. It was also observed O_2 uptake after photoinhibition in plants grown under full sunlight, which was associated to a competition between photosynthesis and photorespiration. The action spectra, obtained for the first time with photoacoustic measurements of O_2 production, showed a good agreement with literature.

Sumário

Resumo	viii
Abstract	ix
Apresentação	1
1 Aspectos gerais da fotossíntese	4
1.1 Introdução	4
1.2 A estrutura vegetal	5
1.3 A parte fotoquímica da fotossíntese	9
1.3.1 A absorção da luz	10
1.3.2 O efeito Emerson: a descoberta de dois fotossistemas	12
1.3.3 O transporte de elétrons e prótons no cloroplasto	13
1.3.4 A separação espacial dos dois fotossistemas	17
1.4 A parte enzimática da fotossíntese	18
1.5 Fotorrespiração	20
1.6 Fatores que influenciam a fotossíntese	21
2 Fotoacústica aplicada à fotossíntese	23
2.1 Um pouco de história	23
2.2 O sinal fotoacústico em folhas	25
2.2.1 A componente fototérmica	25

2.2.2	A componente fotobárica	27
2.3	Materiais e métodos	28
2.3.1	Montagem Experimental	28
2.3.2	A Célula Fotoacústica Aberta	29
2.3.3	Amostras utilizadas	34
3	Curvas de atividade fotossintética	36
3.1	Dependência da fotossíntese com a luz	36
3.1.1	Fotoinibição e fotoproteção	38
3.2	Diferenças anatômicas entre folhas de sol e de sombra	39
3.3	Determinação da energia armazenada	42
3.4	Curvas de indução fotossintética	46
3.5	Estudo da componente fotobárica e o efeito de fotoinibição	49
3.5.1	Medidas em plantas de tabaco	50
3.5.2	Análise da curva de fotoinibição em plantas de tabaco	53
3.5.3	Medidas em plantas Zeyheria	56
4	Espectroscopia fotoacústica	58
4.1	Espectros de ação	60
5	Conclusão e perspectivas	66
	Bibliografia	71

Lista de Figuras

1.1	Representação diagramática de uma célula vegetal (extraído da referência [3]).	6
1.2	Esquerda: Desenho esquemático mostrando a organização das membranas no cloroplasto. Direita: Cloroplasto visto através do microscópio eletrônico, onde é possível ver os grana formados pelos tilacóides (extraído das referências [3] e [4]).	7
1.3	Representação esquemática de um corte transversal de uma folha (extraído da referência [3]).	9
1.4	Desenho esquemático mostrando o conceito de transferência de energia durante a fotossíntese (extraído da referência [3]).	10
1.5	Desenho esquemático dos níveis de energia da molécula de clorofila (extraído da referência [4]).	11
1.6	Efeito de entrelaçamento descoberto por Emerson (extraído da referência [3]).	13
1.7	Esquema Z da fotossíntese, mostrando a representação esquemática da transferência eletrônica entre os PSI e PSII (extraído da referência [3]). . .	14
1.8	Representação esquemática do relógio de oxidação da água (extraído da referência [4]).	15

1.9	Desenho esquemático mostrando a transferência de elétrons e prótons no tilacóide, que deve-se basicamente a quatro complexos de proteínas: PSII, citocromo b_6f , PSI e ATP-sintase (extraído da referência [3]).	16
1.10	Representação da membrana tilacoidal, mostrando a concentração dos fotossistemas e dos principais complexos associados com a fotossíntese (extraído da referência [3]).	18
1.11	Ciclo de Calvin ou ciclo do carbono: seqüência de reações (extraído da referência [4]).	19
2.1	Diagrama esquemático representando a montagem experimental utilizada.	28
2.2	Seção transversal esquemática de um microfone de eletreto (esquerda) e da geometria de uma OPC (direita).	30
2.3	Diagrama esquemático da célula fotoacústica utilizada para medidas em alta freqüência.	33
3.1	Curva de saturação fotossintética em função da intensidade de luz incidente.	37
3.2	Foto comparativa de uma planta de tabaco cultivada no sol (esquerda) com outra cultivada na sombra (direita).	40
3.3	Fotomicrografias da seção transversal de uma folha de tabaco cultivada no sol. Aumentos de 10x1 (esquerda) e 40x1,6 (direita).	41
3.4	Fotomicrografias da seção transversal de uma folha de tabaco cultivada na sombra. Aumentos de 10x1 (esquerda) e 40x1,6 (direita).	41
3.5	Fotomicrografia da seção transversal de uma folha de <i>Zeyheria digitalis</i> (esquerda) e <i>Zeyheria tuberculosa</i> (direita). Aumento de 20x1.	42
3.6	Exemplo de efeito positivo numa folha de tabaco de sombra. A freqüência de modulação foi de 350 Hz, a intensidade de luz modulada foi de $39 W/m^2$ e a intensidade da luz contínua foi de $430 W/m^2$ (ligado = luz contínua ligada; desligado = luz contínua desligada).	44

3.7	Inverso do efeito positivo em função da intensidade de luz modulada para uma folha de tabaco de sol (esquerda) e sombra (direita). A frequência de modulação foi de 350 Hz, o laser de diodo foi utilizado como fonte de luz modulada e a intensidade da luz de saturação foi de $430 W/m^2$. As barras de erro representam os desvios em relação às medidas feitas em 7 folhas, de 5 plantas diferentes.	45
3.8	Exemplo da curva de indução fotossintética para uma folha de tabaco cultivada no sol (esquerda) e na sombra (direita). Os símbolos são pontos experimentais, enquanto a curva sólida representa o ajuste da indução fotossintética a partir da equação 3.3.	47
3.9	Exemplo da curva de indução fotossintética para uma folha de <i>Zeyheria digitalis</i> (esquerda) e outra de <i>Zeyheria tuberculosa</i> (direita). Os símbolos são pontos experimentais, enquanto a curva sólida representa o ajuste da indução fotossintética a partir da equação 3.3.	48
3.10	Amplitude (esquerda) e fase (direita) do efeito negativo e fotoinibição para uma folha de tabaco cultivada no sol. As retas em azul representam, para esta folha, os valores do sinal estacionário (e), térmico (t) e de fotoinibição, após ser desligada a luz de saturação (f).	51
3.11	Amplitude (esquerda) e fase (direita) do efeito negativo e fotoinibição para uma folha de tabaco cultivada na sombra. As retas em azul representam, para esta folha, os valores do sinal estacionário (e), térmico (t) e de fotoinibição, após ser desligada a luz de saturação (f).	51
3.12	Amplitude (esquerda) e fase (direita) da componente fotobárica para uma folha de tabaco cultivada no sol.	53
3.13	Amplitude (esquerda) e fase (direita) da componente fotobárica para uma folha de tabaco cultivada na sombra.	54

3.14	Efeito negativo numa folha de tabaco adaptada ao sol, para três diferentes tempos de exposição à luz de saturação.	55
3.15	Exemplo da curva de efeito negativo e fotoinibição para uma folha de Zeyheria digitalis.	56
3.16	Exemplo da curva de efeito negativo e fotoinibição para uma folha de Zeyheria tuberculosa.	57
4.1	Espectro fotoacústico obtido com incidência direta na membrana da OPC, utilizado para normalizar os espectros das folhas.	59
4.2	Espectro fotoacústico de uma folha de tabaco obtido com a OPC.	60
4.3	Espectros fotoacústicos em folhas de tabaco cultivadas no sol (esquerda) e na sombra (direita), na ausência de luz contínua de saturação (curvas A) e com a presença desta (curvas B).	61
4.4	Espectros de oxigênio em plantas de tabaco de sol (L) e de sombra (S), obtidos a partir dos espectros da figura 4.3.	62
4.5	Medidas de efeito negativo obtidos para a planta de floresta Zeyheria tuberculosa em três comprimentos de onda diferentes.	63
4.6	Espectros de oxigênio em plantas Zeyheria digitalis (C) e Zeyheria tuberculosa (F). Os símbolos representam o efeito negativo da figura 4.5 normalizado pelas intensidades de emissão da lâmpada de Xenônio.	64
4.7	Espectros de ação para diferentes tipos de plantas obtidos através de medidas de absorção de CO_2 (extraído da referência [4]).	65
5.1	Fase da componente fotobárica do sinal fotoacústico para plantas de tabaco cultivadas no sol e na sombra, em função da frequência de modulação incidente.	69

Lista de Tabelas

3.1	Dados obtidos pelo ajuste da curva de indução fotossintética. O erro representa o desvio com relação à média para 10 (6) medidas, num total de 6 (3) plantas de tabaco (<i>Zeyheria</i>) utilizadas.	48
3.2	Valores obtidos para o sinal fotobárico e fotoinibição em plantas de tabaco. O erro representa o desvio com relação à média para 8 medidas, num total de 6 plantas utilizadas.	52
3.3	Valores obtidos para o sinal fotobárico e fotoinibição em plantas <i>Zeyheria</i> . O erro representa o desvio com relação à média para 5 medidas, num total de 3 plantas utilizadas.	57

Apresentação

O efeito fotoacústico tem se mostrado como uma técnica bastante útil na investigação de sistemas biológicos, devido às suas características próprias, tanto em estudos espectroscópicos quanto em outras aplicações. Uma dessas características vantajosas é o fato da técnica prescindir, de um modo geral, de preparação especial da amostra, o que lhe confere um caráter não-destrutivo. Outra grande vantagem é o fato de que o sinal obtido depende somente da energia incidente que é absorvida, sendo que a parte refletida/espalhada e transmitida não interfere no resultado. Assim sendo, pode-se analisar sem dificuldade amostras altamente espalhadoras de luz, como é o caso das folhas vegetais. Uma terceira característica importante da técnica é a capacidade que ela apresenta de selecionar o sinal proveniente de uma certa camada da amostra, ou seja, de obter o seu perfil de profundidade. Isto pode ser feito através da análise da fase do sinal, ou através da escolha da frequência de modulação apropriada. Esta capacidade é particularmente útil em amostras estratificadas, que também é o caso das folhas vegetais.

Muitos trabalhos têm sido publicados relatando o uso do efeito fotoacústico no estudo de plantas. Em vários deles a espectroscopia fotoacústica é usada na quantificação relativa dos diferentes pigmentos encontrados nas folhas, notadamente a clorofila, bem como na análise da distribuição espacial dos mesmos. Uma contribuição significativa nesta linha de pesquisa foi o desenvolvimento de uma Célula Fotoacústica Aberta, na qual a amostra forma uma das paredes da célula. Com esta célula pode-se estudar folhas vegetais intactas (convencionalmente as amostras eram formadas de pequenos discos de folhas

cortadas), mantidas na própria planta (medida *in vivo* e *in situ*). A importância desta nova configuração experimental repousa não somente na capacidade de manutenção das condições normais da amostra durante o experimento, mas também na possibilidade de acompanhamento de longa duração numa mesma planta sujeita a determinadas condições de crescimento.

O efeito fotoacústico é sensível às variações de pressão produzidas numa câmara (célula) devidas à absorção de luz por parte da amostra. No caso geral, esta variação de pressão é produzida pela elevação de temperatura decorrente da transformação da energia luminosa absorvida em calor. No caso de folhas vegetais, a luz absorvida dá origem a reações fotoquímicas no interior dos cloroplastos, reações estas que liberam O_2 . Esse oxigênio liberado também produz aumento de pressão no gás da célula, dando origem a um segundo componente do sinal fotoacústico. Desta forma, o sinal medido depende diretamente do oxigênio produzido na fotossíntese, ou seja, ele revela a taxa de atividade fotossintética da folha.

As aplicações do efeito fotoacústico no estudo da atividade fotossintética dividem-se basicamente em dois grupos: i) medidas em baixas frequências de modulação (dezenas de Hz), nas quais o componente de produção de oxigênio é detectado. Este tipo de medida monitora a atividade do Fotossistema II, onde ocorre a quebra da molécula de água e a produção de O_2 ; ii) medidas em altas frequências de modulação (centenas de Hz): neste caso, o sinal de evolução de oxigênio é fortemente atenuado, e somente a componente térmica é detectada. Destas medidas pode-se avaliar a fração da energia luminosa que é armazenada na fotossíntese (energia fotoquímica armazenada).

Sabemos que o nível de iluminação das plantas durante o crescimento é determinante da morfologia e estrutura das folhas, em particular no tocante à quantidade e distribuição dos cloroplastos. O objetivo deste trabalho é utilizar a técnica fotoacústica para demonstrar as diferenças morfológicas e estruturais entre plantas adaptadas a diferentes condições de irradiância. No capítulo 1 apresentamos conceitos básicos de fo-

tossíntese, fundamentais para o entendimento dos resultados obtidos. O capítulo 2 introduz princípios da técnica fotoacústica, explicita a contribuição das componentes do sinal fotoacústico, bem como apresenta a montagem experimental utilizada e as amostras estudadas. O capítulo 3 enfoca a dependência das plantas com a luz, e mostra resultados obtidos que revelam o desempenho fotossintético de plantas adaptadas a distintos graus de luminosidade. Os resultados de espectroscopia, enfocando a separação das diferentes componentes do sinal fotoacústico, são mostrados no capítulo 4. Por fim, o capítulo 5 apresenta as principais conclusões obtidas e perspectivas futuras para uma continuação do trabalho desenvolvido.

Capítulo 1

Aspectos gerais da fotossíntese

1.1 Introdução

Para a manutenção da vida, um constante fornecimento de energia é requerido. Uma diferença fundamental entre plantas e animais é a forma como essa energia é obtida. Os animais obtêm os compostos orgânicos através dos alimentos, enquanto a energia química (ATP, do inglês “adenosine triphosphate”) é obtida através da respiração. As plantas absorvem energia em forma de luz solar, convertendo-a em energia química num processo denominado fotossíntese.

Assim, a fotossíntese pode ser entendida como um processo físico-químico pelo qual as plantas utilizam energia luminosa a fim de sintetizar compostos orgânicos. Em plantas, algas e certos tipos de bactérias, a fotossíntese resulta na evolução de oxigênio (O_2), enquanto gás carbônico é removido da atmosfera e utilizado na síntese de compostos orgânicos (carboidratos). Esse processo é, na verdade, composto por uma cadeia de reações de oxi-redução que pode ser resumida através da reação:



O processo fotossintético citado acima consiste em dois estágios principais, que são interligados: a oxidação da molécula de água, mediada pela luz e liberando O_2 , com a

conseqüente produção de ATP; e a redução do CO_2 em moléculas orgânicas, onde o ATP produzido na etapa anterior é utilizado¹.

De uma forma direta ou indireta, a fotossíntese supre todas as nossas necessidades alimentares e nos fornece inúmeras quantidades de fibras e materiais utilizados pelo homem, como o algodão, a madeira, o carvão e o papel (celulose), por exemplo. A energia armazenada no petróleo e seus derivados, no gás natural e lenha, que são utilizados como combustíveis em várias partes do mundo, veio a partir do sol via fotossíntese. Entre outros assuntos que podem se associar ao estudo da fotossíntese, podemos citar a busca por componentes eletrônicos cada vez menores e mais eficientes. Afinal, a eletrônica se baseia em mecanismos chaveadores, e os centros de reação fotossintética nada mais são que “chaves naturais” de dimensões moleculares.

Uma vez que a fotossíntese afeta a composição atmosférica, o seu entendimento também é essencial para compreendermos como o ciclo do CO_2 e outros gases, que causam o efeito estufa, afeta o clima global do planeta. Assim sendo, a pesquisa científica neste tema possui uma importância vital [1]. Se pudermos entender e controlar o processo fotossintético, saberemos como aumentar a produtividade de alimentos, fibras, madeira e combustível, além de aproveitar melhor as áreas cultiváveis. O sistema de coleta de energia pelas plantas pode ser adaptado aos sistemas humanos para fornecer modos eficientes de aproveitamento da energia solar.

1.2 A estrutura vegetal

Os vegetais são seres eucarióticos e possuem uma típica organização celular eucariótica, com uma separação funcional entre o núcleo e o citoplasma, como pode ser visto na figura

¹Oxidação é a remoção ou perda de elétrons ou átomos de hidrogênio (próton + elétron) ou adição de oxigênio, assim como podemos definir redução como a adição ou ganho de elétrons ou átomos de hidrogênio ou remoção de oxigênio. O agente redutor ao doar elétrons se oxida, enquanto o agente oxidante, ao receber elétrons, se reduz.

1.1 [2]. O conteúdo nuclear das células vegetais está relacionado com o crescimento e desenvolvimento dos organismos, pois contém a maioria do material genético destes. O citoplasma é protegido pela membrana plasmática e composto por várias organelas, que apresentam cada uma sua função celular. Entre as principais organelas citoplasmáticas podemos destacar: os retículos endoplasmáticos (liso e rugoso) e o complexo de Golgi, que estão relacionados com a secreção de proteínas; a mitocôndria, que é responsável pela respiração celular; os plastídeos, e entre eles os cloroplastos, que são organelas ausentes nas células animais e é o local onde ocorre fotossíntese; além de um grande vacúolo central, responsável por armazenar água e solutos úteis às células.

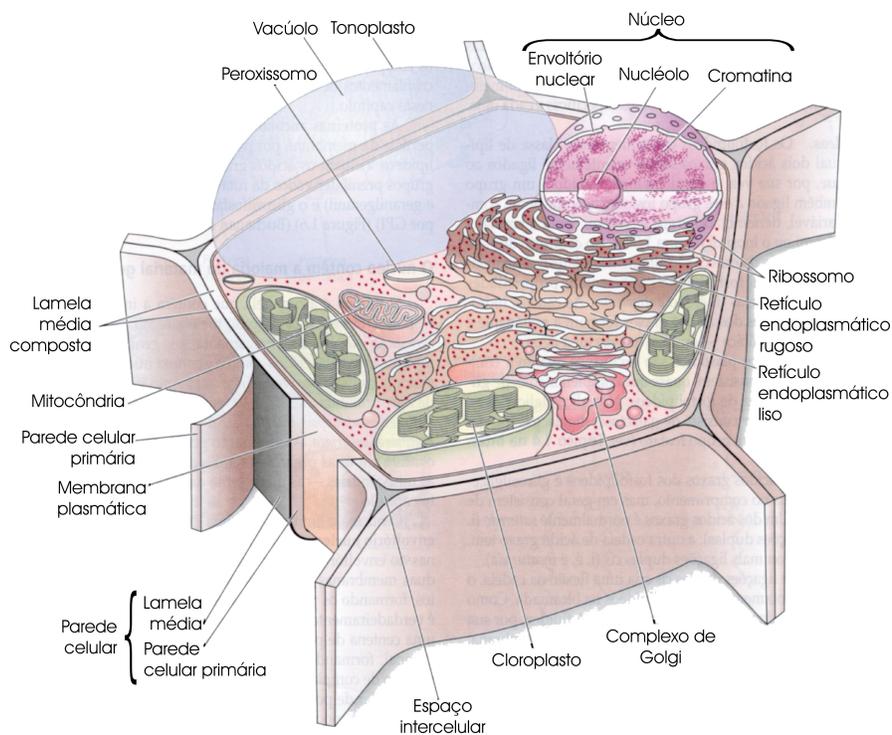


Figura 1.1: Representação diagramática de uma célula vegetal (extraído da referência [3]).

A célula vegetal possui duas principais organelas que desempenham funções do ponto de vista energético: mitocôndrias e cloroplastos. Essas organelas podem ser chamadas de semi-autônomas, pois contêm seu próprio DNA (no entanto, a maioria das proteínas

utilizadas por estas células ainda é codificada pelo DNA do núcleo; daí o nome semi-autônomo). Como já foi mencionado, as mitocôndrias são responsáveis pela respiração, um conjunto de reações de oxi-redução para a obtenção de energia a partir de uma fonte energética orgânica e que ocorre obrigatoriamente em todas as células. Essas reações consistem basicamente na transferência de H^+ de um composto orgânico para outro, com desprendimento de energia.

Já os cloroplastos pertencem a um grupo de organelas denominado plastídeos. A figura 1.2 mostra a estrutura de um cloroplasto, com toda a complexidade de sua organização. Essas organelas são estruturas com duas membranas - uma interna e outra externa -, também conhecidas como envelopes, que são compostas por duas camadas de lipídios. Além dos envelopes, os cloroplastos possuem um terceiro sistema de membranas chamado tilacóides. É nos tilacóides que estão presentes proteínas e pigmentos responsáveis pelos eventos fotoquímicos da fotossíntese (clorofilas e carotenóides), formando estruturas chamadas de “complexos de antena” ou “antena”. Uma pilha de tilacóides forma um granum.

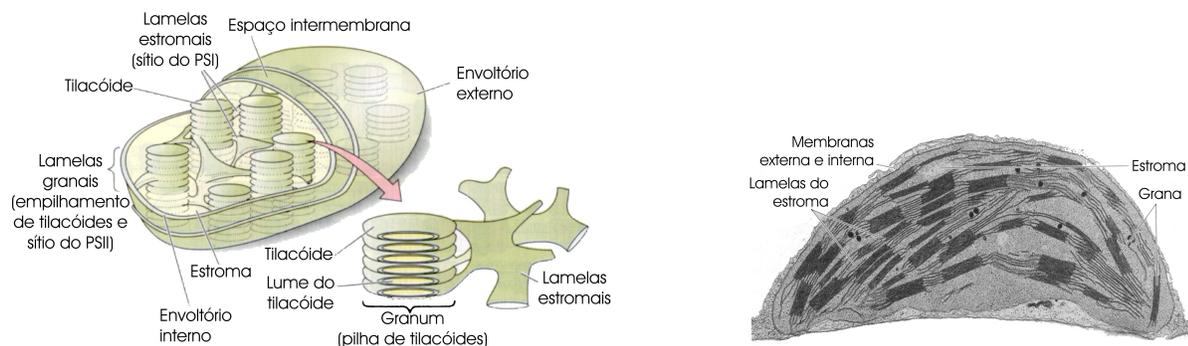


Figura 1.2: Esquerda: Desenho esquemático mostrando a organização das membranas no cloroplasto. Direita: Cloroplasto visto através do microscópio eletrônico, onde é possível ver os grana formados pelos tilacóides (extraído das referências [3] e [4]).

Grana adjacentes são conectados por membranas chamadas de estroma lamelae. Todo este conjunto de membranas encontra-se mergulhado em um fluido gelatinoso que preenche o cloroplasto, chamado de estroma, onde há enzimas, DNA, pequenos ribossomos e amido.

Os diferentes componentes do aparato fotossintético estão localizados em diferentes regiões dos grana e do estroma lamelae. A principal enzima energética do cloroplasto (ATP sintase) está localizada nos tilacóides. Durante a fotossíntese, reações de transferência de elétrons, mediadas pela luz, resultam num gradiente de prótons através dos tilacóides, como será visto adiante.

Os tecidos celulares são formados por um conjunto de células que desempenham basicamente a mesma função. No caso dos vegetais, podemos identificar três principais sistemas de tecidos, encontrados em todos os organismos: o tecido dérmico, o tecido fundamental e o tecido vascular. O conjunto desses tecidos forma os órgãos vegetais, que por sua vez compõem o corpo da planta. Os vegetais superiores são compostos por pelo menos três órgãos: raiz, caule e folha. A função principal da raiz é ancorar a planta e absorver água e sais minerais; o caule é responsável pelo suporte, enquanto que a folha tem como principal função a fotossíntese.

Os principais constituintes da folha podem ser vistos na figura 1.3. Sua estrutura básica apresenta três camadas: epiderme, mesófilo e feixes vasculares. Na superfície superior (adaxial) da folha, diretamente exposta à luz solar, há uma camada de cera (cutícula), cuja função é absorver a radiação ultra-violeta proveniente do sol. O tecido fotossinteticamente ativo nas plantas é o mesófilo das folhas. As células do mesófilo contêm muitos cloroplastos, que concentram-se principalmente no parênquima paliçádico, logo abaixo da epiderme adaxial. Os tecidos vasculares (xilema e floema) situam-se mais ao centro da folha. A transpiração da folha é regulada principalmente pelas células guardas, que controlam o tamanho e a abertura dos estômatos, responsáveis pela demanda fotossintética de CO_2 e a saída de O_2 , ao mesmo tempo em que minimizam a perda de água para a atmosfera.

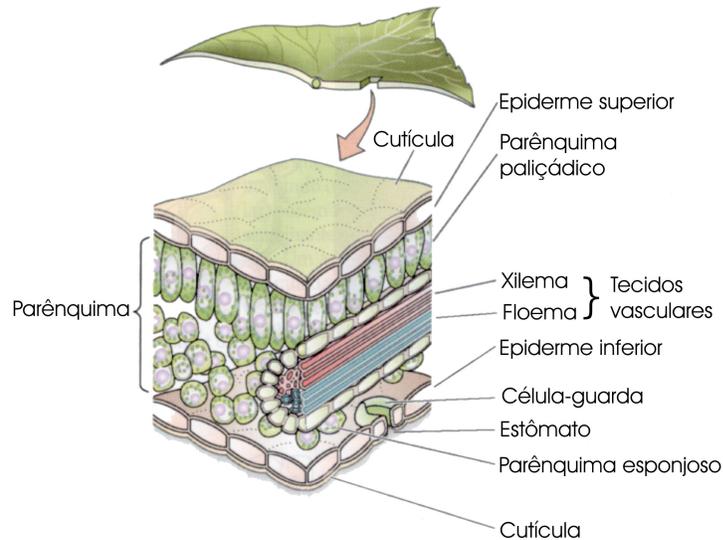


Figura 1.3: Representação esquemática de um corte transversal de uma folha (extraído da referência [3]).

1.3 A parte fotoquímica da fotossíntese

Como já foi mencionado, dois principais estágios sequenciais ocorrem nos cloroplastos: primeiro, certos comprimentos de onda provenientes da luz são absorvidos, e a energia luminosa é convertida em energia química por uma série de passos chamados de reações de luz ou fase fotoquímica. Essas reações são processadas nas membranas internas do cloroplasto (tilacóides); depois, o CO_2 é fixado e reduzido a compostos orgânicos, particularmente açúcares, por uma série de passos chamados de reações de fixação de CO_2 , ou ainda fase enzimática. Esse processo ocorre independentemente de luz, na matriz fluida do cloroplasto (estroma).

A fase fotoquímica da fotossíntese tem como principal função converter energia luminosa em energia química, ou seja, converter luz em ATP. Para isto, as plantas possuem pigmentos fotossintéticos que coletam a luz usada na fotossíntese. O pigmento mais im-

transição para um estado de mais alta energia, ou estado excitado. Como a energia do fóton é inversamente proporcional ao comprimento de onda, $E = hc/\lambda$, onde h é a constante de Planck e c a velocidade da luz, a absorção de luz azul excita a clorofila para um estado de mais alta energia que a de luz vermelha. Neste estado de mais alta energia, a molécula é extremamente instável (apresenta uma meia-vida $\tau \approx 10^{-12}s$), perdendo parte da energia absorvida na forma de calor e decaindo para um estado excitado de mais baixa energia (figura 1.5). A clorofila se mantém nesse estado - metaestável - por vários nanosegundos, podendo decair até o estado fundamental por diversas vias:

- convertendo diretamente a energia de excitação em calor, sem emissão de um fóton;
- emitindo um outro fóton, com energia menor que o absorvido (devido à lei de conservação de energia), num processo conhecido como fluorescência;
- transferindo a energia para uma outra molécula adjacente, num processo conhecido como transferência por ressonância.

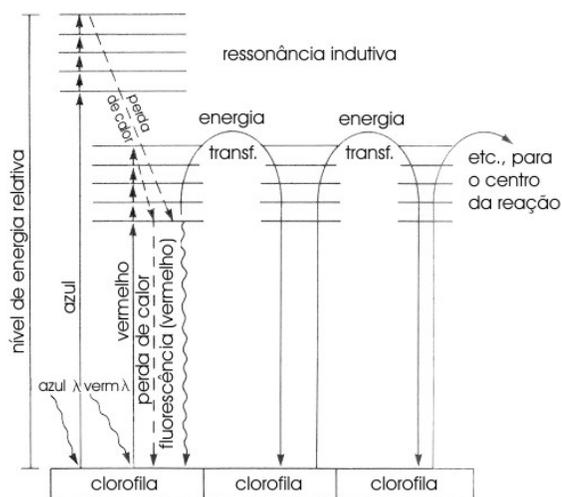


Figura 1.5: Desenho esquemático dos níveis de energia da molécula de clorofila (extraído da referência [4]).

Este último processo é significativo, sendo o mecanismo pelo qual a energia coletada por dezenas ou centenas de moléculas é canalizada ao centro de reação. Pode-se destacar que as etapas iniciais do armazenamento fotossintético de energia estão entre as reações mais rápidas já conhecidas.

As reações fotoquímicas da fotossíntese ocorrem nos centros de reação fotossintética, que nada mais são do que proteínas em forma de pigmentos que ocupam um espaço limitado nas membranas do tilacóide. É nesses centros de reação que a energia absorvida é utilizada para iniciar a transferência de elétrons. São formados por moléculas de clorofila *a* especializadas; no entanto, para cada molécula de clorofila presente num centro de reação, há cerca de outras 300 no cloroplasto participando do sistema de antenas (LHC, do inglês “Light-Harvesting Complex”). Assim, a grande maioria das clorofilas atua no sistema captador de luz, e não como parte dos centros de reação. Temos então um processo extremamente eficiente, pois se cada clorofila captadora de luz tivesse um centro de reação associado a ela, as enzimas associadas a esse sistema estariam inativas a maior parte do tempo, sendo ativadas apenas através da absorção de um fóton.

1.3.2 O efeito Emerson: a descoberta de dois fotossistemas

No final da década de 1950, um experimento realizado por Emerson mostrou um resultado desconhecido, denominado a partir de então como efeito de entrelaçamento ou efeito Emerson [6]. Ele mediu a taxa de atividade fotossintética utilizando dois comprimentos de onda diferentes de forma independente, e depois usando os dois feixes juntos. Quando esses feixes eram utilizados ao mesmo tempo, a taxa fotossintética era maior que a soma das taxas quando eram utilizados separadamente (figura 1.6). Emerson utilizou luz nos comprimentos de onda de 680 nm (vermelho) e de 700 nm (vermelho distante). Essas observações foram explicadas na década de 1960, quando se descobriu que dois complexos fotoquímicos, hoje conhecidos como fotossistemas I e II (PSI e PSII, respectivamente), operam em série para aumentar a eficiência da transferência de elétrons no processo.

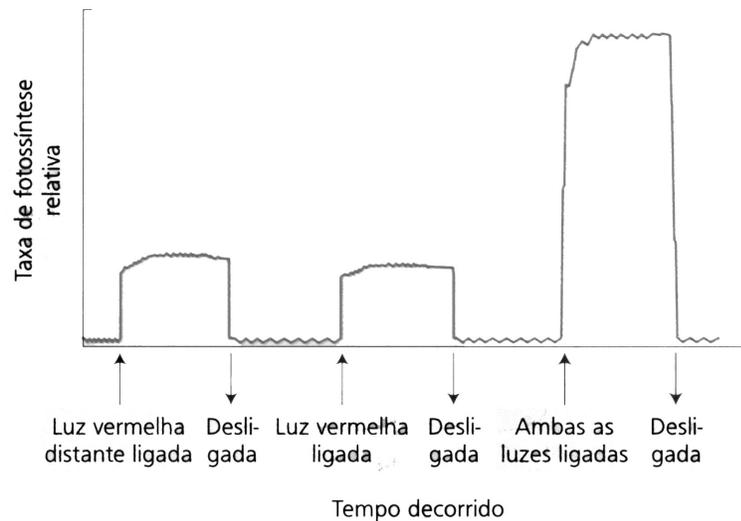


Figura 1.6: Efeito de entrelaçamento descoberto por Emerson (extraído da referência [3]).

O PSI absorve preferencialmente comprimentos de onda perto do infravermelho, maiores que 680 nm; já o PSII absorve comprimentos de onda entre 670 e 680 nm. Esta dependência explica o efeito de entrelaçamento. Outra diferença entre os dois fotossistemas é que o PSI produz um forte redutor, capaz de reduzir a molécula $NADP^+$, enquanto o PSII produz um forte oxidante, capaz de oxidar a água.

1.3.3 O transporte de elétrons e prótons no cloroplasto

A figura 1.7 mostra o transporte de elétrons realizado na fotossíntese, que relaciona os dois fotossistemas. Este esquema é conhecido como esquema Z, e é a base para o entendimento de organismos fotossintéticos com evolução de oxigênio. Fótons excitam os pigmentos fotossintéticos, que transferem sua energia para os centros de reação (P680 para o PSII, e P700 para o PSI). Estes números estão relacionados com o comprimento de onda máximo que o fotossistema é capaz de absorver (680 nm para o PSII e 700 nm para o PSI).

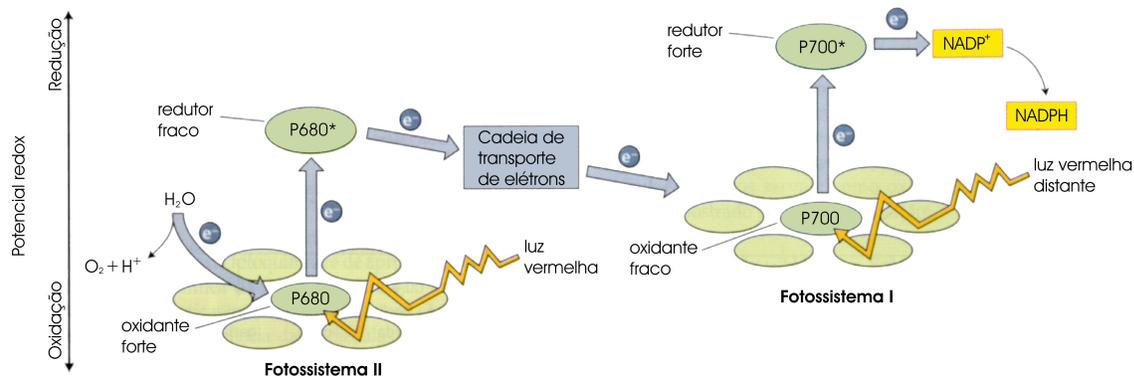


Figura 1.7: Esquema Z da fotossíntese, mostrando a representação esquemática da transferência eletrônica entre os PSI e PSII (extraído da referência [3]).

O relógio de oxidação da água

Após a absorção de luz e excitação do P680, o transporte de elétrons na fotossíntese tem início com a quebra da molécula de água no espaço tilacoidal interno (lume). Durante a fotossíntese, elétrons são transportados da molécula de H_2O para $NADP^+$ e são temporariamente armazenados nas moléculas de NADPH antes da redução de CO_2 . A razão pela qual a energia em forma de luz é requerida é que a molécula de água é termicamente difícil de se oxidar, enquanto que $NADP^+$ é difícil de se reduzir. No entanto, a questão de como os elétrons são na verdade removidos da água é vital para o entendimento do transporte destes.

Em 1969, Pierre Joliot demonstrou em Paris que cloroplastos mantidos no escuro e em seguida expostos a pulsos de luz liberam O_2 a partir de H_2O em picos de 4 distintos pulsos [4]. Esta periodicidade sugeriu que alguma molécula (ou moléculas) deveria(m) estar acumulando carga positiva após cada pulso, até que se tenha acumulado quatro H^+ - uma vez que a liberação de uma molécula de O_2 requer a oxidação de duas moléculas de H_2O e a remoção de quatro elétrons. Ele chamou estes vários estados de S_0 , S_1 , S_2 , S_3 e S_4 , de tal forma que a conversão de S_0 para S_1 envolve a perda de um elétron, a

conversão de S_1 para S_2 a perda de outro, até que S_4 tenha quatro H^+ extras. Assim, S_4 tomaria quatro elétrons de volta a partir das duas moléculas de H_2O e retornaria a S_0 . Este esquema está representado na figura 1.8, e é conhecido como relógio de oxidação da água.

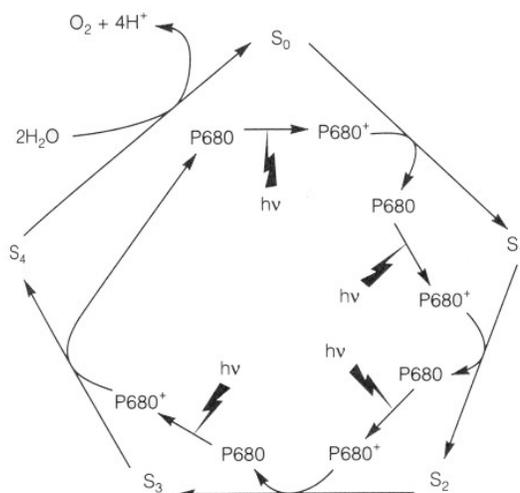
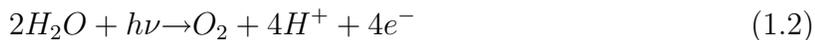


Figura 1.8: Representação esquemática do relógio de oxidação da água (extraído da referência [4]).

Em relação à natureza química dos estados S, sabe-se que P680 se oxida com a perda de um elétron depois de um pulso de luz. Logo, P680 só pode perder um elétron e pode acumular somente uma carga positiva. Estudos mostraram que os estados S representam vários estados de oxidação do manganês. Sabe-se que quatro átomos de Mn estão associados com cada PSII e que todos os quatro são essenciais para a liberação de O_2 .

Enfim, a equação



representa a chamada reação de foto-oxidação da água: energia luminosa dissocia moléculas de água, liberando oxigênio para a atmosfera. Já os prótons e elétrons seguem uma seqüência de reações nas membranas.

O caminho através das membranas

Enquanto cada elétron liberado passa por uma cadeia de reações até o PSI, íons de hidrogênio (prótons) são transferidos do estroma para o lume através da plastoquinona, uma molécula que recebe o elétron excitado na região intermediária da membrana tilacoidal, retirando um próton da região do estroma para se manter eletricamente neutra (figura 1.9). O elétron extraído do P680 passa sucessivamente pela feofitina (Pheo) e pela quinona A (Q_A) até atingir a quinona B (Q_B). Enquanto Q_A só aceita um elétron por vez, Q_B aceita dois elétrons, de tal forma que a doação de dois elétrons por parte de P680 forma Q_B^{-2} . Este composto incorpora dois prótons do estroma, sendo liberado como hidroquinona (PQH_2 , também chamado de plastoquinol).

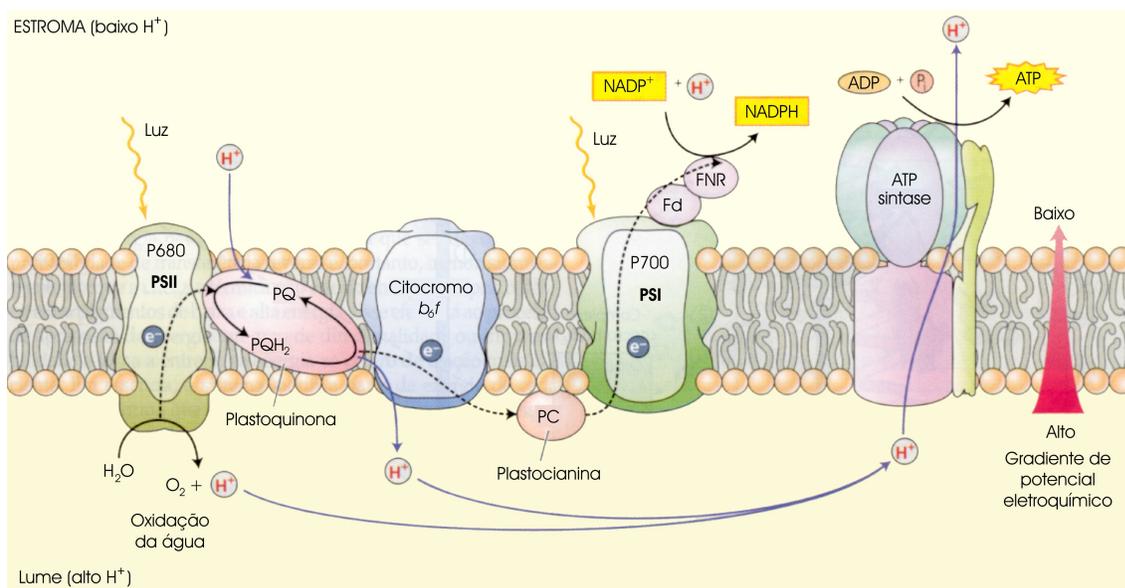


Figura 1.9: Desenho esquemático mostrando a transferência de elétrons e prótons no tilacóide, que deve-se basicamente a quatro complexos de proteínas: PSII, citocromo b_6f , PSI e ATP-sintase (extraído da referência [3]).

O elétron é então transferido para um transportador eletrônico, o citocromo b_6f , localizado junto ao lume. Assim, o próton capturado é libertado nesse espaço (lume), gerando um gradiente eletroquímico na membrana tilacoidal devido ao acúmulo de prótons. Além da diferença de potencial elétrico, o lume torna-se cerca de 1000 vezes mais ácido (pH 5) do que o estroma (pH 8). Esse forte gradiente produz uma descarga de prótons que atravessam a membrana de volta ao estroma através da enzima ATP-sintase, situada nos tilacóides. Durante o processo há síntese de ATP.

O complexo de citocromos b_6f oxida a hidroquinona formada na cadeia de reações fotoquímicas, transferindo íons de hidrogênio ao lume. Em seguida, reduz a plastocinana (PC), uma proteína que contém cobre, encontrada nos cloroplastos. Esta proteína, por sua vez, transfere elétrons ao pigmento P700 que, quando excitado por energia luminosa, repassa-os a uma nova série de receptores. O receptor primário A_0 é uma clorofila a , e o secundário A_1 é uma quinona conhecida como vitamina K1. Em seguida, os elétrons são transmitidos por proteínas da membrana tilacoidal (FeS_x , FeS_B e FeS_A) até chegar à ferredoxina (Fd).

Os elétrons que passam pela Fd fazem com que a ferredoxina-NADP-redutase (um tipo de enzima, abreviada por FNR) forme NADPH a partir de $NADP^+$, através da seguinte reação:



O composto NADPH atua como armazenador de energia e agente redutor, pois é facilmente oxidado.

1.3.4 A separação espacial dos dois fotossistemas

A figura 1.10 mostra a localização dos principais complexos associados com a fase fotoquímica da fotossíntese dentro dos tilacóides. Vemos que o centro de reação do PSII, com suas clorofilas e proteínas relacionadas com o transporte de elétrons, está localizado predominantemente nos grana. Já o PSI, assim como a enzima que cataliza a formação

de ATP, são encontradas quase que exclusivamente no estroma lamelae e nas partes finais dos grana. O citocromo b_6f , que conecta os dois fotossistemas, é geralmente distribuído entre o granum e o estroma lamelae.

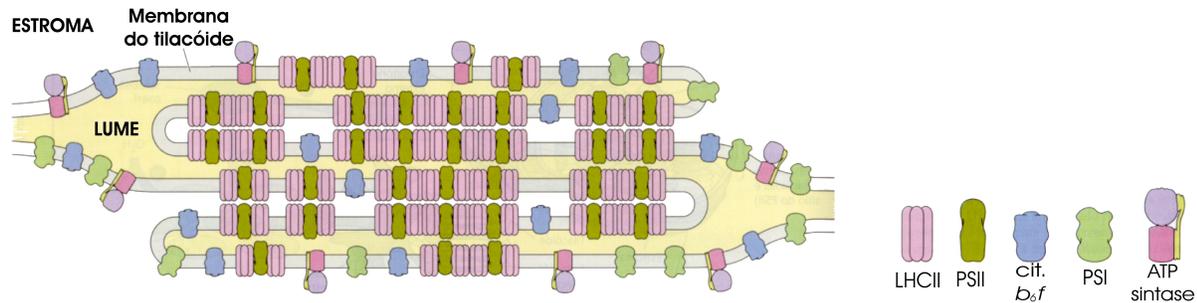


Figura 1.10: Representação da membrana tilacoidal, mostrando a concentração dos fotossistemas e dos principais complexos associados com a fotossíntese (extraído da referência [3]).

A separação espacial de dezenas de nanômetros entre os dois fotossistemas ainda não é completamente entendida [7, 8], mas explica porque a proporção entre esses complexos não é, necessariamente, 1:1. Assim, a transferência de elétrons do PSII para o PSI ocorre através da difusão de portadores de elétrons da região dos grana até a região do estroma lamelae. Prótons liberados na oxidação da água também se difundem a esta última região, onde ocorre a síntese de ATP.

1.4 A parte enzimática da fotossíntese

Todos os organismos fotossintéticos eucarióticos, desde a alga mais primitiva até a mais avançada angiosperma, reduz o gás carbônico em carboidrato através do mesmo mecanismo: o ciclo de Calvin, ou ciclo RPP (do inglês, “Reductive Pentose Phosphate”). Esse processo ocorre no estroma do cloroplasto, e envolve uma série de reações enzimáticas.

O ciclo de Calvin pode ser dividido em três estágios: a carboxilação do CO_2 , formando

duas moléculas de 3-fosfoglicerato; a redução do composto formado anteriormente, formando um carboidrato; a regeneração do CO_2 a partir do carboidrato formado (figura 1.11).

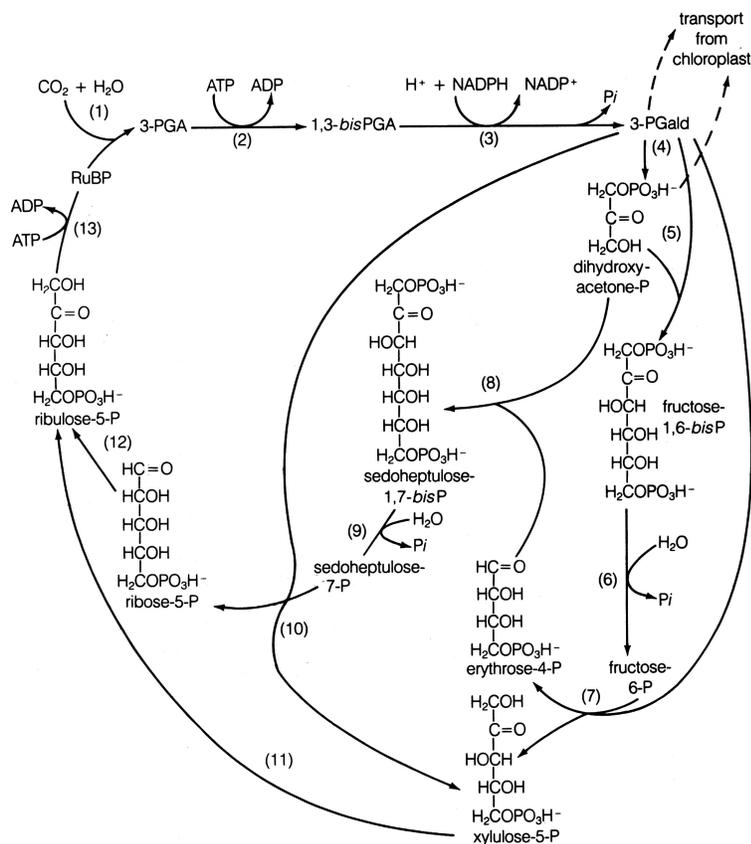


Figura 1.11: Ciclo de Calvin ou ciclo do carbono: seqüência de reações (extraído da referência [4]).

Ao ser absorvido, o CO_2 se combina com o açúcar ribulose 1,5-bifosfato (RuBP), com 5 carbonos. Essa reação, denominada (1) na figura 1.11, é catalisada pela enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (RuBisCO), a enzima mais abundante da Terra, e gera duas moléculas de 3-foglicerato (3-PGA), com 3 carbonos. As moléculas de 3-PGA sofrem fosforilação através da reação com ATP (reação (2)) e o composto formado é, em seguida, reduzido pelo NADPH (reação (3)), formando fosfogliceraldeídos (triose-fosfato).

O fosfogliceraldeído (3-PGald) é considerado a molécula de troca entre o cloroplasto e o citoplasma, pois é a única molécula que consegue sair do cloroplasto. Uma pequena fração das moléculas de 3-PGald formadas pode participar da glicólise, utilizado no ciclo de Krebs da respiração, na mitocôndria; outra fração maior é utilizada na formação de glicose ou frutose (reações 5,6), que vai para todo o corpo da planta através dos tecidos vasculares; ou ainda, parte das moléculas de 3-PGald pode ser convertida em ribulose fosfato (RuP), não saindo do cloroplasto. Esta última, por sua vez, gera RuBP (reações 4,8,9,12), realimentando o ciclo do carbono.

A energia necessária às reações do ciclo de Calvin é fornecida essencialmente pelos compostos químicos armazenados na fase clara da fotossíntese: o ATP é usado na fosforilação de compostos enquanto que o NADPH atua como agente redutor. O conjunto de reações do ciclo de Calvin, descrito de forma básica na figura 1.11, utiliza um total de 13 enzimas como catalisadores.

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 requer a “queima” de 2 moléculas de NADPH e 3 moléculas de ATP (compostos armazenadores de energia).

1.5 Fotorrespiração

Em 1920, um bioquímico alemão chamado Otto Warburg notou que a fotossíntese em algas é inibida por O_2 [4]. Notou ainda que esta inibição é maior quanto menor for a concentração de CO_2 no ambiente. Para entender essa influência, John P. Decker mostrou, na década de 1950, que plantas apresentam maiores taxas de respiração na presença de luz do que no escuro e que, sob condições normais, a respiração causa a liberação de 1/4 a 1/3 do CO_2 que é fixado na fotossíntese. Hoje é conhecido que a respiração em organismos fotossintéticos iluminados ocorre através de dois processos: um que está presente em todos os momentos, até mesmo no escuro, realizado na mitocôndria; e um outro processo muito

mais rápido, totalmente dependente de luz, conhecido como fotorrespiração. A realização deste último envolve a cooperação de cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias.

Na presença de luz, a formação de RuBP ocorre muito mais rápido do que no escuro porque, para produzir esta molécula, o ciclo de Calvin necessita de ATP e NADPH, ambos produtos da fase fotoquímica. Além disso, a luz causa a liberação de O_2 a partir de H_2O nos cloroplastos, tornando abundante a concentração deste gás. O fato da enzima RuBisCO ser ativada pela luz torna possível a fixação de O_2 , gerando o processo fotorrespiratório.

A fotossíntese e a fotorrespiração trabalham em direções totalmente opostas, de forma que esta resulta na perda de CO_2 de células que estejam simultaneamente fixando este mesmo gás por meio do ciclo de Calvin. A fixação fotossintética do CO_2 e a oxigenação fotorrespiratória são reações que competem entre si, reduzindo a eficiência da fotossíntese.

1.6 Fatores que influenciam a fotossíntese

Embora as características genéticas sejam específicas de cada tipo de planta, tornando-as mais adaptativas a alguns ambientes do que a outros, vários fatores externos podem influenciar - e limitar - a fotossíntese [4]. O nível de intensidade de exposição à luz, a temperatura, a salinidade, o grau de hidratação, a concentração de CO_2 , a presença de nutrientes e a concentração de enzimas são alguns dos fatores que influenciam a produção fotossintética. A compreensão de como cada um desses fatores e seus efeitos afetam a fotossíntese torna-se indispensável quando se almeja minimizar os seus efeitos adversos, a fim de se obter uma maior produtividade.

Sabe-se que o aumento da temperatura², por exemplo, aumenta tanto a atividade fotossintética como a respiratória. O mesmo efeito pode ser obtido à medida que se aumenta a intensidade luminosa ou a concentração de CO_2 . Este último também pode

²Isto ocorre até um certo valor de temperatura limite, que varia de planta para planta. A partir deste valor, a elevação de temperatura passa a ser prejudicial para a atividade fotossintética da planta.

ser limitado pela água, através da entrada e saída de compostos pelos estômatos na folha. Os estômatos podem fechar se o suprimento de água é pobre, podendo causar uma parada no fornecimento de CO_2 para a fotossíntese.

No entanto, é intuitivo pensar que um dos fatores que mais influenciam a fotossíntese é a quantidade de luz disponível para as plantas. Vimos que a grande maioria do aparato fotossintético só é ativada na presença de luz, de tal forma que plantas expostas a diferentes intensidades luminosas devem apresentar características diferentes entre si.

Nossa proposta, neste trabalho, é estudar e evidenciar características morfológicas e fisiológicas de plantas adaptadas a diferentes níveis de luminosidade. Para tal, utilizamos a técnica fotoacústica, assunto que abordaremos no próximo capítulo.

Capítulo 2

Fotoacústica aplicada à fotossíntese

2.1 Um pouco de história

Em 1880, Alexander Graham Bell viu que a incidência de luz solar modulada num sólido em forma de diafragma, conectado a um tubo, produzia um sinal acústico (som) [9, 10]. Estava sendo descoberto o efeito fotoacústico, ou seja, a produção de um sinal acústico através da incidência de luz num meio. Esse efeito também foi estudado em líquidos e gases por Bell, que mostrou a influência da absorção de luz por um material na intensidade do sinal acústico observado.

Até o século XIX sabia-se que o aquecimento de um gás através da absorção de luz, por exemplo, numa câmara fechada, gerava mudanças de pressão e volume nesta. O efeito fotoacústico em sólidos e líquidos, no entanto, foi alvo de diversas teorias. Rayleigh acreditava que o fenômeno se devia a um movimento mecânico no sólido. Bell defendia a hipótese de que a luz modulada incidente numa amostra porosa expandia suas partículas, provocando um ciclo de expulsão e reabsorção do ar nos poros. Ambos foram contestados por Preece, que após suas experiências sugeriu a expansão e contração do gás dentro da célula fotoacústica como causadores do efeito [11]. Mercadier então concluiu que o aquecimento periódico fazia vibrar a camada de gás em contato com a amostra, que é a

idéia utilizada para explicar o modelo da difusão térmica [12].

A falta de detectores apropriados para medir o sinal fotoacústico transformou a descoberta em mera curiosidade. O interesse desse estudo só foi retomado com a otimização do microfone. Mesmo assim, as pesquisas na área se restringiram a aplicações em gases até 1973, quando Rosencwaig iniciou estudos de espectroscopia em sólidos utilizando o efeito fotoacústico [13]. A partir daí, modelos teóricos para o efeito em sólidos foram desenvolvidos por Parker [14], e por Rosencwaig e Gersho [15], com aprimoramentos posteriores de McDonald e Wetsel [16] e Aamodt, Murphy e Parker [17]. Esses modelos apresentaram uma grande concordância com resultados experimentais (para sólidos e líquidos), e os mecanismos básicos responsáveis pelo efeito fotoacústico parecem estar bem entendidos.

As primeiras aplicações da técnica fotoacústica ao estudo da fotossíntese datam de 1976, quando Adams et al. extraíram clorofila de folhas de espinafre e obtiveram o espectro fotoacústico da solução preparada [18]. Em 1978, Rosencwaig mostrou que era possível obter o espectro fotoacústico da própria folha vegetal, colocando um pedaço desta numa célula fotoacústica fechada [19]. Nesse mesmo ano, Cahen et al. demonstraram a possibilidade de estudar o processo fotossintético através da fotoacústica [20], e com Poulet determinaram o coeficiente de difusão do oxigênio em folhas [21].

A partir desse momento, a fotoacústica começou a ser usada na observação da atividade fotossintética estimulada pela incidência de luz (indução fotossintética). Inicialmente, as medidas foram realizadas em suspensões de cloroplastos [22] ou com a folha cortada e colocada na célula [23]. Ambas as alternativas representaram importantes passos no uso da fotoacústica para estudar a fotossíntese. Contudo, tais medidas apresentam certas desvantagens: em suspensões de cloroplastos, medidas são realizadas sob condições diferentes daquelas encontradas *in vivo* (com as folhas nas plantas); no caso de cortes da folha, há o problema da desidratação [24].

Em 1987, Perondi e Miranda apresentaram a Célula Fotoacústica Aberta (OPC, do inglês “Open Photoacoustic Cell”) [25], um dispositivo descrito como “um detector barato

e sensível a qualquer radiação, das microondas até os raios-X” [26]. Logo após, Nery et al. propuseram usar a OPC para análise espectral de folhas vegetais [27]. Poucos anos depois, a OPC foi completamente introduzida no campo de estudo da fotossíntese [24, 28]. A nova ferramenta permitiu medidas em folhas intactas e fixadas ao corpo da planta - o chamado monitoramento *in situ* e *in vivo*. Muitos estudos têm sido feitos com a OPC, tais como o efeito de desidratação em folhas [24], medidas de indução fotossintética em híbridos de milho [29] e determinação da energia armazenada [30].

2.2 O sinal fotoacústico em folhas

Como foi mencionado na seção anterior, o efeito fotoacústico consiste na variação de pressão num meio produzida pela absorção de luz modulada ou pulsada. A energia luminosa absorvida pelo sólido - caso de nosso interesse - se converte em calor, provocando uma variação de temperatura, de forma também modulada, na mesma frequência de modulação da luz incidente. Esta, por sua vez, gera o efeito mecânico de expansão e contração periódicas, dando origem a ondas de pressão. Assim, o modelo fotoacústico pode ser usado para investigar processos de desexcitação não-radiativa que ocorrem num sistema periodicamente excitado por absorção de luz.

No caso de folhas vegetais, quando se faz incidir luz modulada num comprimento de onda fotossinteticamente ativo (680 nm, por exemplo), parte da luz que é absorvida é transformada em calor, parte é utilizada na reação fotoquímica da fotossíntese e uma pequena fração (entre 2 e 3 %) é reemitida (vide seção 1.3.1).

2.2.1 A componente fototérmica

O calor gerado, de forma modulada, dá origem a ondas térmicas que se difundem até o gás adjacente à folha na célula fotoacústica. No caso da espessura da camada de gás

ser maior que o comprimento de difusão térmica do mesmo¹, podemos considerar que essa camada fronteira funciona como um pistão vibratório, produzindo ondas de pressão e criando um sinal acústico que pode ser detectado por um microfone. Uma vez que essas variações de pressão periódicas são proporcionais à quantidade de calor liberado da folha, há uma correspondência entre o sinal acústico e a quantidade de luz absorvida pela mesma. Este é o chamado **componente fototérmico** do sinal acústico produzido em folhas, que está sempre presente, e é associado à perda de energia em forma de calor.

Em 1976, Rosencwaig e Gersho apresentaram um modelo teórico do efeito fotoacústico em sólidos [15], que explica a componente fototérmica do sinal. Nesse modelo, o sinal numa célula fotoacústica pode ser descrito quantitativamente em termos dos parâmetros ópticos, térmicos e geométricos do sistema, prevendo uma dependência em termos do coeficiente de absorção óptica (β) da amostra. Assim, em certas situações, podemos obter espectros de absorção de amostras altamente espalhadoras de luz, como folhas vegetais.

O modelo de Rosencwaig-Gersho faz uma análise unidimensional da produção do sinal acústico numa célula cilíndrica. Considera que as espessuras de gás e do suporte na célula fotoacústica são muito maiores que seus comprimentos de difusão térmica (μ_g e μ_b , respectivamente). Como as ondas que propagam o fluxo de calor modulado são exponencialmente atenuadas ao longo da distância de propagação, a uma distância de $2\pi\mu_g$ a modulação da temperatura no gás é desprezível. Assim, pode-se assumir que apenas a camada de gás localizada a uma distância x da amostra, inferior a $2\pi\mu_g$, responderá termicamente à modulação da temperatura na superfície da amostra, sofrendo expansão e contração periódicas, atuando como um pistão vibratório no resto do gás. A partir daí, Rosencwaig e Gersho calculam a variação de pressão na camada de gás, considerando o gás como ideal, a expansão da camada fronteira como sendo isobárica e a compressão do restante da coluna de gás adiabática.

¹O comprimento de difusão térmica, também chamado de comprimento de onda térmica, é definido como $\mu = \sqrt{\frac{\alpha}{\pi f}}$, onde α representa a difusividade térmica da amostra num determinado meio, e f é a frequência de modulação da luz incidente.

2.2.2 A componente fotobárica

Especificamente no caso de folhas vegetais, há outro componente do sinal fotoacústico. A reação fotoquímica ativada pela energia da radiação absorvida resulta, entre outros produtos, na fotossíntese da folha e, conseqüentemente, na liberação de O_2 . Este gás, que é liberado também de forma modulada, dá origem a uma outra onda de pressão, na mesma freqüência que a primeira, eventualmente defasada, que também é detectada pelo microfone. Esta é a **componente fotobárica** do sinal fotoacústico, que pode ou não estar presente, dependendo da situação experimental (o comprimento de difusão do O_2 , $\mu_{O_2} = (D_{O_2}/\pi f)^{1/2}$, onde D_{O_2} representa o coeficiente de difusão de massa desse gás, diminui à medida que a freqüência de modulação aumenta. Assim, haverá uma freqüência de corte a partir da qual a componente fotobárica não será mais observada).

Tanto as ondas térmicas quanto as ondas de concentração devido ao oxigênio são originadas nos cloroplastos da folha, no interior das células vegetais, difundindo-se nos espaços intercelulares até atingirem o gás.

Devemos observar, por fim, que as reações da fotossíntese absorvem CO_2 da câmara fotoacústica. Como os valores do coeficiente de difusão do CO_2 no meio celular e a permeabilidade desse gás nas membranas da folha são muito menores dos que os encontrados para o O_2 , as ondas de concentração devido ao consumo de CO_2 são fortemente atenuadas dentro da folha. Além disto, enquanto a constante de reação na produção de O_2 é da ordem de $10^3 s^{-1}$, a fixação de CO_2 passa por pelo menos duas etapas com constante reativa de $10 s^{-1}$. Se adicionarmos a isto o fato de que a produção de NADPH é limitada a $30 s^{-1}$, chegamos à conclusão de que a absorção de CO_2 se dá de forma praticamente contínua nas freqüências de modulação usuais (a partir de poucas dezenas de Hz), não contribuindo para o sinal [31].

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Montagem Experimental

A figura 2.1 mostra um diagrama esquemático do sistema experimental utilizado. O espectrômetro fotoacústico é composto por uma lâmpada de arco de Xenônio de alta pressão (Oriol, mod. 6128, 1000 W), uma pá mecânica (chopper PAR, mod. 192) e um monocromador que opera na faixa de 300-800 nm (Oriol, mod. 77250). Este último utiliza uma grade de difração (Oriol, mod. 77298, 1200 linhas/mm), possuindo com isso uma resolução de $(\lambda \pm 5) \text{ nm}$ (a largura das fendas de entrada e de saída de luz no monocromador é variável, mas em todos os experimentos foi fixada em 3,16 mm). Filtros ópticos foram utilizados a fim de evitar ordens superiores de difração. Uma lente de quartzo focaliza o feixe resultante numa das entradas de um cabo óptico trifurcado, que guia a luz até a célula fotoacústica utilizada. A intensidade da luz na saída do cabo óptico foi de $I_{480} = (24 \pm 5) \text{ W/m}^2$, em $\lambda = 480 \text{ nm}$ e $I_{680} = (13 \pm 3) \text{ W/m}^2$, em $\lambda = 680 \text{ nm}$.

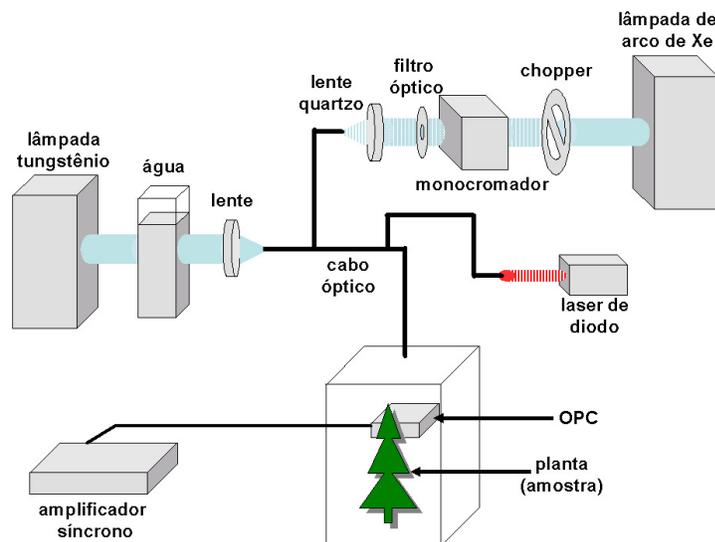


Figura 2.1: Diagrama esquemático representando a montagem experimental utilizada.

Também utilizamos um laser de diodo como fonte de luz modulada, cujo feixe era direcionado para uma segunda entrada do cabo óptico. Neste caso, o espectro de emissão é fixo e centrado em $(665 \pm 2) \text{ nm}$, e este era modulado por um circuito eletrônico. A intensidade de emissão do feixe colimado na saída do cabo óptico foi medida, e o resultado obtido foi de $I_{laser} = (39 \pm 4) \text{ W/m}^2$.

Além da luz modulada, outra fonte de luz visível não modulada (DC) foi usada para produzir a saturação fotossintética, com o propósito de eliminar a componente fotobárica do sinal. Este sub-sistema era composto por uma lâmpada de tungstênio (250 W), uma coluna de água, para cortar a forte emissão da lâmpada no infravermelho (luz não-fotossintetizante), e uma lente de vidro para focalizar o feixe na terceira entrada do cabo óptico. A intensidade da luz resultante na saída do cabo pode chegar até $1,0 \text{ kW/m}^2$.

2.3.2 A Célula Fotoacústica Aberta

A OPC consiste num microfone comercial de eletreto cuja câmara cilíndrica é usada como célula fotoacústica. A câmara não possui tampa (daí o nome “célula aberta”), sendo que a própria amostra fecha o sistema no momento das medições. O microfone é composto por um diafragma de eletreto metalizado e por uma placa de metal, que são separados por uma fina camada de ar e conectados por um resistor, alimentando um pré-amplificador FET na cápsula do microfone (figura 2.2). A sensibilidade do microfone de eletreto varia de acordo com o microfone, porém é da ordem de 10 mV/Pa . Para selar hermeticamente a câmara, aplicamos graxa de silicone em torno do orifício do microfone. Desta forma, parte da folha sob estudo permanece exposta ao exterior, captando CO_2 externo e minimizando mudanças na atmosfera interna da câmara [25].

Em 1991, Marquezini et al. apresentaram uma teoria para o sinal fotoacústico produzido na OPC [32], considerando que para amostras opticamente transparentes, como folhas vegetais, 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.

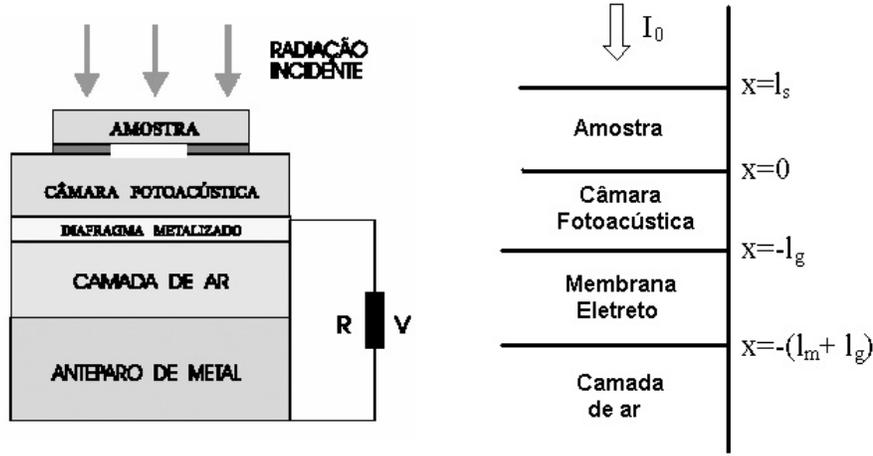


Figura 2.2: Seção transversal esquemática de um microfone de eletreto (esquerda) e da geometria de uma OPC (direita).

A figura 2.2 mostra a seção transversal esquemática de um microfone de eletreto, cuja membrana metalizada apresenta densidade superficial de carga σ_0 , constante dielétrica ϵ e espessura l_m , separado de uma superfície metálica de área A por uma camada de ar de espessura s_1 . Se essa camada de espessura s_1 varia periodicamente, de forma que $s_1 = l_b + \eta e^{j\omega t}$, alterando os campos elétricos e induzindo cargas nas camadas dielétricas, a voltagem V através do resistor R é dada por [32]:

$$V = \frac{l_b l_m \sigma_0}{l_b \epsilon + l_m \epsilon_0} \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \frac{\delta P}{\gamma P_0} e^{j\omega t} \quad (2.1)$$

A deflexão do diafragma decorre da variação de pressão na câmara fotoacústica. Esta, por sua vez, é causada pela variação da temperatura, que pode ser obtida através da equação de difusão térmica, de acordo com o modelo de Rosencwaig-Gersho. Para entender a equação de difusão, é necessário lembrar que, se há um gradiente de temperatura numa amostra, por exemplo, existirá um fluxo de calor $\vec{\Phi}$ que, no regime estacionário, pode ser descrito pela Lei de Fourier (no caso em que esse fluxo se dá por condução) [33]:

$$\vec{\Phi} = -k \vec{\nabla} T \quad (2.2)$$

onde k representa a condutividade térmica da amostra. No caso em que a temperatura varia com o tempo, a conservação local de energia deve ser considerada, originando a equação de difusão térmica, que descreve o transporte de energia. No caso unidimensional, temos:

$$\frac{\partial^2 T(x, t)}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha} T(x, t) = -\frac{s(x, t)}{k} \quad (2.3)$$

onde o termo à direita da equação acima representa fontes de calor geradas no meio pela absorção de luz incidente, por exemplo, e α é a difusividade térmica do meio.

Assumindo a incidência de um feixe monocromático modulado na frequência ω de intensidade $I_0 e^{j\omega t}$ sobre uma amostra com coeficiente de absorção óptica β , e considerando os meios da figura 2.2, podemos montar um sistema de equações de difusão térmica, de tal forma que

$$\begin{cases} \frac{\partial^2 T_s}{\partial x^2} - \sigma_s^2 T_s = -\frac{\beta I_0}{k_s} e^{-\beta(l_s - x)} \\ \frac{\partial^2 T_g}{\partial x^2} - \sigma_g^2 T_g = 0 \\ \frac{\partial^2 T_m}{\partial x^2} - \sigma_m^2 T_m = -\frac{\beta' I_0}{k_m} e^{-\beta l_s} \delta(s + l_g) \end{cases} \quad (2.4)$$

onde $\sigma_i = (1 + j)/\mu_i$, e o índice i denota o meio em questão como sendo a membrana ($i=m$), a amostra ($i=s$) ou o gás ($i=g$). Pode-se notar a presença de dois termos de fonte na eq. 2.4: um devido à absorção de radiação pela amostra e outro devido à absorção da radiação transmitida da amostra pelo diafragma do microfone de eletreto; β' representa o coeficiente de absorção da membrana.

Resolvendo o sistema de equações diferenciais 2.4, pode-se mostrar que

$$\langle T_g \rangle = \theta_m + \theta_s \quad (2.5)$$

onde $\langle T_g \rangle$ é a média espacial da variação da temperatura do ar no volume da célula ($-l_g \leq x \leq 0$ na figura 2.2). Os dois termos da direita são dados por

$$\theta_m = \frac{\beta' I_0 e^{-\beta l_s} \cosh(l_m \sigma_m) [\cosh(l_g \sigma_g) - 1]}{l_g \sigma_g k_m \sigma_m \sinh(l_m \sigma_m) \sinh(l_g \sigma_g)} \quad (2.6)$$

$$\theta_s = \frac{I_0 r [\cosh(l_g \sigma_g) - 1] \{2r - e^{-\beta l_s} [(r + 1)e^{l_s \sigma_s} + (r - 1)e^{-l_s \sigma_s}]\}}{l_g \sigma_g k_s \sigma_s (r^2 - 1) \sinh(l_g \sigma_g) [e^{l_s \sigma_s} - e^{-l_s \sigma_s}]} \quad (2.7)$$

onde θ_m e θ_s representam as contribuições da membrana e da amostra para a variação da temperatura na célula, respectivamente. Nestas equações, $r = \beta/\sigma_s$ é um parâmetro que depende do coeficiente de absorção óptica e σ da amostra, e l_i representa a espessura da camada de gás (g), da amostra (s) ou da membrana (m).

Assumindo o modelo de Rosencwaig-Gersho para a produção do sinal fotoacústico [15], de tal forma que a camada de gás responde adiabaticamente, a variação de pressão em função da temperatura é dada por

$$\delta P = \frac{\gamma P_0}{T_0} \langle T_g \rangle \quad (2.8)$$

Substituindo a eq. 2.5 na eq. 2.8 e esta na eq. 2.1, o sinal na OPC pode ser escrito como

$$V_{OPC} = V_0 \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \frac{\theta_m + \theta_s}{T_0} e^{j\omega t} \quad (2.9)$$

onde $V_0 = \frac{l_b l_m \sigma_0}{l_b \epsilon + l_m \epsilon_0}$.

Para amostras opticamente transparentes ($\beta l \ll 1$) e termicamente grossas ($l/\mu \gg 1$), caso de folhas vegetais, a eq. 2.9 pode ser simplificada:

$$V_{OPC} = V_0 \chi G \frac{I_0}{T_0 l_g \sigma_g k_s \sigma_s} F_s e^{j\omega t} \quad (2.10)$$

onde $\chi = \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC}$ é a função resposta do microfone, $G = \frac{\cosh(l_g \sigma_g) - 1}{\sinh(l_g \sigma_g)}$ é a função resposta da camada de ar e F_s é dado por

$$F_s = \left[\frac{r}{1 - r} + \beta' \frac{k_s}{k_m} \left(\frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right)^{1/2} \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} \right] e^{-\beta l_s} \quad (2.11)$$

O resultado acima mostra que, para amostras termicamente grossas, o sinal da OPC é proporcional à transmitância da amostra, uma vez que a eq. 2.11 é dominada pelo seu segundo termo. Substituindo esta equação na eq. 2.10, vemos que o sinal resultante depende de $I_0 e^{-\beta l_s}$, além de variar com a frequência de acordo com f^{-1} .

A célula aberta com microfone B&K

Na tentativa de encontrar um valor absoluto para a energia armazenada nas medidas de efeito positivo, utilizamos uma outra célula fotoacústica aberta, com outro microfone como detector. O motivo pelo qual fizemos esta troca é que, com esta célula, não há a contribuição da membrana, como será visto adiante (seção 3.3). A figura 2.3 mostra um diagrama esquemático da seção transversal desta OPC, que também permite medidas *in vivo* e *in situ*. A grande diferença é que essa célula tem como detector um microfone condensador Brüel & Kjaer (B&K, mod. 4166), cuja sensibilidade é 48 mV/Pa. Temos um detector que, além de ser mais sensível, possui uma resposta plana em função da frequência².

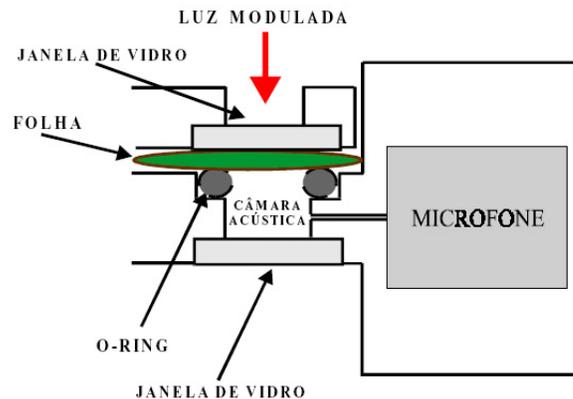


Figura 2.3: Diagrama esquemático da célula fotoacústica utilizada para medidas em alta frequência.

No entanto, para baixas frequências de modulação (dezenas de Hz), a razão sinal/ruído desta célula fotoacústica é menor, fazendo com que a OPC com o microfone de eletreto fosse a melhor escolha como célula a ser utilizada na região de trabalho destas frequências.

²Para frequências inferiores a 30 Hz, o microfone de eletreto não apresenta uma resposta plana em função da frequência.

A célula fotoacústica convencional

Se, ao invés de usarmos a folha para fechar a célula fotoacústica da figura 2.3, colocarmos uma janela transparente, teremos uma célula convencional típica. Neste caso, a amostra seria colocada dentro da câmara fotoacústica, e no caso de plantas, estudos em sistemas fotossintéticos são feitos através de medidas em folhas recortadas. Como a amostra é a única fonte de sinal neste tipo de célula (diferentemente da OPC com microfone de eletreto, em que há a contribuição da membrana), podemos considerar a expressão 2.9, com $\theta_m = 0$, como o sinal fotoacústico medido numa célula convencional³. Medidas neste tipo de célula serão apresentadas e comentadas posteriormente, no capítulo 5.

2.3.3 Amostras utilizadas

Plantas de tabaco

Para demonstrar as diferenças morfológicas e estruturais entre plantas da mesma espécie crescidas sob diferentes intensidades de luz, utilizamos como amostra plantas de tabaco selvagem (*Nicotiana tabacum*). As sementes foram fornecidas pelo Departamento de Genética da ESALQ (USP), e cultivadas em casas de vegetação no Instituto de Biologia (IB) da Unicamp. As plantas cresceram no mesmo ambiente, porém em estufas diferentes, de tal forma que todas as condições ambientais (temperatura, tipo de solo, fotoperíodo, etc.) foram as mesmas, exceto o nível de iluminação: um lote de amostras foi exposto diretamente à luz solar, recebendo 100% do nível de irradiância proveniente do sol (plantas de sol), enquanto que um outro lote foi exposto a somente 50% de luz solar (plantas de sombra). Para obter este nível de intensidade de luz, utilizamos um sombrite nas casas de vegetação. As plantas eram regadas através de aspersor controlado três vezes ao dia, não caracterizando, portanto, estresse hídrico.

³O mesmo se aplica à célula aberta com microfone B&K, uma vez que o sinal da membrana é um problema intrínseco do microfone de eletreto.

Todas as medidas foram realizadas em plantas com idade entre 45 e 60 dias, contados a partir da data de semeadura, sempre em folhas do segundo par completamente expandido - garantindo, assim, um padrão morfológico nas folhas submetidas aos experimentos. Cada lote era composto por 10 plantas, e em cada planta foram utilizadas entre 2 e 4 folhas para diversos tipos de medidas. Em cada experimento, foram realizadas aproximadamente 9 repetições de medidas (1-2 folhas para cada planta / 6 plantas para cada tipo de amostra). Em todos os experimentos de fotoacústica realizados nestas plantas, utilizamos o laser de diodo como fonte de luz modulada (exceto naqueles onde o comprimento de onda da luz incidente varia).

Plantas *Zeyheria*

Sabe-se que plantas típicas de floresta são adaptadas a condições de baixa intensidade de luz, uma vez que crescem rodeadas por árvores muito próximas umas das outras, evitando sua exposição direta à luz solar. Por outro lado, plantas típicas de cerrado são adaptadas à incidência direta de luz solar, explicitando assim diferenças estruturais e morfológicas geradas pelo habitat natural.

Baseado neste fato, também realizamos medidas fotoacústicas em plantas de duas espécies diferentes, porém pertencentes ao mesmo gênero: *Zeyheria tuberculosa* (planta da floresta) e *Zeyheria digitalis* (planta do cerrado). Essas amostras foram semeadas e cultivadas nas casas de vegetação do IB-Unicamp, e cedidas pelo Departamento de Anatomia Vegetal do mesmo Instituto. Ambas as plantas foram submetidas às mesmas condições de luminosidade (30% de exposição à luz solar, obtido com o uso de sombrite), diferindo apenas pela sua procedência (origem). Todas as medidas foram realizadas em plantas com idade entre 110 e 125 dias, em folhas do segundo par completamente expandido. Ao total, foram realizadas aproximadamente 6 repetições (1-3 folhas para cada planta / 3 plantas para cada tipo de amostra). Nestas plantas, a lâmpada de arco de Xenônio foi utilizada como fonte de luz modulada em todos os experimentos.

Capítulo 3

Curvas de atividade fotossintética

3.1 Dependência da fotossíntese com a luz

Como vimos na seção 1.6, vários fatores influenciam a taxa de atividade fotossintética das plantas, entre eles o nível de iluminação. Para entender quantitativamente como a luz afeta a fotossíntese, é necessário examinar o quanto de energia luminosa proveniente do sol é útil. Sabe-se que na camada superior da atmosfera a irradiância total é 1360 W/m^2 (constante solar), que inclui a região do ultravioleta ao infravermelho¹ [4]. No entanto, conforme a luz penetra na atmosfera, parte da energia é perdida por absorção e espalhamento, de forma que aproximadamente 900 W/m^2 atinge as plantas, dependendo do horário, do dia do ano, elevação da superfície, latitude, condição atmosférica, entre outros. Desta intensidade, 5% pertence a região do ultravioleta, pouco mais que metade deve-se ao infravermelho e o resto tem comprimentos de onda distribuídos entre 400 e 700 nm, na chamada radiação fotossinteticamente ativa (PAR, do inglês “Photosynthetically Active Radiation”). Num dia de céu limpo, sem nuvens, a PAR pode chegar a 500 W/m^2 , dependendo dos fatores mencionados.

Estudos mostram que aproximadamente 80 a 90% da quantidade da PAR é absorvida

¹Este valor varia aproximadamente 2% devido à órbita elíptica da Terra

pelas folhas, embora estes valores variem consideravelmente com a estrutura e a idade das mesmas. O restante é transmitido e/ou refletido. Da radiação absorvida, mais da metade é convertida em calor, enquanto que uma pequena parte é utilizada no processo fotossintético (e/ou fluorescência).

A atividade fotossintética de uma folha varia com a intensidade de luz de tal forma que podemos modelar a curva de acordo com a seguinte expressão:

$$R(I) = \frac{aI}{1 + I/I_{1/2}} \quad (3.1)$$

onde R é a taxa de atividade fotossintética (evolução de O_2 ou captação de CO_2 , por exemplo), $I_{1/2}$ é a intensidade de luz capaz de produzir metade da saturação e a é a perda fotoquímica, isto é, a fração de luz absorvida que é armazenada pela planta como energia química [34, 35]. A figura 3.1 mostra a atividade fotossintética em função da intensidade de luz incidente numa folha. É possível notar que acima de uma certa irradiância, chamada luz de saturação, o aumento de luz não provoca um aumento correspondente de O_2 liberado.

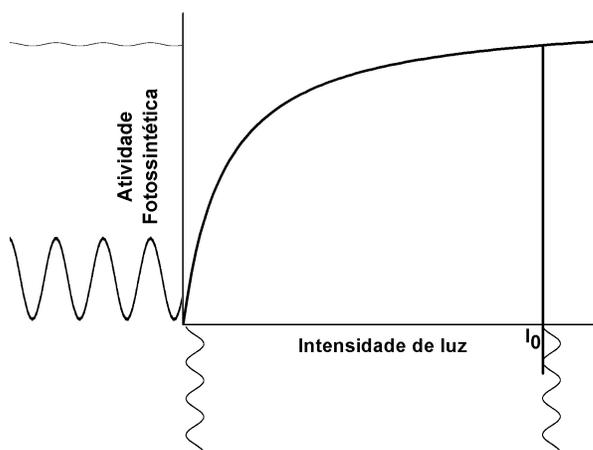


Figura 3.1: Curva de saturação fotossintética em função da intensidade de luz incidente.

Do ponto de vista da técnica fotoacústica, vemos que se tivermos apenas a presença de uma luz modulada de baixa intensidade, a resposta fotossintética à luz também é

modulada, com uma amplitude apreciável (figura 3.1). No entanto, se adicionarmos luz contínua de alta intensidade, capaz de atingir a saturação fotossintética da folha (I_0 na figura), a taxa de fotossíntese e, conseqüentemente, a evolução de O_2 , devido à luz modulada não é afetada em relação à componente DC de luz. Nesse caso, a componente fotobárica do sinal é eliminada. Portanto, na presença de luz contínua capaz de saturar a fotossíntese, temos apenas a componente fototérmica do sinal fotoacústico.

3.1.1 Fotoinibição e fotoproteção

Se submetemos a planta a uma irradiância maior que a luz de saturação por um longo tempo, o excesso de luz pode inibir a fotossíntese em folhas [3, 4]. Basicamente, esse processo pode ocorrer de duas formas: a fotoinibição e a foto-oxidação.

A foto-oxidação é um processo irreversível e envolve diretamente os pigmentos receptores de luz. Quando estes absorvem muita luz durante um período excessivo, ficam muito tempo excitados e interagem com o CO_2 , produzindo radicais livres, como o superóxido (O_2^-), que podem destruir os pigmentos. Há algumas defesas bioquímicas, como a enzima superóxido dismutase (SOD), que destrói os radicais livres, mas essas defesas são insuficientes se a exposição à alta luminosidade é prolongada.

Já a fotoinibição envolve danos reversíveis aos centros de reação, especialmente o PSII, quando estes são sobre-excitados. O fácil dano no PSII deve-se à perda da proteína D1, envolvida na transferência de elétrons entre o P680 e a PQ. Isto não ocorre tão facilmente no PSI porque a ferredoxina (Fd) próxima a esse fotossistema é altamente redutora, podendo assim evitar a formação de O_2^- a partir do oxigênio molecular.

No entanto, os vegetais superiores possuem um mecanismo de fotoproteção, denominado de *quenching*, que permite à planta ajustar-se a diferentes condições de intensidades luminosas. Os carotenóides, por exemplo, protegem a planta contra o excesso de luz incidente. Esses pigmentos são responsáveis pela diminuição de estados excitados da clorofila, absorvendo rapidamente a energia desses estados excitados e voltando a seguir ao estado

fundamental, transformando o excesso de energia em calor.

Um outro importante mecanismo utilizado na dissipação do excesso de energia no sistema de pigmentos é o chamado ciclo das xantofilas. Sob alta intensidade de luz, enzimas convertem o carotenóide violaxantina em zeaxantina, um outro carotenóide. Esse processo de conversão é conhecido como desepoxidase, e ocorre à medida que o pH na região dos tilacóides se torna ácido. A funcionalidade dessa conversão não é bem conhecida até hoje, mas trabalha-se com a hipótese de a molécula de violaxantina apresentar uma energia de estado excitado acima do nível energético excitado da clorofila, agindo como doadora de energia, enquanto que a zeaxantina teria um nível excitado pouco abaixo do nível da clorofila, agindo como dissipadora do estado excitado e posteriormente sofrendo desexcitação térmica.

Há também alterações fisiológicas que reduzem os riscos de danos em alta luminosidade. Geralmente estas alterações são lentas, demorando dias para se pronunciarem de forma a alterar a morfologia da folha. Entre estas, os cloroplastos podem deslocar-se de um lado ao outro da célula, num movimento denominado ciclose. A orientação da folha pode ser alterada de tal forma que ela se alinhe paralelamente (perpendicularmente) à incidência dos raios solares, e assim absorver menos (mais) luz. Há também, eventualmente, alteração da expressão gênica, com síntese de diferentes pigmentos.

3.2 Diferenças anatômicas entre folhas de sol e de sombra

Os vegetais superiores têm a capacidade de sobreviver tanto em ambientes com alta intensidade de luz como em ambientes com baixa intensidade, apresentando em cada caso características anatômicas contrastantes. É constatado, por exemplo, que plantas crescidas em baixas intensidades de luz apresentam um número maior de clorofilas por centro de reação, têm uma razão maior de clorofila *b* por clorofila *a*, e normalmente suas

folhas são mais finas que as folhas de plantas adaptadas a altas intensidades de luz. Além disso, plantas crescidas sob altas intensidades luminosas possuem mais RuBisCO, enzima vital no ciclo de Calvin, e presença constante de componentes responsáveis pelo ciclo das xantofilas.

Há também uma diferença na quantidade de pigmentos encontrados nas folhas. Plantas adaptadas a altos níveis de luminosidade apresentam uma camada de cutícula mais espessa que as plantas adaptadas a baixas intensidades luminosas. Por outro lado, estas últimas apresentam maior quantidade de pigmentos fotossintéticos (clorofilas, carotenóides) que as primeiras, adquirindo assim uma cor verde mais acentuada devida a presença de clorofilas, que possuem um coeficiente de reflexão alto nessa região de comprimentos de onda. Esse aspecto pode ser comprovado na figura 3.2, que mostra duas plantas de tabaco submetidas a diferentes condições de luminosidade. Pode-se notar que a planta de sol, cultivada em ambiente com maior irradiância (lado esquerdo na figura), é ligeiramente mais clara que a planta de sombra (lado direito da figura).



Figura 3.2: Foto comparativa de uma planta de tabaco cultivada no sol (esquerda) com outra cultivada na sombra (direita).

Todas as diferenças relacionadas com a morfologia das folhas citadas acima podem ser evidenciadas em análise por microscopia óptica. As figuras 3.3 e 3.4 mostram fotomicrografias da seção transversal da região internervural de uma folha, para duas plantas

de tabaco (sol e sombra, respectivamente). As fotos foram feitas num microscópio óptico com aumento de 10x1 (fotos da esquerda) e 40x1,6 (fotos da direita). É possível notar, nas fotos com menor aumento, uma maior concentração de células (e, conseqüentemente, de cloroplastos) no parênquima paliçádico para as plantas de sombra.

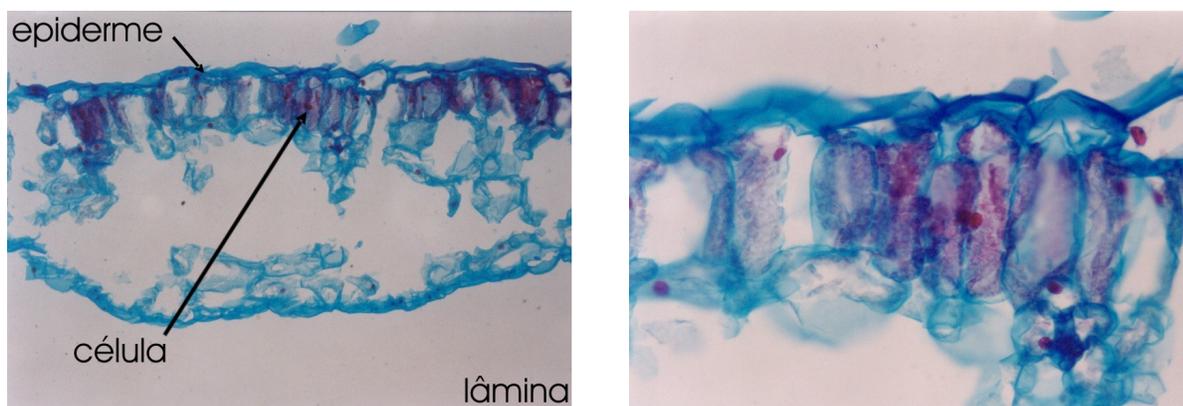


Figura 3.3: Fotomicrografias da seção transversal de uma folha de tabaco cultivada no sol. Aumentos de 10x1 (esquerda) e 40x1,6 (direita).

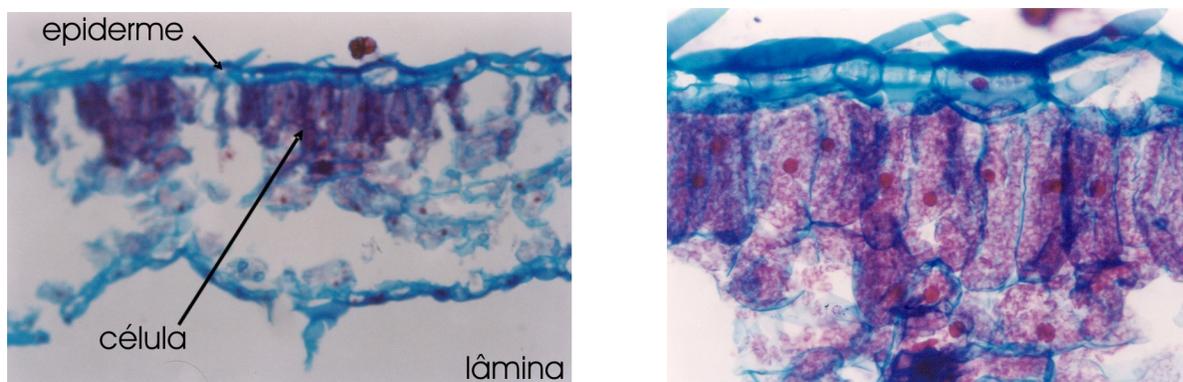


Figura 3.4: Fotomicrografias da seção transversal de uma folha de tabaco cultivada na sombra. Aumentos de 10x1 (esquerda) e 40x1,6 (direita).

No caso das plantas *Zeyheria*, embora as espécies *Zeyheria tuberculosa* (floresta) e *Zeyheria digitalis* (cerrado) pertençam ao mesmo gênero, diferem bastante quanto às suas

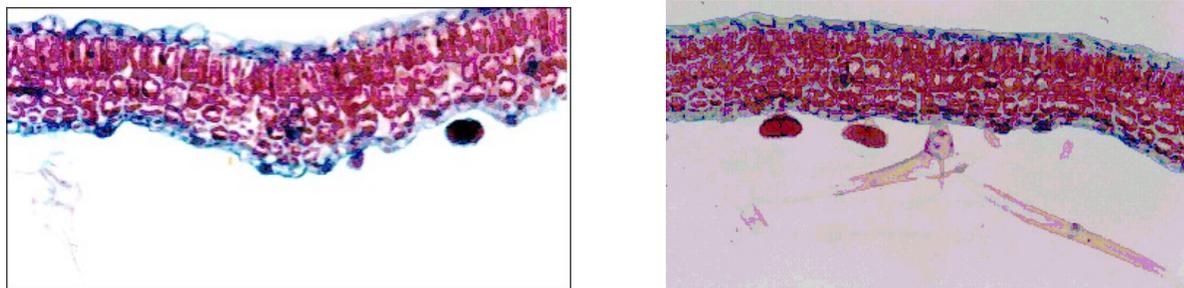


Figura 3.5: Fotomicrografia da seção transversal de uma folha de *Zeyheria digitalis* (esquerda) e *Zeyheria tuberculosa* (direita). Aumento de 20x1.

estruturas. No entanto, como mostra a figura 3.5, a espécie *Zeyheria digitalis* apresenta uma morfologia típica de plantas de sol enquanto a *Zeyheria tuberculosa* se assemelha a plantas de sombra, sendo estas características próprias da origem das plantas, uma vez que foram cultivadas sob as mesmas condições ambientais.

Todas essas diferenças na morfologia e estrutura das folhas causadas pelos diferentes níveis de iluminação aos quais estas são expostas refletem-se também em diferenças do ponto de vista fisiológico, alterando a taxa de atividade fotossintética. Plantas crescidas sob diferentes intensidades de luz também diferem em relação às taxas de respiração, e essas diferenças alteram a relação entre fotossíntese e respiração. Ao contrário das plantas de sol, plantas crescidas em baixas intensidades de luz apresentam baixas taxas respiratória e de fotoinibição, uma vez que é necessária uma maior eficiência de conversão de energia nestas plantas. Vejamos algumas diferenças na atividade fotossintética que podem ser detectadas pela técnica fotoacústica.

3.3 Determinação da energia armazenada

Conforme foi discutido no fim da seção 2.2.2, um dos motivos pelo qual o CO_2 capturado não é detectado pelo microfone deve-se ao fato de seu coeficiente de difusão e da

permeabilidade da membrana ao CO_2 serem relativamente baixos². Assim, mesmo em baixas frequências de modulação (dezenas de Hz) sua absorção se dá de forma contínua.

O mesmo fenômeno é verificado com o O_2 , mas neste caso a frequência de corte é mais elevada (algumas centenas de Hz). Assim, modulando a luz em altas frequências, é possível eliminar completamente a componente fotobárica do sinal fotoacústico. Logo, o sinal resultante passa a ser puramente fototérmico, e este é proporcional à energia absorvida que é transformada em calor na folha. Se nestas circunstâncias a luz contínua de saturação for adicionada, o sinal fotoacústico sofre um aumento, que é denominado de **efeito positivo**. Isto ocorre porque, uma vez que a fotossíntese foi saturada, qualquer acréscimo de energia absorvida será convertido em calor ou fluorescência, pois a via de reação fotoquímica já foi suprimida. Este acréscimo no sinal fototérmico assim observado expressa (é proporcional a) a energia armazenada nas reações fotoquímicas. A figura 3.6 ilustra um experimento de efeito positivo obtido para uma folha de tabaco cultivada na sombra. Para encontrar a frequência de corte, a partir da qual a componente fotobárica do sinal não é mais observada, variamos a frequência de modulação entre 250 e 450 Hz, e vimos que a partir de 350 Hz o efeito positivo medido foi o mesmo, sendo esta frequência portanto uma boa escolha para medidas de efeito positivo.

A partir de medidas de efeito positivo podemos obter dados da perda fotoquímica na folha, isto é, a quantidade de energia incidente que é armazenada como energia química. Este armazenamento diminui a quantidade de luz absorvida que é transformada em calor. Vimos que a taxa de energia química armazenada R , para uma dada intensidade de luz absorvida, é dada pela equação 3.1. Logo, o efeito positivo pode ser quantificado e escrito como:

$$EP = \frac{PA_+ - PA_-}{PA_+} = \frac{R}{I} = \frac{a}{1 + I/I_{1/2}}$$

²Como dito na seção 2.2.2, o principal motivo de não detectarmos a contribuição do CO_2 para o sinal fotoacústico deve-se às baixas constantes de reação pelas quais o processo fotossintético passa até a utilização deste gás no ciclo.

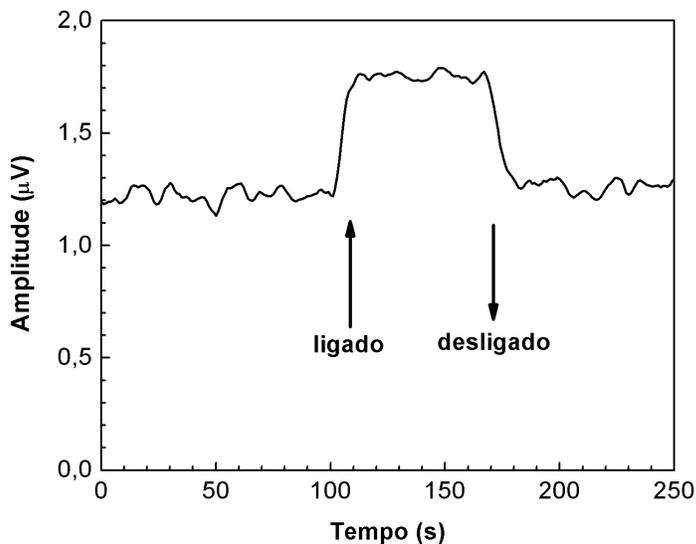


Figura 3.6: Exemplo de efeito positivo numa folha de tabaco de sombra. A frequência de modulação foi de 350 Hz, a intensidade de luz modulada foi de 39 W/m^2 e a intensidade da luz contínua foi de 430 W/m^2 (ligado = luz contínua ligada; desligado = luz contínua desligada).

$$\frac{1}{EP} = \frac{1}{a}(1 + I/I_{1/2}) \quad (3.2)$$

Nota-se, da equação 3.2, que a dependência de $(1/EP)$ com a intensidade da luz incidente I é linear, e que no limite de intensidade zero tem valor $(1/a)$. Logo, pode-se determinar a perda fotoquímica na folha calculando a energia armazenada para diferentes intensidades de luz incidente, de acordo com a equação 3.2.

Para realizar este tipo de medida, utilizamos a configuração experimental descrita na seção 2.3.1. No entanto, na tentativa de encontrar um valor absoluto para a energia armazenada utilizando a célula aberta, é necessário adotarmos um procedimento de normalização para compensar o sinal fotoacústico devido à absorção de luz pela membrana de eletreto do microfone da OPC [30]. Uma outra opção é utilizar uma célula fotoacústica com outro microfone como detector. Para tal, utilizamos a célula fotoacústica aberta da

figura 2.3.

A figura 3.7 mostra o resultado de medidas feitas em folhas de tabaco, onde $(1/EP)$ é determinado para diferentes intensidades de luz modulada. O ajuste linear pelo método dos mínimos quadrados permite determinar o coeficiente linear da curva e, conseqüentemente, a perda fotoquímica a . Os valores obtidos³ para esta grandeza foram $(18 \pm 5)\%$ para plantas de sol e $(29 \pm 6)\%$ para plantas de sombra, mostrando que as plantas de sol apresentam uma menor eficiência no armazenamento de energia química que plantas de sombra, quando submetidas a baixos níveis de irradiância. Medidas de efeito positivo em plantas *Zeyheria* não foram realizadas.

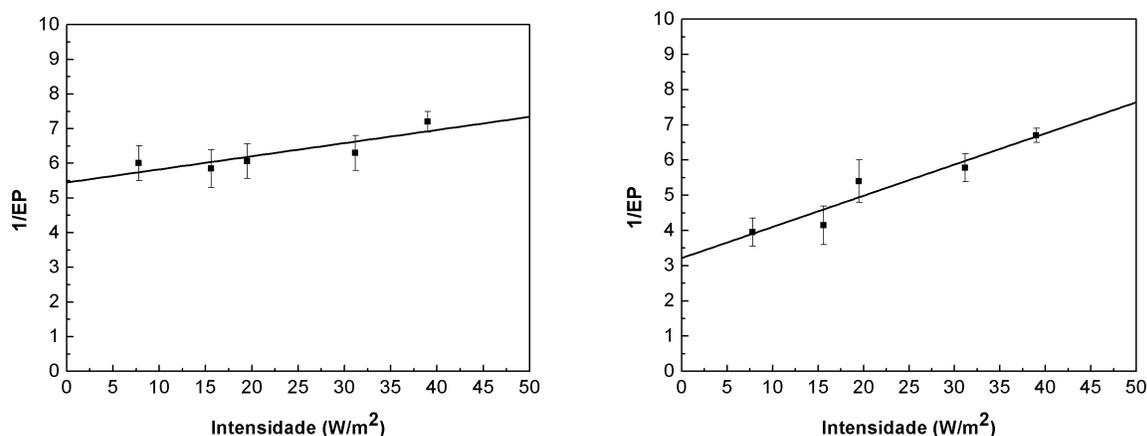


Figura 3.7: Inverso do efeito positivo em função da intensidade de luz modulada para uma folha de tabaco de sol (esquerda) e sombra (direita). A frequência de modulação foi de 350 Hz, o laser de diodo foi utilizado como fonte de luz modulada e a intensidade da luz de saturação foi de 430 W/m^2 . As barras de erro representam os desvios em relação às medidas feitas em 7 folhas, de 5 plantas diferentes.

³Os erros devem-se aos desvios em relação às medidas feitas nas diferentes folhas, em diferentes plantas.

3.4 Curvas de indução fotossintética

Quando a planta fica no escuro por longo período (tipicamente acima de 2 horas), seus centros de reação fotossintética ficam desativados, de forma que imediatamente após a reincidência de luz, não se verifica liberação de oxigênio. Nesta situação o sinal fotoacústico é formado exclusivamente pelo seu componente fototérmico. À medida que o tempo passa, a produção de oxigênio é iniciada e vai aumentando até atingir uma taxa estável (estado estacionário)⁴. A curva da taxa de oxigênio produzido em função do tempo é chamada de curva de indução fotossintética. O tempo deste transiente está relacionado com a capacidade da planta de reorganizar seu sistema fotossintético na presença de luz (reação auto-catalítica). Esta reorganização depende da disponibilidade de compostos metabólicos previamente sintetizados, e varia de acordo com a morfologia da planta.

De acordo com Silva et al. [29], a indução fotossintética da folha pode ser ajustada de acordo com a curva logística

$$S = S_0 + \Delta S \frac{e^{(t-t_0)/\Delta t}}{1 + e^{(t-t_0)/\Delta t}} \quad (3.3)$$

onde S_0 é o valor inicial do sinal fotoacústico, ΔS é a diferença entre o sinal do nível estacionário e o sinal inicial S_0 , t_0 é o valor para o qual $(S - S_0)/S = 0,5$, enquanto Δt está relacionado com o grau de inclinação da curva entre S_0 e S .

A figura 3.8 mostra as curvas de indução fotossintética obtidas para uma planta de tabaco cultivada no sol e outra na sombra, respectivamente. As medidas foram realizadas com o laser de diodo, na frequência de modulação $f = 17 \text{ Hz}$. Antes do início das medidas, as plantas foram mantidas no escuro por um período de 2 horas. Esse valor foi escolhido devido ao fato de que a curva de indução não se alterou para períodos superiores a este, mostrando que os centros de reação fotossintética das folhas estavam desativados já nesse tempo.

⁴É válido lembrar que, nesta situação, devemos fazer medidas com frequências de modulação na região de dezenas de Hz, para que acompanhem a produção de oxigênio.

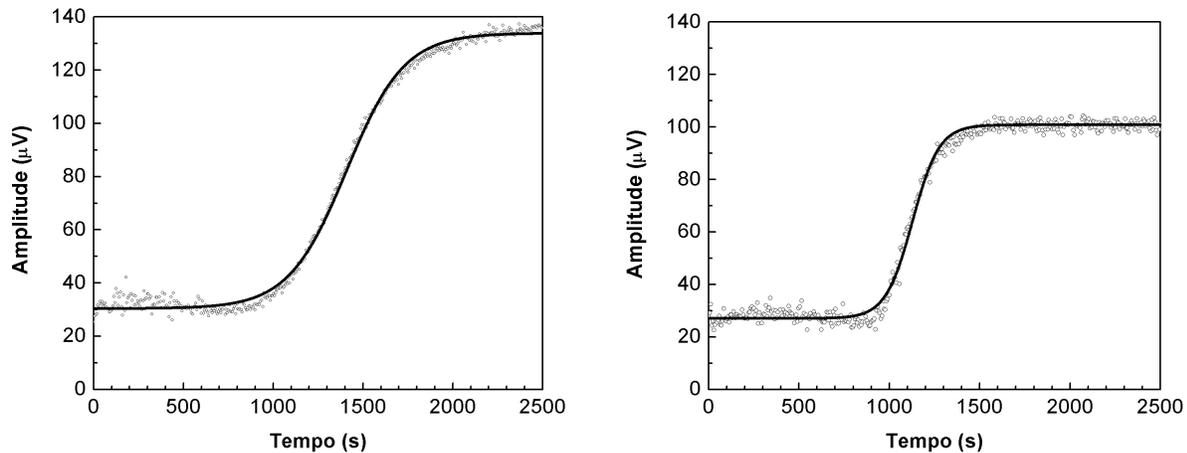


Figura 3.8: Exemplo da curva de indução fotossintética para uma folha de tabaco cultivada no sol (esquerda) e na sombra (direita). Os símbolos são pontos experimentais, enquanto a curva sólida representa o ajuste da indução fotossintética a partir da equação 3.3.

As curvas de indução para duas plantas *Zeyheria* são mostradas na figura 3.9. As medidas foram realizadas em $f = 17 \text{ Hz}$, em $\lambda = 680 \text{ nm}$ (lâmpada de Xenônio e monocromador). O tempo de adaptação ao escuro foi de 4 horas nos dois casos.

Analisando as curvas, nota-se que plantas de baixas intensidades luminosas levam um tempo menor para atingir o nível estacionário que plantas de altas intensidades. Este resultado é natural, uma vez que as medidas são feitas em baixa intensidade de luz, condição natural para as plantas de sombra. Também é possível observar a presença de um transiente rápido logo no início para os dois tipos de folhas. Este deve-se a uma possível evolução de O_2 mais acentuada em virtude de um rápido consumo de metabólitos na presença de luz, depois de algum tempo no escuro, e é visto em vários tipos de plantas, como a ervilha e o feijão-vagem, por exemplo [36].

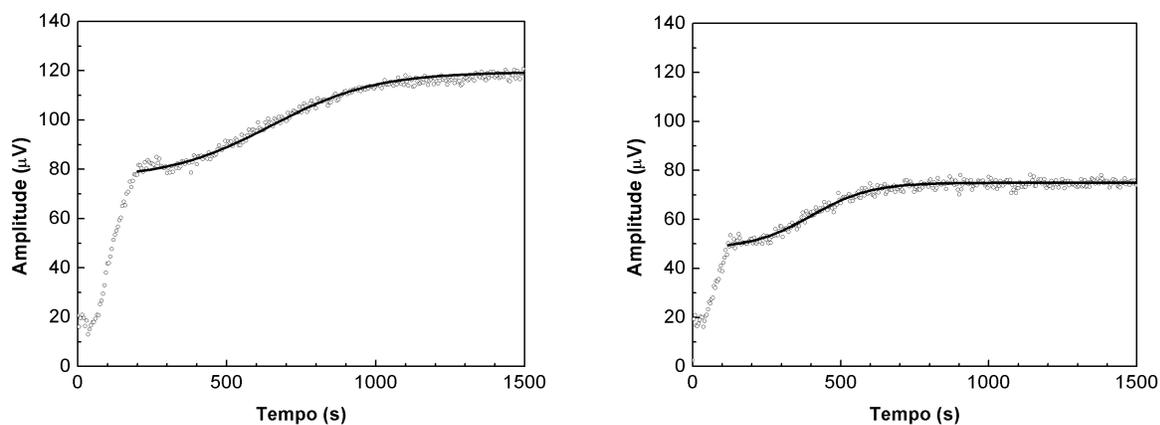


Figura 3.9: Exemplo da curva de indução fotossintética para uma folha de *Zeyheria digitalis* (esquerda) e outra de *Zeyheria tuberculosa* (direita). Os símbolos são pontos experimentais, enquanto a curva sólida representa o ajuste da indução fotossintética a partir da equação 3.3.

Podemos ainda analisar os resultados obtidos pelo ajuste da curva de acordo com a equação 3.3. A tabela 3.1 mostra os resultados obtidos para todos os tipos de planta medidos. No caso das plantas *Zeyheria*, o ajuste foi feito desprezando-se o transiente

Planta	$S_0(\mu V)$	$\Delta S(\mu V)$	$t_0 \cdot 10^2(s)$	$\Delta t \cdot 10(s)$
Plantas de sol				
Tabaco	21 ± 7	100 ± 3	17 ± 2	$15,7 \pm 0,4$
<i>Zeyheria digitalis</i>	75 ± 5	45 ± 9	$6,5 \pm 0,2$	18 ± 1
Plantas de sombra				
Tabaco	19 ± 4	56 ± 9	12 ± 3	8 ± 2
<i>Zeyheria tuberculosa</i>	48 ± 5	27 ± 7	$4,0 \pm 0,3$	10 ± 1

Tabela 3.1: Dados obtidos pelo ajuste da curva de indução fotossintética. O erro representa o desvio com relação à média para 10 (6) medidas, num total de 6 (3) plantas de tabaco (*Zeyheria*) utilizadas.

rápido. Os resultados dos ajustes mostram não só que plantas de sol demoram um tempo maior para atingir o estado estacionário, mas que a inclinação da curva é maior em plantas de sombra (menor Δt).

3.5 Estudo da componente fotobárica e o efeito de fotoinibição

Em baixas frequências de modulação, partindo-se da situação em que se tem apenas luz modulada (e, portanto, ambas as componentes do sinal), ao adicionarmos luz contínua de saturação eliminamos a componente fotobárica, de forma que o sinal resultante diminui. Esta queda no sinal é chamada de **efeito negativo**. Através deste tipo de experimento pode-se avaliar a quantidade do sinal fotoacústico que se deve à componente fotobárica.

Quantitativamente, na presença de luz modulada de baixa intensidade, o sinal fotoacústico é dado por

$$S_{mod} = Ae^{j(\phi+\omega t)} = S_{term} + S_{oxig} = A_{term}e^{j(\phi_{term}+\omega t)} + A_{oxig}e^{j(\phi_{oxig}+\omega t)} \quad (3.4)$$

onde A representa a amplitude da onda e ϕ a fase do sinal térmico ou de oxigênio. Com a incidência simultânea de luz modulada e de luz contínua de saturação, não se observa a componente fotobárica, ou seja, o único sinal neste caso é o sinal fototérmico. No entanto, vimos na seção 3.3 que a presença dessa luz contínua provoca um aumento da componente fototérmica, de tal forma que, neste caso, o sinal resultante pode ser escrito como

$$S_{cont+mod} = S'_{term} = A'_{term}e^{j(\phi'_{term}+\omega t)} \quad (3.5)$$

No entanto, a relação entre S'_{term} e S_{term} é dada por

$$S'_{term} = (1 + EP)S_{term} \quad (3.6)$$

onde $EP=EP(I)$ é a energia armazenada na folha e pode ser encontrada pelo experimento de efeito positivo, descrito anteriormente, para uma dada intensidade de luz modulada.

Vale a pena notar que, em relação à fase do sinal térmico, $\phi'_{term} = \phi_{term}$, uma vez que EP é real e depende apenas das amplitudes dos sinais com e sem luz de saturação.

Assim, o sinal devido à componente fotobárica na folha pode ser obtido através da subtração do sinal estacionário pelo sinal fototérmico, dado pelo valor da curva na presença de luz de saturação, e corrigido pelo aumento relativo obtido pelos experimentos de efeito positivo. No entanto, cabe ressaltar o fato de que a amplitude da componente fotobárica nas diferentes plantas não devem ser comparadas, uma vez que suas morfologias são diferentes, como visto na seção 3.2. Assim, $1 \mu V$, por exemplo, não representa a mesma taxa de O_2 evoluído em plantas de sol e sombra, pois o sinal na OPC deve-se à variação de pressão na parte traseira da folha, e portanto o caminho que a onda tem que percorrer é diferente nos dois casos. Esta discussão será abordada com mais detalhes na seção 4.1.

Uma vez que a planta está em franca atividade fotossintética, ou seja, a partir do momento em que o estado estacionário é atingido, podemos estudar a influência de fatores externos, como o nível de irradiância, por exemplo. O excesso de radiação produz radicais livres nocivos à própria fotossíntese, fazendo com que a taxa de atividade fotossintética seja reduzida. Este é o chamado **efeito de fotoinibição**, fazendo com que a amplitude do sinal seja menor que aquela de antes da aplicação da luz de saturação. Da comparação dos níveis de sinal antes e após o efeito negativo podemos avaliar o efeito de fotoinibição, e tirar conclusões sobre a capacidade da folha de dissipar o excesso de energia luminosa incidente.

3.5.1 Medidas em plantas de tabaco

As figuras 3.10 e 3.11 mostram resultados de medidas de efeito negativo e fotoinibição em folhas de tabaco cultivadas no sol e na sombra, respectivamente. O laser de diodo foi utilizado como fonte de luz modulada, na frequência de $f = 17 \text{ Hz}$. A intensidade de saturação para obtenção de efeito negativo foi de 430 W/m^2 , enquanto o tempo de iluminação foi de 15 minutos em ambos os casos. A mudança de fase durante o período

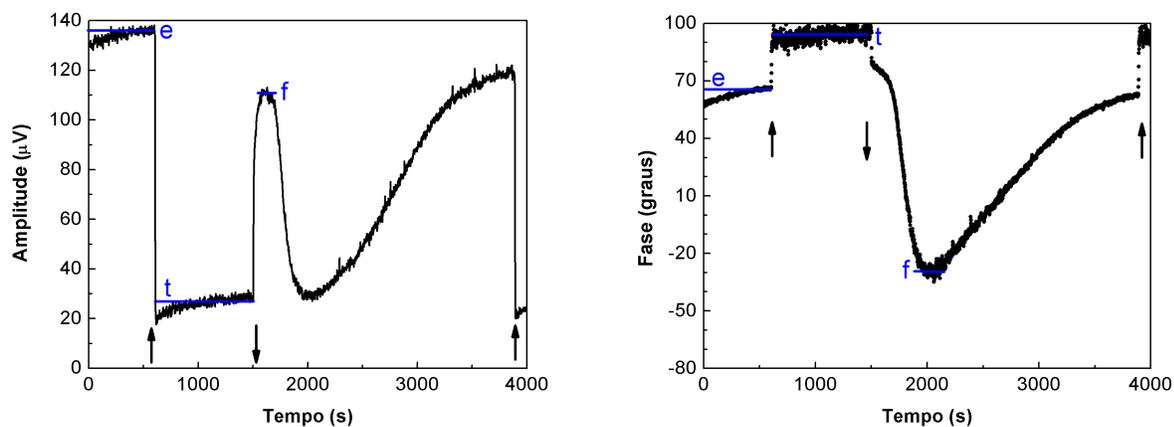


Figura 3.10: Amplitude (esquerda) e fase (direita) do efeito negativo e fotoinibição para uma folha de tabaco cultivada no sol. As retas em azul representam, para esta folha, os valores do sinal estacionário (e), térmico (t) e de fotoinibição, após ser desligada a luz de saturação (f).

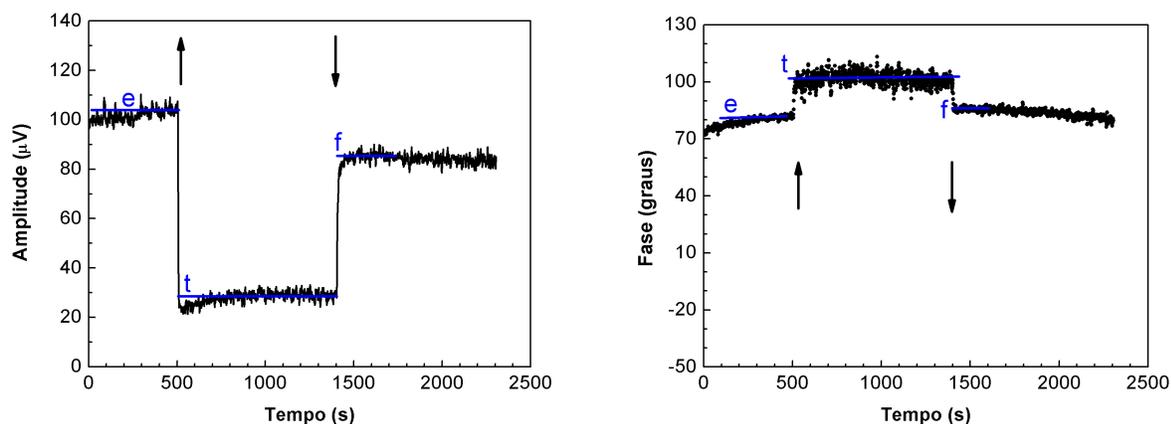


Figura 3.11: Amplitude (esquerda) e fase (direita) do efeito negativo e fotoinibição para uma folha de tabaco cultivada na sombra. As retas em azul representam, para esta folha, os valores do sinal estacionário (e), térmico (t) e de fotoinibição, após ser desligada a luz de saturação (f).

em que a luz de saturação está ligada indica uma mudança da fonte do sinal fotoacústico (do sinal térmico + O_2 para o sinal puramente térmico).

Os resultados encontrados para as plantas de tabaco estão resumidos na tabela 3.2, que mostra as amplitudes dos sinais estacionário (mostrada como a reta denominada e na figura 3.10, para o caso de uma folha) e térmico (reta t) - este último já corrigido pelo efeito positivo -, a amplitude correspondente à componente fotobárica (antes da fotoinibição) e a fração de evolução de O_2 reduzida após a incidência da luz de saturação (taxa de fotoinibição). Para calcular a taxa de fotoinibição, utilizamos como referência o sinal de O_2 logo após a luz de saturação ser desligada (reta f), de forma que

$$\text{tx. fotoinibição} = \frac{\text{Sinal de } O_2 \text{ depois de desligar a lâmpada de saturação}}{\text{Sinal de } O_2 \text{ antes de ligar a lâmpada de saturação}} \quad (3.7)$$

Os resultados mostram que plantas de sombra são mais sensíveis à alta incidência de luz, o que é esperado, uma vez que as plantas de sol possuem um mecanismo de dissipação de energia mais eficiente que plantas de sombra, tendendo a voltar ao nível estacionário mais rapidamente. Isto ocorre devido ao fato de plantas de sol estarem adaptadas a níveis de luminosidade maiores que plantas de sombra.

Condição de luminosidade	A_{est} (μV)	A_{term}^{corrig} (μV)	Sinal de O_2 (μV)	Taxa de Fotoinibição (%)
Sol	127 ± 5	26 ± 3	101 ± 9	10 ± 4
Sombra	80 ± 7	22 ± 2	58 ± 9	22 ± 5

Tabela 3.2: Valores obtidos para o sinal fotobárico e fotoinibição em plantas de tabaco. O erro representa o desvio com relação à média para 8 medidas, num total de 6 plantas utilizadas.

No entanto, é possível notar uma grande diferença no comportamento das plantas alguns minutos após desligarmos a luz de saturação. Enquanto plantas de sombra apresentam uma liberação de oxigênio menor que aquela obtida anteriormente, de forma constante, o sinal fotoacústico em plantas de sol atinge um certo valor e decresce de forma

rápida, retornando praticamente à mesma amplitude do sinal térmico. Depois de um certo tempo o sinal cresce lentamente, até atingir um valor considerável, embora menor que o sinal estacionário registrado antes da incidência de luz de saturação.

3.5.2 Análise da curva de fotoinibição em plantas de tabaco

Para entender os diferentes comportamentos após a saturação fotossintética das plantas de tabaco, acompanhamos a curva de evolução de O_2 no tempo. Do efeito negativo obtido nas figuras 3.10 e 3.11 é possível obter a componente fototérmica e, através da subtração complexa do sinal total por esta componente, obtemos a componente fotobárica do sinal fotoacústico. Os resultados são mostrados nas figuras 3.12 e 3.13. Nestas figuras, os pontos correspondentes à fase durante o efeito negativo foram retirados dos gráficos, uma vez que o sinal de oxigênio vai a zero e a fase torna-se aleatória.

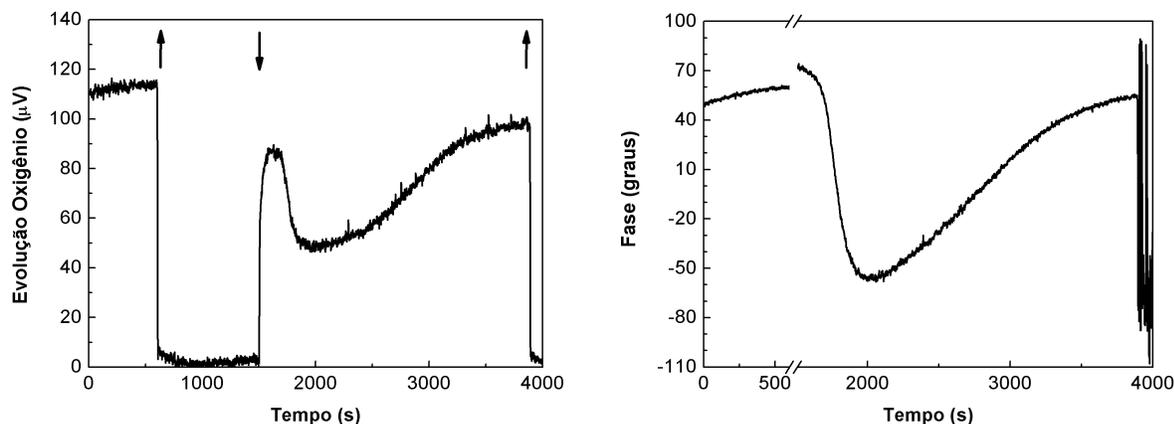


Figura 3.12: Amplitude (esquerda) e fase (direita) da componente fotobárica para uma folha de tabaco cultivada no sol.

O comportamento da fase do sinal fotobárico nas plantas de sol pode indicar o que está ocorrendo a partir de $t > 1500$ s. Sabe-se que uma mudança de 180° pode ser devida a processos de absorção de oxigênio [37], considerando as condições das medidas (frequência

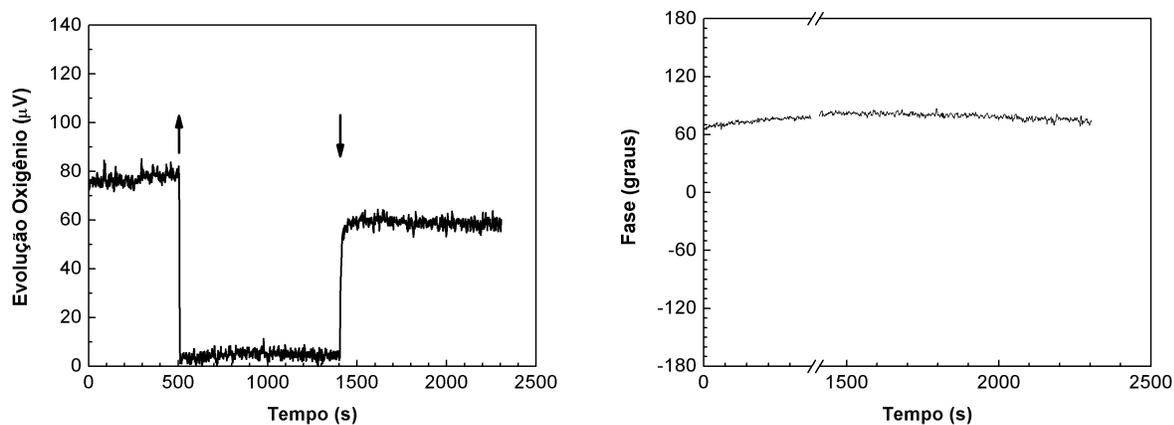


Figura 3.13: Amplitude (esquerda) e fase (direita) da componente fotobárica para uma folha de tabaco cultivada na sombra.

de modulação de 17 Hz, condições atmosféricas normais). É possível notar uma mudança de fase da ordem de 135° na figura 3.12, o que indica uma eventual competição entre evolução e absorção de O_2 após os 15 minutos da presença de luz de saturação.

Do ponto de vista fisiológico, esse consumo de oxigênio pode ser devido à respiração do cloroplasto. No entanto, esta acontece o tempo inteiro, e os motivos pelos quais esta respiração seria detectada somente após a fotoinibição (caso a hipótese fosse verdadeira) não são claros. Outra possibilidade seria que, ao expor as plantas a alta intensidade luminosa, haveria um aumento no estado de redução das membranas do tilacóide, e com isso, algum oxigênio seria consumido para a produção de peróxidos de hidrogênio e superóxidos⁵. No entanto, provavelmente este efeito deve-se à fotorrespiração das folhas, funcionando como uma “válvula de escape” para os elétrons que estão em excesso nos tilacóides. Como visto na seção 3.2, a literatura mostra que plantas de sol apresentam maior atividade fotorrespiratória devido ao alto “custo” de funcionamento dessas plantas [3, 4]. Neste caso, estaríamos vendo uma competição entre fotossíntese e fotorrespiração após uma alta in-

⁵Embora isto seja um processo que deveria ocorrer, em sua maior parte, durante a aplicação da luz de saturação, e tal efeito após a saturação fotossintética não deveria ser tão significativo.

cidência de luz. Um outro fator importante que pode ratificar esta última hipótese é que a produção de O_2 de forma contínua contribui para o aumento da concentração deste gás, favorecendo a fotorrespiração (vide seção 1.5).

Uma outra característica da fotoinibição apresentada por essas plantas é que o processo de competição entre absorção e evolução de O_2 dá-se após um longo período de forte iluminação saturante. A figura 3.14 mostra experimentos de efeito negativo utilizando três diferentes tempos de exposição à luz: 45 segundos, 1 minuto e 15 minutos, respectivamente. A queda do sinal e sua conseqüente reabilitação dá-se apenas para o maior período de tempo, mostrando que este efeito não ocorre para pequenos intervalos de forte iluminação. Nota-se essa mesma característica em plantas de sombra, sendo necessário um tempo de aproximadamente 15 minutos para verificar o efeito de fotoinibição. Cabe

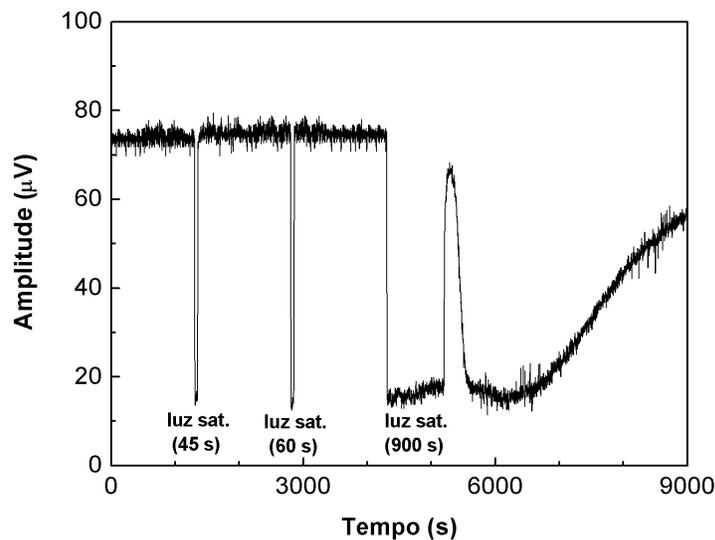


Figura 3.14: Efeito negativo numa folha de tabaco adaptada ao sol, para três diferentes tempos de exposição à luz de saturação.

ressaltar que a amplitude do sinal estacionário da figura 3.14 é relativamente baixo, se comparado com a mesma amplitude apresentadas pelas plantas de sol (tabela 3.2). Isto deve-se ao fato desta medida ter sido realizada após um longo período de experimentos,

ficando a planta submetida a um alto grau de stress, além de algumas semanas mais velha, o que contribui para a diminuição do sinal de O_2 .

3.5.3 Medidas em plantas *Zeyheria*

As figuras 3.15 e 3.16 mostram os resultados de efeito negativo e fotoinibição em folhas das espécies *Zeyheria digitalis* e *Zeyheria tuberculosa*, respectivamente. Nesses experimentos, utilizamos a lâmpada de arco de Xenônio como fonte de luz, com o comprimento de onda fixo em $\lambda = 680 \text{ nm}$ (selecionado pelo monocromador). A luz foi modulada em $f = 17 \text{ Hz}$. A intensidade da luz de saturação foi de aproximadamente 700 W/m^2 , durante 15 minutos contínuos.

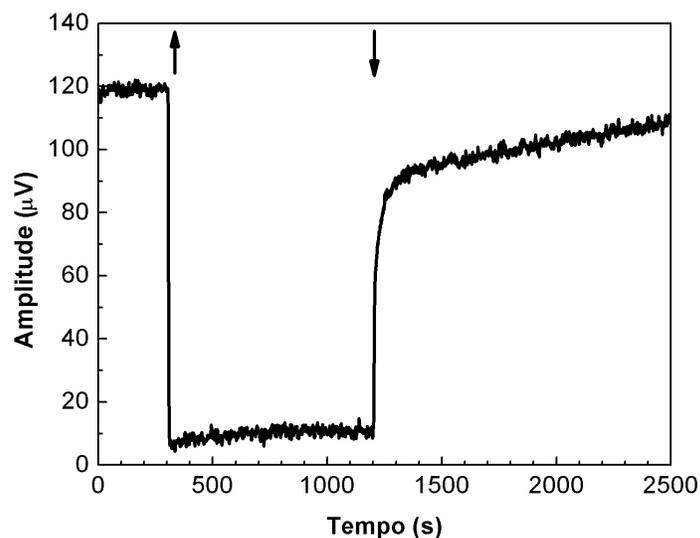


Figura 3.15: Exemplo da curva de efeito negativo e fotoinibição para uma folha de *Zeyheria digitalis*.

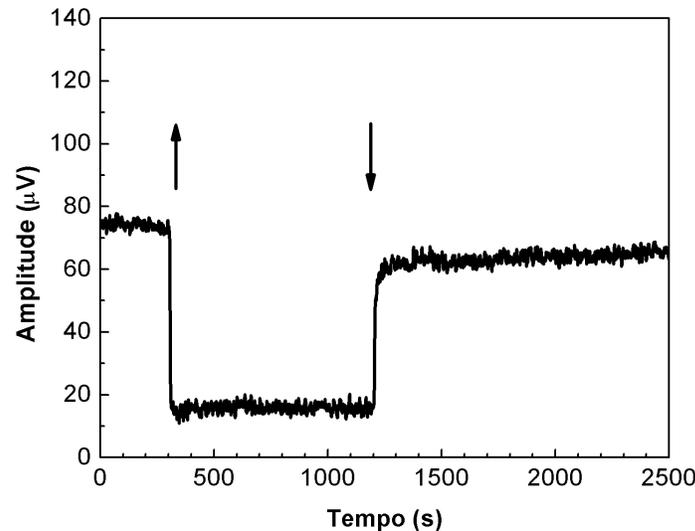


Figura 3.16: Exemplo da curva de efeito negativo e fotoinibição para uma folha de *Zeyheria tuberculosa*.

Nesses experimentos, é possível notar que após os 15 minutos de exposição da folha à forte irradiância, a amplitude do sinal fotoacústico é menor que aquela de antes da aplicação da luz de saturação. No entanto, este efeito é maior em plantas de sombra, mostrando uma maior sensibilidade destas a altas intensidades luminosas. Os valores medidos e determinados são apresentados na tabela 3.3.

Espécie	A_{est} (μV)	A_{term} (μV)	Sinal de O_2 (μV)	Taxa de Fotoinibição (%)
<i>Zeyheria digitalis</i>	119 ± 4	11 ± 6	107 ± 7	15 ± 5
<i>Zeyheria tuberculosa</i>	74 ± 7	16 ± 5	59 ± 9	23 ± 4

Tabela 3.3: Valores obtidos para o sinal fotobárico e fotoinibição em plantas *Zeyheria*. O erro representa o desvio com relação à média para 5 medidas, num total de 3 plantas utilizadas.

Capítulo 4

Espectroscopia fotoacústica

Como mencionado na seção 2.2.1, a técnica fotoacústica é particularmente apropriada para a obtenção de espectros de absorção de amostras altamente espalhadoras de luz. Este é o caso das folhas vegetais. Outra vantagem da técnica é a sua capacidade de discriminar a profundidade em que a absorção de luz ocorreu, permitindo assim a obtenção do perfil de profundidade da amostra no caso dela ter uma distribuição do coeficiente de absorção óptica ao longo da espessura.

Vimos que, para amostras opticamente transparentes e termicamente grossas, o sinal fotoacústico na OPC é proporcional à transmitância da amostra, e é dado pela equação 2.10, que pode ser simplificada por

$$V_{OPC} = V_0 \chi G \frac{I_0}{T_0 l_g \sigma_g k_s \sigma_s} \beta' \frac{k_s}{k_m} \left(\frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right)^{1/2} \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} e^{-\beta l_s} e^{j\omega t} \quad (4.1)$$

O sinal com incidência direta na membrana (equivalente a assumir $\theta_s = 0$ na equação 2.9, e $\beta = 0$) é dado por

$$V_D = V_0 \chi G \frac{I_0}{T_0 l_g \sigma_g k_s \sigma_s} \beta' \frac{k_s}{k_m} \left(\frac{\alpha_m}{\alpha_s} \right)^{1/2} \frac{\cosh(l_m \sigma_m)}{\sinh(l_m \sigma_m)} e^{j\omega t} \quad (4.2)$$

Se dividirmos a equação 4.1 pela equação 4.2, o resultado será

$$V_N = \frac{V_{OPC}}{V_D} = e^{-\beta l_s} \quad (4.3)$$

cujo único parâmetro que varia com o comprimento de onda é o coeficiente de absorção óptica da amostra, β . Desta forma, espectros fotoacústicos podem ser facilmente obtidos adotando esse procedimento de normalização.

O espectro de incidência direta na membrana pode ser medido usando uma lâmina de vidro como amostra, por exemplo, uma vez que esta transmite de forma aproximadamente contínua na região 400-800 nm (caso de nosso interesse) e tem baixo coeficiente de absorção óptica. A figura 4.1 mostra o espectro típico de um sinal de incidência direta, obtida com uma lâmina de vidro, utilizando uma frequência de modulação de 17 Hz. Esta frequência foi fixa em todos os experimentos de espectroscopia. O espectro é equivalente ao espectro de emissão da lâmpada de arco de Xenônio após passar pelos elementos ópticos da montagem.

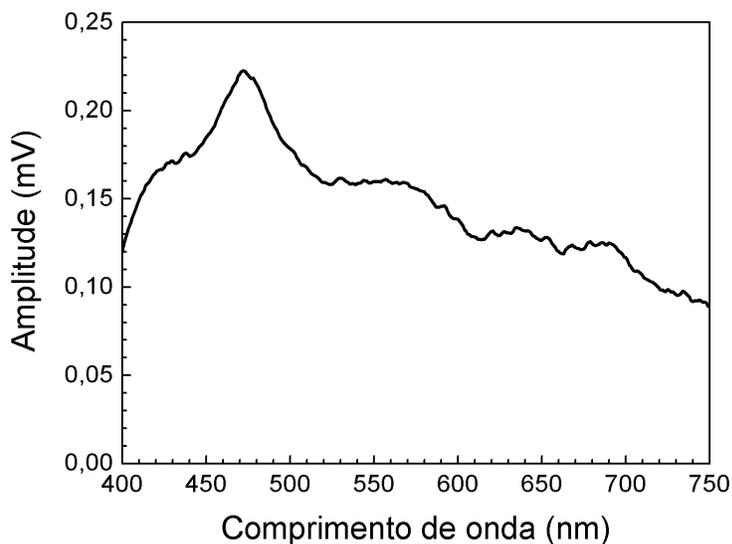


Figura 4.1: Espectro fotoacústico obtido com incidência direta na membrana da OPC, utilizado para normalizar os espectros das folhas.

A figura 4.2 mostra um espectro fotoacústico típico obtido para folhas vegetais na OPC. É possível notar a presença de um baixo sinal de transmissão na região entre 400 e 500 nm, além de um vale entre 650 e 700 nm, devido aos picos de absorção dos carotenos

e das clorofilas, respectivamente.

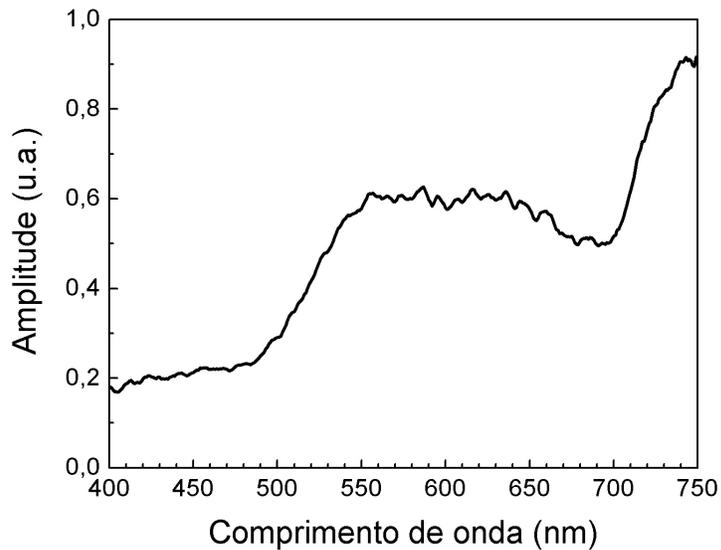


Figura 4.2: Espectro fotoacústico de uma folha de tabaco obtido com a OPC.

A fim de entender melhor este tipo de espectro, é necessário lembrar que, no caso de folhas vegetais, temos dois tipos de contribuição para o sinal fotoacústico. Logo, torna-se fundamental separar as duas componentes para, a partir daí, fazermos uma análise do oxigênio liberado em cada comprimento de onda.

4.1 Espectros de ação

Ao subtrairmos o espectro realizado na presença de luz contínua saturante do espectro realizado sem esta, obteremos um espectro proporcional apenas à contribuição de O_2 liberado. À curva que representa a atividade fotossintética em função do comprimento de onda da luz incidente dá-se o nome de espectro de ação. A mesma pode ser obtida de diversas maneiras. Geralmente, esse tipo de espectro é feito através de medidas de absorção de CO_2 [38]. Com a técnica fotoacústica, R. Carpentier et al. utilizaram inibidores de fotossíntese e determinaram o espectro de ação através de medidas de energia

armazenada [39]. K. Veeranjanyulu et al. usaram medidas de efeito positivo para obter espectros semelhantes [40]. No entanto, não encontramos na literatura espectros de ação obtidos através de medidas fotoacústicas de evolução de oxigênio. Há uma grande vantagem nesta metodologia, uma vez que nossos experimentos são realizados *in vivo* e *in situ*, preservando a folha (método não-invasivo) e com baixas frequências de modulação (maior razão sinal/ruído). Além disto, não requer o uso de componentes extras, como inibidores fotossintéticos.

Determinamos os espectros de ação tanto para as plantas de tabaco como para as plantas *Zeyheria*. Nos espectros com luz de saturação, a intensidade desta foi de 430 W/m^2 (para as plantas de tabaco) ou 700 W/m^2 (para as plantas *Zeyheria*). Na figura 4.3 podemos ver o espectro fotoacústico de folhas de tabaco cultivadas no sol (esquerda) e na sombra (direita), sem a presença de luz de saturação e na presença desta. Os espectros

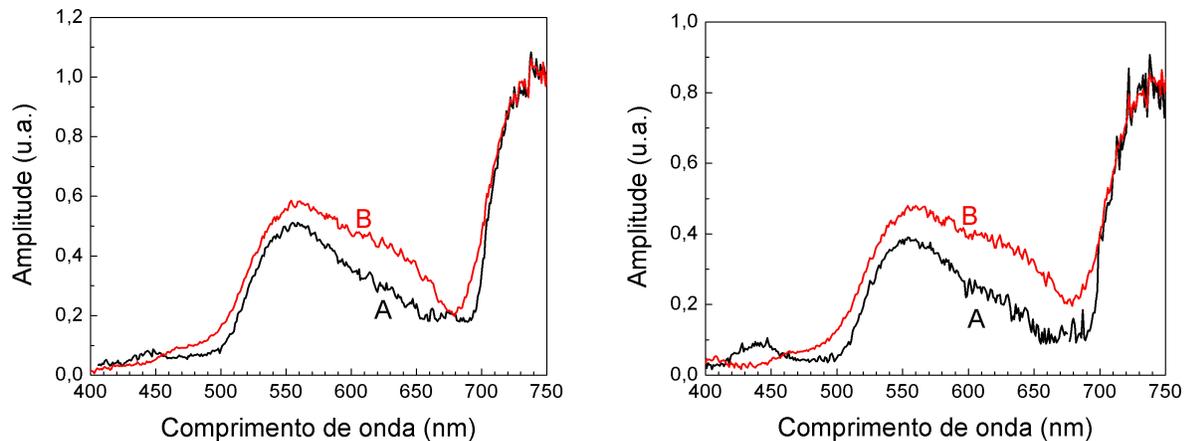


Figura 4.3: Espectros fotoacústicos em folhas de tabaco cultivadas no sol (esquerda) e na sombra (direita), na ausência de luz contínua de saturação (curvas A) e com a presença desta (curvas B).

de ação obtidos para as plantas de tabaco (sol e sombra) podem ser vistos na figura 4.4. As curvas referentes ao espectro de ação representam a média das curvas obtidas em cada uma das repetições de diferentes folhas. No entanto, cabe ressaltar que a forma das curvas

obtidas para cada planta não variou significativamente da média das curvas.

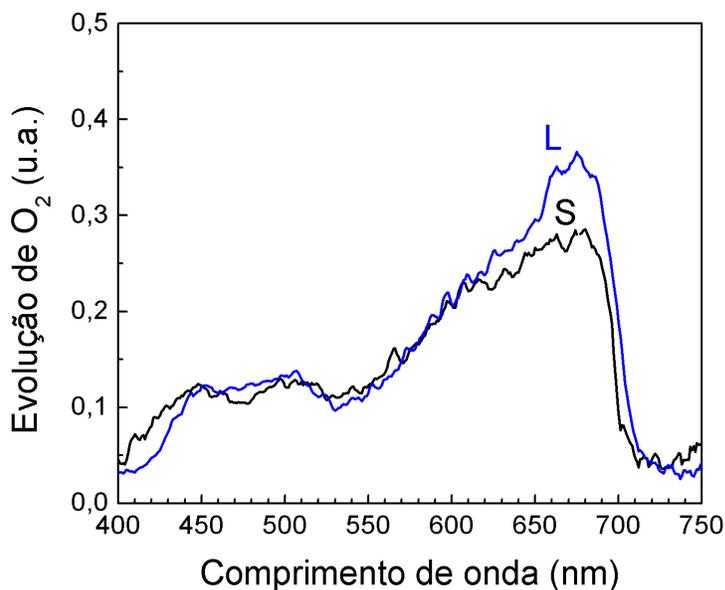


Figura 4.4: Espectros de oxigênio em plantas de tabaco de sol (L) e de sombra (S), obtidos a partir dos espectros da figura 4.3.

Para confirmarmos o fato de que o que estamos obtendo corresponde à evolução de O_2 , podemos realizar medidas de efeito negativo em diferentes comprimentos de onda e, a partir daí, determinar a amplitude do sinal fotobárico. A figura 4.5 mostra resultados de medidas de efeito negativo em plantas *Zeyheria tuberculosa*, em três comprimentos de onda distintos: 520 nm, região onde há pouca absorção dos pigmentos; 480 nm, região de absorção dos carotenos e clorofilas; e 680 nm. Os resultados mostram que mais de 80% do sinal fotoacústico deve-se à contribuição de O_2 quando se incide luz com comprimento de onda $\lambda = 680$ nm, enquanto que este valor é inferior a 50% no caso de $\lambda = 520$ nm, demonstrando que a atividade fotossintética da folha depende do comprimento de onda da luz incidente, como era de se esperar. A contribuição da componente fotobárica em $\lambda = 480$ nm é aproximadamente 66%.

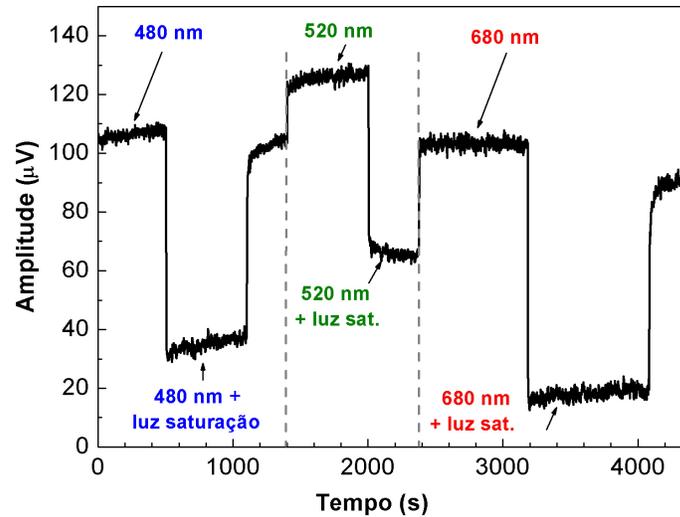


Figura 4.5: Medidas de efeito negativo obtidos para a planta de floresta *Zeyheria tuberculosa* em três comprimentos de onda diferentes.

A figura 4.6 mostra os espectros de ação, obtidos da mesma forma que os espectros de ação para as plantas de tabaco, para plantas *Zeyhera* do cerrado (C) e da floresta (F). Nos espectros feitos com a presença da luz de saturação (não mostrados para esta planta), a intensidade da luz de saturação foi de 700 W/m^2 . Mais uma vez, cada curva representa a média das curvas obtidas para cada planta.

Os símbolos na figura 4.6 representam o valor do efeito negativo obtido na figura 4.5, normalizado pelo sinal da intensidade de emissão da lâmpada em cada comprimento de onda (figura 4.1). A concordância entre estes e o espectro da planta da floresta mostra que esta última corrobora o fato de ambos corresponderem à evolução de O_2 , embora a curva sólida não representa somente a planta na qual foram feitas as medidas de efeito negativo.

É possível notar que o espectro de oxigênio para as folhas de sol têm maior amplitude que os correspondentes para as folhas de sombra. Em particular, o espectro de ação para a planta do cerrado é aproximadamente o dobro do espectro para a planta da floresta.

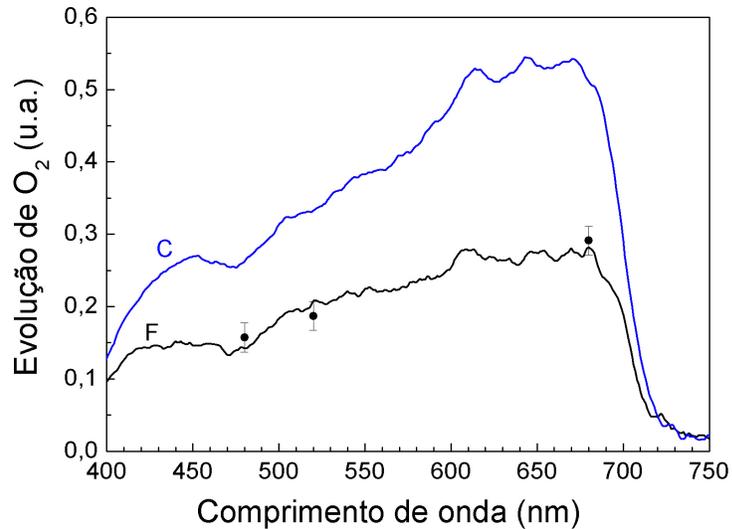


Figura 4.6: Espectros de oxigênio em plantas *Zeyheria digitalis* (C) e *Zeyheria tuberculosa* (F). Os símbolos representam o efeito negativo da figura 4.5 normalizado pelas intensidades de emissão da lâmpada de Xenônio.

No entanto, aqui também temos que levar em consideração o fato do sinal na OPC ser proporcional às variações de pressão na parte traseira da amostra. Assim, nestas medidas a superfície adaxial é iluminada enquanto a superfície abaxial, que não é iluminada, está em contato com a câmara fotoacústica. Logo, o caminho que as ondas térmicas e de concentração de oxigênio têm que percorrer não é o mesmo para os diferentes tipos de plantas.

Nas fotomicrografias da seção 3.2, pode-se notar que folhas de sol apresentam uma cutícula mais espessa e células do parênquima mais alongadas, fazendo com que a profundidade média dos pigmentos seja maior do que a da folha da planta de sombra. Esta diferença na distribuição espacial dos pigmentos explica o fato da amplitude do sinal ser maior em plantas do cerrado, uma vez que o caminho médio a ser percorrido até a superfície abaxial é menor nestas plantas.

Para se ter uma idéia comparativa entre os métodos, a figura 4.7 mostra espectros de ação para diferentes espécies de plantas de cultivo (milho, ervilha, feijão, etc.) obtidos a partir de medidas de absorção de CO_2 [4]. Comparando os espectros desta figura com as curvas obtidas acima (figuras 4.4 e 4.6), vemos que estas têm excelente concordância, mesmo sendo obtidas por diferentes métodos. É possível notar que todas as espécies mostram um pico principal próximo a 680 nm e uma banda entre 400 e 500 nm. Ambos são resultantes da absorção de luz pelas clorofilas e carotenóides, respectivamente. Apesar de um certo padrão, há diferenças nos espectros de ação de diferentes plantas, e mesmo em plantas da mesma espécie cultivadas sob diferentes intensidades luminosas.

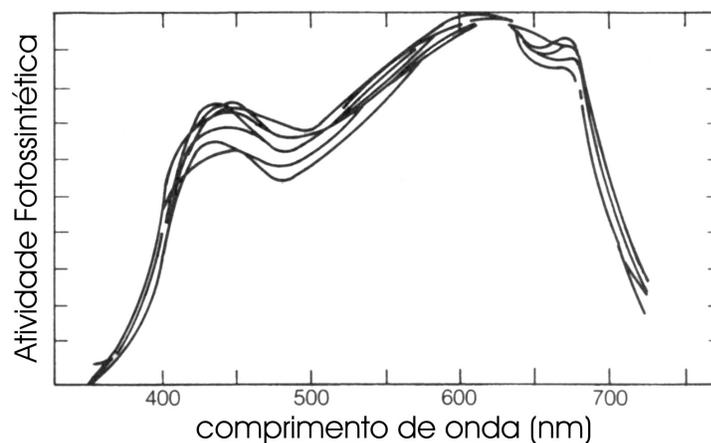


Figura 4.7: Espectros de ação para diferentes tipos de plantas obtidos através de medidas de absorção de CO_2 (extraído da referência [4]).

Capítulo 5

Conclusão e perspectivas

O trabalho desenvolvido mostrou que há diferenças não só morfológicas, mas também fisiológicas, em plantas da mesma espécie crescidas sob diferentes graus de luminosidades, assim como em plantas congênicas de biomas bastante contrastantes (cerrado e mata atlântica). Essas diferenças são conhecidas da literatura, e nosso projeto mostra que as mesmas podem ser evidenciadas pela fotoacústica, comprovando a eficácia dessa técnica no estudo da fotossíntese.

As fotomicrografias mostraram diferenças, já esperadas, na seção transversal de folhas de sol e de sombra. Vimos que folhas adaptadas a altos níveis de luminosidade apresentam uma camada de cutícula mais espessa, enquanto folhas adaptadas a baixas intensidades de luz têm uma maior concentração de cloroplastos e, conseqüentemente, pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenos). Estas diferenças morfológicas induzem diferentes respostas fisiológicas em cada uma das plantas, alterando suas taxas respiratória e fotossintética.

Através de medidas de efeito positivo para diferentes intensidades de luz incidentes pode-se determinar a energia armazenada nas folhas, mostrando a quantidade de energia luminosa absorvida que é convertida em energia química. Os resultados mostraram que plantas adaptadas a ambientes de sombra armazenam energia química com maior

eficiência que plantas de sol.

Ao provocarmos a desativação dos centros de reação fotossintéticos, mantendo as plantas no escuro por um determinado tempo, foi possível observar a curva de indução. Neste caso, plantas adaptadas a altos níveis de luminosidade demoraram um tempo maior para atingir um estado estacionário de produção de oxigênio, indicando que as reações autocatalíticas do aparato fotossintético são re-estabelecidas mais prontamente em plantas de sombra.

Em relação à exposição da planta ao excesso de intensidade luminosa por um longo período de tempo (15 minutos), durante os experimentos de efeito negativo, plantas adaptadas a baixas luminosidades provaram ser mais sensíveis à fotoinibição, indicando uma menor evolução de O_2 após o excesso de luz saturante. Nesse estudo, também é possível destacar o comportamento das plantas de tabaco cultivadas no sol após o efeito negativo, que mostra uma queda acentuada na evolução de oxigênio, com um posterior reestabelecimento de uma taxa estável do sinal fotoacústico. A variação de 135° na fase da componente fotobárica indica uma provável competição entre evolução de O_2 e algum processo de absorção, que pode ser devido ao efeito de fotorrespiração nestas plantas, funcionando como uma “válvula de escape” para o excesso de produção de NADPH e ATP produzidos na fase fotoquímica. Plantas de tabaco cultivadas na sombra não apresentaram este efeito, e uma possível causa é o fato de plantas de sombra fotorrespirarem numa taxa consideravelmente menor, fazendo com que o excesso de luz provoque danos no PSII e “freando” a máquina fotossintética no início do ciclo. No entanto, estudos mais aprofundados podem revelar com maior clareza essa diferença observada.

Vimos também que é possível medir espectros fotoacústicos de folhas com a OPC, podendo separar a componente fototérmica da componente fotobárica. Esta última fornece a amplitude do sinal fotobárico para cada comprimento de onda, ou espectro de ação das folhas. Até o nosso conhecimento, a obtenção de espectros de ação através de medidas de evolução de oxigênio com a OPC é inédita na literatura. Esse método apresenta

grandes vantagens, uma vez que é clara sua capacidade de realizar medidas *in vivo* e *in situ* (preservando a folha), além de utilizar baixas frequências de modulação (maior razão sinal/ruído). O fato de não ser necessário nenhum agente externo, como o uso de inibidores, por exemplo, também é um ganho para a realização deste tipo de medida.

Todos os resultados citados acima levam a outras dúvidas e perguntas que podem ser respondidas com um maior estudo e aplicação da técnica fotoacústica neste tipo de amostras. Por exemplo, podemos citar o estudo das propriedades estruturais das folhas a partir da determinação das propriedades de transporte de massa no processo fotossintético.

Vimos que a componente fotobárica do sinal fotoacústico depende de fatores associados à ativação do sistema fotossintético, como a intensidade luminosa, além da abundância de compostos que participam das reações. Sabemos também que a componente fotobárica depende de fatores experimentais, como a frequência de modulação, ou seja, para uma folha em franca atividade fotossintética, o sinal fotobárico cai à medida que a frequência de modulação aumenta (seção 2.3.2). Isto se deve ao caráter difusivo do transporte de O_2 dos cloroplastos até os espaços intercelulares, governado pela diferença de concentração. O transporte em regime oscilatório se caracteriza pela impedância do meio, impedância esta ligada ao coeficiente de difusão de oxigênio no meio celular e pela permeabilidade das membranas dos cloroplastos e das células. Esta impedância aumenta com a frequência de modulação, fazendo com que a amplitude do sinal caia, e ao mesmo tempo a defasagem com relação à incidência de luz aumente. Desta forma, a medida da fase em função da frequência de modulação pode ser usada para a determinação dos parâmetros de transporte de massa através do ajuste de curvas por um modelo que leve em conta características geométricas do sistema (cloroplasto + célula + espaço intercelular) [41, 31].

A figura 5.1 mostra medidas preliminares da fase da componente fotobárica em função da frequência de modulação para folhas de tabaco cultivadas no sol e na sombra. A inflexão das curvas está associada à interferência das ondas de concentração causada pelas reflexões das mesmas nas membranas. Nota-se que há diferenças na inflexão em

cada uma destas curvas, indicando que os parâmetros de difusão de massa nestas folhas são diferentes, como é esperado, uma vez que estas apresentam estruturas diferentes.

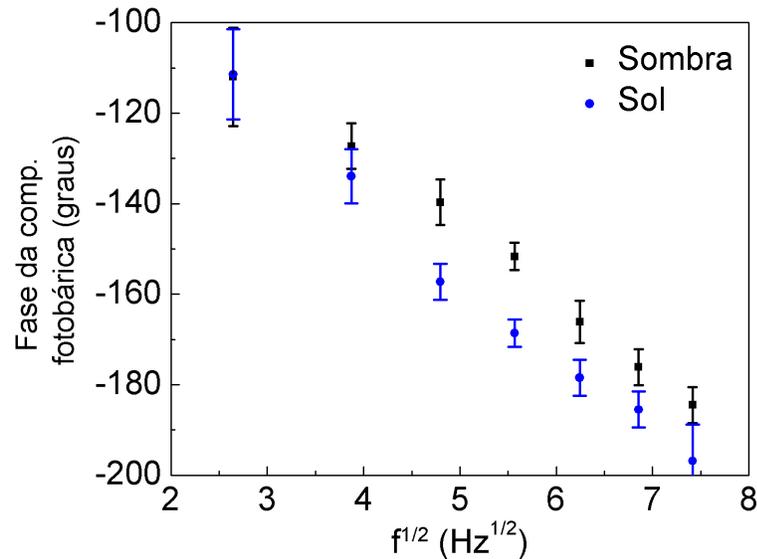


Figura 5.1: Fase da componente fotobárica do sinal fotoacústico para plantas de tabaco cultivadas no sol e na sombra, em função da frequência de modulação incidente.

O interesse mais amplo do estudo de plantas de tabaco cultivadas em diferentes intensidades de luz é na sua aplicação em tabacos transgênicos, que recebem um gene da ervilha. Tal gene é promotor da produção de proteínas associadas às clorofilas do sistema de antenas, e resulta em um sistema coletor de luz mais eficiente na planta geneticamente modificada. Esta maior capacidade de coleta de luz é vantajosa quando a planta está sujeita a condições de irradiância moderada. No entanto, o manuseio de plantas transgênicas deve ser controlado, e assim estudos fotoacústicos com plantas modificadas são possíveis, porém devem ser feitos respeitando certas normas.

Com a utilização das plantas congenéricas *Zeyheria*, foi possível comprovar que, além das condições de crescimento, a procedência também afeta a fisiologia da folha, podendo apresentar respostas fotossintéticas bastante diferentes. Um próximo passo seria estudar

a influência simultânea dos dois fatores citados. Medidas preliminares de espectroscopia fotoacústica e dados de crescimento foram realizados num par de plantas congênicas crescidas em ambientes com diferentes níveis de luminosidade, mostrando que plantas da floresta cultivadas no sol são mais adaptativas que plantas do cerrado cultivadas na sombra. Um estudo mais detalhado sobre esta combinação de origens e condições de crescimento diferentes, somados a dados de biomassa e estudos anatômicos sobre estas plantas, também pode ser alvo de projetos futuros.

Referências Bibliográficas

- [1] S. Rojstaczer, S.M. Sterling e N.J. Moore, *Science* **294**, 2549 (2001).
- [2] B.E.S. Gunning e M.W. Steer, *Plant cell biology: structure and function of plant cells*, Jones and Bartlett, Boston (1996).
- [3] L. Taiz e E. Zeiger, *Plant Physiology*, 3rd ed., Sinauer Assoc, Massachusetts (2002).
- [4] F.B. Salisbury e C.W. Ross, *Plant Physiology*, 4th ed., Wadsworth Publishing Company, California (1992).
- [5] E. Rabinowitch e Govindjee, *Photosynthesis*, John Wiley & Sons, New York (1969).
- [6] R. Emerson, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **9**, 1 (1958).
- [7] J.F. Allen e J. Forsberg, *Trends Plant Sci.* **6**, 317 (2001).
- [8] H.W. Trissl e C. Wilhelm, *Trends Biochem. Sci.* **18**, 415 (1993).
- [9] A. Rosencwaig, *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*, volume 57, John Wiley & Sons, New York (1980).
- [10] A.G. Bell, *Am. J. Sci.* **20**, 305 (1880). Citado em [9].
- [11] W.H. Preece, *Proc. R. Soc. London* **31**, 506 (1881). Citado em [9].
- [12] M.E. Mercadier, *C. R. Acad. Sci. Paris* **92**, 409 (1881). Citado em [9].

- [13] A. Rosencwaig e A. Gersho, *Science* **181**, 657 (1973).
- [14] J.G. Parker, *App. Opt.* **12**, 2974 (1973).
- [15] A. Rosencwaig e A. Gersho, *J. App. Phys.* **47**, 64 (1976).
- [16] F.A. McDonald e G.C. Wetsel Jr., *J. Acoust. Soc. Am.* **60**, S52 (1976).
- [17] L.C. Aamodt, J.C. Murphy e J.G. Parker, *J. App. Phys.* **48**, 927 (1977).
- [18] M.J. Adams, B.C. Beadle, A.A. King e G.F. Kirkbright, *Analyst* **101**, 553 (1976).
- [19] A. Rosencwaig, *Advances in electronics and electron physics*, volume 46, Acad. Press (1978).
- [20] D. Cahen, S. Malkin e E.I. Lerner, *FEBS Letters* **91**, 339 (1978).
- [21] P. Poulet, D. Cahen e S. Malkin, *Biochem. Biophys. Acta* **724**, 433 (1983).
- [22] N. Lasser-Ross, S. Malkin e D. Cahen, *Biochem. Biophys. Acta* **593**, 330 (1980).
- [23] G. Bults, B.A. Horwitz, S. Malkin e D. Cahen, *Biochem. Biophys. Acta* **679**, 452 (1982).
- [24] A.C. Pereira, M. Zerbetto, G.C. Silva, W.J. Silva, H. Vargas, G.O. Neto, N. Cella e L.C.M. Miranda, *Meas. Sci. Technol.* **3**, 931 (1992).
- [25] L.F. Perondi e L.C.M. Miranda, *J. Appl. Phys.* **62**, 2955 (1987).
- [26] M.D. da Silva, I.N. Bandeira e L.C.M. Miranda, *J. Phys. E* **20**, 1476 (1987).
- [27] J.W. Nery, O. Pessoa Jr., H. Vargas, F.A.M. Reis, A. Gabrielli, L.C.M. Miranda e C.A. Vinha, *Analyst* **112**, 1487 (1987).
- [28] A.C. Pereira, G.O. Neto, H. Vargas, N. Cella e L.C.M. Miranda, *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 1512 (1994).

- [29] W.J. Silva, L.M. Prioli, L.C.M. Miranda, N. Cella, H. Vargas e A.M. Mansanares, *Plant Sci.* **104**, 177 (1995).
- [30] P.R. Barja e A.M. Mansanares, *Instrum. Sci. Technol.* **26 (2&3)**, 209 (1998).
- [31] Paulo Roxo Barja, *Produção e difusão de oxigênio: processos biofísicos da fotossíntese investigados com a técnica fotoacústica*, Tese de Doutorado, IFGW-Unicamp (2000).
- [32] M.V. Marquezini, N. Cella, A.M. Mansanares, H. Vargas e L.C.M. Miranda, *Meas. Sci. Technol.* **2**, 396 (1991).
- [33] D.P. Almond e P.M. Patel, *Photothermal Science and Techniques*, 1st ed., Chapman& Hall Publishing, Londres (1996).
- [34] A.D. Jassby, T. Platt, *Limnology and Oceanography* **21**, 540 (1976).
- [35] J. Szurkowski, *Progress in Natural Science* **6**, S554 (1996).
- [36] R.T. Prinsley e R.C. Leegood, *Biochim. Biophys. Acta* **849**, 244 (1986).
- [37] P.R. Barja, A.M. Mansanares, E.C. da Silva, A.C.N. Magalhães e P.L.C.A. Alves, *Photosynthetica* **39 (4)**, 489 (2001).
- [38] G.R. Lister e J.B. Clark, *Plant Physiol.* **55**, 401 (1975).
- [39] R. Carpentier, B. LaRue e R.M. Leblanc, *J. Physique Colloque C6, sup. n. 10, Tome 44*, 355 (1983).
- [40] K. Veeranjanyulu, M. Charland, D. Charlebois e R.M. Leblanc, *Photosynth. Res.* **30**, 131 (1991).
- [41] P.R. Barja, N. Cella, P. Korpiun, C.N. Magalhaes, A.M. Mansanares, E.C. da Silva, H. Vargas, *AIP Conference Proceedings* **463**, Photoacoustic and Photothermal Phenomena - Tenth International Conference, ed. F. Scudieri and M. Bertolotti, pp. 588-590, Woodbury, NY (1999).