



DETECÇÃO ÓPTICA DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA DA FOTOSSÍNTESE

Carlos Henrique Duarte

Recife, 22 de Abril de 2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

DETECÇÃO ÓPTICA DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA DA FOTOSSÍNTESE

Por

Carlos Henrique Duarte.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da UFPE
como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Frederico Dias Nunes, Doutor.

Recife, 22 de abril de 2003

Dedico este trabalho à memória de minha mãe, Francisca Helena da Silva, que não se limitou ao possível, mas se dedicou de corpo e alma para o crescimento e maturação de sua família.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter superado mais esta etapa na minha vida.

À CAPES que me proveu um importante suporte financeiro durante o curso. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e ao Grupo de Fotônica pelo suporte nos translados para a realização das atividades experimentais.

Ao orientador, Prof. Frederico Dias Nunes, pelos ensinamentos transmitidos e por sua atenciosidade e presteza antes mesmo antes do início do mestrado.

Ao Professores Eduardo Fontana, Antônio Jerônimo Belfort, Joaquim Martins e, particularmente, Eurico Bezerra pelo apoio na solução de dúvidas e problemas.

À Prof^ª. Rejane Mansur e ao mestrando Manoel Bandeira, ambos da UFRPE, e, especialmente, ao Prof. Everardo Sampaio do Departamento de Energia Nuclear pela sua ajuda e pelos seus ensinamentos.

Aos Professores Luiz Carvalho do LIKA e Diogo Ardaillon Simões do Departamento de Bioquímica pela disponibilidade e pronto atendimento quando solicitados.

Ao Doutor Paulo César, aos demais amigos da Embrapa Milho e Sorgo e aos Professores. José Pires de Lemos do ICB-UFMG e Ângela Maria Soares do Departamento de Fisiologia da UFLA pela receptividade e acolhimento quando estive em Minas Gerais.

Ao doutorando Rogério Machado da Unesp-Botucatu, com quem efetivamente aprendi os procedimentos e cuidados para ensaios e medições com plantas vivas.

Aos Professores Luiz Gustavo Marcassa e Vanderlei Bagnato pelo acolhimento e pela cessão dos laboratórios do Instituto de Física da USP-São Carlos.

À minha família (Waldemar André Duarte, Ana Cristina Duarte e Leandro Duarte de Paula), à minha namorada Maria Grescy R. Santos, aos amigos Adriano Márcio e Hercília Maria e a fantástica equipe fotônica: André Torres, Carmelo Bastos Filho, Daniel F. da Ponte, Emery Cleiton Lins, Flávio Pereira, Eric J. de A. Arantes, Hélder Pereira, Isnaldo J.S. Coêlho, José Paulo G. de Oliveira, Luciana Salles e Sérgio Campello Oliveira, entre outros que participaram direta ou indiretamente dessa grande conquista.

INDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
O objetivo da Pesquisa	3
O Desenvolvimento da Pesquisa	4
1. AGRONEGÓCIO	6
1.1. Introdução	6
1.2 A Importância do Agronegócio	6
1.3 O desenvolvimento da tecnologia no campo	8
1.4 O Agronegócio em Petrolina-PE	10
1.5 Bibliografia do Capítulo 1	12
2. FUNDAMENTOS QUÂNTICOS	13
2.1 Introdução	13
2.2 O Modelo de Bohr para o Átomo de Hidrogênio	13
2.3 Estados Singlete e Tripleto	15
2.4. Estados de Energia Molecular	18
2.4.1. Níveis de Energia Rotacional.....	18
2.4.2. Níveis de Energia Vibracional	20
2.4.3. Níveis de Energia Eletrônico	21
2.4.4. Estado Vibracional da Molécula.....	22
2.5 Transferência de Energia de Excitação e Migração de Energia	25
2.6 Bibliografia Capítulo 2.....	28
3. FOTOSSÍNTESE	29
3.1 Introdução.....	29
3.2. Histórico	29
3.3. Definição	30
3.4. A Importância da Fotossíntese	32
3.5. Etapas da Fotossíntese	32
3.6. Cloroplasto: Onde se Realiza a Fotossíntese nas Plantas	34
3.7. Absorção de Luz Pelos Pigmentos. Complexo Coletor de Luz.....	35
3.8 Pigmentos Fotossintéticos.....	37
3.9. Sistemas Fotossintéticos. Unidades Fotossintéticas	38
3.10. Transporte Fotossintético de Elétrons.....	40
3.10.1. Fotossistema II.....	41
3.10.2. Fotossistema I	43
3.10.3. Conexão Entre os Dois Fotossistemas	45
3.11. Bibliografia do Capítulo 3.....	47
4. FLUORESCÊNCIA	49
4.1. Introdução.....	49
4.2. Absorção e Conversão de Energia	49
4.3. Importância da Fluorescência	51
4.4. Atividade do Fotossistema II	52
4.5 Emissão por Fluorescência.....	54
4.6. Fluorescência da Clorofila em Relação à Fotossíntese	56
4.7 Eficiência da Fotoquímica	58
4.8. Bibliografia do Capítulo 4.....	59
5. EXPERIÊNCIA NO CAMPO	62
5.1. Introdução	62

5.2. Exigências Nutricionais do Milho	62
5.2. Instrumento de Estimação da Eficiência da Fotoquímica Planta	63
5.2.1 Clipe Foliar.....	64
5.2.2. Unidade Sensora	65
5.2.3. Unidade de Controle	66
5.3 Medição da Eficiência Quântica da Fotossíntese.....	67
5.3.1 Metodologia do Trabalho em Campo	67
5.4. Bibliografia do Capítulo 5.....	73
6. ESPECTROSCOPIA DA FLUORESCÊNCIA	74
6.1. Introdução.....	74
6.2. Espectroscopia da Fluorescência.....	74
6.3. Sistema de Espectroscopia da Fluorescência.....	75
6.4. Metodologia da Experiência.....	77
6.5. Obtenção dos Espectros.....	77
6.6. Análise dos Resultados.....	85
6.7. Bibliografia do Capítulo 6.....	86
7. Instrumentação	87
7.1. Introdução.....	87
7.2. Módulo de Controle de Corrente e de Temperatura.....	87
7.2.1. Controlador de Temperatura	87
7.2.2. Planta de Controle	92
7.3. Projeto da Instrumentação de Determinação da Eficiência Quântica.....	95
7.3.1. Fonte de Luz.....	96
7.3.2. Circuito de Detecção e Amplificação	98
7.4. Bibliografia do Capítulo 7.....	101
8. CONCLUSÕES.....	102
8.1 Introdução.....	102
8.2. Desenvolvimento do Trabalho	102
8.3. Conclusões	103
8.4. Perspectivas.....	104
ARTIGOS SUBMETIDOS A EVENTOS	106

RESUMO

A fotossíntese é o processo de síntese orgânica realizada por vegetais portadores de clorofila, que absorvem a luz para possibilitar a reação entre o gás carbônico e a água, produzindo carboidratos e oxigênio. Num sistema biológico, a importância da resposta à luz tem de ser analisada em termos de seu requerimento quântico. Neste sentido, a medida da fluorescência da clorofila *a* é uma técnica simples, rápida e não invasiva, para avaliação quantitativa *in vivo* da fotossíntese.

Este trabalho objetiva utilizar a fotônica para detectar alterações físicas pré-determinadas numa cultura de milho, que foi escolhida por sua simplicidade, grande importância dentre os principais cultivos de grãos e rápido crescimento.

Assim, iniciamos a confecção de um módulo optoeletrônico, que será nosso primeiro protótipo para as medições. Em seguida realizamos trabalho de campo, na Embrapa Sete Lagoas – MG, utilizando um fluorímetro para medição da fluorescência de uma cultura de milho submetida ao déficit de nitrogênio. Finalmente, obtivemos nos laboratórios da USP-São Carlos, curvas de espectroscopia da fluorescência das folhas de milho sob diferentes regimes hídricos.

Paralelamente a isso reunimos uma farta bibliografia relativa aos processos de realização da fotossíntese e à emissão de fluorescência. Também como motivação para este trabalho mostramos a importância da inserção da tecnologia no aumento da produção de grãos.

A proximidade entre este centro de fotônica e a próspera região agrícola de Petrolina, propiciam condições favoráveis para incrementar a alta tecnologia no campo.

Palavras chave: fotossíntese, fluorescência, luz.

ABSTRACT

Photosynthesis is a organic synthesis process of vegetal that have chlorophyll absorbing light to enable the reaction between carbonic gas and water for a production of carbohydrates and oxygen.

In a biological system light response must be analyzed by your quantum requirement. In this way, chlorophyll fluorescence measurement is a simple, fast and nonintrusive assesment of *in vivo* photosynthesis.

This aim of this work is by the use of photonics detect previously physical alterations in a maize culture. This culture was chosen for your simplicity and your great importance among the others, besides the fast growth of its leaves.

In the beginning we have started to make an optoeletronic module, that will be our first prototype for measurement. Then we did experience in the field, at Embrapa Sete Lagoas - MG, using a fluorimeter for fluorescence assesment of a maize under nitrogen deficit. Finally, we obtained, at USP-São Carlos laboratory, fluorescence spectroscopy of a maize with different water contents.

At the same time we collect a large bibliography about photosynthesis process and fluorescence emission. As an encouragement to this work we show the importance of technology use in a more production of grains

Due to this photonics center is close to the prosperous agricultural region of Vale do São Francisco, is an advantage to increase high technology in the field.

Key words: photosynthesis, fluorescence, light.

Introdução

A fotossíntese, um processo físico-químico em que organismos vivos sintetizam compostos orgânicos a partir de matéria-prima inorgânica, utilizando a energia da luz solar, tem sido pesquisada desde 1770 e até hoje ainda não foi totalmente desvendada. A fotossíntese utiliza a energia solar para absorver dióxido de carbono e água, obtendo como produto carboidratos e como subproduto o oxigênio. A energia armazenada em materiais fósseis e hoje largamente utilizada como combustível, advém da energia solar via fotossíntese. Assim, uma melhor compreensão da fotossíntese a partir da pesquisa científica permitirá um aumento na eficiência e na produtividade das plantas.

O objetivo da Pesquisa

O uso da tecnologia óptica para o estudo da absorção e conversão da energia luminosa em energia química é um nicho ainda não tão explorado, especialmente quanto ao agronegócio, que tem sido o motor da economia no país nos últimos anos. Assim, o Grupo de Fotônica da UFPE, objetivado buscar aplicações da tecnologia óptica e fotônica, não somente no mercado das telecomunicações, iniciou em abril de 2002 este projeto de pesquisa, como tema de dissertação de mestrado: a detecção óptica da eficiência quântica da fotossíntese de plantas verdes pela avaliação da emissão de fluorescência. O objetivo é estruturar um laboratório de aplicações fotônicas para pesquisa em fotossíntese, meio ambiente e atividades afins, possibilitando tanto a análise e tratamento de dados, como o desenvolvimento de instrumentação optoeletrônica.

Trata-se de um tema multidisciplinar, envolvendo as áreas de bioquímica, fisiologia vegetal, eletrônica, informática, óptica, física e química quânticas, e que exigiu a colaboração de alunos, professores e pesquisadores não só da UFPE, mas também de outras instituições de ensino e pesquisa.

Devido aos elevados custos dos equipamentos de medição da eficiência quântica nas plantas usando a emissão de fluorescência, instrumentação esta importada com um custo inicial mínimo em torno de U\$ 15.000 (quinze mil dólares), este trabalho pretende ser o início de um processo que culminará com a confecção de um equipamento similar nacional a preços bem mais acessíveis, viabilizando a sua utilização comercial.

A conjunção de um centro de óptica e fotônica, de referência nacional em Recife e da próspera região agrícola do Vale do São Francisco, sendo expoente o município de Petrolina, cuja produção é voltada para a exportação, visando atender, especialmente, os

rígidos mercados americano e europeu, é um fator determinante para alavancar ainda mais o agronegócio e a pesquisa de ponta em engenharia no Nordeste Brasileiro. Vale ainda ressaltar que também será possível integrar uma rápida e eficaz transmissão de dados, devido a avançada tecnologia em telecomunicações alcançada pelo Grupo de Fotônica da UFPE.

O Desenvolvimento da Pesquisa

O trabalho inicial foi confeccionar um módulo possuindo uma fonte de tensão estabilizada e com unidades controladoras de temperatura e de corrente para um laser de diodo semiconductor, a ser utilizado como fonte de luz de excitação. A meta seguinte era adquirir um pequeno espectrômetro de fibra óptica, com conexão ao PC, permitindo-nos obter a resposta do espectro de fluorescência. Devido ao crescente custo da aquisição do espectrômetro, orçado previamente em U\$ 2.100, ocasionado pela acentuada elevação da cotação do dólar, não foi possível adquirir este equipamento e atingir o objetivo inicial traçado.

Assim sendo, para contornar o problema, o trabalho de campo da dissertação prosseguiu na Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas – MG. A medição das variáveis da fluorescência foi realizada pelo uso de um fluorímetro da marca Hansatech modelo PEA. Para a avaliação da atividade fotossintética, plantas de milho foram tratadas com baixo (estresse de nutrientes) e alto teor de nitrogênio, sendo as medições feitas após 40 dias do cultivo. Finalmente, foram obtidos nos Instituto de Física de São Carlos os espectros de resposta da emissão por fluorescência de folhas de milho submetido a diferentes condições hídricas.

Em substituição aos onerosos métodos que avaliam as taxas de trocas gasosas envolvidas nesta reação, ou às complexas e demoradas análises químicas, a fluorescência da clorofila *a* tem se mostrado ser uma técnica prática, simples e rápida para estimativa *in vivo* da eficiência quântica da fotossíntese.

Para isto torna-se necessária a utilização de equipamentos ópticos que detectem o sinal de fluorescência emitido quando a planta é irradiada por luz na região do espectro visível. Assim, este trabalho de pesquisa foi desenvolvido em três partes: início da confecção de um módulo optoeletrônico nos laboratórios do grupo de fotônica, medições da eficiência quântica da fotossíntese de uma cultura de milho sob baixo e alto teor de nitrogênio, na Embrapa Sete Lagoas-MG, e obtenção de curvas de espectroscopia do milho, no Instituto de Física da USP-São Carlos.

Resumo dos Capítulos

Esta dissertação que se inicia no Capítulo 1 com uma visão geral da evolução do agronegócio no Brasil ao longo da última década. Discorre-se sobre os grandes avanços na biotecnologia desenvolvida por pesquisadores brasileiros, propiciando uma significativa melhoria e adaptação de cultivares ao clima e ao solo das diversas regiões do Brasil, gerando a multiplicação dos grãos neste período. Associada a isto há uma grande inserção de tratores e colheitadeiras modernas, resultando na redução das perdas da produção.

No capítulo 2, discorre-se acerca dos fundamentos da mecânica quântica que serão aplicados nos capítulos subseqüentes. Partindo da importância do requerimento quântico para a determinação da eficiência fotossintética, passando pelos modelos de estados de energia de um átomo, encerra com uma abordagem acerca dos estados singleto e tripleto de um átomo de dois elétrons.

No capítulo 3, após um breve histórico, da definição e da importância da fotossíntese, aborda-se os seus aspectos fisiológicos: etapas química e fotoquímica, cloroplasto que é a sede das reações fotossintéticas, pigmentos fotossintéticos, absorção de luz pelos pigmentos e sistemas fotossintéticos. A finalização trata do aspecto bioquímico do transporte de elétrons.

No capítulo 4, há uma introdução discorrendo sobre a importância da estimação, tanto no campo como no laboratório, da eficiência do aparato fotossintético *in vivo* pelo uso da resposta por fluorescência, uma técnica simples, rápida e não invasiva. Os tópicos seguintes versam a respeito da atividade do fotossistema II em relação à fluorescência, dos processos de absorção e conversão de energia, dos parâmetros da emissão por fluorescência, do papel da fluorescência da clorofila em relação à fotossíntese, análise da extinção da energia absorvida e eficiência da fotoquímica.

O capítulo 5 versa sobre a experiência da medição da fluorescência, realizada na Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas-MG, de uma cultura de milho submetida ao déficit de nutriente. No capítulo 6 avaliamos algumas curvas de espectroscopia da fluorescência do milho obtidas nos laboratórios do Instituto de Física em São Carlos da Universidade de São Paulo.

O capítulo 7 enfoca a instrumentação optoeletrônica a ser utilizada para a determinação dos parâmetros da eficiência quântica fotossintética. Finalmente no capítulo 8, apresentamos os resultados e conclusões, além das sugestões para a continuidade da linha de pesquisa.

Capítulo 1

Agronegócio

1. Agronegócio

1.1. Introdução

Neste capítulo apresentaremos uma análise do agronegócio no Brasil desde 1990, objetivando mostrar a sua importância econômico-social, como a necessidade de aplicação de tecnologia de ponta nesta área. Como veremos, a tecnologia tem sido a base para excepcionais avanços no agronegócio, produzindo competitividade internacional e riqueza nacional. Pontuando a importância da tecnologia vemos a necessidade do Grupo de Fotônica se inserir na geração de tecnologia nacional para uso no campo.

1.2 A Importância do Agronegócio

A agropecuária e os negócios que ela gera têm sido a âncora da economia brasileira e a salvação da balança de comércio exterior. De janeiro a julho de 2002, o produto interno da agricultura cresceu 9,2% em relação ao mesmo período do ano anterior. Este número se torna ainda mais grandioso se comparado à marca de 0,14% propiciada pela economia brasileira no primeiro semestre de 2002. Se toda a economia brasileira fosse agrária, no final do ano o país teria produzido um superávit na balança comercial de 21 bilhões de dólares. Só para comparar, as indústrias eletrônica, química e de bens de capital somaram em 2001 um saldo negativo de 18 bilhões de dólares. Safra recorde, câmbio favorável e preços internacionais altos, transformam o agronegócio no principal motor da economia brasileira (CAIXETA, 2002).

A importância do agronegócio não está apenas no mero resultado econômico, mas, também na origem desses resultados: a tecnologia incorporada ao negócio. Uma evidência disso está na geração de tecnologia do plantio redundando em um grande aumento da produtividade.

Considerando uma mesma área plantada, o país colhe aproximadamente o dobro de grãos que colhia há dez anos. Ao longo deste período, enquanto a área plantada cresceu de apenas 37,8 para 41,4 milhões de hectares, ou 9,5%, a produção passou de 57 milhões de toneladas para 108,5 milhões de toneladas., ou 87,7% (EDWARD E VIEIRA, 2002).

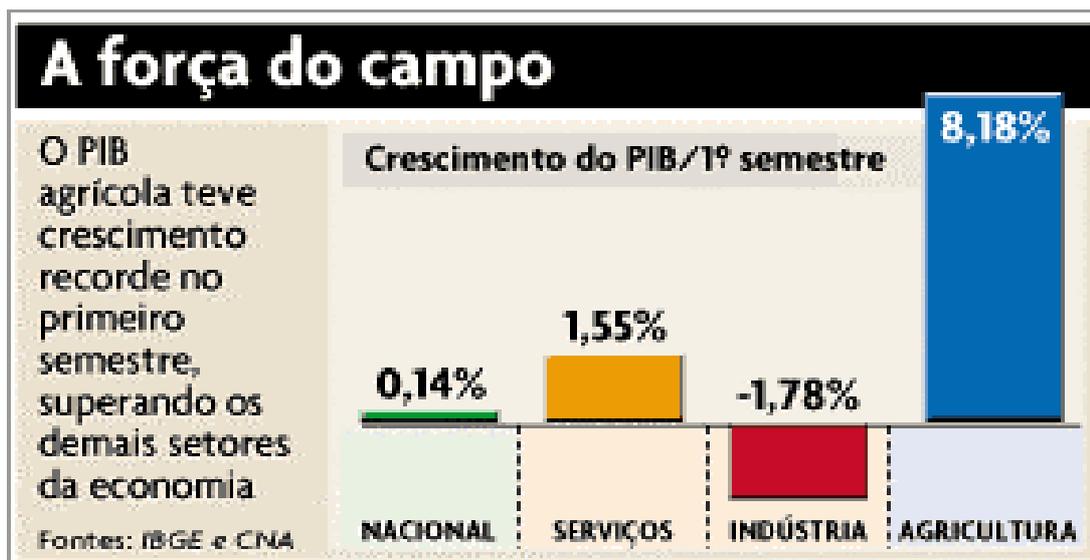


Fig. 1.1. Crescimento do PIB/1º semestre de 2002. (Agricultura: O motor que faz o Brasil andar. Revista Veja, São Paulo, edição 1769, set. 2002. Disponível em: www.revistaveja.com.br/veja18Set02.html. Acesso em 20 de novembro de 2002.)

Segundo Caixeta (2002), a produtividade média de 1,2 tonelada por hectare do início dos anos 80, saltou para 2,5 toneladas por hectare na virada do século. Numa estimativa preliminar, dados do governo apontam para uma produção de 108,5 milhões de toneladas de soja, algodão, milho, arroz, feijão e trigo – safra 11,7% maior do que a do ano anterior e um novo recorde. As conseqüências destes resultados não se limitam apenas à colheita de grãos, mas se estendem a outros setores como o da produção de carnes bovina, suína e de aves. Nos últimos doze meses anteriores a setembro de 2002, estas exportações atingiram 3 bilhões de dólares.

O Brasil é hoje o maior produtor de café, açúcar e suco de laranja do mundo. E o segundo de frango, carne bovina e soja. A agricultura emprega atualmente 1,2 milhão de trabalhadores com carteira assinada e responde por 37% do PIB nacional. Só na agricultura, e levando-se em conta apenas os trabalhadores com carteira assinada, o campo passou a construção civil neste ano em número de empregados. A questão é que a agroindústria precisa de mão-de-obra qualificada, e também não qualificada, nos seus vários estágios. O operador de colheitadeira atual não é o mesmo tratorista de antigamente, tendo em vista ter de operar uma máquina que faz o plantio com um sistema GPS (ALESSANDRA E CUNHA, 2002).

especial agronegócio

A MULTIPLICAÇÃO DOS GRÃOS

O pequeno crescimento da área plantada e o contínuo aumento da produção mostram a extraordinária produtividade da agricultura brasileira

■ Produção (em milhões de toneladas)
■ Área (em milhões de hectares)

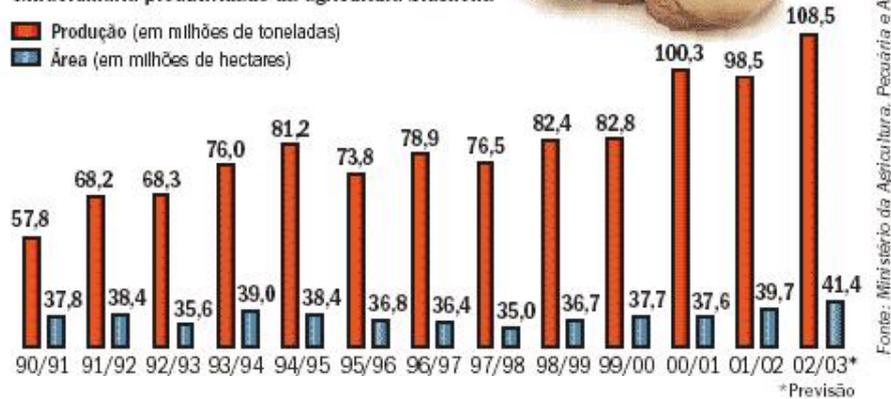


Figura 1.2. O crescimento da produção de grãos a partir de 1990 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2002).

1.3 O desenvolvimento da tecnologia no campo

Há dez anos, o Brasil desperdiçava 10% de sua colheita e, hoje, esta perda não chega a 1% da colheita. Antigas máquinas colheitadeiras danificavam os grãos ou deixavam que eles ficassem pelo caminho (EDWARD E VIEIRA, 2002). A grande transformação no campo foi o aumento da produtividade. As vitórias econômicas na zona rural são produto do uso intensivo de capital e da aplicação de modernização e de soluções de alta tecnologia. Foi uma revolução lastreada em tecnologia de ponta, eficiência gerencial e agregação de valor.

Segundo Caixeta (2002), tal desempenho deve-se ao uso mais intensivo de adubos, variedades mais precoces e produtivas, inovações como o plantio direto e máquinas mais modernas e eficientes. Os tratores e colheitadeiras são equipados com direção hidráulica, ar-condicionado, assento anatômico e instrumentos digitais. O produtor brasileiro tem acesso às mesmas máquinas e à mesma tecnologia que seus colegas do Hemisfério Norte. A agricultura é um dos setores de mais alto nível tecnológico no Brasil e no mundo. Quem visitar uma propriedade agrícola moderna verá uma colheitadeira com o mesmo GPS utilizado em aviões, produtores de sementes com alta genética e especialistas realizando ensaios de agricultura de precisão.

NASCE UMA SEMENTE	
O longo caminho do laboratório à lavoura	
Novas variedades de plantas são criadas a partir das já existentes – como os 4 661 tipos de soja arquivados na Embrapa a -20°C	
Após cinco anos de trabalho, as novas sementes chegam ao multiplicador, o agricultor que transforma quilos de novas sementes em toneladas	
Amostras voltam ao laboratório. A produção só pode ser vendida como semente se tiver mantido as características iniciais	
Quase dez anos depois do início da pesquisa, o agricultor pode comprar e plantar as sementes certificadas	
Uma nova variedade de planta, ou cultivar, oferece em média 3% mais produtividade que a anterior. O ganho pode chegar a 10%	
<i>Fontes: Embrapa, Fundação MT e Aprosmat</i>	

Figura 1.5. A evolução da semente: do laboratório à lavoura.

(http://portalexame.abril.com.br/pgMain.jhtml?ch=ch03&sc=sc0301&pg=pgart_0301_231002_39693.html. Acesso em: 17 fev. 2003).

A alta tecnologia também é responsável pela entrada do país na lista de exportadores de máquinas e equipamentos agrícolas, área em que o Brasil sempre foi importador. Neste primeiro semestre, a indústria do agronegócio exportou o equivalente a 600 milhões de dólares em tratores e máquinas agrícolas. Além de produzir mais na mesma área plantada, o Brasil também está conquistando novos e importantíssimos espaços agricultáveis nas últimas décadas. Só para exemplificar, até os anos 70 as cultivares de soja eram trazidas do Estados Unidos e limitadas ao plantio no clima temperado da Região Sul. Hoje foram adaptadas às condições de Minas Gerais, da Bahia, do Maranhão e do Piauí. A

produtividade que inicialmente mal chegava a 35 sacas por hectare, hoje bate a marca de 55 a 60 sacas, superior à média de 53 sacas obtidas pelos agricultores americanos. A vitalidade do campo é uma notícia excelente num país nocauteado diariamente por informações pessimistas sobre o dólar e o risco Brasil.

O efeito multiplicador significa que quando a agricultura vai bem consegue também alavancar o crescimento de outros segmentos importantes da economia. O dinheiro do campo aumenta o poder aquisitivo para a compra de imóveis, automóveis e eletrodomésticos, contribuindo para o desenvolvimento do comércio das cidades, que têm no agronegócio sua principal fonte de renda.

Os méritos, em grande parte, são dos cientistas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), que desenvolveram tecnologia para incorporar ao sistema produtivo do país os cerrados e outros ecossistemas antes hostis. A biotecnologia, genuinamente brasileira, associada à mecanização moderna tornaram possível tais acontecimentos. O próximo passo é a agricultura de precisão, e, para isso, será necessário o desenvolvimento de técnicas e/ou equipamentos nacionais para avaliação *in vivo* da atividade fotossintética da planta, possibilitando identificar prematuramente a deficiência hídrica ou de minerais, bem como a incidência de doenças, sem a necessidade de levar uma amostra para identificação em laboratório. Este procedimento evita o retardo no início do controle das doenças e de estresses ambientais.

1.4 O Agronegócio em Petrolina-PE

No estado de Pernambuco, o agronegócio também apresenta uma grande importância econômica e tecnológica. A indústria canavieira, hoje decadente, contribuiu durante muitos anos para o desenvolvimento do estado, sendo que, ainda hoje, tem relevada importância. Entretanto, surgiram outras *commodities* agrícolas importantes e pujantes. Podemos citar como exemplo a fruticultura irrigada no Vale do São Francisco, sendo seu expoente o município de Petrolina.

Petrolina, situada no submédio São-Francisco do sertão pernambucano, tem o agronegócio como o principal setor de sua economia, tanto no aspecto da participação da base econômica quanto na absorção de mão-de-obra. A partir de 1990, em substituição aos cultivos temporários, teve início a especialização de fruteiras irrigadas, tais como manga, uva, coco e goiaba. A produção agrícola integrou-se à produção agro-industrial caracterizando-se como exportadora de alimentos para outras regiões e para o exterior. (CORREIA E MARINOZZI, 2003).

Isto se deve aos recursos de solo e de clima, como pela presença do Rio São Francisco, que possibilitou a implantação de vários perímetros irrigados. O clima quente e seco, associado a irrigação, permite que se tenha ciclos sucessivos de produção e colheitas ao longo do ano, com produtividades acima da média nacional.

A partir da implantação do seu primeiro pólo irrigado, Petrolina tem apresentado taxa de crescimento econômico anual acima de 10%. A participação do PIB do município em relação ao estado de Pernambuco saltou de 1,89% em 1970 para 9,63% em 1997. A taxa de urbanização é de 77%. A agricultura emprega 51% da população economicamente ativa, seguida pelo comércio com 39,75% e pela indústria com 8,7%. (CORREIA, 2003).

As empresas que atuam no local se especializaram no plantio de uva e, mais acentuadamente, de manga. Entre 1997 e 1999, do total de 19.193 toneladas de uvas e das 116.320 toneladas de manga exportadas pelo Brasil, respectivamente, 95% e 85,5% foram colhidas no pólo de Juazeiro e Petrolina. Assim, dos 104 milhões de dólares obtidos com essas exportações, pelo menos 95 milhões de dólares, ou 91%, foram auferidos por produtores deste pólo.

1.5 Bibliografia do Capítulo 1

CAIXETA, NELY. **Especial Agronegócio: A Força do Campo**. Revista Exame: São Paulo, edição 778, ano 36, p. 52-58 (out. 2002).

EDWARD, JOSÉ e VIEIRA, KARINE. **Agricultura: O Motor que faz o Brasil andar**. Revista Veja, São Paulo, set. 2002, edição 1769. Disponível em: /veja18Set02.html

FONTANA, ALESSANDRA e CUNHA, RODRIGO VIEIRA DA. **Seu Trabalho sob Nova Direção - ...E o que depende do Mercado**. Revista Você S/A: São Paulo, edição 55, p. 22-25 (jan. 2003).

OLIVEIRA, MARCOS DE. **Tecnologia – Agricultura: Luz Sobre as Laranjeiras**. Revista Fapesp: São Paulo, nº 80, p. 63-66 (out. 2002).

CORREIA, REBERT COELHO E MARINOZZI, GABRIO. **Dinâmicas da agricultura irrigada do pólo Juazeiro-BA/Petrolina-PE**. <http://gipaf.cnptia.embrapa.br/itens/publ/sober/trab048.pdf>. Acesso em 13 fev. 2003.

CORREIA, REBERT COELHO. **Alterações na agricultura irrigada do pólo Jazeiro-BA/Petrolina-PE**. <http://www.cpatsa.embrapa.br/artigos/agrocast.html>. Acesso em 17 fev. 2003.

Capítulo 2

Fundamentos Quânticos

2. Fundamentos Quânticos

2.1 Introdução

Neste capítulo discorreremos acerca dos níveis de energia do átomo de hidrogênio, estados singlete e tripleto, espectro molecular e da transferência de energia de excitação. Pretendemos entender como ocorrem as transições do nível fundamental para o nível excitado de uma molécula de clorofila ao absorver luz em um determinado comprimento de onda, conseqüentemente, re-emitindo em outro comprimento de onda. Também teremos uma visão do processo de transferência de energia desencadeado pelo complexo coletor de luz. Estes assuntos serão abordados no Capítulo 3 - Fotossíntese.

2.2 O Modelo de Bohr para o Átomo de Hidrogênio

O modelo de Bohr para um átomo constituído de um núcleo de carga $+Ze$ e massa M , prevê que um elétron de carga $-e$ e massa m , girando numa órbita circular em torno do núcleo só pode se mover numa órbita na qual seu momento angular orbital L é um múltiplo inteiro de \hbar

$$L = n\hbar, \hbar = h/2\pi \quad 2.1$$

Esta equação descreve a quantização de Bohr do momento angular orbital de um elétron atômico que se movimenta submetido a uma força inversamente proporcional ao quadrado da distância.

O terceiro postulado de Bohr garante a estabilidade do átomo afirmando que um elétron movendo-se em uma destas possíveis órbitas, mesmo estando constantemente acelerado, não emite radiação, fazendo com que sua energia total E permaneça constante. Finalmente, o quarto postulado, que na realidade é o postulado de Einstein, define a frequência de um fóton de radiação eletromagnética como sendo igual energia transportada pelo fóton dividida pela constante de Planck

$$\nu = \frac{E_i - E_f}{h} \quad 2.2$$

A quantização do momento angular orbital implica na quantização da energia total E na forma (EISEBERG, 1979)

$$E = -\frac{mZ^2e^4}{(4\pi\epsilon_0)^2 2\hbar} \frac{1}{n^2} \quad 2.3$$

Deste modo, quando o elétron se move de uma órbita inicial de energia total E_i para uma órbita final E_f há emissão de radiação eletromagnética igual a quantidade $(E_i - E_f)$ dividida pela constante de Planck h

$$\nu = \frac{E_i - E_f}{h} = +\left(\frac{1}{4\pi\epsilon_0}\right)^2 Z^2 \left(\frac{1}{n_f^2} - \frac{1}{n_i^2}\right) \quad 2.4$$

Assim, utilizando 2.3 podemos representar o diagrama de níveis de energia para o átomo de hidrogênio ($Z = 1$) conforme a figura 2.1. A energia de ligação do átomo de hidrogênio, que liga o elétron ao núcleo, corresponde numericamente a energia em que $n = 1$.

O estado mais estável ou estado fundamental é aquele no qual o elétron tem o mínimo de energia em que $n = 1$. Ao absorver energia o elétron sofre uma transição para um estado excitado ou de maior energia onde $n > 1$. Ao retornar ao estado fundamental, o átomo emite o excesso de energia, por uma série de transições em que o elétron decai para estados de mais baixa energia.

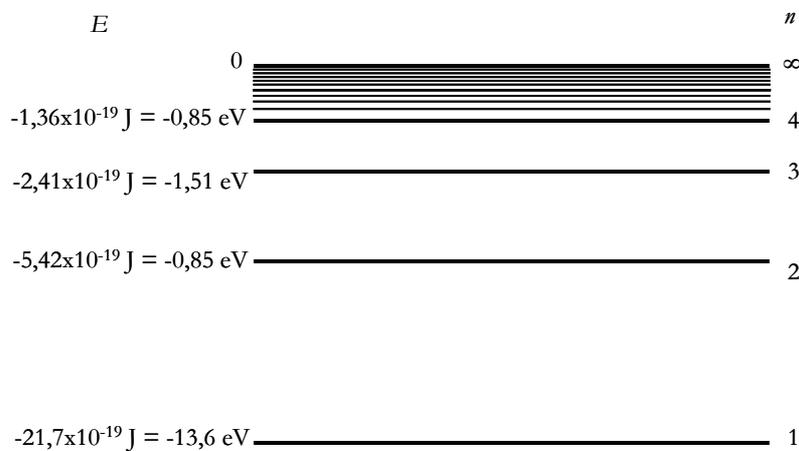


Figura 2.1. Diagrama de níveis de energia para o átomo de hidrogênio.

Como veremos na seção 3.7, fótons incidindo em compostos orgânicos estáveis ($n = 1$), podem transferir suas energias para estas moléculas possibilitando que seus elétrons da camada mais externa sofram uma transição do estado fundamental para um estado excitado ($n > 1$), tornando as moléculas mais reativas para uma reação química.

2.3 Estados Singleto e Tripleto

Para uma descrição quântica de duas partículas idênticas 1 e 2 sem interação, como dois elétrons, em que os resultados mensuráveis pela mecânica quântica independem da identificação das partículas, construiremos duas combinações lineares de duas autofunções na forma:

$$\psi_S = \frac{1}{\sqrt{2}} [\psi_\alpha(1)\psi_\beta(2) + \psi_\beta(1)\psi_\alpha(2)] \quad \dots 2.5$$

$$\psi_A = \frac{1}{\sqrt{2}} [\psi_\alpha(1)\psi_\beta(2) - \psi_\beta(1)\psi_\alpha(2)] \quad \dots 2.6$$

ψ_S e ψ_A são, respectivamente, as autofunções simétrica e anti-simétrica, para as partículas 1 e 2, com seus quatro números quânticos (três espaciais e um de spin) representados por α e β .

Se supusermos ambas as partículas no mesmo estado quântico α , espacial e de spin, e considerando a equação 2.6, a autofunção seria identicamente nula. Pelo princípio de exclusão de Pauli, um átomo multieletrônico não pode possuir mais de um elétron ocupando o mesmo estado quântico. Assim, concluímos que os elétrons idênticos devem ser descritos por uma autofunção total anti-simétrica. Uma partícula com característica anti-simétrica, que é uma propriedade básica determinada experimentalmente como a carga e o spin, é denominada férmion e seu número de spin s é um semi-inteiro ($s = 1/2$).

Podemos re-escrever a autofunção total do sistema na equação 2.6 de forma que as variáveis espaciais e de spin ocorram separadamente

(autofunção total) = (autofunção espacial) x (autofunção de spin)

Substituindo-se em 2.5 e 2.6 os símbolos α e β , que descrevem os quatro números quânticos, para a e b, representando apenas o conjunto dos três números quânticos espaciais, teremos

$$\varphi_S = \frac{1}{\sqrt{2}} [\psi_a(1)\psi_b(2) + \psi_b(1)\psi_a(2)] \quad \dots 2.7$$

$$\varphi_A = \frac{1}{\sqrt{2}} [\psi_a(1)\psi_b(2) - \psi_b(1)\psi_a(2)] \quad \dots 2.8$$

O spin de um elétron somente possui duas orientações discretas em relação a qualquer eixo z , pois sua componente S_z assume os valores $+1/2$ ou $-1/2$, em unidade de \hbar . Para o caso de dois elétrons sem interação teremos quatro estados de spin permitidos para o sistema, e, conseqüentemente, apenas quatro autofunções de spin possíveis. A única autofunção de spin anti-simétrica descreve o estado singleto e as três autofunções simétricas os estados de tripleto.

$$\varphi_{A1} = \frac{1}{\sqrt{2}} [(+1/2, -1/2) - (-1/2, +1/2)] \quad (\text{singleto}) \quad \dots 2.9$$

$$\varphi_{S1} = (+1/2, -1/2) \quad \dots 2.10$$

$$\varphi_{S2} = \frac{1}{\sqrt{2}} [(+1/2, -1/2) + (-1/2, +1/2)] \quad (\text{tripleto}) \quad \dots 2.11$$

$$\varphi_{S3} = (+1/2, -1/2) \quad \dots 2.12$$

Determinando para cada estado o módulo S' e a componente S'_z , do momento angular total de spin S' , que é a soma dos momentos angulares de spin de dois elétrons, teremos

$$S' = S_1 + S_2 \quad \dots 2.13$$

S' e S'_z são quantizados na forma (Eiseberg, 1979)

$$S' = \sqrt{s'(s'+1)}\hbar \quad 2.14$$

$$S'_z = m'_s \hbar \quad 2.15$$

e os números quânticos obedecem às relações

$$m'_s = -s', \dots, +s' \quad 2.16$$

$$s' = 0, 1 \quad 2.17$$

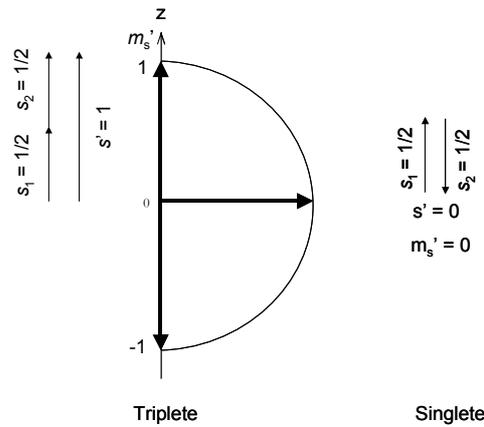


Figura 2.2. Diagramas vetoriais representando as regras de adição de números quânticos de spin.

Utilizaremos um diagrama vetorial para termos uma noção da representação das regras de adição dos números quânticos $s_1 = 1/2$ e $s_2 = 1/2$ para obtermos os valores de s' e m'_s . Nesta representação, mostrada na figura 2.2, observa-se que os estados de tripleto correspondem a $s' = 1, m'_s = +1$; $s' = 1, m'_s = 0$; $s' = 1, m'_s = -1$, em que os spins eletrônicos são paralelos. De outra forma, no estado singlete em que os spins são antiparalelos, $s' = 0, m'_s = 0$.

No estado tripleto os spins eletrônicos são paralelos, a autofunção espacial de spin é simétrica e a autofunção espacial anti-simétrica, para se obter uma autofunção total do elétron anti-simétrica. Considerando o caso em que as variáveis espaciais de ambos os elétrons tenham aproximadamente os mesmo valores ($\psi_a \approx \psi_b$), teremos que a autofunção espacial anti-simétrica dada pela equação 2.8 será nula. Este resultado mostra que será pequena a densidade de probabilidade dos elétrons no estado tripleto terem coordenadas semelhantes, ou seja, que estejam próximo um do outro. Os elétrons do estado tripleto

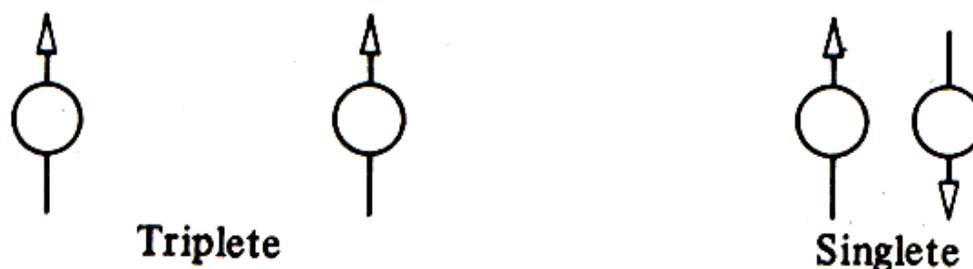


Figura 2.3. Esquema da tendência de alinhamento dos elétrons nos estados tripleto e singleto.

agem como se repelisses mutuamente, sendo isto uma propriedade das autofunções espaciais.

Fazendo a mesma análise para o caso singleto, que tem autofunções de spin anti-simétricas e as autofunções espaciais simétricas, concluiremos que a densidade de probabilidade dos elétrons terem coordenadas semelhantes é $2\psi_b^*(1)\psi_a^*(2)\psi_b(1)\psi_a(2)$, mostrando que neste caso é grande a probabilidade de encontrar os dois elétrons próximos um do outro. Os elétrons do estado singleto agem como se atraíssem mutuamente.

O fato da descrição exata do sistema utilizar uma autofunção total que seja anti-simétrica pela troca das partículas leva a um acoplamento entre suas variáveis espaciais e de spin.

2.4. Estados de Energia Molecular

2.4.1. Níveis de Energia Rotacional

A energia E de uma molécula pode ser expressada pela soma de três tipos de energia (SILVA, 2001):

$$E = E_{\text{rot}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{el}} \quad 2.18$$

em que E_{rot} , E_{vib} e E_{el} são, respectivamente, a energia rotacional, energia vibracional e energia eletrônica. As energias eletrônicas são da ordem de alguns elétron-volts, as vibracionais da ordem de décimos de elétron-volts e as rotacionais da ordem de centésimos de elétron-volts (SVANBERG, 1997).

Consideremos uma molécula diatômica como sendo constituída de duas massas, M_A e M_B , conectadas por uma barra rígida. O estado rotacional é especificado apenas pelo

número quântico J , o momento angular tem magnitude $\hbar\sqrt{J(J+1)}$ e a energia rotacional, com os respectivos níveis representados na figura 2.4, é dada pela equação 2.19 (MACHALE, 1999)

$$E_{rot} = \frac{\hbar^2}{2I_e} J(J+1) = J(J+1)\tilde{B}_e hc \quad 2.19$$

onde

$$\tilde{B}_e = \frac{h}{8\pi^2 I_e c} \quad I_e = \frac{M_A M_B}{M_A + M_B} R_e^2 = \mu R_e^2 \quad J = 0, 1, 2, \dots, \infty \quad 2.20$$

e o subscrito e serve para indicar que a expressão é dada para $R = R_e$, distância internuclear de equilíbrio em que o potencial é mínimo.

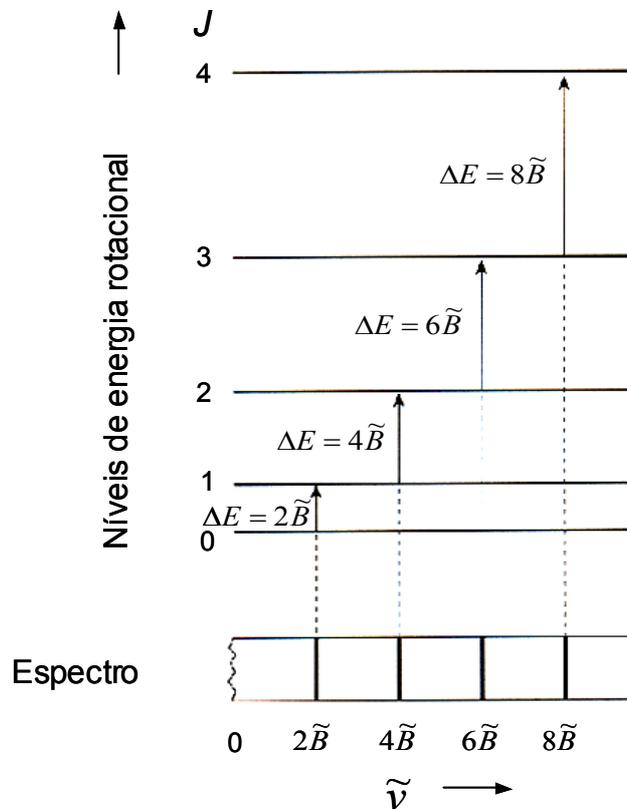


Figura 2.4. Níveis de energia rotacional.

As regras de transição rotacional permitidas obedecem a equação 2.21.

$$\Delta J = \pm 1 \tag{2.21}$$

As frequências em que ocorrem as transições por absorção são dadas por (MACQUARRIE,1997)

$$\tilde{\nu} = 2\tilde{B}(J + 1) \quad J = 0, 1, 2, \dots \tag{2.22}$$

2.4.2. Níveis de Energia Vibracional

Para pequenos deslocamentos vibracionais, em que o movimento é do tipo harmônico, a energia vibracional é dada pela equação 2.23 (MACQUARRIE,1997)

$$E_{vib} = (\nu_1 + \frac{1}{2})h\nu_1 + (\nu_2 + \frac{1}{2})h\nu_2 + \dots \tag{2.23}$$

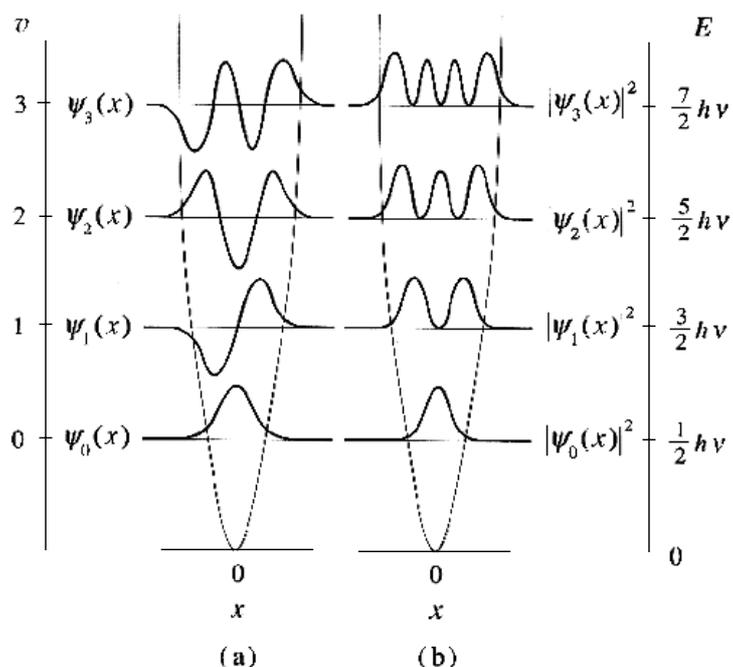


Figura 2.5. Funções de onda (a) e densidades de probabilidade (b) do estado vibracional.

ν_1, ν_2, \dots , são as frequências de vibração e ν_1, ν_2, \dots , os números quânticos associados. A energia do menor estado vibracional ($\nu_1 = \nu_2 = 0, \dots$) é diferente de zero e tem um valor finito, $\frac{1}{2}h\nu_1 + \frac{1}{2}h\nu_2 + \dots$, denominada energia de ponto zero. As funções de onda e as densidades de probabilidade vibracional são mostradas na figura 2.5. A transições entre níveis vibracionais resultantes da absorção de radiação obedecem as regras de seleção

$$\Delta \nu = \pm 1 \tag{2.24}$$

2.4.3. Níveis de Energia Eletrônico

O momento angular orbital e o momento angular de spin são acoplados de modo análogo ao que ocorre nos átomos. Em moléculas lineares e diatômicas, M_L , é um importante número quântico que designa as projeções do momento angular orbital sobre a linha que conecta os dois átomos. M_L representa a soma $\sum_i m_{l,i}$ do momento angular dos números quânticos dos orbitais moleculares ocupados. De modo semelhante às letras s, p, d, f, utilizadas na simbologia dos termos atômicos, as letras gregas $\Sigma, \Pi, \Delta, \Phi, \dots$ são usadas para designar $|M_L| = 0, 1, 2, 3, \dots$ para moléculas lineares. Os valores de m_l para orbitais ocupados se cancelam quando a camada está completa, fazendo com que $|M_L| = 0$. O símbolo Λ é usado para denotar o valor de $|M_L|$. Assim, teremos

$\Lambda :$	0	1	2	3	...
Estado eletrônico :	Σ	Π	Δ	Φ	...

Os estados de transição eletrônico são mostrados na figura 2.6.

O termo simbólico para representar a multiplicidade do estado eletrônico é escrito como $^{2S+1}\Lambda$. O sobrescrito $2S + 1$ indica o número de sub-níveis para um dado valor de J . As transições eletrônicas permitidas obedecem às regras de seleção (SILVA, 2001).

$$\Delta \Lambda = 0, \pm 1 \tag{2.25}$$

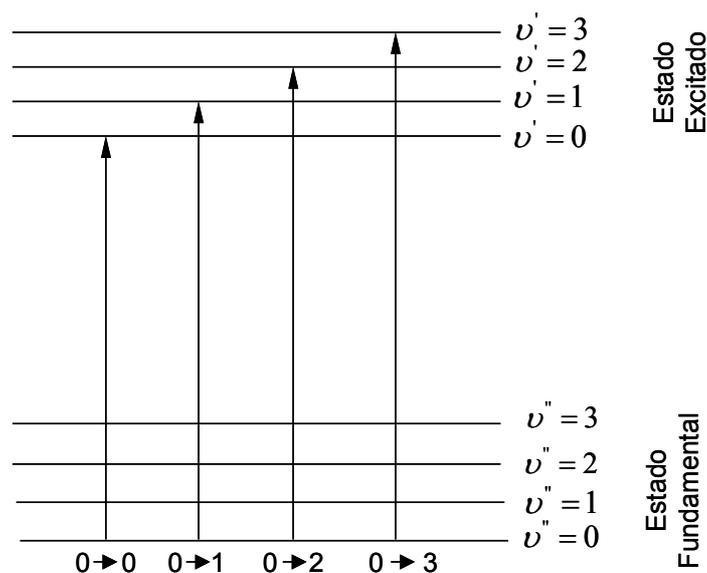


Figura 2.6. Espectro eletrônico devido a transição do estado vibracional fundamental ($v'' = 0$) para excitado ($v' = 0, 1, 2, \dots$). A série de transições é chamada uma progressão em v' .

2.4.4. Estado Vibracional da Molécula

A figura 2.7 mostra duas curvas da energia potencial eletrônica com os estados vibracionais associados. As densidades de probabilidade de cada estado vibracional estão mostradas na figura 2.5.

Uma série de transições vibracionais de um estado vibracional inicial para um número de diferentes estados vibracionais finais é chamada uma progressão de Franck-Condon (FC), sendo a distribuição de intensidade desta progressão determinada pela diferença entre os comprimentos de ligação de equilíbrio da molécula nos dois estados eletrônicos. Na figura 2.7, o comprimento de ligação do estado eletrônico excitado, R_e' , é maior que no estado fundamental, R_e'' . Como os elétrons são muito menos massivos que o núcleo, o movimento dos elétrons é instantaneamente mais rápido do que o do núcleo numa transição de um estado eletrônico para outro. Assim, a transição mais provável no espectro de absorção é a linha vertical indicada na figura 2.7.

Uma versão quântica da probabilidade de transição revela que a intensidade relativa de uma transição da molécula do estado vibracional fundamental para um estado excitado é proporcional ao produto das funções de onda do oscilador harmônico nos dois estados

vibracionais. As funções de onda dos estados fundamental e excitado são escritas como produto das funções de onda eletrônica e vibracional (MACHALE, 1999).

$$\Psi_{fv''} = \psi_g(r; R) \chi_{v''}^f(R) \quad 2.26$$

$$\Psi_{ev'} = \psi_e(r; R) \chi_{v'}^e(R) \quad 2.27$$

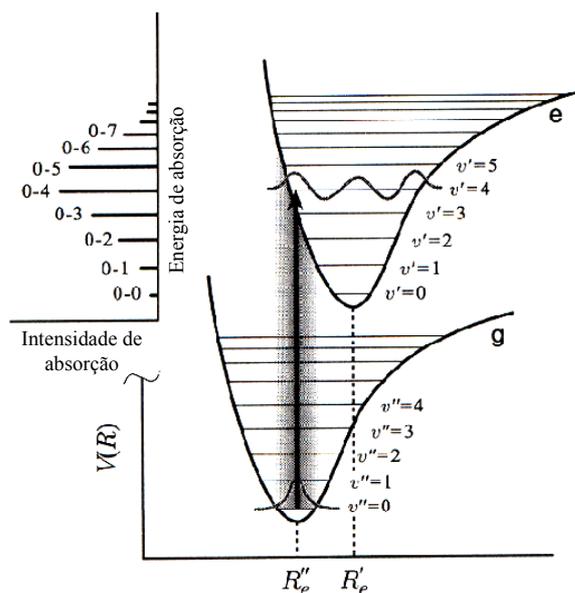


Figura 2.7. Duas curvas de energia potencial eletrônica mostrando os estados vibracionais associados com cada estado eletrônico.

As funções de onda eletrônica $\psi_g(r; R)$ e $\psi_e(r; R)$ dependem parametricamente da distância internuclear, e as funções de onda vibracionais $\chi_{v''}^f(R)$ e $\chi_{v'}^e(R)$ dependem da função energia potencial nos estados fundamental (g) e excitado (e). As coordenadas dos elétrons são simbolizadas pela letra r .

Consideremos atingido o estado FC imediatamente após uma transição vertical. Quanto maior o deslocamento na superfície de potencial superior, maior a energia do estado FC relativa à diferença entre o estado excitado e o estado vibracional fundamental. A diferença de energia entre o estado FC e o estado vibracional fundamental $v' = 0$ é chamada energia de reorganização. Caso a emissão ocorra antes da relaxação vibracional, o

espectro de emissão é idêntico ao de absorção, caracterizando a fluorescência por ressonância.

Entretanto, os tempos de vida radiativo típicos na espectroscopia eletrônica estão na ordem de nanosegundos, que é o tempo em que ocorre a transferência de energia por colisões. Assim, a emissão por relaxação é observada quando ocorre emissão na geometria de equilíbrio do estado eletrônico excitado conforme mostra a figura 2.8. A transição de FC para o estado vibracional fundamental, através do estado eletrônico excitado, envolve perda de energia no meio envolvente. Estas etapas de relaxação não-radiativa ocorrem em moléculas grandes como a clorofila, onde a emissão por relaxação é muito mais comum que a emissão de estados com maiores valores de v' .

Da mesma forma que no caso do espectro de absorção, a máxima intensidade de emissão na progressão vibracional é devida à transição vertical de $v' = 0$ para $v'' = v_{\text{vert}}$, e a largura do espectro de emissão aumenta com o deslocamento entre as curvas de potencial dos estados fundamental e excitado. O espectro de emissão se dá em maiores comprimentos de onda que os da absorção, sendo a diferença entre a absorção e a máxima fluorescência (transição vertical) chamada de deslocamento de Stokes.

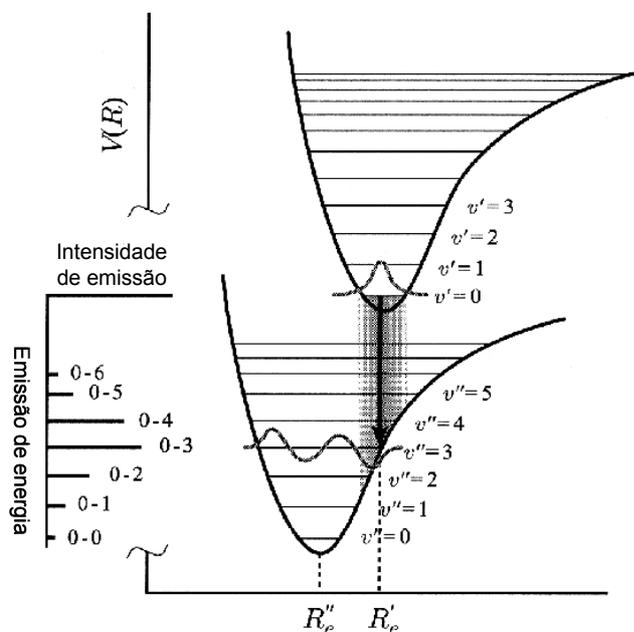


Figura 2.8. Progressão de Franck-Condon no espectro de emissão por relaxação.

2.5 Transferência de Energia de Excitação e Migração de Energia

Quando duas moléculas estão próximas, tendo uma banda de absorção em um comprimento de onda maior do que o da outra, a energia da luz absorvida por aquela que tem menores comprimentos de onda é usualmente transferida para a outra que absorve em maiores comprimentos de onda. Uma molécula age como doadora da energia de excitação e a outra como a receptora desta energia. (GOVINDJEE, 2003).

A transferência de energia pode se dar entre pigmentos diferentes (transferência heterogênea), assim como entre moléculas idênticas (transferência homogênea). Esta última pode ser repetida várias vezes, incrementando a migração de energia. A evidência de que fótons absorvidos por moléculas de um pigmento são transferidos para moléculas de um pigmento diferente é mostrada quando excita-se o primeiro pigmento e se observa somente a fluorescência do segundo. Este fenômeno é chamado de *fluorescência sensibilizada*.

Fótons são absorvidos inicialmente somente por um pigmento. Entretanto, no processo vibracional de dissipação de energia (conversão interna) no estado eletrônico excitado do pigmento “doador” são atingidos estados (vibrando intensamente) que estão em ressonância com certos estados do pigmento aceitador. (Fig. 2.6). Esta ressonância é que

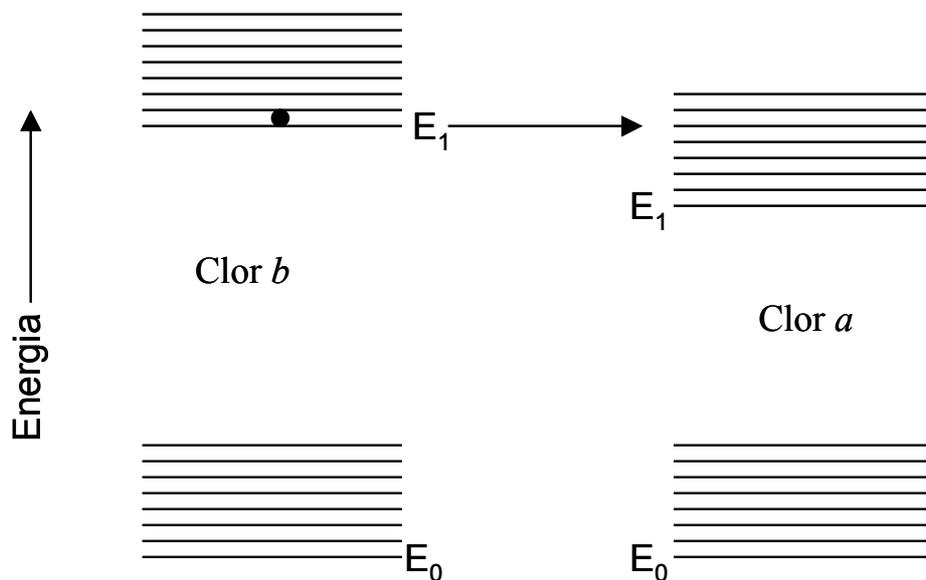


Figura 2.6. Diagramas de energia de dois pigmentos, indicando a transferência de energia no estado excitado do pigmento com maior energia (absorve em um comprimento de onda menor) para o de menor energia (absorve em um comprimento de onda maior).

torna possível a transferência de energia. O exciton pode ser visualizado como consistindo de um elétron excitado com um buraco no estado fundamental de um átomo ou molécula. Ou seja, este tipo de migração não envolve separação de cargas positiva e negativa.

Existem três tipos de parâmetros que controlam a transferência de energia por excitons. A primeira é a medida da probabilidade da transferência dada pela integral da sobreposição entre as bandas de fluorescência do doador e de absorção do receptor (área sombreada na Fig. 2.7). A segunda medida é relacionada a distância entre as moléculas. A interação entre moléculas em que a banda de fluorescência de uma se sobrepõe à banda de absorção da outra, causada pela ressonância, é um efeito de segunda ordem e como tal proporcional a r^{-6} . A terceira medida é o chamado fator de orientação relacionado à orientação dos dipolos das moléculas doadora e receptora.

A probabilidade da transferência de energia pode atingir 50% antes que as moléculas realmente se toquem mutuamente. As distâncias críticas calculadas, na qual a probabilidade de transferência é igual a 50%, são da ordem de 5 nm. Numa estrutura fotossintética a distância entre moléculas de diferentes pigmentos é muito menor do que 5 nm, tal que a probabilidade de transferência de energia é bastante alta.

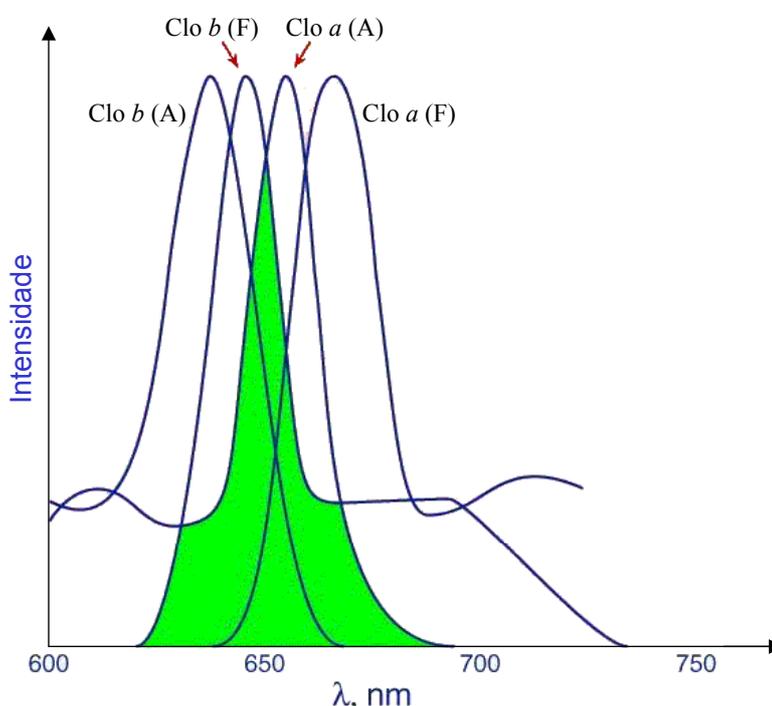


Figura 2.7. Sobreposição das bandas de absorção (A) da clorofila *a* e da fluorescência (F) da clorofila *b* (área sombreada), e as bandas de absorção dos dois pigmentos.

Devido ao deslocamento de Stokes (discutido no princípio de Frank-Condon na seção 2.4.4) a banda de fluorescência de um pigmento absorvendo em comprimentos de onda mais curtos freqüentemente se sobrepõe à banda do pigmento absorvendo em comprimentos de onda mais longos, mas o contrário não ocorre (Fig. 2.7).

A energia de transferência por excitação entre moléculas de pigmentos idênticos não pode ser determinada pela técnica da “fluorescência sensibilizada”. Entretanto, pode ser observada a extinção por fluorescência, ou seja, a fluorescência é reduzida quando a energia de transferência por excitação é o principal evento que conduz à fotoquímica. Além disso, se as moléculas são arranjadas randomicamente, excitação com luz polarizada leva à despolarização da fluorescência, quando ocorre migração da energia de excitação.

A aparente similaridade do espectro de absorção do pigmento da clorofila *in vivo* com o seu pigmento em solução (onde a absorção ocorre em moléculas isoladas) sugere que a maioria dos sistemas fotossintéticos têm um fraco acoplamento de ressonância e que a transferência por excitação ocorre de molécula a molécula randomicamente. Uma evidência indireta da migração da excitação é a quase completa despolarização da fluorescência da clorofila *a in vivo* quando excitada por luz polarizada.

A energia de migração por ressonância por si só não afeta o tempo de vida natural da excitação. Entretanto, um fóton migrando tem uma grande chance de ser capturado por algumas moléculas no arranjo envolvidas em interações químicas. Ou seja, a energia de migração por ressonância pode levar a uma abreviação do tempo de vida do exciton, e, conseqüentemente, da extinção por fluorescência. Na fotossíntese, o centro de captura pode ser o centro de reação, onde o fóton migrando é capturado e colocado para realizar trabalho fotoquímico.

Como mencionado anteriormente, um índice mais sensitivo da migração da energia por ressonância é a despolarização da fluorescência, enfraquecendo ou eliminando a polarização normalmente presente na fluorescência excitada por luz polarizada. Se a fluorescência for excitada por uma luz com polarização linear, ou seja, luz que vibra (e como vimos a absorção de luz por uma molécula causa a vibração na molécula) preferencialmente num certo plano, a fluorescência emitida também é polarizada. Isto se deve ao fato de que no intervalo entre a absorção e a re-emissão do fóton, a molécula não tem tempo suficiente para perder a orientação que tinha no instante da absorção. Mas, se a energia do fóton é alterada, entre a absorção e a emissão, por uma série de transferências por ressonância, cada molécula na cadeia de ressonância será orientada diferentemente, e após algumas transferências, a preferência original por uma certa direção será perdida.

2.6 Bibliografia Capítulo 2

GOVINDJEE. Excitation Energy Transfer and Energy Migration : Some Basics and Background. <http://www.life.uiuc.edu/govindjee/biochem494/foerster.htm>. Acesso em 31 mar. 2003.

MACQUARRIE, DONALD A. AND SIMON, JOHN D. **Physical Chemistry A Molecular Approach**. California: University Science Books, 1997. 1270p.

MACHALE, JEANNE L. **Molecular Spectroscopy**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 463p.

SILVA, WELSON SIQUEIRA. **Espectrômetro de Alta Resolução com Laser de Diodo**. 2001. 90 f. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Elétrica) – Departamento de Engenharia Elétrica e Sistemas de Potência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SVANBERG, SUNE. **Atomic and Molecular Spectroscopy: Basic Aspects and Practical Applications**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 407p.

Capítulo 3

Fotossíntese

3. Fotossíntese

3.1 Introdução

Neste capítulo discorreremos acerca da fotossíntese, processo no qual vegetais portadores de clorofila sintetizam compostos orgânicos a partir de matéria inorgânica utilizando-se da energia solar. Iniciaremos com um breve histórico, seguido da definição e da importância da fotossíntese, as etapas da fotossíntese, a estrutura onde se realiza a fotossíntese, pigmentos fotossintéticos, absorção de luz por estes pigmentos, sistemas fotossintéticos e transporte fotossintético de elétrons.

3.2. Histórico

A descoberta da equação fotossintetizante (LEHNINGER, 1995), equação 3.1, iniciou-se com Joseph Priestley, entre 1770 e 1780. Ele descobriu que queimando uma vela em um volume de ar contido numa jarra, não mais seria possível a combustão ou a vida de um camundongo. Por outro lado; adicionando-se um pequeno broto de menta no jarro, o ar é lentamente “restaurado”, permitindo, deste modo, que uma vela queime e um camundongo viva. Porém somente alguns anos mais tarde é que Jan Ingenhousz, médico e cientista holandês, evidenciou a importância da luz para a “restauração” do ar pelo broto de menta, descobrindo que apenas a parte verde das plantas realiza a produção do oxigênio na luz.

Em 1842, Robert Mayer, descobridor da primeira lei da termodinâmica e da conservação da energia, publicou um trabalho concluindo que era luz solar que fornecia a energia para a formação dos produtos da fotossíntese. Segundo Magalhães (1979), a denominação da fotossíntese introduzida por Ingenhousz teve como colaboradores Senebier (1782), de Saussure (1804), Mayer (1845), Boussingault (1864, relação CO_2/O_2) e Sachs (1864). Assim a equação geral da fotossíntese é formulada sob a forma



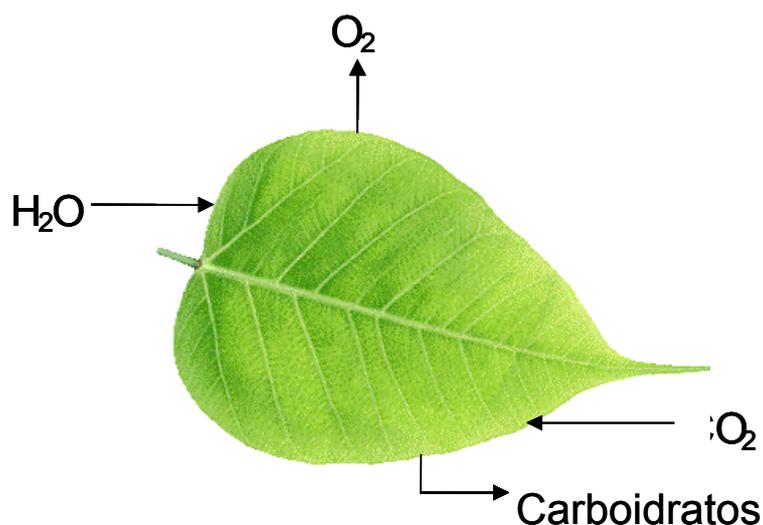
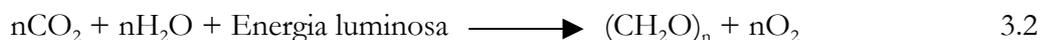


Figura 3.1. Esquema Simplificado da Fotossíntese.

Da equação 3.1 nota-se ser a presença da luz que possibilita a reação, a qual ocorre nas folhas, entre o gás carbônico e a água, produzindo carboidratos e oxigênio. Uma quantidade de energia química, que pode ser utilizada pela célula em vários processos metabólicos, é disponibilizada pela síntese de carboidrato.

Cornelius Van Niels, um pioneiro no estudo do metabolismo comparado, previu que o oxigênio molecular resultante da fotossíntese das plantas é devido exclusivamente à água e não ao dióxido de carbono. Assim, as células das folhas verdes das plantas superiores são produtoras de oxigênio fazendo uso da água como doadora de hidrogênio para a redução do dióxido de carbono e produzindo o oxigênio, de acordo com a equação geral 3.2 (KROGMANN, 1973)



Nesta equação o valor de n em geral é tomado igual a 6 para corresponder à formação da glicose como produto final da redução do CO_2 .

3.3. Definição

A fotossíntese é o processo de síntese orgânica realizada por vegetais portadores de clorofila, que lhes permite produzir os seus alimentos utilizando-se da energia da luz. Pela

transformação da energia radiante (eletromagnética) em energia química, a fotossíntese fornece compostos reduzidos de carbono dos quais depende a grande maioria dos seres autotróficos e heterotróficos. Os seres autotróficos, que possuem células fotossintetizantes, absorvem energia solar para transformar matéria inorgânica (dióxido de carbono e água) em matéria orgânica (carboidrato), resultando na liberação de oxigênio. Os seres heterotróficos, por não possuírem aparato fotossintético, utilizam a matéria orgânica produzida pela fotossíntese para sua sobrevivência. Esse processo é essencial para a manutenção de todas as formas de vida existentes na terra.

Um esquema simplificado dos processos que ocorrem na fotossíntese, da absorção de energia luminosa a produção de carboidrato, está mostrado na figura 3.2 a seguir.

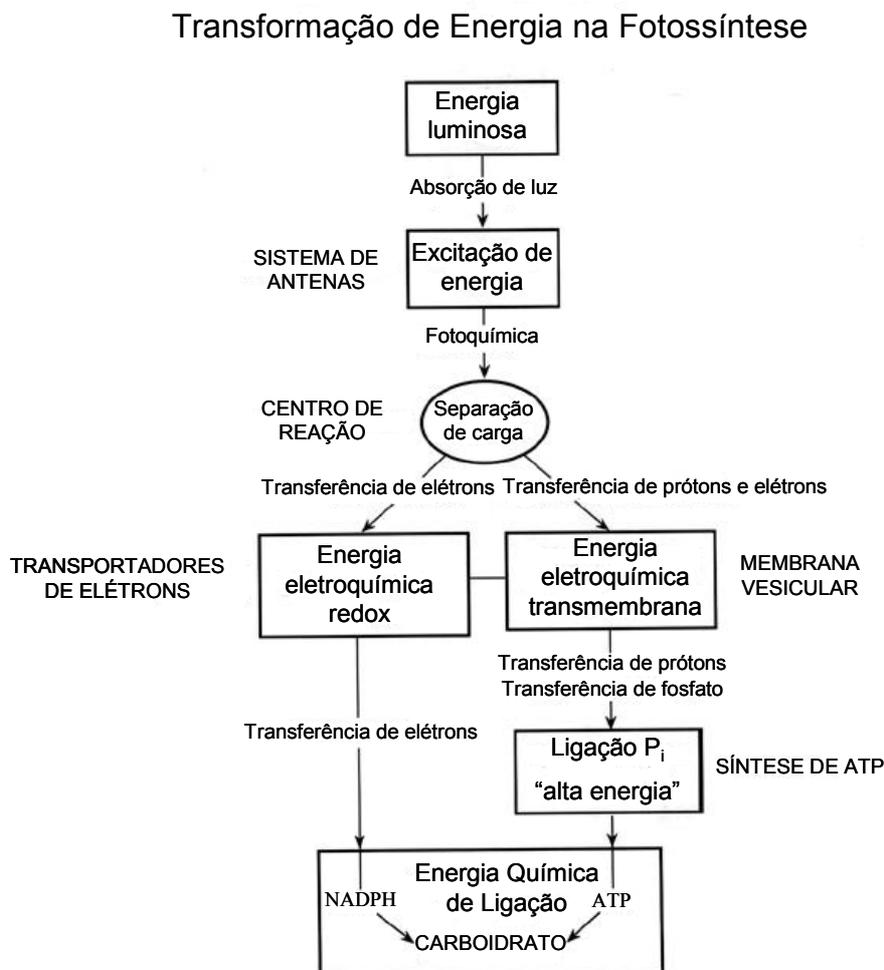


Figura 3.2. Esquema dos processos envolvidos na realização da fotossíntese.

3.4. A Importância da Fotossíntese

Por liberar oxigênio e consumir gás carbônico, a fotossíntese é um dos processos biológicos mais importantes na Terra (<http://www.iq.ufrj.br/~almenara/fotossintese.htm>). A energia armazenada em materiais fósseis e hoje largamente utilizada como combustível, advém da energia solar via fotossíntese. Entendendo e controlando o processo fotossintético, pode-se aumentar a produção de alimentos, fibras, madeira e combustível, além de se poder aproveitar melhor as áreas cultiváveis.

A fotossíntese usa a energia solar e absorve água para converter dióxido de carbono atmosférico em carboidratos, fornecendo a energia necessária à manutenção e desenvolvimento da planta. Neste processo o subproduto é o oxigênio. Posteriormente, caso a planta necessite, ela pode utilizar a energia armazenada nos carboidratos para sintetizar outras moléculas.

Na queima da madeira, bagaço da cana de açúcar, álcool, combustíveis derivados de petróleo e gás natural, há o desprendimento de CO₂ e liberação de energia armazenada para ser convertida em formas de energia útil. Entretanto, anualmente um mínimo 10¹⁷ kJ de energia livre da luz solar é captada para a biossíntese nos organismos fotossintetizadores, totalizando mais do que dez vezes a energia combustível fóssil usada em todo mundo. (LEHNINGER, 1995). O anexo A.3 mostra a energia necessária para a fotossíntese de um mol de glicose.

A irradiação solar não devidamente controlada pode ser altamente danosa, como nos inúmeros casos de câncer de pele. Entretanto, as plantas absorvem luz com o mínimo de dano possível. Assim, o estudo do porque dos danos causados pela luz e os respectivos mecanismos de proteção natural da planta, podem propiciar significativos avanços no campo da medicina.

3.5. Etapas da Fotossíntese

A fotossíntese é um processo complexo que compreende muitas reações físicas e químicas, que ocorrem de maneira coordenada em sistemas de proteínas, pigmentos e outros compostos associados a membranas. Em geral, o processo fotossintético é analisado

em duas etapas, mostradas na figura 3.3, interdependentes e simultâneas (<http://netpar.com.br/duarte/super1.htm>):

- 1) etapa fotoquímica (fase "luminosa") onde ocorre a decomposição das moléculas de água (fotólise) com a liberação para a atmosfera de O_2 e a formação de ATP (adenosina tri-fosfato) e NADPH (forma reduzida de NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato mostrada no anexo A.2), onde fica armazenada a energia da luz. As reações desta fase são representadas pela equação 3.3 (http://www.ufpe.br/projeto_biologico/biochemistry/problem_sets/photosynthesis_1/08c.html)



- 2) a etapa química (fase "escura") que é também chamada de ciclo fotossintético redutivo do carbono ou ciclo de Calvin, ou ainda ciclo das pentoses. Nesta fase, os dois produtos ATP e NADPH, produzidos na primeira fase, e que em conjunto são conhecidos como o “poder assimilatório”, são utilizados para a assimilação do CO_2 do ar e formação de moléculas de glicose.

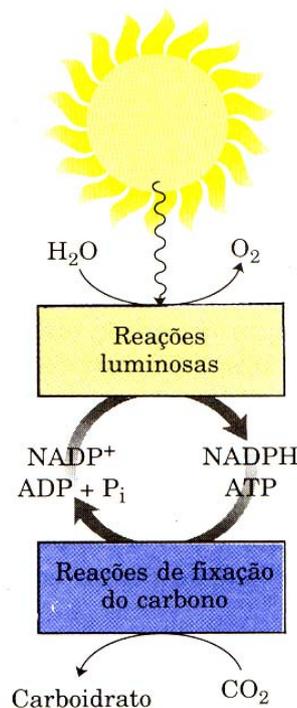


Figura 3.3. Representação das etapas fotoquímica e química da fotossíntese.

3.6. Cloroplasto: Onde se Realiza a Fotossíntese nas Plantas

O cloroplasto, mostrado esquematicamente na figura 3.4, é uma organela (estrutura especializada dentro da célula que realiza uma função específica) constituída de três membranas onde ocorrem as fases luminosa e escura da fotossíntese (LEHNINGER, 1995; <http://www.herbario.com.br/cie/universi/teoria/1027clor.htm>, 2002). Possui uma membrana externa contínua que o envolve, sendo esta muito frágil e altamente permeável a pequenas moléculas e íons. Uma segunda membrana interna, membrana de proteínas, que regula o fluxo, para dentro e para fora, de pequenas moléculas, como açúcares, e das proteínas utilizadas no interior do cloroplasto. Um sistema de membranas, em forma de discos dispostos em pilha, denominados de membranas tilacóides. As tilacóides são impermeáveis a maioria das moléculas e íons, possuindo todos os pigmentos fotossintetizantes do cloroplasto e todas as enzimas necessárias às reações dependentes primariamente da luz. As membranas tilacóides são individualmente interconectadas e tendem a se empilhar para formar agregados denominados de grana. São envolvidas pelo fluído estroma que contém todas as enzimas necessárias para conversão de CO₂ em moléculas orgânicas, como a glicose, além das moléculas de DNA com o genoma do cloroplasto

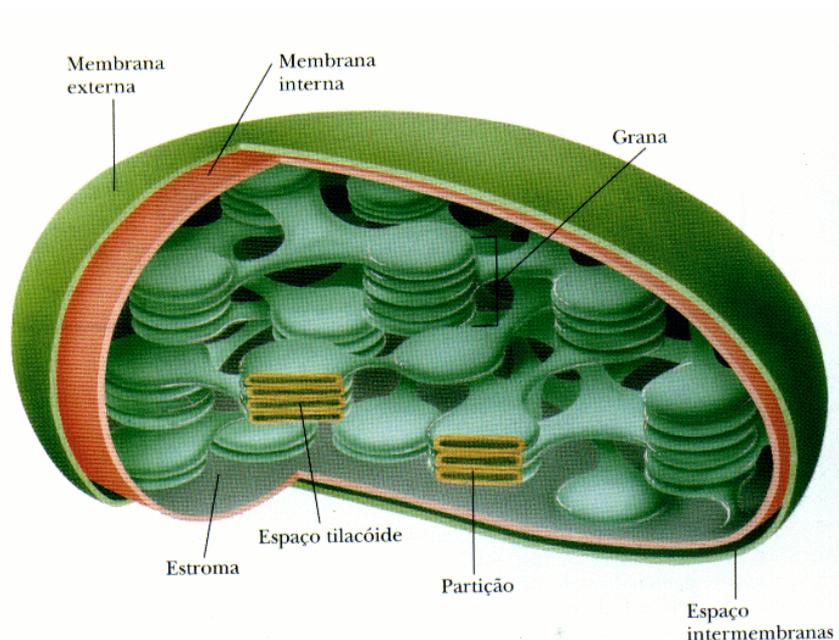


Figura 3.4. Desenho esquemático de um cloroplasto e suas estruturas internas.

À noite, as mitocôndrias, que são elementos constituintes das células das folhas verdes, geram ATP para atender as demandas celulares utilizando oxigênio para oxidar os carboidratos sintetizados nos cloroplastos durante o dia.

As células fotossintetizantes realizam a biossíntese utilizando os produtos da fotossíntese que também são convertidos em um açúcar de baixo peso molecular (normalmente sacarose que pode suprir as necessidades metabólicas das outras células não-fotossintetizantes do vegetal) ou armazenados na forma de um polissacarídeo osmoticamente inerte (em geral amido que é mantido disponível como fonte de açúcar para uso futuro).

3.7. Absorção de Luz Pelos Pigmentos. Complexo Coletor de Luz

Segundo Magalhães (1979), cerca de 50% do fluxo de energia solar que chega até as plantas consiste da radiação eletromagnética com comprimentos de onda entre 400 e 700 nm (radiação fotossinteticamente ativa), que é a região do espectro da energia solar que pode ser absorvida pela plantas. Em biologia a unidade de energia é referida em quilocalorias por mol de fótons. Um mol de fótons é o einstein. A fotossíntese ocorre quando as clorofilas absorvem um fóton de um dado comprimento de onda e utilizam essa energia para iniciar a reação fotoquímica. Assim, um mol de clorofila, para iniciar a reação, deve absorver 6.024×10^{23} fótons de energia ou $Nh\nu$. Temos que

$$E = N \frac{hc}{\lambda} \text{ J/mol de fótons} \quad 3.4$$

e

$$1 \text{ caloria} = 4,186 \text{ J}$$

Daí, fótons com comprimentos de onda de 400, 500, 600 e 700 nm têm para $N = 1$, respectivamente, 71.5, 57.1, 47.6 e 40.9 kcal/einstein de energia. A energia de ligação de compostos orgânicos estáveis varia de 50 a 100 kcal/mol, significando que fótons de 40, 50 ou 70 kcal/einstein podem transferir suas energias para estas moléculas tornando-as excitadas e reativas. Em geral, comprimentos de onda abaixo de 300 nm (ultravioleta) têm energia radiante muito elevada podendo haver decomposição das moléculas. De outro modo, comprimentos de onda acima de 800 nm (infravermelho) não dispõem de energia suficiente para induzir uma diminuição da energia de ligação dos compostos e possibilitar

uma reação química. Dessa forma, a clorofila (clo) no seu estado fundamental ao absorver um fóton faz uma transição para um estado excitado de maior energia:



Cabe ressaltar que o simples aumento no número de fótons não implicará em um crescimento linear das reações fotossintetizadoras. Ao contrário, a partir de uma certa irradiação começa a haver saturação. Segundo Stella (2003), a saturação luminosa é o ponto a partir do qual a taxa fotossintética estabiliza com o aumento da intensidade luminosa. Para a conversão de energia na fotossíntese há uma cooperação de muitas moléculas de clorofila. Sob condições de saturação luminosa, apenas uma molécula de oxigênio é produzida para cada 2500 moléculas de clorofila na amostra (Robert Emerson e Willian Arnold, 1932).

Funcionalmente, as moléculas de clorofila atuam agrupadas. A luz é coletada por um complexo formado por 200-300 pigmentos, que estão ligados a proteínas formando o complexo coletor de luz (LHC, *Light-Harvesting-Complex*), conforme Fig. 3.5. Cada antena está associada a um centro de reação ao qual provê a energia coletada (MARTINEZ, 2002).

Segundo Borisov (1989), a energia absorvida é transportada por ressonância, mecanismo já comentado na seção 2.3. Neste processo a energia de excitação da clorofila para o centro de reação é transferida de uma molécula para outra por um processo não-

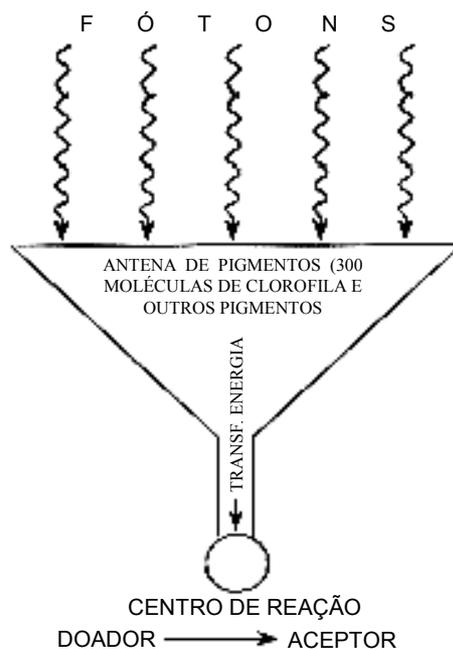


Figura 3.5. Complexo coletor de luz.

radiativo. Uma analogia deste processo é a transferência de energia que ocorre entre dois garfos de afinação. Se um dos garfos está vibrando e é colocado adequadamente próximo do outro, o segundo recebe uma parte da energia do primeiro e começa a vibrar. A eficiência da transferência de energia depende da distância entre os garfos e da orientação relativa, assim como das frequências vibracionais. Exatamente como ocorre na transferência de energia no complexo antena.

Os fótons incidentes são transferidos de molécula para molécula, sendo a energia concentrada num pigmento aprisionador. Como resultado, a energia captada pela antena nos diversos comprimentos de onda converge para um único ponto focal, chamado pigmento aprisionador. Deste modo, o pigmento aprisionador pode receber 200 vezes mais fótons/segundo do que se absorvesse luz isoladamente.

3.8 Pigmentos Fotossintéticos

Todos os organismos fotossintéticos contêm um ou mais pigmentos orgânicos capazes de absorver a radiação visível que iniciará às reações fotoquímicas da fotossíntese. Esses pigmentos podem ser extraídos das folhas com solventes orgânicos. Nas membranas tilacóides das plantas superiores, os principais pigmentos fotossintéticos são as clorofilas *a* ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$)₁ e *b* ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$)₁, além dos carotenóides (<http://www.netpar.com.br/duarte/super1.htm>, 2002).

As clorofilas são os pigmentos que dão às plantas a sua cor verde característica. A clorofila *a* é verde-azulada e a *b* é verde-amarelada. A clorofila *a* ocorre em todos os organismos fotossintéticos que liberam O₂. A maioria das plantas contém duas vezes mais clorofila *a* do que clorofila *b*, que estão presente nas folhas de plantas superiores e nas algas verdes. Os máximos de absorção das clorofilas *a* e *b* situam-se nas regiões do violeta ao azul e do vermelho, conforme mostrado na figura 3.6.

Os carotenóides são pigmentos amarelados ou alaranjados, denominados de pigmentos fotossintéticos acessórios, encontrados em todas as células fotossintetizantes. Normalmente, sua coloração nas folhas é mascarada pela cor verde da clorofila. Os carotenóides têm espectros de absorção de luz na região entre 400 a 550 nm e situam-se nas membranas tilacoidais em íntima associação com as clorofilas. A energia absorvida por esses pigmentos pode ser transferida para a clorofila *a* durante a fotossíntese. Além disso,

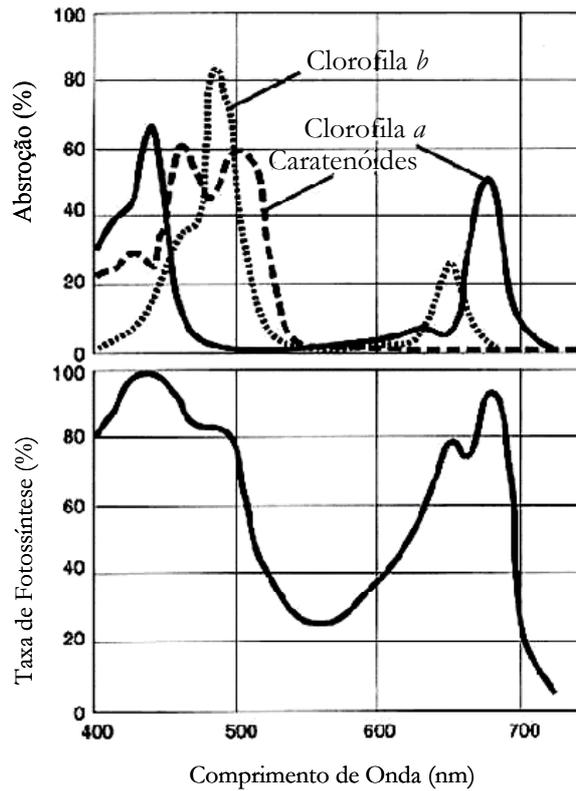


Figura 3.6. Espectro de Absorção das Clorofilas *a* e *b* e Carotenóides. Espectro de Ação da Fotossíntese (modificado de Whittmatsh e Govindjee, 1996. <http://www.ufv.br/DBV/PGFVG/FOTO12.htm>. Acesso em 17 fev. 2003).

os carotenóides protegem as moléculas de clorofilas e proteínas contra a foto-oxidação sob luz excessiva.

A parte inferior da figura 3.5 apresenta a absorção conjunta dos diversos pigmentos em uma folha. Podemos notar o mínimo de absorção próximo a 550 nm que corresponde à cor verde. Desse modo, a luz em torno desse comprimento de onda, não sendo absorvida, é refletida, fazendo com que observemos as plantas na cor verde.

3.9. Sistemas Fotossintéticos. Unidades Fotossintéticas

A eficiência quântica de um processo, como a fotossíntese, é, matematicamente, definida pela equação 3.6 como (TAIZ E ZEIGER, 1991):

$$\Phi_{\text{fotoquímica}} = \frac{\text{produção de produtos fotoquímicos}}{\text{número total de fótons absorvidos}} \quad 3.6$$

O recíproco da eficiência quântica é a exigência quântica. Para a produção de uma molécula de O_2 a máxima eficiência quântica medida é de aproximadamente 0,1, significando que 10 (dez) fótons são absorvidos para cada O_2 desprendido.

Os valores encontrados para a eficiência quântica, na faixa dos comprimentos de onda nos quais a clorofila absorve luz, são aproximadamente constantes, conforme indicado na figura 3.7. Contudo, acima de 680 nm a eficiência cai drasticamente, demonstrando que luz de comprimentos de onda maiores do que 680 nm são menos eficientes do que comprimentos de onda mais curtos.

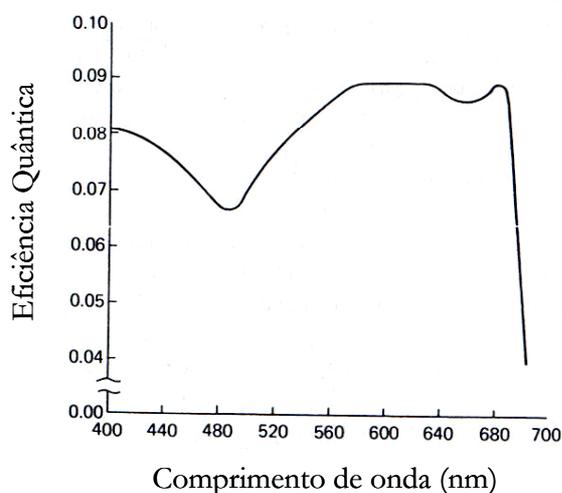


Figura 3.7. Eficiência quântica da fotossíntese da alga *Chlorella* em função do comprimento de onda da luz. Observar a drástica redução na eficiência quando é utilizada luz de comprimentos de onda nos quais somente a clorofila *a* absorve. (Emerson, R. e Lewis, C.M., 1943).

Além disso, a taxa de fotossíntese medida separadamente com luz de diferentes comprimentos de onda, aumenta quando os dois feixes são usados simultaneamente. Sob certas condições, especialmente quando um dos comprimentos de onda é maior do que 680 nm, a taxa fotossintética obtida com ambos os comprimentos de onda é consideravelmente maior que a soma das taxas individuais (EMERSON et al., 1957).

Estes efeitos devem-se ao fato da existência de dois mecanismos envolvendo duas ações fotoquímicas: o fotossistema I (FSI), que absorve preferencialmente luz de comprimentos de onda maiores do que 680 nm, e o fotossistema II (FSII), que absorve bem luz de comprimentos de onda abaixo de 680 nm (HILL AND BENDALL, 1960). Como se vê na figura 3.8, o FS I possui relativamente mais clorofila *a* do que clorofila *b*, se

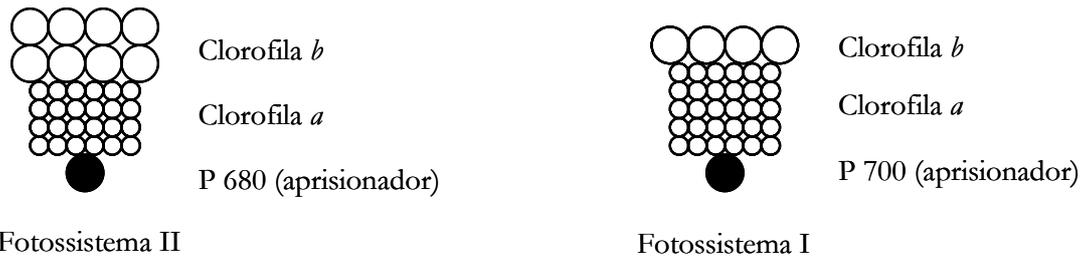


Figura 3.8. Esquema da proporção relativa das clorofilas nos fotossistemas. P 680 e P 700 indicam o comprimento de máxima absorção de luz pelo pigmento aprisionador em cada fotossistema.

se comparado com o FS II (MAGALHÃES, 1979).

Enquanto a clorofila do centro de reação do FSI absorve maximamente em 700 nm, a do FSII absorve maximamente em 680 nm. O FSI produz um forte redutor, capaz de reduzir NADP, e um fraco oxidante; ao passo que o FSII produz um forte oxidante, capaz de oxidar água, e um fraco redutor que re-reduz o oxidante produzido pelo FSI. Os dois fotossistemas são interligados por uma cadeia transportadora de elétrons.

3.10. Transporte Fotossintético de Elétrons

Uma molécula de clorofila da antena ao ser excitada pela luz, transfere diretamente sua energia para uma molécula vizinha e retorna ao seu estado fundamental. Este processo é repetido para uma terceira, uma quarta e, assim sucessivamente, até finalmente excitar a molécula da clorofila do centro de reação, pelo processo de transferência por ressonância (BORISOV, 1989). A figura 3.9 ilustra esta transferência de energia. Neste processo,

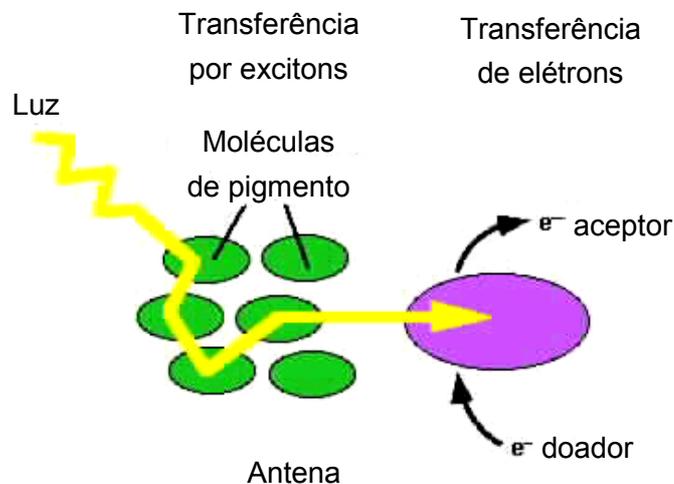


Figura 3.9. Processo de transferência de energia no complexo antena.

fótons não são simplesmente emitidos por uma molécula e absorvidos por outra; a energia de excitação é transferida de uma molécula para outra por um processo não-radiativo. Como as moléculas estão fortemente agregadas, 95-99% dos fótons absorvidos pela antena de pigmentos têm suas energias transferidas para o centro de reação onde serão usadas na fotoquímica (TAIZ AND ZEIGER, 1991).

Na molécula transdutora do centro de reação, a excitação promove um elétron para um orbital de maior energia. Um receptor de elétron vizinho, que é parte da cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto, adquire este elétron, ficando a molécula de clorofila excitada com um orbital vazio. O elétron doado pela clorofila do centro de reação é substituído por outro de uma molécula doadora de elétrons vizinha, que se torna positivamente carregada.

3.10.1. Fotossistema II

O fotossistema II é um complexo transmembrana de proteínas que utiliza a luz solar para conduzir duas reações, a oxidação da água e a redução da plastoquinona. É composto de mais de quinze polipeptídios e diferentes componentes redox (clorofila do centro de reação P680, feofitina, plastoquinonas Q_A e Q_B , aminoácido tirosina, complexo manganês), conforme mostra a figura 3.10, envolvidos no mecanismo da transferência de elétrons (GOVINDJEE AND WHITMARSH, 2003).

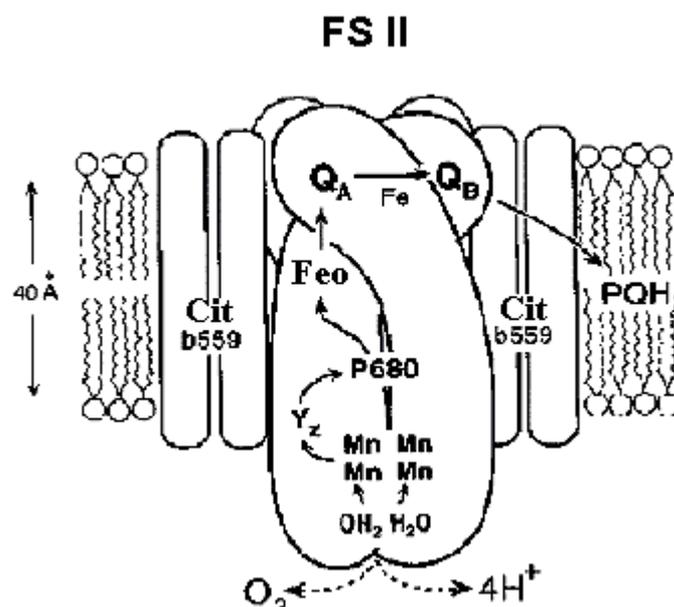
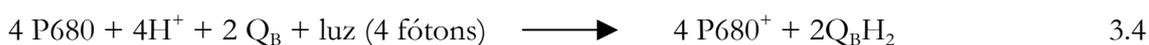


Figura 3.10. Visualização esquemática do FS II.

O FS II é constituído de um complexo coletor de luz (LHC – II), um núcleo com um centro de reação e um complexo de liberação de oxigênio (STRYER,1996).

A fotoquímica no FS II é iniciada pela separação de carga entre o P680 e a feotofina. O P680, um pigmento transdutor do centro de reação do FS II, quando excitado, torna-se P680*, e transfere um elétron à feofitina (uma clorofila que não possui Mg^{2+}) que se torna carregada negativamente (Feo^-). A excitação gera Feo^- e P680*, induzindo a separação de carga, que produz quimicamente um bom agente redutor. Feo^- cede seu elétron a uma plastoquinona, Q_A , um transportador que se encontra fortemente ligada à proteína do FS II. Q_A em seguida doa seu elétron para uma quinona Q_B , um transportador lipossolúvel móvel que se encontra mais fracamente ligado na borda da proteína. Após adquirir dois elétrons de Q_A e dois prótons da solução aquosa, Q_B torna-se totalmente reduzida, na forma Q_BH_2 , dissociando-se da proteína e difundindo-se do centro de reação. A reação pode ser representada pela equação:



O $P680^+$ precisa retornar ao seu estado fundamental para capturar um outro fóton de energia. Assim, o $P680^+$ recebe um elétron de cada vez de um doador imediato, o aminoácido tirosina, representado pelo símbolo Z, que é um agente oxidante muito forte.

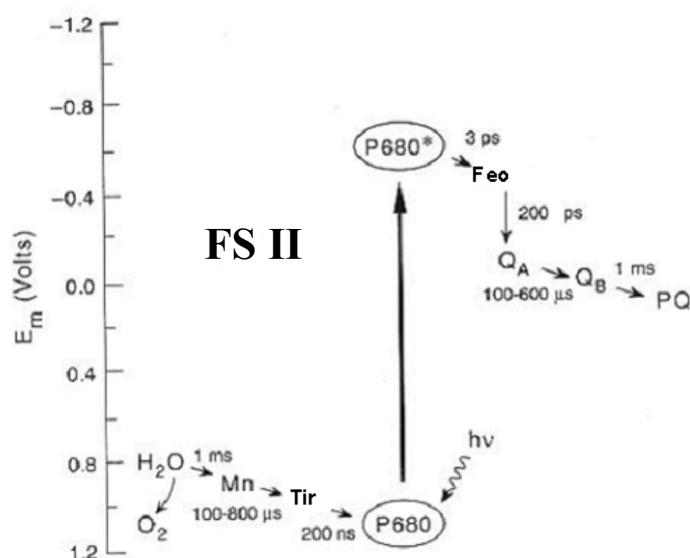


Figura 3.11. Transporte de elétrons e respectivas taxas de transferência para o FS II. (<http://www.life.uiuc.edu/govindjee/paper/gov.html>)

Temos a seguinte reação:



Um dispositivo molecular, complexo de cisão da água ou complexo de evolução do oxigênio, possui um agregado de íons manganês que pode tirar quatro elétrons de um par de moléculas de água, liberando 4H^+ e O_2 .



Quatro fótons incidindo seqüencialmente no agregado de manganês, transforma-no num agente oxidante que retira quatro elétrons de duas moléculas de água, transferindo estes elétrons um de cada vez ao resíduo de tirosina:

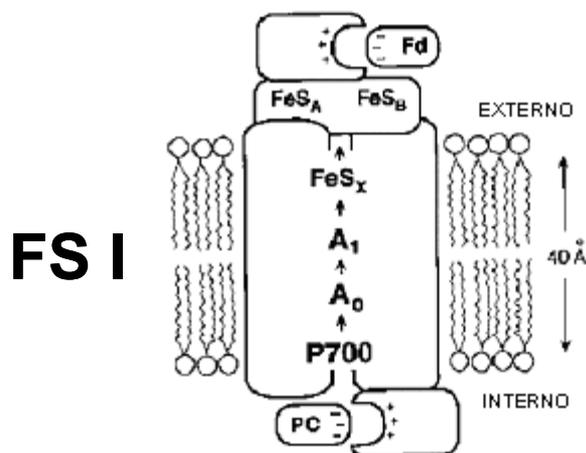


o somatório das equações 3.4 a 3.7 resulta em



3.10.2. Fotossistema I

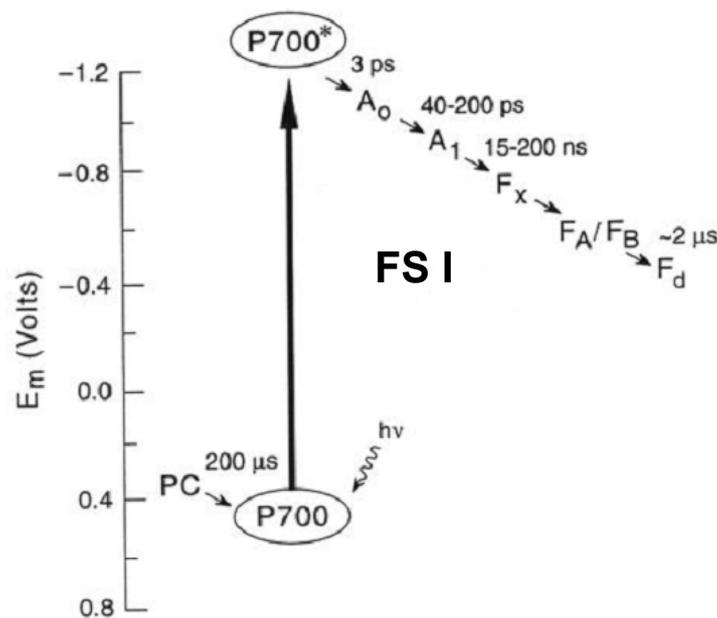
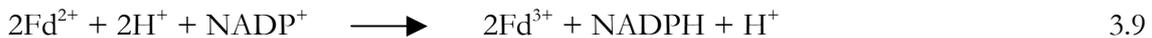
O fotossistema I (FS I), mostrado na figura 3.12, cataliza a oxidação da platocianina, uma proteína de cobre hidrossolúvel transferidora de elétrons, e a redução da ferreoxina, uma pequena proteína ferro-enzofre fracamente ligada à membrana tilacóide.



3.12. Diagrama esquemático do fotossistema I (FSI).

O fotossistema I é um complexo transmembrana constituído de no mínimo 13 cadeias polipeptídicas (STRAYER, 1996). Estas moléculas de proteínas atuam como elo de ligação da maioria dos transportadores de elétron (KRAUSS ET AL., 1993). Contrariamente ao FS II, o transporte de elétrons no FS I não está acoplado à translocação de prótons.

Os eventos fotoquímicos (absorção de luz pelo complexo antena, transferência da excitação ao centro de reação) que se processam após a excitação do FS II (P700) são análogos àqueles no FS I. O centro de reação excitado P700* cede um elétron para A₀, uma clorofila semelhante à feofitina do FS I, gerando A₀⁻ e P700⁺. P700⁺, forte agente redutor, adquire um elétron da plastocianina, A₀⁻, um poderoso agente redutor, passa seus elétrons para a ferredoxina. Por alterações de valência dos átomos de Fe (Fe²⁺ para Fe³⁺), o NADP⁺ adquire os elétrons da ferredoxina, reduzindo-se a NADPH:



3.13. Processo de transferência de elétrons no FS I e respectivas taxas de transferência. (GOLBECK, J.H. (1994) Photosystem I in Cyanobacteria. In: D. Bryant (ed.) The Molecular Biology of Cyanobacteria, pp. 319-360. Kluwer Academic, Netherlands).

3.10.3. Conexão Entre os Dois Fotossistemas

Uma concentração de plastoquinona armazenada nas membranas acumula energia, para assegurar o fornecimento de elétrons para o FS I, ainda que em condições de flutuação de energia radiante (MAGALHÃES, 1979). Várias proteínas integrais de membrana, o complexo citocromo *bf* e a plastocianina, transportam os elétrons armazenados em Q_BH_2 para o P700 do FS I, conforme pode-se observar na figura 3.14.

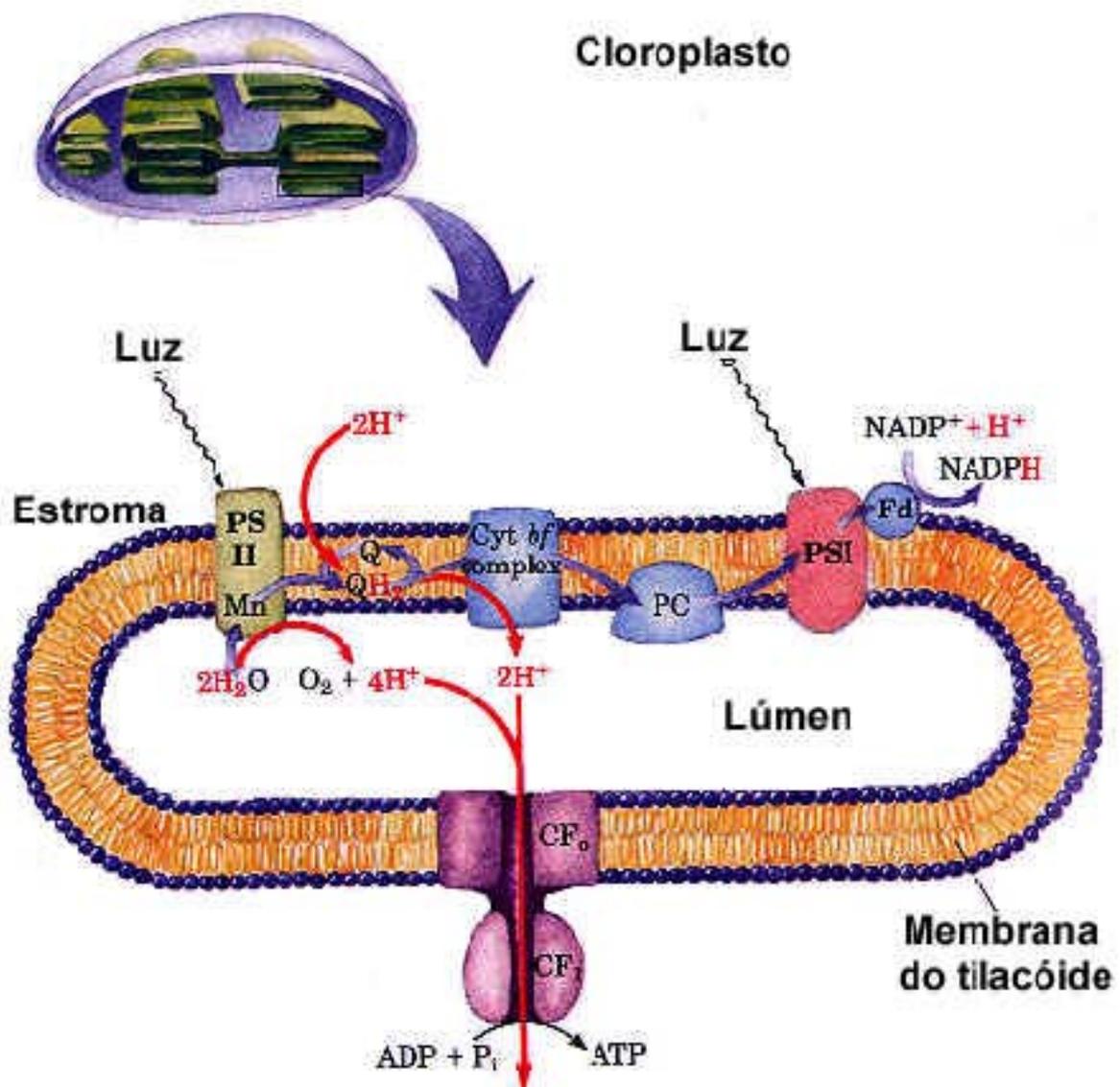


Figura 3.14. Organização estrutural do tilacóide mostrando os quatro complexos proteicos da fase fotoquímica da fotossíntese (Modificado de Lehninger, 1995)

A energia deixada quando os elétrons passam para menores gradientes do FS II para o FS I é coletada pelo complexo citocromo *bf* para bombear prótons (H^+) contra o gradiente de concentração do estroma do cloroplasto para o interior das tilacóides. Quando a concentração cresce no interior das tilacóides (pH diminui) é estabelecido um potencial eletroquímico e criado um forte gradiente de difusão. Como o interior do tilacóide é pequeno, o acréscimo de um pequeno número de prótons faz com que se produza entre o lúmen do tilacóide (pH 4,5) e o estroma (pH 8) uma diferença de 3.000 vezes na concentração de prótons (LEHNINGER, 1995). O movimento de prótons de uma região de alta concentração para outra de baixa concentração ativa a conversão de ADP e P_i em ATP. O ATP provê o segundo ingrediente essencial para o Ciclo de Calvin. Este processo esta mostrado na figura 3.15.

A fotofosforilação ou fosforilação fotossintetizante é o processo no qual parte da energia captada pelos sistemas fotossintetizantes é transformada em energia da ligação fosfato do ATP. O complexo com dois componentes funcionais, CF_0 e CF_1 , é a enzima responsável pela síntese do ATP nos cloroplastos. CF_0 é um poro transmembrana a prótons, composto de várias proteínas integrais da membrana, e CF_1 é um complexo protéico periférico da membrana. Estas duas proteínas constituem a ATP sintetase dos cloroplastos, que possui um canal por onde os prótons em excesso fluem do interior do tilacóide para o estroma.

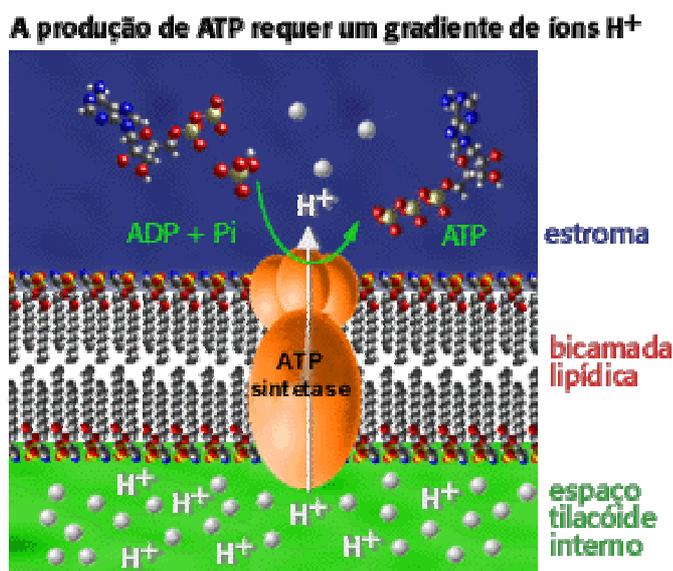


Figura 3.15. Gradiente de prótons.

(http://www.ufpe.br/projeto_biologico/biochemistry/problem_sets/photosynthesis_1/02c.html).

3.11. Bibliografia do Capítulo 3

ANDERSON, J.M., and ANDERSON, B. (1988). **The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion.** Trends Biochem. Sci. 13:351-355.

BENDALL, D.S., AND HILL, R. (1968). **Haem-proteins in photosynthesis.** Annu. Rev. Plant. Physiol, 19, 167-186

BORISOV, A.Y. (1989). **Transfer of excitation energy in photosynthesis: Some thoughts.** Photosynth. Res. 20:35-58.

BLANKENSHIP, R.F., AND PRINCE, R.C. (1985). **Excited-state redox potentials and the Z scheme of photosynthesis.** Trends Biochem. Sci. 10:382-383.

CLAYTON, R. K. (1971) **Light and Living Matter: a Guide to the Study of Photobiology.** McGraw-Hill, New York.

CLAYTON, R. K. (1980). **Photosynthesis: Physical Mechanisms and Chemical Patterns.** Cambridge University Press, Cambridge, England.

EMERSON, R. AND LEWIS, C.M.(1943). **Amer. J. of Botany**, 30, 165.

EMERSON, R., CHALMERS, R., AND CEDERSTRAND, C. (1957). **Some factors influencing the long-wave limit of photosynthesis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 43:133-143.

GOVINDJEE AND WHITMARSH, JOHN. **The Photosynthetic Process.** In: "Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis", Edited by GS Singhal, G Renger, SK Sopory, K-D Irrgang and Govindjee, Narosa Publishers/New Delhi; and Kluwer Academic/Dordrecht, pp. 11-51. Disponível em <http://www.life.uiuc.edu/govindjee/paper/gov.html>. Acesso em 31 mar. 2003.

HILL, R., AND BENDALL, F. (1960) **Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis.** Nature 186:136-137.

<http://www.herbario.com.br/cie/universi/teoria/1027clor.htm>. **Plastos (Cloroplastos) e Fotossíntese.** Acesso em 10 dez. 2002.

<http://www.iq.ufrj.br/~almenara/fotossintese.htm>. **Introdução a Fotossíntese.** Acesso em 21 jun. 2002.

<http://www.netpar.com.Br/Duarte/super1.htm>. **Fisiologia da Nutrição**. Acesso em 21 jun. 2002.

http://www.ufpe.br/projeto_biologico/biochemistry/problem_sets/photosynthesis_1/02c.html. **Lista de problemas sobre a fotossíntese (1)**. - Acesso em 13 jan. 2002.

KRAUSS, N., W. HINRICHS, I. WITT, P. FROMME, W. PRITZKOW, Z. DAUTER, C. BETZEL, K.S. WILSON, H.T. WITT AND W. SAENGER (1993). **Three- dimensional structure of system I of photosynthesis at 6 Å resolution**. Nature 361:326-331.

KROGMANN, DAVID W. (1973). **The Biochemistry of Green Plants**. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 239p.

LEHNINGER, ALBERT L; NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M (1995). **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: 2ª edição, Sarvier Editora de Livros Médicos, 839p.

MAGALHÃES, ANTÔNIO CELSO NOVAES (1979). **Fotossíntese. In: Fisiologia Vegetal**. Vol. 1. 2ª Ed.. Ferri, Mário Guimarães. E.P.U. Editora Pedagógica e Universitária Ltda..

MARTINEZ, CARLOS A. **Aspectos Básicos da Fotossíntese**. <http://www.ufv.br/DBV/PGFVG/FOTO12.htm#2>. CLOROPLASTOS: ESTRUTURA E ORGANIZACAO. Acesso em 21 jun.2002.

STELLA, A.; VALLE, V.; MIELKE, M.S. **Efeitos do ambiente em algumas características fotossintéticas de folhas de *Caesalpinia Echinata lam, caesalpinaceae***. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/profs/fsantos/relatorios/ne313-l6.pdf>. Acesso em 17 fev. 2003.

STRAYER, LUBERT (1996). **Bioquímica**. Rio de Janeiro: 4ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., 1000p.

TAIZ, LINCOL AND ZEIGER, EDUARDO (1991). **Plant Physiology**. The Benjamin/Cummings Company, Inc., 565 p.

Capítulo 4

Fluorescência

4. Fluorescência

4.1. Introdução

Neste capítulo abordaremos a utilização da emissão de fluorescência. A fluorescência é a habilidade de uma molécula que está sendo irradiada emitir luz, pelo decaimento de um estado excitado para o estado fundamental, em que ambos possuem os mesmos spins (singleto-singleto). É uma técnica de mensuração *in vivo* da eficiência quântica da fotossíntese. Para isso discutiremos, neste capítulo, sobre a importância desta técnica, descrição da atividade do fotossistema II (responsável por 90% da emissão de fluorescência), processos de absorção e de conversão de energia pela molécula, emissão por fluorescência, dos parâmetros da emissão por fluorescência, do papel da fluorescência da clorofila em relação à fotossíntese, análise da extinção da energia absorvida pela molécula e eficiência da fotoquímica.

4.2. Absorção e Conversão de Energia

Uma molécula estável está no estado fundamental singleto, ou seja, todos os seus orbitais eletrônicos são ocupados por um par de elétrons com spins anti-paralelos. Nesta condição, os elétrons de cada par no orbital apresentam spins anti-paralelos. A incidência de energia radiante desloca os elétrons para um nível energético que depende da energia incidente. Essa excitação eletrônica cria perturbações na molécula que a leva a estados vibracionais. Isso ocorre num período de cerca de 0,1 ou 1 ps, após os elétrons transitarem para o estado excitado no qual também têm spins anti-paralelos. Nesta situação diz-se que a molécula está no estado singleto.

A vida média do estado excitado ou tempo de relaxamento vibracional, para o caso da clorofila *a* em solução e absorvendo luz vermelha, é de aproximadamente 15 ps. Este tempo permite à molécula realizar milhares de vibrações, o que faz com que parte da energia dos elétrons seja perdida termicamente, sendo absorvida pelo meio externo pela transferência de calor. Isso leva a transições promovidas por calor liberado pela molécula como indica a figura 4.1. Os elétrons podem retornar ao estado fundamental, e a perda da energia absorvida pode se dar por fluorescência, com a emissão de radiação em um comprimento de onda mais longo.

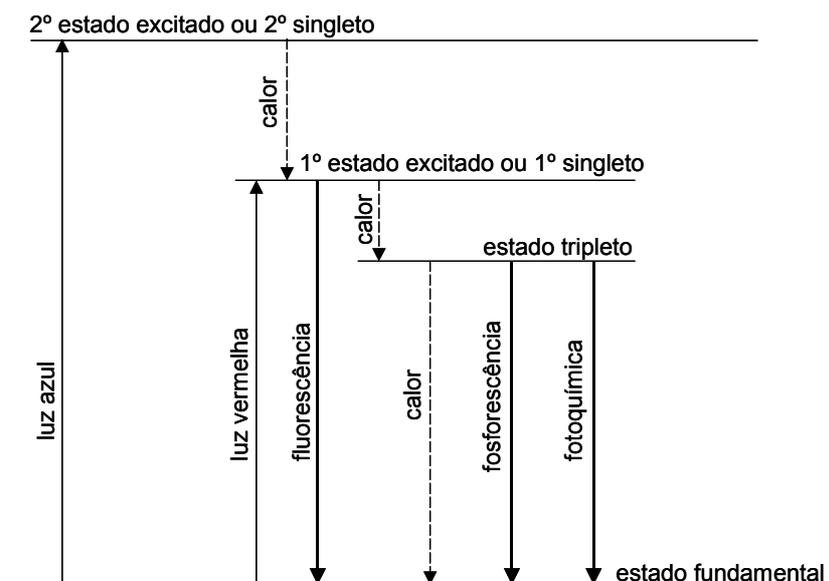


Figura 4.1. Estados de energia na molécula de clorofila e suas regras de reações fotoquímicas.

O retorno dos elétrons ao seu estado fundamental pode se dar por calor ou pela via radiativa na forma de fluorescência, conforme mostra a figura 4.1. Assim, há emissão de fótons de menor energia (com maior comprimento de onda).

Supondo que o estado fundamental de uma molécula é o estado singlete (figura 4.2), todos os elétrons são anti-paralelos. S_0 é chamado estado singlete zero. A excitação de uma molécula pode se dar pela promoção de um elétron de um orbital ocupado para outro orbital de maior energia em que os spins se mantêm anti-paralelos, gerando o estado excitado singlete, em que S_1 é o menor estado excitado. A molécula excitada no estado singlete ao retornar ao estado fundamental emite radiação na forma de fluorescência. Assim, a emissão envolvendo dois estados de mesmos spins (singlete-singlete) é chamada de fluorescência.

Entretanto, a molécula pode perder sua energia através de conversões internas pela transferência do movimento vibracional de modo intramolecular, tornando paralelos os spins dos elétrons do par de um orbital. A molécula passa para o estado tripleto, T_1 . Como vimos na seção 2.3, o estado tripleto tem menor energia devido a menor repulsão intereletrônica entre os elétrons. Transições entre T_1 e S_0 são inibidas pela mudança nas autofunções de spin, mas tornam-se permitidas devido ao acoplamento entre as autofunções espaciais e de spin. Este acoplamento faz com que uma alteração na função de spin de anti-simétrica do estado singlete para uma função simétrica do estado tripleto seja

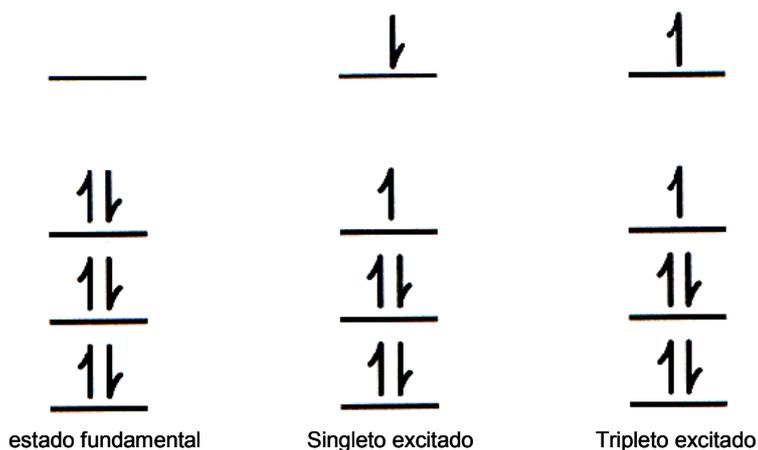


Figura 4.2. Configurações eletrônicas para uma molécula tendo a última camada completa.

acompanhada de uma mudança das funções espaciais de simétrica para anti-simétrica. Isso mantém a autofunção total do elétron anti-simétrica. A emissão envolvendo estados de diferentes spins (tripleto-singlete) é a fosforescência. A fosforescência tem maiores comprimentos de onda e maior tempo de vida que a emissão por fluorescência do estado singlete excitado para o estado fundamental.

Uma molécula no estado tripleto tem tempo de vida em torno de 10 ms, tempo suficiente para haver colisão com uma molécula diferente para a qual o excesso de energia possa ser transferido. A segunda molécula “aceitadora” pode então passar por uma mudança fotoquímica num processo que é dito ser fotosensibilizado. O pigmento é chamado de sensibilizador.

4.3. Importância da Fluorescência

No passado, a pesquisa da eficiência da fotossíntese era orientada pela medição de trocas gasosas, que envolvia principalmente a necessidade de utilização de sofisticados e custosos sistemas que detectavam a captação de CO₂ pela planta e a, conseqüente, evaporação de H₂O (FIELD ET AL., 1989). Em substituição a estes processos, a medida da fluorescência da clorofila é uma técnica simples, rápida e não invasiva, para avaliação quantitativa *in vivo* da fotossíntese. Tem o potencial de estimar a eficiência quântica da fotossíntese, tanto no laboratório como no campo, além de permitir a obtenção de dados a respeito de reações químicas parciais e do fracionamento da energia de excitação (SNEL AND VAN KOOTEN, 1990).

A fluorescência da clorofila tem sido utilizada como um indicador muito útil e informativo do transporte fotossintético de elétrons em folhas intactas, algas e cloroplastos isolados (BRITAINS ET AL., 1986; RENGER AND SCHREIBER 1986; SCHREIBER AND BILGER, 1987, 1992; KRAUSE AND WEIS, 1991; KARUKSTIS, 1991). É uma técnica que tem sido utilizada, por exemplo, para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de café (LAGE; SCHOOR; CARVALHO; JALINK, 2002) e detectar o estresse hídrico (LICHTENTHALER and BABANI, 2000).

Conforme já relatado nas seção 3.7, o complexo antena coletor de luz (LHC – *Light-Harvesting-Complex*) das folhas verdes absorve radiação na região fotossinteticamente ativa e canaliza esta energia do fóton para os centros de reação do FS I e FS II. Ao lado do processo de excitação concorre o de de-excitação, se ocorre conforme a equação 4.1 (DURÃES, 2002):

$$E_{\text{absorvida}} = E_{\text{fotoquímica}} + E_{\text{calor}} + E_{\text{fluorescência}} \quad 4.1$$

Esta equação mostra que a de-excitação da energia absorvida ocorre por extinção fotoquímica, emissão de calor ou de fluorescência. Sob condições ideais, uma grande parte da energia luminosa absorvida é utilizada para trabalho fotoquímico na fotossíntese.

A fotoquímica compreende a conversão da energia da luz em energia de ligação química contida nos produtos finais da fotossíntese e o consumo de energia nos processos metabólicos que não resultam no armazenamento de energia. A conversão da luz em calor é um processo de dissipação não-radiativo, enquanto a re-emissão dos fótons na forma de fluorescência uma forma de dissipação radiativa. É importante que o mínimo de energia da molécula excitada seja extinta por fluorescência, pois que a energia é para ser usada na fotossíntese.

4.4. Atividade do Fotossistema II

Uma vez que os diversos estresses (altas ou baixas temperaturas, seca, radiação excessiva) afetam direta ou indiretamente o FS II (LAWLOR, 1995), pode-se utilizar a fluorescência da clorofila *a* como um instrumento indireto para a mensuração do estresse tanto no laboratório como no campo (BÖLHÁR-NORDENKAMPF, 1993). Isto porque cerca de 90% da fluorescência é devida à clorofila *a* do FS II que tem uma relação

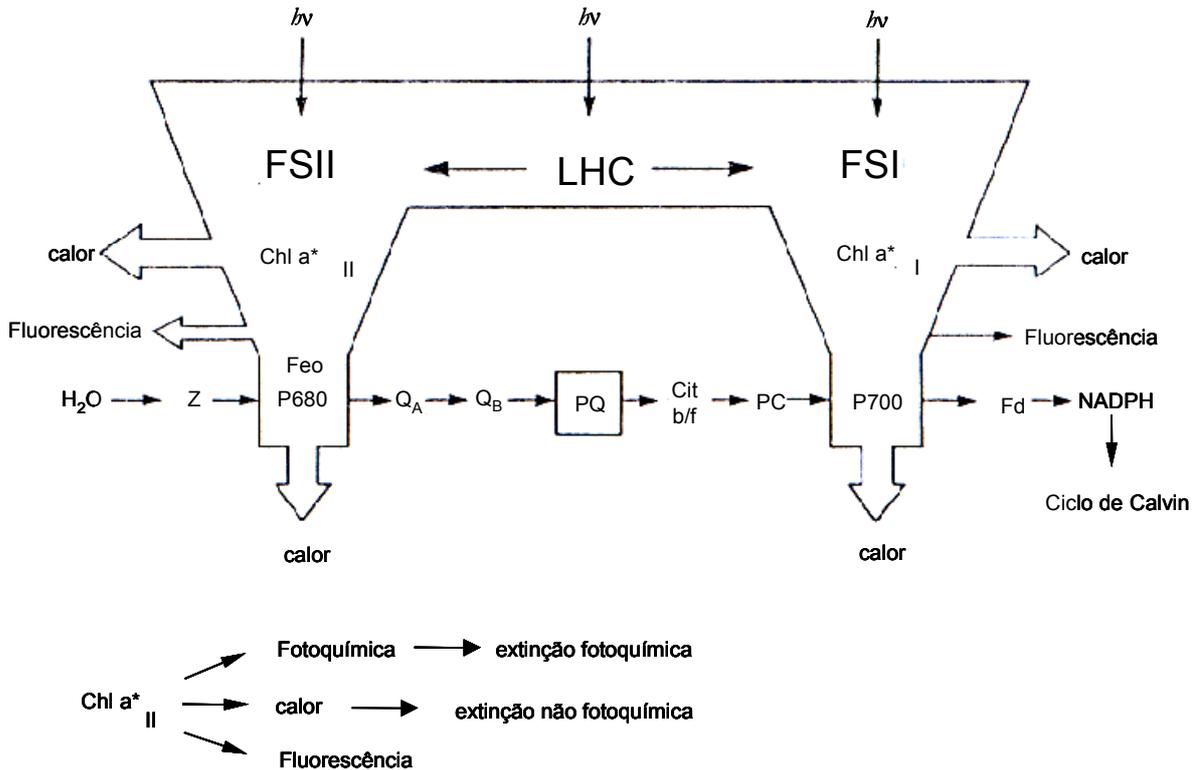


Figura 4.3. Ilustração esquemática da conversão de energia primária na fotossíntese. Como já aminoácido tirosina, P680 e P700 – pigmentos aprisionadores dos fotossistemas II e I (FS II e FS I), Chl_a^{*}_{II}, e Chl_a^{*}_I – clorofilas excitadas do FS II e FS I, Feo – feofitina, Q_A e Q_B – quinonas A e B, PQ – plastoquinona, Cit b/f - citocromo b/f, PC – plastocianina, Fd – ferredoxina. As setas horizontais de H₂O até NADPH representam a cadeia transportadora de elétrons.

funcional com os outros componentes do aparato fotossintético. A extinção por fluorescência da clorofila *a* se apresenta, pois, como um método não invasivo, eficiente e confiável para avaliar as mudanças no funcionamento do FS II (LU & ZHANG, 1998; KRAUSE & WEIS, 1991; SCHREIBER ET AL., 1994). Entretanto, a emissão de fluorescência compete com as dissipações fotoquímica e por calor, como mostra a figura 4.1

O FS II tem importância fundamental na transdução da energia e no monitoramento do mecanismo molecular de oxi-redução envolvido na transmissão de sinais para a aclimação a estresses ambientais. Segundo Anderson et al. (1995), essa aclimação do aparato fotossintético possibilita às plantas coordenarem a alocação de recursos para manter ótimas taxas de fotossíntese, além de permitir o funcionamento

efetivo sobre condições de excesso e limitação de luz. Deste modo, as plantas devem manter um balanço efetivo entre o suprimento de energia e a energia consumida.

Quando uma planta é submetida a irradiância ela excessiva perde a função do FS II (OHAD ET AL. 1994; OSMOND, 1994) pela fotoinibição que está associada a inúmeros fatores ambientais danosos aos sistemas de membranas. Segundo Baker et al. (1994), as alterações mais importantes dos fenômenos fotossintéticos ocorrem nas membranas tilacóides, provocando um decréscimo na eficiência da utilização da energia dos fótons capturados nas reações fotoquímicas. Entretanto, em condições de luz excessiva no campo a fotoinativação do FS II pode ser uma estratégia de fotoaclimatação para as plantas submetidas ao estresse (ANDERSON ET AL., 1997). Neste caso, ao cessar a causa do estresse a funcionalidade dos centros de reação é restaurada. Assim sendo, a fotoinibição é reversível, podendo ser considerada como um processo regulatório, protetor, estando sob controle fisiológico (KRAUSE, 1988).

4.5 Emissão por Fluorescência

Além das clorofilas, outros pigmentos podem absorver luz a ser utilizada na fotossíntese. Entretanto, o espectro da fluorescência de células de plantas iluminadas é sempre devido à clorofila *a*. Isto indica que os outros pigmentos absorvedores iniciais de luz transferem suas energias de excitação para as moléculas de clorofila *a* que, finalmente, extingue a energia na forma de fluorescência ou fotoquímica. Os comprimentos de onda do espectro de fluorescência são sempre maiores que os correspondentes espectros de absorção. Assim, clorofila *a* absorve luz com máximos em 430 e 662 nm e emite como fluorescência em 668 nm (ZELITCH, 1971).

Segundo Kautsky and Hirsch (1931), a cinética da emissão da fluorescência induzida reflete as fases iniciais da indução da fotossíntese. *In vivo*, a clorofila existe na forma de complexos pigmentos de proteínas, localizados na membrana tilacóide, que canalizam suas energias para o centro de reação (P680 e P700), onde ocorre a conversão de energia pela separação de carga.

Os dois principais fatores que causam mudanças na eficiência da fluorescência são: a taxa de conversão de energia fotoquímica e a taxa de dissipação de energia não-radiativa. A energia da luz é absorvida pelas moléculas da clorofila para a fotossíntese. Entretanto, frações da luz absorvida são freqüentemente perdidas como calor ou pela re-emissão por fluorescência. Como estes processos de decaimento da clorofila excitada são competitivos,

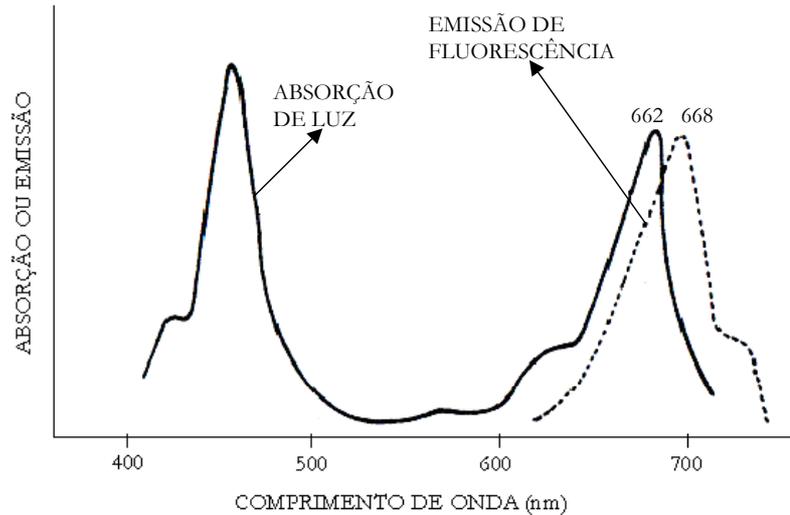


Figura 4.3. Espectro de absorção emissão da clorofila *a* (MAGALHÃES, 1979).

mudanças na taxa fotossintética e/ou na emissão de calor dissipativo causarão mudanças complementares na intensidade da fluorescência emitida.

A luz azul é cerca de 1.5 vezes mais energética que a luz vermelha (ou seja, $4.62 \times 10^{-19} \text{ J fóton}^{-1}$ em 430 nm comparada a $3.00 \times 10^{-19} \text{ J/ fóton}^{-1}$ em 662 nm), mas tende a não ser mais efetiva porque o 2º estado singleto da clorofila (excitado por luz azul) é muito instável, decaindo rapidamente para estados com menor excitação com a geração de calor. Da mesma forma que é perdida como calor, a energia desprendida quando elétrons excitados retornam ao estado fundamental pode ser coletada pelos centros de reação para propiciar a separação de cargas e, conseqüentemente, conduzir o transporte de elétrons e a geração de ATP e NADPH, ou ser re-emitida na forma de fluorescência. Sendo a fluorescência do FS II somente um dos processos de de-excitação das moléculas de clorofila excitada, a probabilidade de que uma molécula de clorofila excitada seja de-excitada por fluorescência (equivalendo a eficiência quântica da fluorescência, $\Phi_F = \text{número de fótons emitidos por fluorescência/número de fótons absorvidos (I)}$) é dada pela razão da taxa constante de fluorescência em relação aos outros processos competitivos (JONES, 1992)

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_D + k_T + k_P} \quad 4.2$$

Considerando todos os centros de reação abertos teremos que:

k_F - taxa constante para a de-excitação por fluorescência

k_D - taxa constante para dissipação térmica na forma de calor

k_T - energia transferida para o FS I

k_p - fotoquímica do FS II

Normalmente Φ_F tem valores no intervalo de 0.01 a 0.02.

4.6. Fluorescência da Clorofila em Relação à Fotossíntese

Mudanças na dissipação de calor são relativamente lentas quando comparadas com as alterações na fotoquímica e na fluorescência. Desse modo, a análise da fluorescência emitida por um tecido foliar, numa transição de escuro para iluminado, pode fornecer informações a respeito das mudanças na extinção fotoquímica (conversão da energia radiante em energia química). O trabalho fotoquímico é determinado pela concentração da abertura dos centros de reação (KAUTSKY ET AL. 1960; DUYSSENS AND SWEERS, 1993).

O entendimento da curva de fluorescência se dá em função do transporte de elétrons discutido na seção 3.10. Na figura 4 está graficada a intensidade de fluorescência em função do tempo alinhada com as reações na cadeia transportadora de elétrons. Ao iluminar uma folha adaptada ao escuro, situação em que todos os componentes da cadeia transportadora de elétrons devem estar completamente oxidados, a fluorescência imediatamente cresce para o nível F_0 , característica da abertura dos centros de reação do FS II e da oxidação completa do acceptor primário de elétrons (Q_A). A eficiência quântica da fluorescência neste caso é dada pela equação 4.2.

Quando a luz absorvida provoca a separação de cargas no centro de reação, Q_A recebe um elétron, reduzindo-se. Em seguida Q_A re-oxida-se passando este elétron para Q_B . Após receber dois elétrons, Q_B fica totalmente reduzida (Q_BH_2), fecham-se os centros de reação do FSII e a fluorescência atinge seu valor máximo, F_m . Neste ponto, devido a todos os centros de reação estarem fechados, a excitação da clorofila não decai por fotoquímica (k_p tende a zero) e, assim, da equação 4.2 teremos

$$F_m = \Phi F = \frac{k_F}{k_F + k_D + k_T} \quad 4.3$$

O crescimento na fluorescência implica no declínio da taxa de conversão fotoquímica. Os elétrons em Q_BH_2 são transferidos a uma cadeia transportadora de elétrons, ou seja, os elétrons em Q_BH_2 são transferidos ao citocromo *bf* e deste à plastocianina. Iniciado o transporte de elétrons, a fotossíntese cresce e a fluorescência diminui gradativamente. Analogamente, à redução de Q_BH_2 , há um novo incremento na fluorescência quando NADP torna-se totalmente reduzido na forma NADPH. NADPH cede seus elétrons para propiciar o Ciclo de Calvin ou Ciclo de Conversão de Carbono, incrementando a fotoquímica e, conseqüentemente, reduzindo a fluorescência.

Como veremos adiante, um parâmetro útil derivado da cinética da curva de fluorescência induzida é a chamada fluorescência variável, F_v , que é a diferença entre a F_m e F_0 .

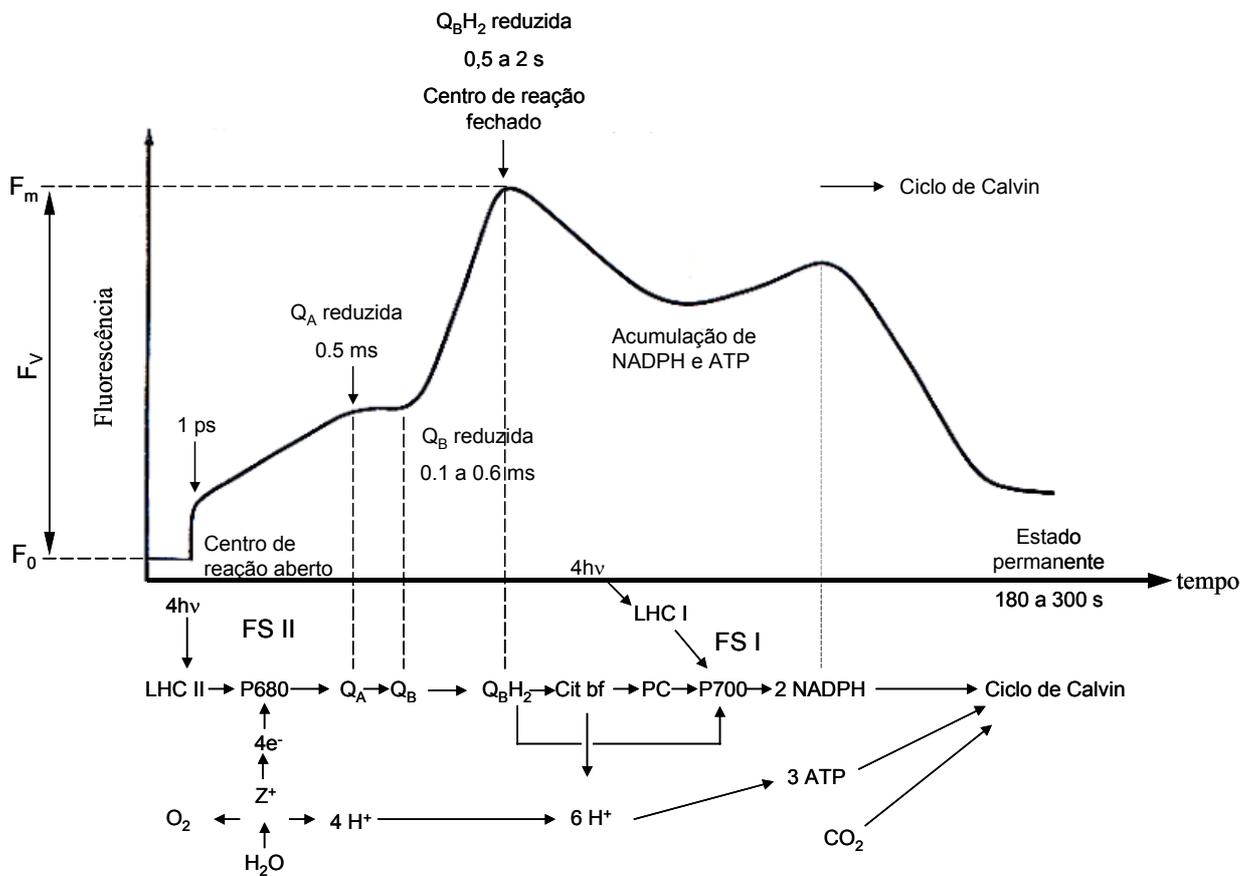


Figura 4.4 . Curva de fluorescência induzida alinhada com as reações na cadeia transportadora de elétrons. (BOLHÅR-NORDENKAMPF, H.R. AND ÖQUIST, G. (1993))

4.7 Eficiência da Fotoquímica

A eficiência de captura da energia de excitação quando os centros de reação do FS II estão abertos pode ser obtida da equação 4.2. Nesta situação, a conversão de energia fotoquímica é máxima e a fluorescência será mínima ($F = F_0 = I \Phi_F$).

$$F_0 = I \left\{ \frac{k_F}{k_F + k_D + k_T + k_P} \right\} \quad 4.6$$

sendo F_v a diferença entre F_m , dada pela equação 4.3, e F_0 , teremos

$$F_v = F_m - F_0 = I \left\{ \frac{k_F}{k_F + k_D + k_T} - \frac{k_F}{k_F + k_D + k_T + k_P} \right\} \quad 4.7$$

Dividindo por F_m e rearrumando obteremos

$$\frac{F_v}{F_m} = \left\{ 1 - \frac{k_F + k_D + k_T}{k_F + k_D + k_T + k_P} \right\} = \frac{k_P}{k_F + k_D + k_T + k_P} I \quad 4.8$$

demonstrando que a proporção da energia absorvida usada na fotoquímica é dada por F_v/F_m , que é uma medida da eficiência da fotoquímica da abertura dos centros de reação do FS II. A razão F_v/F_m tem uma variação típica de 0.75 a 0.85. (BOLHÄR-NORDENKAMPF AND G.ÖQUIST, 1993).

4.8. Bibliografia do Capítulo 4

ANDERSON, J.M.; PARK, Y.I.; CHOW, W.S. **Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature.** *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 100, p.214-223, 1997.

BAKER, N.R.; FARAGE, P.K., STIRLING, C.M.; LONG S.P. **Photoinhibition of crop photosynthesis in the field at low temperature.** In: *Photoinhibition of photosynthesis – from Molecular Mechanisms to the Field* (N.R. Baker; J. R. Bowyer eds.), Bios Scientific Publishers, Oxford, p. 349-363. 1994.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG B (1987). Photon yield of O₂-evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489 – 504.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G. (1993). **Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research.** In: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual.* Edited by D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bøhr-Nordenkampf, R.C. Leegoo and S.P. Long. Chapman & Hall, Londond, 1993. cap. 12. p. 193-201.

BRITAINS JM; VERNOTTE C; KRAUSE GH; WEIS E (1986). **Chlorophyll a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves.** In: Govindjee, Ames J. Fork CD (eds) *Light emission by plants and bacteria.* Academic Press, New York, pp 539-583.

DENISON, R.FORD and RUSSOTTI, R. FORD (1996). **Field estimates of green leaf area index using laser-induced chlorophyll florescence.** In *Field Crops Research* 52 (1997) 143-149.

DURÃES, FREDERICO O.M. **Fotossíntese e Fluorescência da Clorofila: Parâmetros Indicadores de Tolerância a Estresses.** <http://www.cnpms.embrapa.br/nucleos/nea/pesquisa/gest002.html>. Acesso em 21 jun. 2002.

FIELD CB; BALL JT; BERRY, JÁ (1989). **Photosynthesis: principles and field techniques.** In: Pearcy RW, Ehleringer J, Mooney HÁ, Rundel PW (eds) *plant physiological ecology.* Chapman and Hall, London, pp 209-253.

HUNER, N.P.; MAXWELL, D.P.; GRAY, G.R.; SAVICH, L.V. KROLL,M.;IVANOV,A G.; FALK, S. **Sensing environmental temperature change through imbalance between enrgy supply and energy consumption: redox state of photosystem II.** *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v.98, p.358-364, 1996.

JONES, HAML Y G. **Plants and Microclimate.** Cambridge: sec edition, 1992. 420p.

LAGE, G.; SCHOOR, R.V.D.; CARVALHO, M.L.M.; JALINK, H. (2002). **Método da fluorescência da clorofila induzida por luz laser para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de café.** XXXI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, Salvador.

LICHTENTHALER, HARTMUT K. and BABANI, FATBARDHA, (2000). **Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence.** Plant Physiol. Biochem. 38 (2000) 889-895.

KARUKSTIS KK (1991). **Chlorophyll fluorescence as a physiological probe of the photosynthetic apparatus.** In: Scheer H (ed) Chlorophylls. CRC Press, Boca Raton, pp 769-795.

KAUTSKY, H. and A. HIRSCH (1934). **Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensaureassimilation.** Das Fluoreszenzverhalten grüner Pflanzen. Biochem. Zeitschrift 274, 423-434.

KRAUSE, G. H. & WEIS, E., (1991). **Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics.** Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v.42, p.313-349, 1991.

LAWLOR, D. W. **The effects of water deficit on photosynthesis.** In: SMIRNOFF, N., Environmental and Plant Metabolism – flexibility and acclimation. Bios Sci. Publ, 1995, p.129-160.

LU, C.; ZHANG, J. **Modifications in photosystem II photochemistry in senescent leaves of maize plants.** Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 49, n.327, p. 1671-1679, 1998.

OHAD, I.; KEREN, N.; ZER, H.; GONG, H., MOR, T.S.; GAL, A; SHLOMIT, T.; DOMOVICH, Y. **Light induced degradation of the photosystem II reaction center D1 protein in vivo: an integrative approach.** In: **Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field.** N.R. Baker, JR Browyer eds. Bios Scientific Publishers, Oxford. 1994. p.433-447.

OSMOND, C.B., **What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants.** In: Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field. N.R. Baker, JR Browyer eds. Bios Scientific Publishers, Oxford. 1994. p.161-177.

RENGER G; SCHREIBER U (1986). **Practical applications of fluorometric methods to algae and higher plant research.** In: Govindjee, Amesz J.Fork CD (eds) Light Emission by plants and bacteria. Academic Press, new York, pp 587-619.

SCHREIBER, U.; BILGER, W (1987). **Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements.** In: Tenhunen JD, Catarino FM, Lange OL, Oechel WD (eds). *Plant Response to stress*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 27-53.

SCHREIBER, U.; BILGER, W (1992). **Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the last years in retrospect.** *Prog. Bot.* 54: 151-173.

SCHREIBER, U.; BILGER, W. NEUBAUER, C., **Chlorophyll fluorescence as a non-invasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis.** In: E. S. SCHULZE, M. M. CALSWELL. *Ecophysiology of photosynthesis*, Berlin'springer Verlag, 1994. p.49-70.

SCANDALIOS, J.G. **Oxygen stress and superoxide dismutases.** *Plant Physiology*, Maryland, V.101,p 7-12,1993.

SMIRNOFF, N. **The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation.** *New Phytologist*, Cambridge, v.125, p.27-58, 1993.

SNEL JFH, van Iepren W, Vrendenberg WJ (1990). **Complete suppression of oxygen evolution in open PS 2 centers by non-photochemical fluorescence quenching?** In: Baltscheffsky M (ed). *Current research in photosynthesis*, vol II. Kluwer, Dordrecht, pp 911-914.

VAN KOOTEN O, SNEL JFH (1990). **The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology.** *Photosynth Res.* 25:147-150.

ZELITCH, ISRAEL (1971). **Photosynthesis, Photorespiration, and Plant Productivity.** Academic Press. New York.

Capítulo 5

Experiência no Campo

5. Experiência no Campo

5.1. Introdução

O milho (*Zea mays L.*) é uma planta que nas condições brasileiras apresenta um ciclo vegetativo variando entre 110 e 180 dias, que é o período entre a semeadura e a colheita. A frutificação, etapa compreendida desde a fecundação até o enchimento completo dos grãos, tem uma duração estimada de 40 a 60 dias. Devido à sua simplicidade, além de sua grande importância dentre os principais cultivos de grãos, inclusive devido ao rápido crescimento de suas folhas, a cultura do milho foi escolhida para a análise dos parâmetros de fluorescência.

5.2. Exigências Nutricionais do Milho

O milho é uma cultura que possui alta produtividade, alcançando 10 toneladas por hectare de grãos e 70 toneladas por hectare de forragem, alcançadas por agricultores no Brasil que adotam tecnologias adequadas. Entretanto, na prática a sua produção é muito baixa e irregular, apresentando-se nos patamares de 2 a 3 toneladas de grãos por hectare e de 10 a 45 toneladas de massa verde por hectare (COELHO E FRANÇA, 1995).

A fertilidade do solo é considerada um dos principais fatores desta baixa produtividade. A quantidade de nutrientes que a planta extrai durante o seu ciclo determina suas necessidades nutricionais. Para suprir deficiências, as adubações deverão fornecer à planta a quantidade de nutrientes que esta extrai.

O aumento na produção é acompanhado por uma maior extração pela planta de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio. Os nutrientes mais exigidos pelo milho são nitrogênio e potássio, principalmente quando o sistema de produção é de uma agricultura intensiva e tecnificada, com o uso da irrigação. Isto porque as exigências nutricionais, em condições de baixa produtividade, são menores, e mesmo um modesto fornecimento pelo solo de nitrogênio e de potássio pode ser suficiente para suprir as plantas com estes nutrientes.

Tabela 6.1. Extração média de nutrientes pela cultura do milho destinada à produção de grãos e silagem em diferentes níveis de produtividade (COELHO E FRANÇA, 1995).

Tipo de exploração	Produtividade (t/há)	Nutrientes extraídos (kg/ha)				
		N	P	K	Ca	Mg
Grãos	3.65	77	9	83	10	10
	5.80	100	19	95	17	17
	7.87	167	33	113	27	25
	9.17	187	34	143	30	28
	10.15	217	42	157	32	33
Silagem (matéria seca)	11.60	15	15	69	35	26
	15.31	181	21	213	41	28
	17.13	230	23	271	52	31
	18.65	231	26	259	58	32

Para o nitrogênio, temos a seguinte relação, dada na tabela 6.1, entre a quantidade de nitrogênio extraída (kg/hectare) e a produtividade (toneladas/hectare), considerando agricultura irrigada, que utiliza alta tecnologia para obter elevadas produtividades.

Para identificação do nível nutricional da planta é utilizada uma análise química da folha, que, por ser a sede do metabolismo vegetal reflete bem, na sua composição, as mudanças na nutrição. Esse critério do diagnóstico pelo uso da análise foliar advém da premissa de existir uma considerável relação entre o suprimento de nutrientes e os níveis dos elementos. Deste modo, incrementos ou decrementos nas concentrações de nutrientes se relacionam, respectivamente, com produções mais altas ou mais baixas.

5.2. Instrumento de Estimação da Eficiência da Fotoquímica Planta

O PEA (*Plant Efficiency Analyser*), da Hansatech Instruments, permite determinar a emissão de fluorescência da clorofila *a* emitida pelas plantas verdes. É um equipamento simples, leve e portátil, que pode ser utilizado tanto no laboratório como no campo. As medições da fluorescência induzida são feitas utilizando-se plantas intactas pré-adaptadas ao escuro. O sistema é constituído basicamente de clipe foliar, unidade sensora e unidade de controle.

5.2.1 Clipe Foliar



Figura 5.1. PEA (Plant Efficiency Analyser)

O primeiro passo no processo de medição consiste em cobrir a área da folha a ser analisada com um clipe foliar leve e pequeno. O clipe consiste basicamente de pinças conjugadas a um sistema de janela, que tem uma área circular do limbo foliar em torno de quatro milímetros de diâmetro. A folha é inserida entre as duas superfícies da pinça, repousando sobre a parte inferior, sendo que a janela na parte superior pode ser fechada, excluindo a incidência de luz e possibilitando a adaptação do tecido foliar ao escuro. Isto permite o “relaxamento” do sistema transportador de elétrons fotossintéticos, pois a realização da fotossíntese depende da energia da luz, garantindo o estado oxidado dos receptores de elétrons. Os cliques são construídos em plástico branco para minimizar os efeitos do aumento da temperatura sobre a folha durante o período de adaptação.

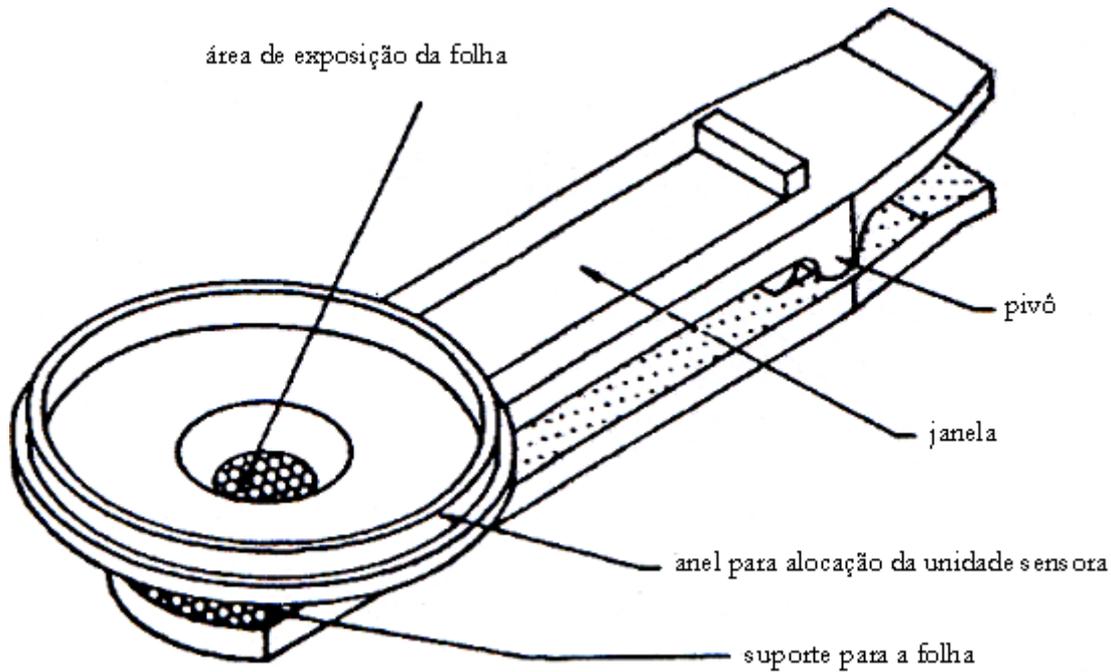


Fig. 5.2. Partes constituintes do clipe foliar.

5.2.2. Unidade Sensora

O sensor é conectado sobre o clipe foliar, tal que a luz solar seja excluída. Assim, a janela no clipe foliar pode ser aberta para expor a folha à iluminação da fonte de luz do equipamento. Uma chave localizada na unidade sensora permite iniciar a medição ou abortá-la sem a necessidade de controle via painel de controle, o que é muito útil quando da necessidade de ter uma das mãos livre durante a medição.

A unidade sensora possui um conjunto óptico constituído de uma fonte de luz para excitar a folha e de um detector para captar do sinal de resposta da fluorescência. A iluminação é fornecida por seis LEDs vermelhos de alta potência, que são focalizados numa área de 4 mm de diâmetro sobre a superfície exposta da folha.

Os LEDs têm o máximo do comprimento de onda em 650 nm, possibilitando uma rápida absorção da luz pelos cloroplastos da folha. Este dispositivo tem a vantagem de ser robusto, emitir baixos níveis de calor, não necessitar de complexos sistemas de controle e proporcionar o alcance da intensidade máxima muito rapidamente (tipicamente microsegundos). Estas características possibilitam uma precisa medição de F_0 .



Fig. 5.3. Alocação da unidade sensora no clipe foliar.

Um circuito óptico de realimentação monitora e corrige mudanças na intensidade de saída dos LEDs, que são causadas pelo aquecimento da junção do dispositivo.

O detector é um fotodiodo pin associado a um circuito de amplificação. Um filtro óptico garante que o detector responda aos maiores comprimentos de onda do sinal de fluorescência e bloqueie a detecção da luz do LED refletida pela folha que tem comprimentos de onda mais curtos.

5.2.3. Unidade de Controle

O PEA utiliza um controlador microprocessado para todas as funções de instrumentação. O sinal de fluorescência recebido pela unidade sensora é digitalizado por um conversor A/D. Pode-se avaliar desta maneira os seguintes parâmetros da emissão de fluorescência: fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (F_v) e eficiência quântica (F_v/F_m) do fotossistema II. Como a curva de fluorescência é um gráfico da sua intensidade em função do tempo, também é disponibilizado o tempo, T_m , em que F_m ocorreu.



Fig. 5.4. Unidade de controle do PEA.

5.3 Medição da Eficiência Quântica da Fotossíntese

5.3.1 Metodologia do Trabalho em Campo

Segundo Lopes (1989), a adubação mineral de nitrogênio para a cultura do milho, na região de Minas Gerais (sítio em que foi realizada esta experiência) varia de 50 a 80 kg/hectare de terreno. Considerando uma profundidade média do solo de 20 cm, teremos uma dosagem mínima recomendada para aplicação de nitrogênio de

50 kg de nitrogênio/hectare - 25 mg/dm³

e a dosagem máxima

80 kg de nitrogênio/hectare - 40 mg/dm³

Na experiência em questão, o tratamento fisiológico quanto à dosagem de nitrogênio, como o controle de estresse hídrico das plantas foram feitas pelo doutorando Rogério Alessandro Faria Machado da Unesp/Botucatu. Foram utilizadas duas espécies de

milho, denominadas espécies L 1170 e L13.1.2, as quais foram obtidas do programa de melhoramento de milho para tolerância à seca da Embrapa Milho e Sorgo. Estas amostras foram tratadas com baixo (20 mg/dm^3) e alto teor de nitrogênio (80 mg/dm^3). Para o milho com baixo teor de nitrogênio fez-se uma aplicação única de 20 mg/dm^3 30 dias após a germinação do milho. Para o milho com alto teor de nitrogênio procedeu-se, a partir desta data, a uma aplicação semanal, durante quatro semanas seguidas, de 20 mg/dm^3 , até se completar os 80 mg/dm^3 .

Na experiência em questão as plantas também foram submetidas às condições de capacidade de campo (CC), que chamaremos de planta irrigada, e de estresse hídrico (EH), denominada planta sob estresse hídrico. Para uma dada área de solo irrigada, a capacidade de campo é definida conceitualmente como a máxima quantidade de água retida pelo solo depois que o excesso tenha sido drenado (MELLO ET AL, 2003). Para as plantas irrigadas foram providas 1 l de água por dia, enquanto que para as plantas sob estresse hídrico houve um fornecimento de 700 ml de água por dia. Essa quantidade de água teve o objetivo de repor a perda de água por evapotranspiração (soma da perda de água pela planta e pelo solo).

Conforme Strasser (2003), a técnica da fluorescência pode ser utilizada para uma determinada cultura sob condições físicas bem definidas para analisar sua resposta as mudanças no ambiente (estresse químico). Nesta experiência as condições físicas foram definidas separadamente como capacidade de campo e estresse hídrico para se analisar as respostas da eficiência fotoquímica do milho às mudanças dos níveis de nitrogênio. Assim, comparou-se a aplicação de alto e baixo teor de nitrogênio, nas situações de capacidade de campo e de estresse hídrico. Deve ser ressaltado que, nesta experiência, não se pode comparar o rendimento quântico entre as situações de capacidade de campo e estresse hídrico, tendo em vista as amostras para análise também estarem sendo submetidas a variações no teor de nitrogênio. Para se realizar esta análise seriam necessários a inserção de outros parâmetros de controle. Como uma primeira avaliação optou-se por este caso mais simples utilizando-se as duas variáveis independentemente (teor de água e de nutrientes).

Foram utilizadas 48 (quarenta e oito) amostras de milho cultivados em vasos, sendo 24 (vinte e quatro) de cada linhagem. Das 24 de cada linhagem, 12 (doze) foram tratadas com baixo teor de nitrogênio e as outras doze com alto teor de nitrogênio, sendo estas doze subdividas em dois grupos referentes à capacidade de campo e ao estresse hídrico.

Desta forma, foram realizadas seis medições em cada amostra (capacidade de campo e alto teor de nitrogênio, capacidade de campo e baixo teor de nitrogênio, estresse

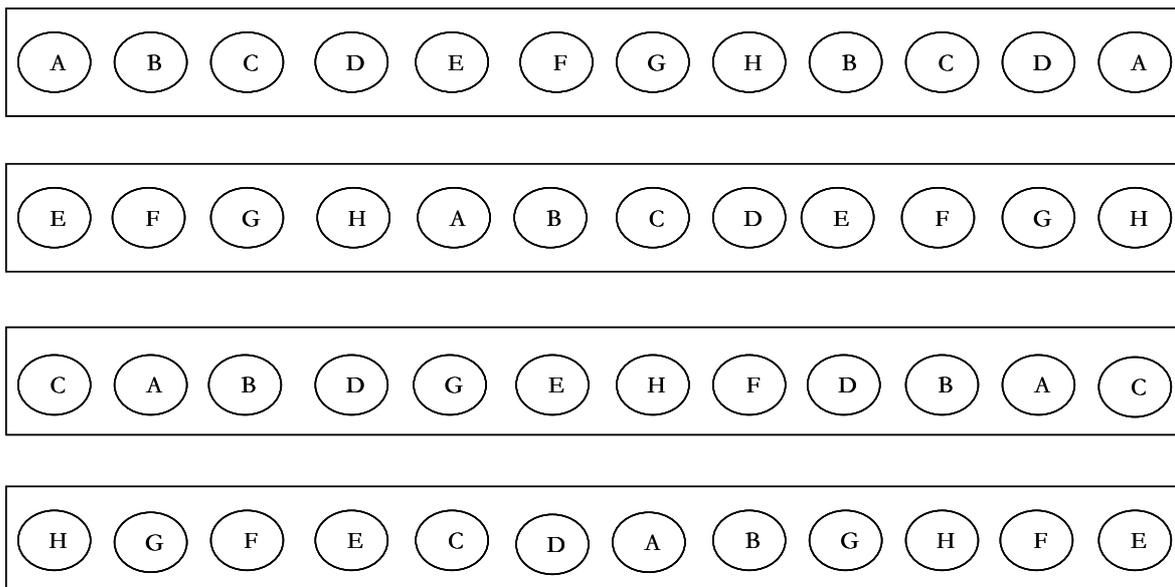


Figura 5.5. Disposição das amostras na casa de vegetação.

hídrico e baixo teor de nitrogênio, estresse hídrico e alto teor de nitrogênio). Além disso, os vasos foram dispostos de forma aleatória, para eliminar possíveis variações de natureza ambiental quanto à incidência solar, umidade do ar, entre outros, minimizando quaisquer erros nas leituras. A figura 5.5. mostra a disposição das amostras na casa de vegetação. As designações A, B, C, D, E, F, G e H estão representados na tabela 5.2.

Tabela 5.2. Representação do conjunto de seis amostras de plantas com os devidos tratamentos.

Conjunto	Espécie	mg/dm ³ Nitrogênio	regime hídrico
A	L 1170	20	CC
B	L 1170	80	CC
C	L 13.1.2	20	CC
D	L 13.1.2	80	CC
E	L 1170	20	EH
F	L 1170	80	EH
G	L 13.1.2	20	EH
H	L 13.1.2	80	EH

Os resultados da medição com o PEA foram obtidos por média simples das seis leituras de cada amostra (A, B, C, D). Na situação de capacidade de campo, obteve-se os seguintes valores mostrados na tabela 5.3.

Tabela 5.3. Dados medidos na capacidade de campo para baixo e alto teor de nitrogênio.

Conjunto	Espécie	mg/dm ³ Nitrogênio	F _v /F _m
A	L 1170	20	0,7347
B	L 1170	80	0,7548
C	L 13.1.2	20	0,7492
D	L 13.1.2	80	0,7642

Eficiência Quântica da Fotossíntese na Capacidade de Campo

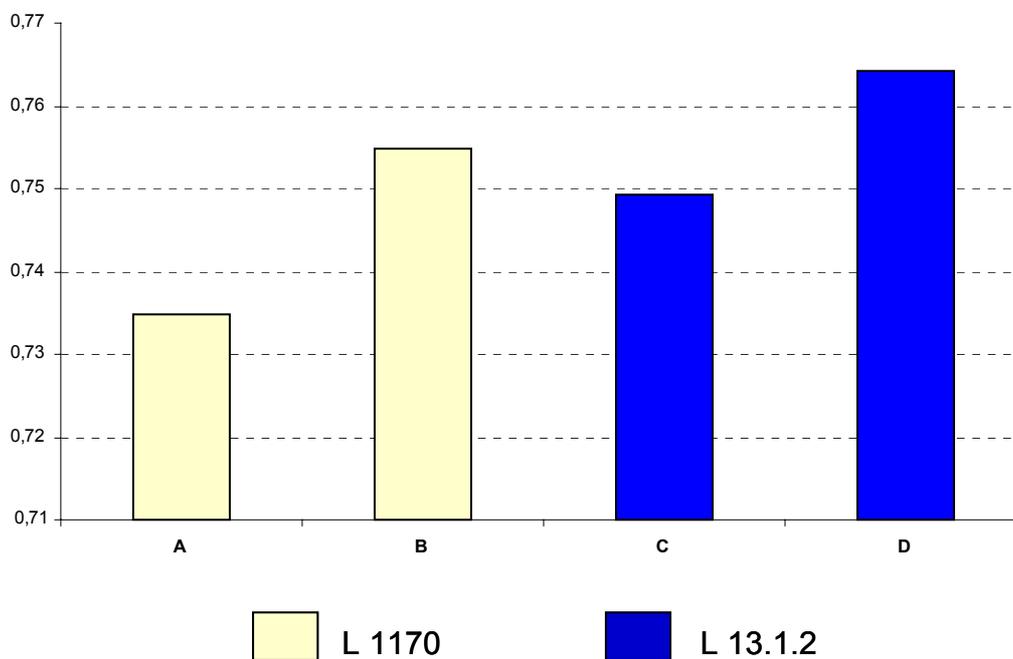


Figura 5.6. Eficiência quântica para as linhagens L 1170 e L 13.1.2 na capacidade de campo para baixo (A e C) e alto teor (B e D) de nitrogênio.

Observando a tabela 5.3 e o respectivo gráfico da figura 5.6, pode-se notar que na situação de capacidade de campo as amostras que receberam baixo teor de nitrogênio apresentaram um rendimento quântico abaixo do limite inferior determinado por $F_v/F_m = 0.75$. As plantas tratadas com alto teor de nitrogênio tiveram um rendimento quântico considerado ideal, ou seja, na faixa entre 0.75 e 0.85.

Para as condições físicas de estresse hídrico obtivemos as leituras da tabela 5.4.

Tabela 5.4. Dados medidos na situação de estresse hídrico para baixo e alto teor de nitrogênio.

Conjunto	Linhagem	mg/dm ³ nitrogênio	F_0/F_m
E	L 1170	20	0,7435
F	L 1170	80	0,7732
G	L 13.1.2	20	0,7448
H	L 13.1.2	80	0,7733

Eficiência Quântica da Fotoquímica na Situação de Estresse Hídrico

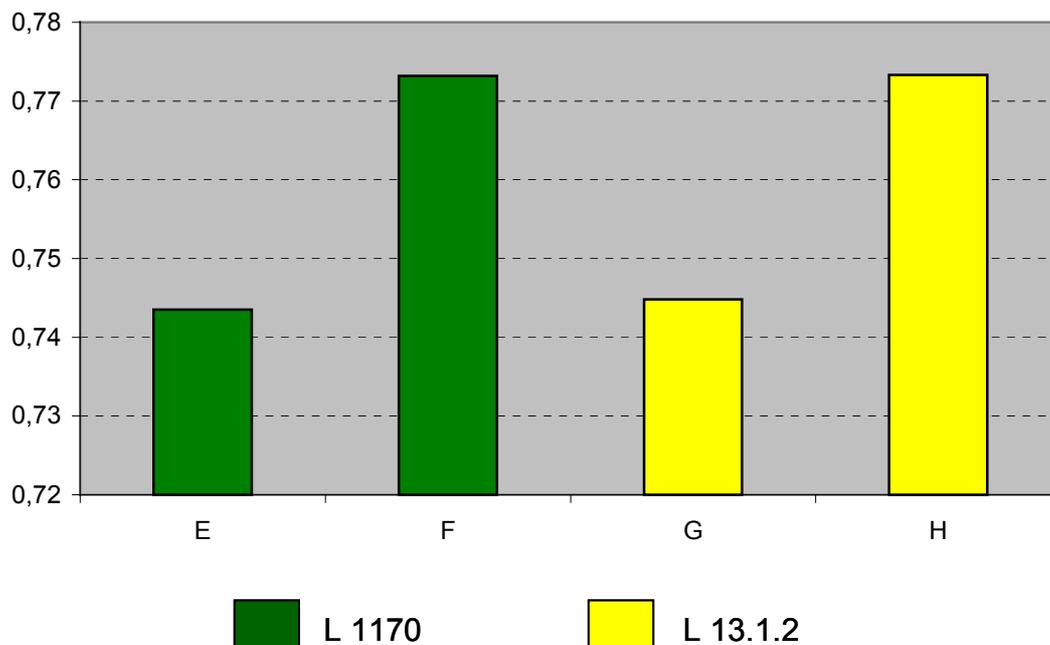


Figura 5.6. Eficiência quântica para as linhagens L 1170 e L 13.1.2 sob estresse hídrico para baixo (E e G) e alto teor (F e H) de nitrogênio.

Analogamente, pela avaliação dos valores da tabela 5.4 e do gráfico 5.6, temos que para a situação de estresse hídrico as duas espécies de milho com baixo teor de nitrogênio apresentaram rendimento quântico abaixo de 0.75. As amostras com alto teor de nitrogênio resultaram num rendimento quântico na faixa de 0.75 a 0.85. Devemos considerar que o estresse hídrico, fornecimento de 70% da quantidade de água necessária em condições normais as plantas, não incorreu no decréscimo do rendimento quântico para limites inferiores ao mínimo da relação F_v/F_m . Isto se deve ao fato das duas linhagens serem obtidas do programa de melhoramento de milho para tolerância à seca.

Conforme visto na seção 4.7, para as condições ideais, a razão F_v/F_m é proporcional à eficiência quântica da fotoquímica e varia de 0.75 a 0.85. Considerando a adaptação a cada condição física, capacidade de campo e estresse hídrico, observa-se nos gráficos que as duas linhagens de milho, L1170 e L.13.1.2, apresentam uma relação F_v/F_m abaixo de 0.75 para baixos teores de nitrogênio e entre 0.75 e 0.85 para altos teores de nitrogênio. Deste modo, os valores obtidos encontram-se no intervalo teórico pré-estabelecido. E assim, pode-se verificar a eficácia do PEA, um instrumento óptico que utiliza a resposta da fluorescência da planta, para determinar a eficiência quântica da conversão fotoquímica sob condições físicas bem definidas no ambiente.

5.4. Bibliografia do Capítulo 5

COELHO, ANTÔNIO MARCOS E FRANÇA, GONÇALO EVANGELISTA. **Seja o doutor do seu milho, nutrição e adubação.** Potafos - Arquivo do Agrônomo. Piracicaba, 2ª edição, p. 1-9 (Set.1995).

LOPES, ALFREDO SCHEID. **Comissão para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – CFSEMG** -. 4º aproximação, 176 p. (1989).

MELLO, CARLOS ROGÉRIO; OLIVEIRA, GERALDO CÉSAR DE; RESCK, DIMAS VITAL SIQUEIRA; LIMA, JOSÉ MARIA DE; JÚNIOR, MOACIR DE SOUZA DIAS. **Estimativa da Capacidade de Campo Baseado na Curva de Inflexão da Curva Característica.** http://www.editora.ufla.br/revista/26_4/art21.pdf (Acesso em 13 fev.2003).

STRASSER, R.J.; SIRIVASTA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. **The fluorescence Transient as Tool to Characterize and Screen Photosynthetic Samples.** <http://www.unige.ch/sciences/biologie/bioen/CHAP25.PDF>. Acesso em 13 Fev. 2003.

6. Espectroscopia da Fluorescência

6.1. Introdução

A espectroscopia estuda a interação da luz com a matéria, envolvendo uma gama de comportamentos físico-químicos, tal como ocorre na fotoquímica. Um típico espectro consiste da intensidade de uma certa resposta, tal como a emissão de luz por fluorescência, em função do comprimento de onda da luz. A intensidade dá uma medida da taxa de transição das moléculas de um nível de energia para outro, enquanto o comprimento de onda da radiação é diretamente relacionado à diferença entre as energias inicial e final da molécula.

Deste modo, a espectroscopia é de suma importância para a definição dos parâmetros dos componentes optoeletrônicos de um fluorímetro para estimar a eficiência quântica da fotossíntese. A obtenção dos espectros, devido à fluorescência de uma cultura de milho, foi realizada nos laboratórios do Instituto de Física da USP-São Carlos.

Neste capítulo iremos descrever a espectroscopia da fluorescência, o equipamento de espectroscopia, os procedimentos para a realização da experiência, as curvas obtidas por espectroscopia da fluorescência e, finalmente, faremos a análise dos dados.

6.2. Espectroscopia da Fluorescência,

Na espectroscopia da fluorescência em geral são observados dois máximos de fluorescência, um em torno de 685 nm, que corresponde à fluorescência do FS II (fotossistema II), e outro menor, por volta de 730 nm, relativo ao FS I, conforme mostrados na figura 6.1. (<http://www.udec.cl/~lebravo/practico1.doc>, 2003).

Segundo Lou e Zhang (1999), que estimaram a eficiência quântica utilizando o PEA da Hansatech e o MINI-PAM da Walz, o estresse hídrico não afeta a fotoquímica primária do FS II (fotossistema II), mas induz a um decréscimo na eficiência quântica do transporte de elétrons, sendo consideradas as condições de estresse hídrico moderado, variando de 3 a 4 dias, e severo, em torno de dez dias, após a retirada da água.

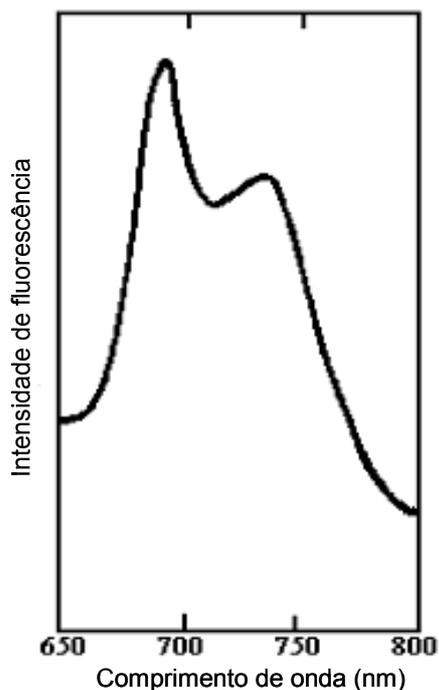


Figura 6.1. Espectro da fluorescência. (<http://www.udec.cl/~lebravo/practico1.doc>, 2003).

6.3. Sistema de Espectroscopia da Fluorescência

O sistema espectral de fluorescência utilizado foi concebido para diagnosticar tumores malignos na pele, mucosa bucal, dutos respiratórios, trato digestivo e no sistema urogenital. Porém, pode ser adaptado para análise da fluorescência do tecido foliar pela alteração do tempo de exposição da fonte de luz de 50 para 5 milisegundos. A faixa espectral de operação varia de 440 a 850 nm, com uma resolução de ~5 nm. É constituído de um cabo flexível de fibra óptica, monocromador, fotodetector, software pré-instalado, e fonte à laser.

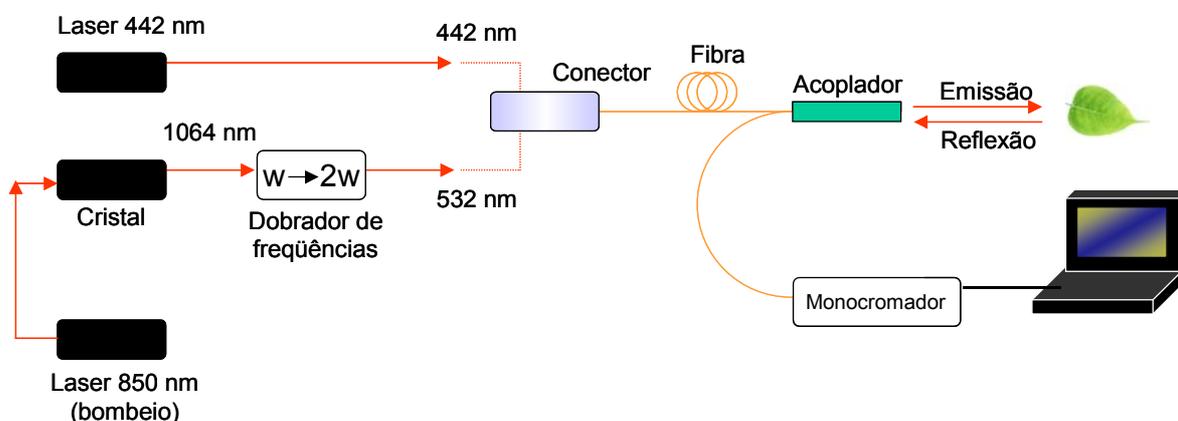


Figura 6.2. Diagrama de operação do equipamento de espectroscopia da fluorescência.

A figura 6.2 mostra o diagrama de operação do equipamento de espectroscopia da fluorescência e a figura 6.3 ilustra os seus componentes. O cabo óptico consiste de 7 (sete) fibras ópticas dispostas simetricamente, uma central para conduzir a luz de excitação ao tecido e seis ao seu redor para coletar o sinal de fluorescência da folha e também o sinal retro-espalhado. Cada fibra tem 100 μm e uma abertura numérica de 0.22. O monocromador é baseado numa grade com 300 linhas/mm. O fotodetector é um array CCD linear de 2048 elementos fotodetetores. O programa LightView_Med (LVM.EXE) é o software que provê a operação de todo o sistema, monitorando e armazenando o espectro selecionado em arquivos binário e ASCII. As fontes de laser utilizadas são de 1 a 10 mW em 442 nm (violeta) e em 532 nm (verde) e de 1 a 15 mW em 633 nm (vermelho).



Figura 6.3. Visualização do equipamento de espectroscopia da fluorescência.

6.4. Metodologia da Experiência

Para nossa análise, as amostras de milho foram colhidas na fazenda da Embrapa Sudeste, em São Carlos. As plantas foram semeadas em 20 de dezembro de 2002. Receberam adubação de nitrogênio de 500 kg/hectare no plantio e de 400 kg/hectare na cobertura. Foram aplicados 200 ml/hectare de inseticida Karatê e 3 l/hectare de herbicida (após a emergência) Primestra Gold. As amostras foram submetidas ao mesmo regime hídrico na fazenda da Embrapa, desde a semeadura em 20 de dezembro de 2002, até o momento de nossa colheita, às 15:00 hs do dia 31 de janeiro de 2003. Após a colheita as amostras de milho foram colocadas em sacos contendo terra retirada do próprio solo onde estavam cultivadas, minimizando a perda das características até o início do tratamento diferenciado no laboratório.

Dessa forma, às 16:00 hs no laboratório do Instituto de Física da USP São Carlos, as plantas foram separadas em dois grupos, um que recebeu irrigação (irrigado) e outro que ficou submetido à seca (não irrigado), para avaliação quanto à mudança no espectro da fluorescência face à mudança de suprimento hídrico. O enfoque foi observar tal comportamento em um curto intervalo de tempo. Posteriormente, uma folha da planta irrigada foi cortada para nova comparação. As plantas foram designadas por I (irrigada) e NI (não-irrigada), e a folha cortada por C (cortada). As medições foram feitas utilizando-se como fonte de excitação um laser com comprimento de onda em 442 nm e outro em 532 nm.

6.5. Obtenção dos Espectros

A seguir estão mostrados os espectros obtidos. Os máximos observados nos espectros em 532 nm e em 442 nm referem-se às reflexões da própria fonte laser. Assim, para a análise da fluorescência consideraremos, conforme a figura 6.1, a faixa do espectro entre 650 nm e 800 nm. Como os comprimentos de onda são praticamente os mesmos em todos os espectros obtidos, levando-se em conta a faixa de resolução do equipamento de ± 5 nm, foi feita a análise das variações nas intensidades da fluorescência emitida pelas amostras de milho. A intensidade de fluorescência de cada curva do espectro foi normalizada em relação ao valor do 1º máximo.

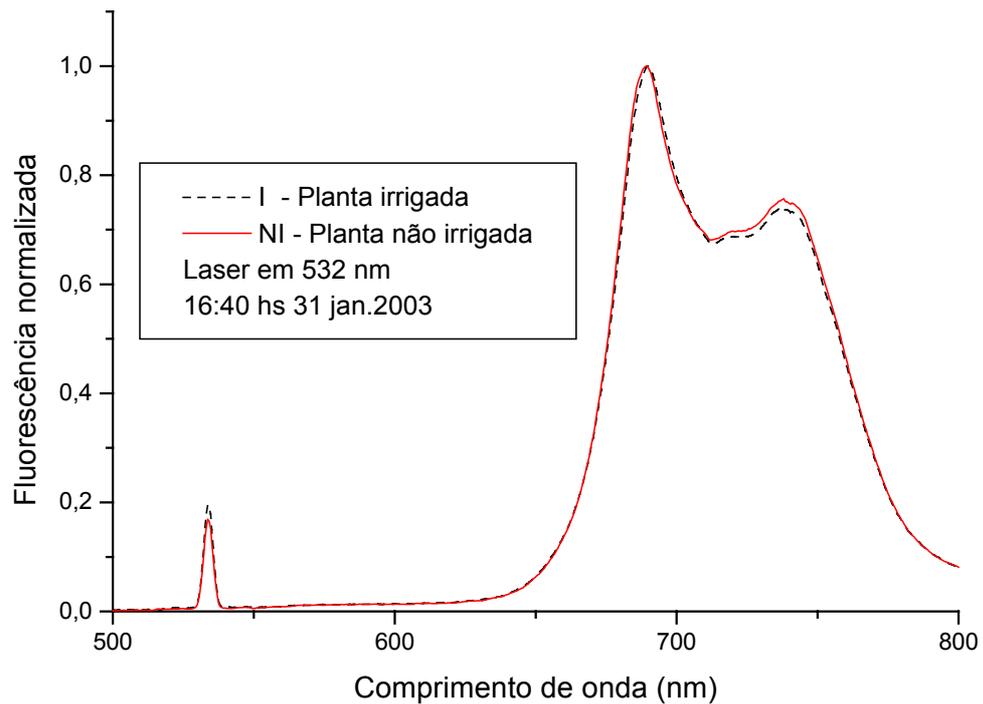


Figura 6.4. Espectro de fluorescência às 16:40 hs de 31 jan. 2003.

No espectro da figura 6.4, obtido às 16:40 hs do dia 31 de janeiro, as curvas de emissão de fluorescência das plantas irrigada e não irrigada foram praticamente idênticas.. A diferença da intensidade de fluorescência da planta não irrigada em relação à irrigada foi de 2% no 2º máximo e de 1% no mínimo local da intensidade. Isso indica que no intervalo de tempo entre a extração da planta do solo até o momento da 1ª medição, 1:40 hs após, nenhuma mudança considerável ocorreu Os valores mais relevantes do espectro da figura 6.4 estão relacionados na tabela 6.1.

Tabela 6.1. Máximos e mínimo local de fluorescência da figura 6.4.

Dados principais do espectro - 31 de janeiro de 2003 – 16:40 hs						
Leitura	1º Máximo		2º Máximo		Mínimo Local	
	Intensidade	λ (nm)	Intensidade	λ (nm)	Intensidade	λ (nm)
I	1	689	0.7413	738	0.6739	713
NI	1	690	0.7569	738	0.6811	712

Em seguida obteve-se o espectro para uma excitação com laser em 442 nm.

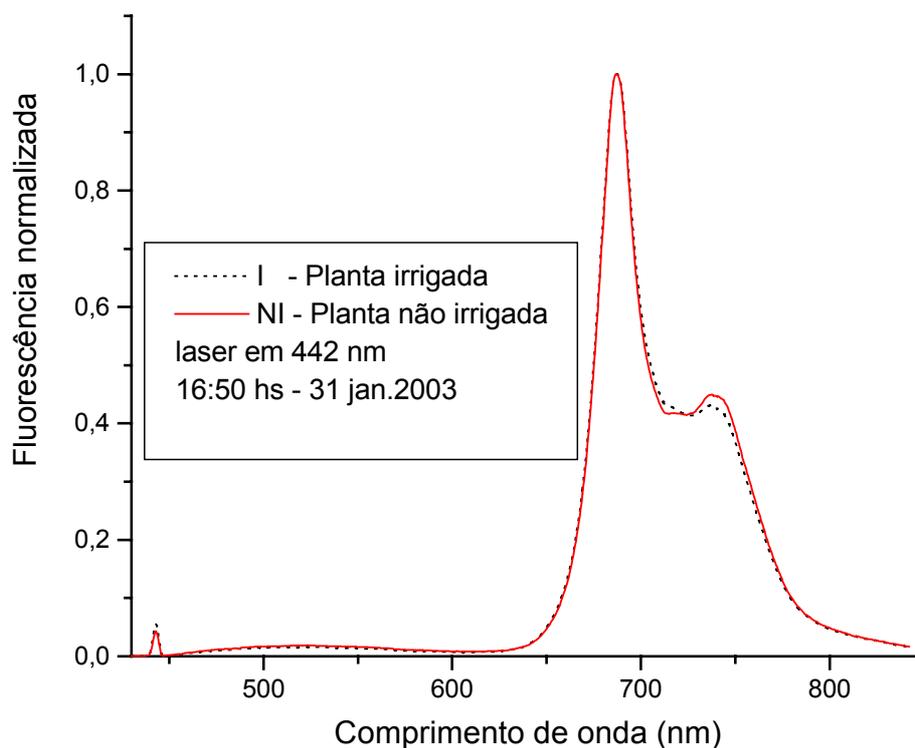


Figura 6.5. Espectro de fluorescência às 16:50 hs de 31 jan. 2003.

No espectro da figura 6.5, excitação com laser em 442 nm, as curvas de fluorescência das folhas das plantas irrigada e não irrigada também são praticamente idênticas. Contudo, há uma maior diferença do 1º para o 2º máximo de fluorescência se compararmos ao espectro com excitação por um laser em 532 nm. Se verificarmos a figura 3.5 da seção 3.6, observaremos que a absorção de luz sofre uma acentuada redução entre 500 e 600 nm. Isso indica que a taxa de transporte de elétrons (diretamente proporcional à eficiência da conversão fotoquímica) devido à absorção de luz é reduzida neste intervalo, resultando num maior decréscimo do 2º máximo da intensidade de fluorescência para excitação em 442 nm do que em 532 nm. A diferença da fluorescência da planta não irrigada em relação à irrigada foi de 4% no 2º máximo e de 2% no mínimo local de intensidade. Os dados principais da figura 6.5 estão listados na tabela 6.2.

Tabela 6.2. Máximos e mínimo local de fluorescência da figura 6.5.

Dados principais do espectro - 31 de janeiro de 2003 – 16:50 hs						
	1° Máximo		2° Máximo		Mínimo Local	
	Intensidade	λ (nm)		λ (nm)		λ (nm)
I	1	688	0.4323	738	0.4134	721
NI	1	687	0.4495	738	0.4145	720

Às 12:15 hs foram obtidos novos espectros das plantas irrigada e não-irrigada mostrados na figura 6.6.

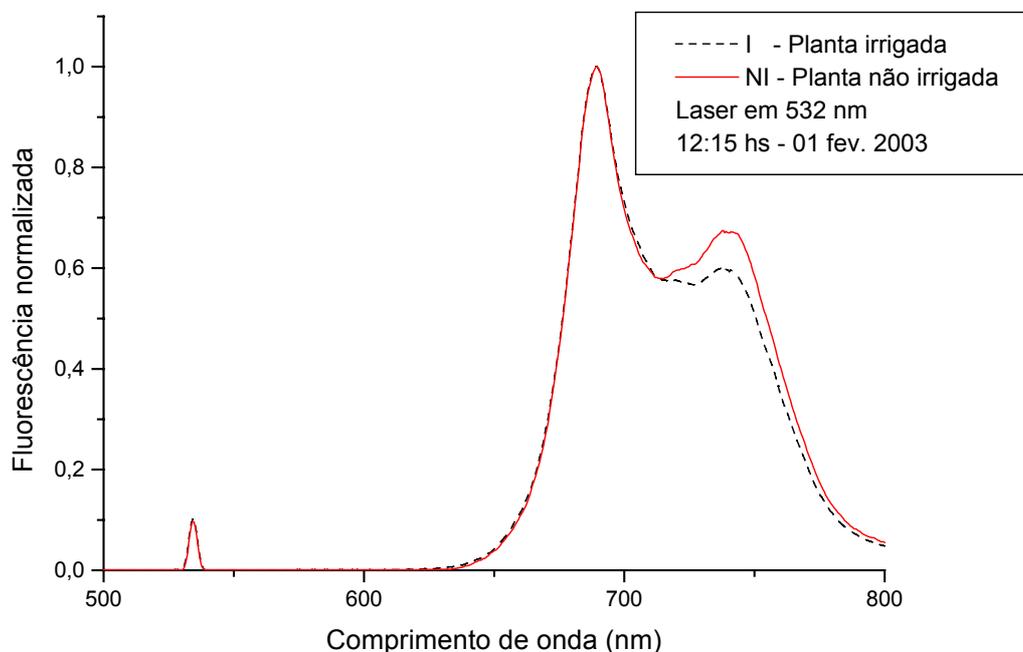


Figura 6.6. Espectro de Fluorescência às 12:15 de 01 fev. 2003. Folhas adaptadas ao escuro por 1h.

Os espectros obtidos na figura 6.6, às 12:15 hs (19:30 hs após a colheita) já apresentam uma separação em torno do 2° máximo entre as curvas de fluorescência das plantas irrigada e não irrigada. As folhas da planta não irrigada já se apresentavam visualmente murchas devido ao efeito do estresse hídrico. A diferença de fluorescência da planta não irrigada em relação à irrigada foi de 11% no 2° máximo e de 4 % no mínimo local. É nítida a mudança nas curvas do espectros. Na tabela 6.3 estão os valores mais relevantes da figura 6.6.

Tabela 6.3. Máximos e mínimo local da fluorescência da figura 6.6.

Espectro – 01 de fevereiro de 2003 – 12:15 hs						
Leitura	1º Máximo		2º Máximo		Mínimo Local	
	Intensidade	λ (nm)	Intensidade	λ (nm)	Intensidade	λ (nm)
I	1	690	0.6006	738	0.5670	722
NI	1	690	0.6670	738	0.5876	713

Também às 12:15 hs, 1:15 hs após uma folha da planta irrigada ser cortada, foram obtidos os espectros da planta irrigada e da folha cortada.

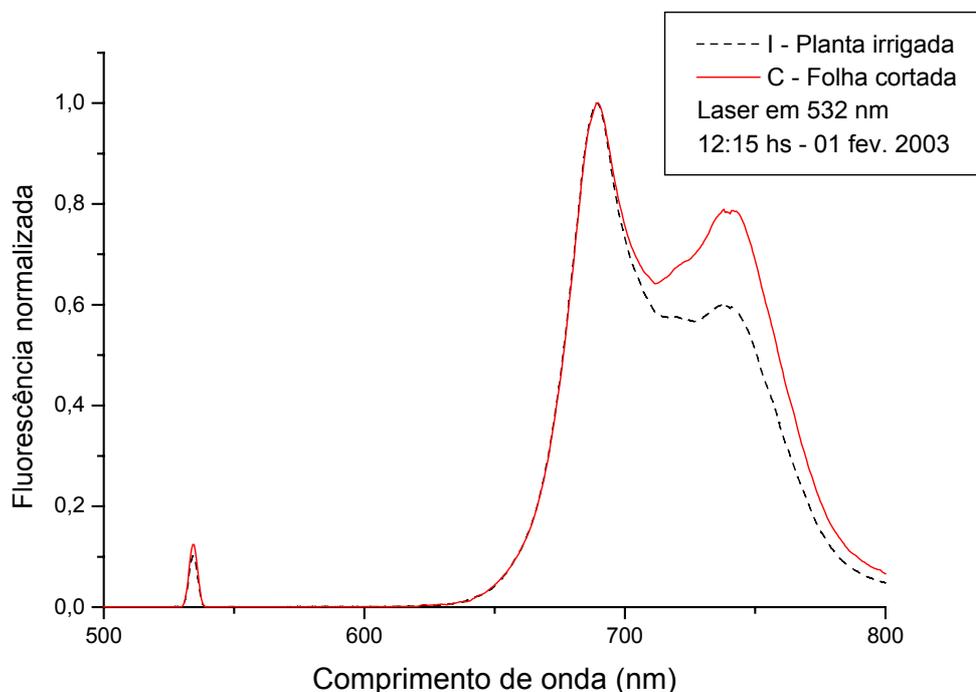


Figura 6.7. Espectro de Fluorescência às 12:15 de 01 fev. 2003. Folha cortada.

Na figura 6.7, são mostrados os espectros obtidos às 12:15 hs (19:30h após a colheita), da folha cortada da planta irrigada e da planta irrigada. A diferença de fluorescência da folha cortada em relação à planta irrigada foi de 31% no 2º máximo e de 13 % no mínimo da intensidade. A tabela 6.4 resume os principais parâmetros da espectroscopia da figura 6.7.

Tabela 6.4. Máximos e mínimo local da fluorescência da figura 6.7

Espectro - 01 de fevereiro de 2003 – 12:15 hs						
Leitura	1º Máximo		2º Máximo		Mínimo Local	
	Intensidade	λ (nm)	Intensidade	λ (nm)	Intensidade	λ (nm)
I	1	690	0.6006	738	0.5670	722
C	1	690	0.7893	738	0.6413	712

Às 16:37 hs, praticamente 24 hs após a primeira espectroscopia quando as plantas encontravam-se em iguais condições hídricas, foi obtido o último espectro comparativo entre as plantas irrigada e não-irrigada mostrado na figura 6.8.

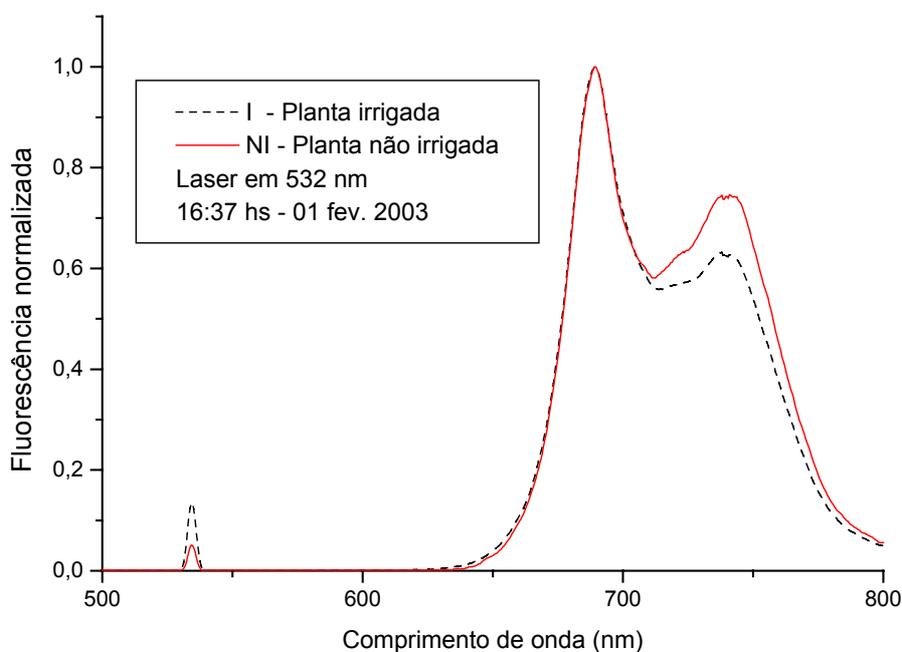


Figura 6.8. Espectro de Fluorescência às 16:37 hs de 01 fev. 2003.

A diferença de fluorescência da planta não irrigada em relação à planta irrigada aumentou para 18 % no 2º máximo e se manteve em 4% no mínimo local da intensidade. Assim pode-se mostrar que com o passar do tempo a intensidade da fluorescência da planta sob estresse hídrico aumenta cada vez mais devido à redução da conversão fotoquímica de energia. Os valores de interesse encontram-se listados na tabela 6.5.

Tabela 6.5. Máximos e mínimo local da fluorescência da figura 6.8.

Espectro - 01 de fevereiro de 2003 – 16:37 hs						
Leitura	1° Máximo (P1)	P1 λ (nm)	2° Máximo (P2)	P2 λ (nm)	Mínimo (M)	M λ (nm)
I	1	689	0.6319	738	0.5585	714
NI	1	690	0.7463	741	0.5813	713

Também às 16:37, 05:30 hs após o corte da folha da planta irrigada, foi obtido o espectro comparativo entre a folha cortada e a planta irrigada, mostrado na figura 6.9.

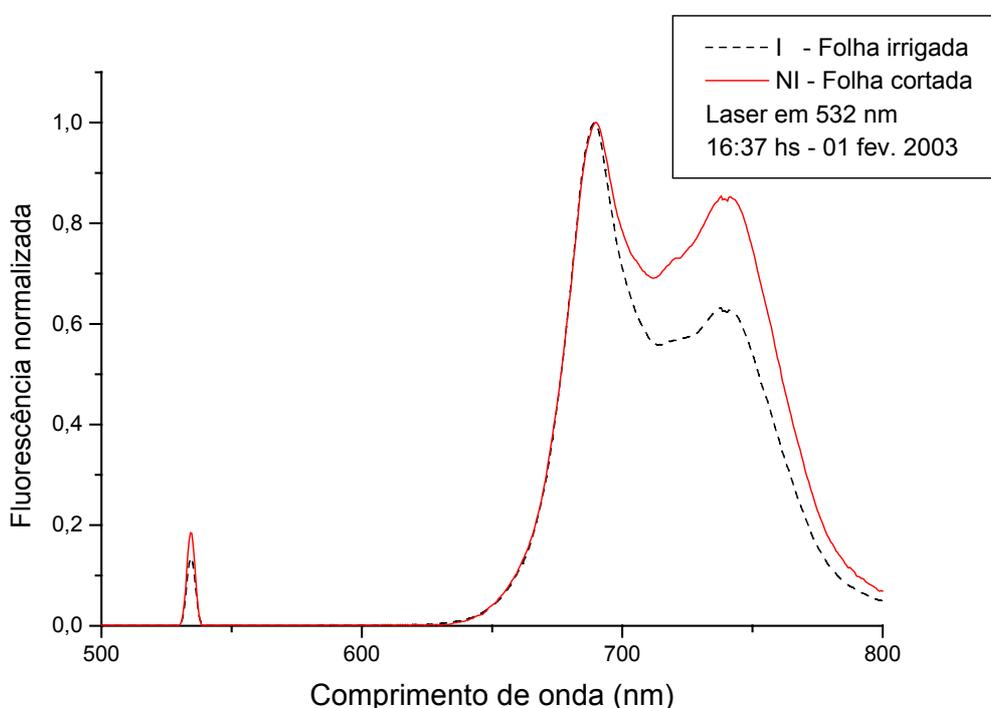


Figura 6.9. Espectro de Fluorescência às 16:37 hs de 01 fev. 2003. Folha cortada.

No espectro da figura 6.9 a diferença de fluorescência da planta não irrigada em relação à folha cortada foi de 34 % no 2° máximo e de 24% no mínimo local da intensidade. Pode-se observar que a folha cortada teve um grande incremento na fluorescência (34%) na primeira hora após o corte. Entretanto, decorridas mais 04:22 hs, esse aumento foi para apenas 34%. Isso se deve ao fato da folha cortada já estar “morta” e, assim, sofrer uma grande redução fotoquímica inicial logo após o corte.

Tabela 6.6. Máximos e mínimo local da fluorescência da figura 6.9

Dados principais do espectro – 01 de fevereiro de 2003 – 16:37 hs						
Leitura	1º Máximo		2º Máximo		Mínimo Local	
	Intensidade	λ (nm)	Intensidade	λ (nm)	Intensidade	λ (nm)
I	1	689	0.6319	738	0.5585	714
C	1	690	0.8538	738	0.6908	712

Com esta experiência também foi possível mostrar ser a espectroscopia da fluorescência um método rápido, não-invasivo e eficiente para a determinação de alterações físicas (estresse hídrico) numa cultura vegetal.

Além disso, este equipamento para a obtenção da curva do espectro de fluorescência, desenvolvido para diagnose de tumores malignos, já foi utilizado pelos pesquisadores da USP para detectar *cancro cítrico* em folhas de laranjeira. Neste caso as folhas que possuem a bactéria *Xanthomonas axonopodis pv. citri* emitem uma resposta no espectro de fluorescência diferente das folhas saudas, conforme mostra a figura 6.10. Assim, é possível a identificação prévia da doença que só era detectada visualmente por especialistas, porém já num estágio avançado quando muitas árvores já havia sido contaminadas.

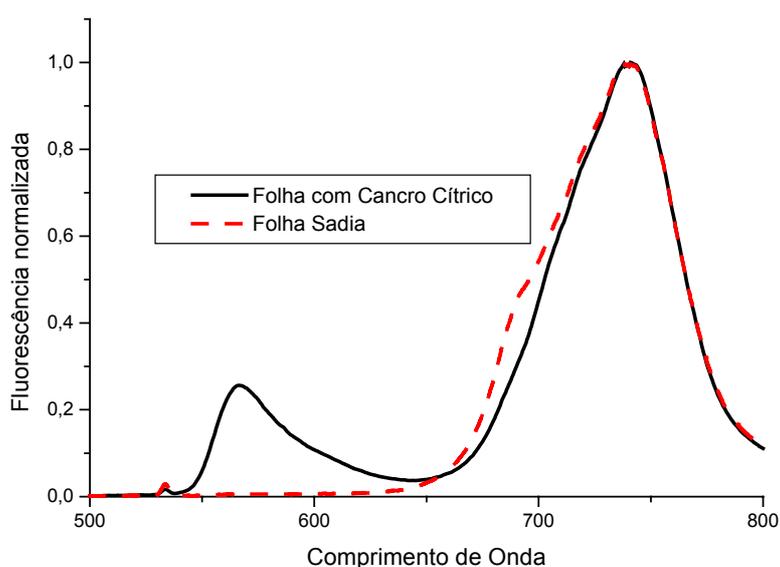


Figura 6.10. Espectro de fluorescência das folhas de laranjeira sadia e com cancro cítrico.

6.6. Análise dos Resultados

Das curvas obtidas para os casos das plantas irrigada e não irrigada, como da folha cortada, pode-se observar que as formas das curvas em torno do primeiro máximo de fluorescência, se mantêm inalteradas para todas as medições. Isso indica que a fotoquímica primária do FS II não foi afetada.

Comparando estes espectros com a figura 4.4 (Curva de fluorescência induzida alinhada com as reações na cadeia transportadora de elétrons), vemos que, após o primeiro máximo, inicia-se a cadeia transportadora de elétrons. Decorridas 1:40 hs após a colheita no campo, no dia 31 de janeiro, quando fizemos a separação da plantas quanto ao tratamento irrigado e não irrigado, a obtenção dos espectros das curvas nos dois casos são praticamente idênticos. A máxima diferença entre os espectros das plantas irrigada e não irrigada foi de 2% para a excitação com laser em 532 nm e de 4% para o laser em 442 nm.

Às 11:00 hs do dia 01 de fevereiro, a folha da planta irrigada foi cortada. Às 12:15 hs, a planta não irrigada apresentava-se com as folhas murchas pelo estresse hídrico. Obtivemos, então, os espectros para as plantas irrigada e não irrigada, como para a folha cortada. A máxima diferença entre os espectros aumentou para 11% entre a planta irrigada e a planta não irrigada. A diferença entre a planta irrigada e a folha cortada foi de 31%.

Às 16:37 hs, a máxima diferença entre os espectros das plantas irrigada e não irrigada cresceu para 18% e, entre a planta irrigada e a folha cortada, para 34%.

Estes resultados mostram que a fluorescência da planta não-irrigada em relação à planta irrigada aumenta consideravelmente com o passa do tempo. Contudo, a fluorescência da folha cortada aumenta bastante somente na primeira hora inicial. Como já dissemos isso se deve ao fato da folha cortada já estar morta.

Tanto no segundo máximo como no mínimo local da faixa do espectro de interesse, região em que a fluorescência é afetada pela variação na eficiência quântica do transporte de elétrons, os comprimentos de onda estão nos limites do erro de 5 nm.

Dessa forma, pela análise da espectroscopia da fluorescência foi possível diferenciar o estresse hídrico.

6.7. Bibliografia do Capítulo 6

<http://www.udec.cl/~lebravo/practico1.doc>. **Fluorescência del fotosistema II**. Acesso em: 17 mar. 2003.

LU, CONGMING AND ZHANG, JIANHUA (1999). **Effect of water on stress photosynthesis II photochemistry and its thermostability in wheat plants**. Journal of experimental botany, vol. 50, n° 336,pp. 1199-1206.

Capítulo 7

Instrumentação

7. Instrumentação

7.1. Introdução

Neste capítulo descreveremos a instrumentação para detecção óptica da fluorescência. Deste modo procedemos a uma adequação da instrumentação desenvolvida por Silva (2001), realizando uma melhoria no módulo de controle de corrente e de temperatura para a estabilização de leds e lasers de diodo. Em seguida elaboramos um projeto para conclusão da instrumentação da eficiência quântica da fotossíntese.

O objetivo da parte instrumental é montar um laboratório de desenvolvimento de equipamentos optoeletrônicos dedicado ao estudo da fotossíntese. A importância do desenvolvimento destes equipamentos reside no fato da nossa necessidade de independência tecnológica para proteger a nossa agricultura e de reduzirmos os custos dos equipamentos importados. Isso reduzirá os custos de aquisição devido a eliminação das tarifas de importação.

Para excitar as moléculas do aparato fotossintético de uma planta necessita-se de uma fonte de luz, sendo o LED e o laser as mais comumente utilizadas. Estes dois dispositivos optoeletrônicos, para funcionar em condições ideais, precisam de um controle de corrente e de temperatura de operação.

7.2. Módulo de Controle de Corrente e de Temperatura

7.2.1. Controlador de Temperatura

O uso de controladores de temperatura é largamente explorado em diversos processos para manter a temperatura de um certo sistema no entorno de um valor determinado, mesmo que haja perturbações, propiciando a mínima oscilação dentro da faixa tolerável.

No caso de componentes ópticos, como lasers semicondutores, a frequência de emissão precisa permanecer estável nas condições de operação. Os dois fatores que controlam o deslocamento da frequência do laser são (SINGH, 1995):

- quando há um aumento da temperatura, mudanças na banda proibida do semicondutor causam o deslocamento de todo o espectro de ganho para menores energias. A mudança na banda proibida na maioria dos semicondutores é de cerca

de -0.5 meV/K . Isto implica numa mudança do espectro de ganho em torno de 1 a 4 \AA/K se não existirem fatores adicionais, como mostrado na figura 7.1. Entretanto, a emissão não depende somente do pico de ganho, mas dos modos Fabry-Perot que estiverem mais próximos do pico de ganho. Isto leva ao segundo efeito:

- quando há mudança de temperatura, a expansão térmica da cavidade do laser e a alteração no índice de refração alteram a posição dos modos ressonantes. Os modos ressonantes são dados pela equação 7.1 (q é um inteiro e L é o comprimento da cavidade):

$$q\lambda_q = 2L; \lambda = \frac{\lambda_q}{n_r} \tag{7.1}$$

Se o comprimento efetivo da cavidade aumenta devido à temperatura, as posições dos modos serão deslocadas relativamente ao espectro de ganho que por si só também se altera com a temperatura, conforme esquematizado na figura 7.1.

Assim, resulta que o comprimento de onda do laser de diodo aumenta quando temperatura da junção aumenta. Contudo, em sistemas ópticos coerentes, esta variação não é tolerada, levando a necessidade do controle de temperatura.

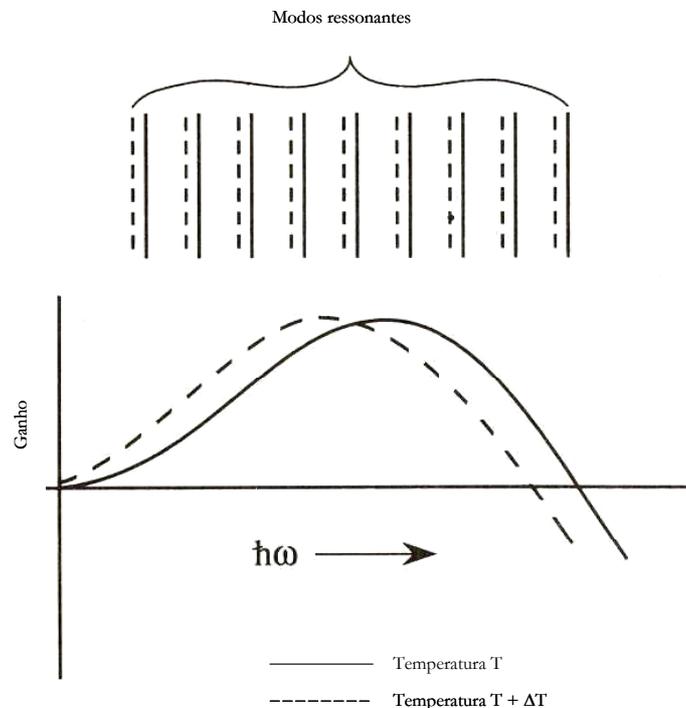


Figura 7.1. O deslocamento do espectro de ganho e dos modos ressonantes da cavidade de um laser com a temperatura.

Como resultado dos dois eventos, a emissão do comprimento de onda de um laser Fabry-Perot tem o comportamento ilustrado na figura 7.2. O comprimento de onda de emissão desloca-se de $1 \text{ \AA}/\text{K}$ até um modo adjacente tornar-se próximo do máximo ganho, provocando a mudança do modo.

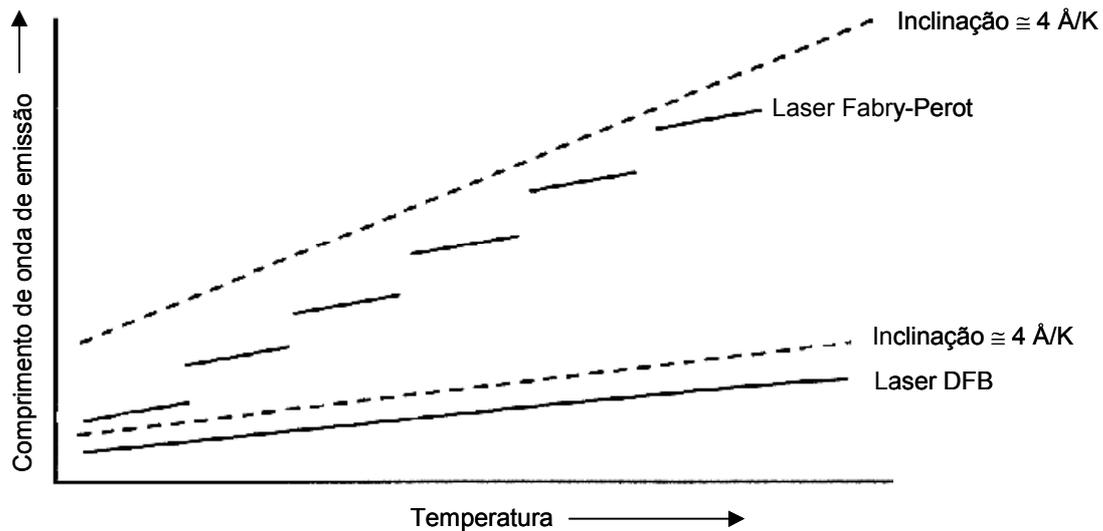


Figura 7.2 Deslocamento no comprimento de onda de emissão do laser com a temperatura.

Deve-se considerar ainda que há uma variação da potência do laser em função da temperatura, reforçando a utilização do controle do laser. Como o ganho de um laser é função da taxa de inversão de população, uma variação na temperatura acarretará uma perturbação na distribuição de equilíbrio de Fermi-Dirac. Um aumento na temperatura da junção do laser provoca uma variação na distribuição da população de Fermi-Dirac natural dos elétrons. São necessários mais elétrons na banda de condução para se conseguir a mesma inversão efetiva de população.

Numa junção $p-n$ polarizada diretamente os portadores são injetados a partir dos lados dopados na região ativa. No caso ideal, os portadores devem termalizar na região ativa e recombinar para emitir fótons, conforme mostrado na figura 7.3. Contudo, com o aumento da temperatura, a distribuição de carga injetada deve ser maior para manter a mesma potência óptica de saída.. Isso porque há uma crescente fuga da carga através da

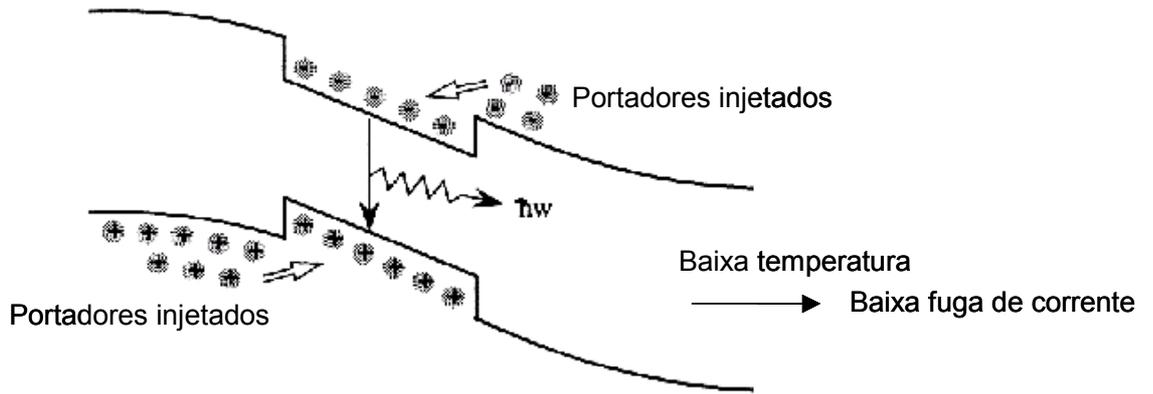


Figura 7.3. Esquema da injeção de portadores numa junção p-n em baixa temperatura.

região ativa, conforme ilustra a figura 7.4. A corrente de fuga não contribui para os processos de emissão, reduzindo a potência óptica.

Uma maior corrente elétrica de operação da junção leva a um incremento na injeção de portadores, provocando o aquecimento do dispositivo e, como resultado, o crescimento da fuga de corrente.

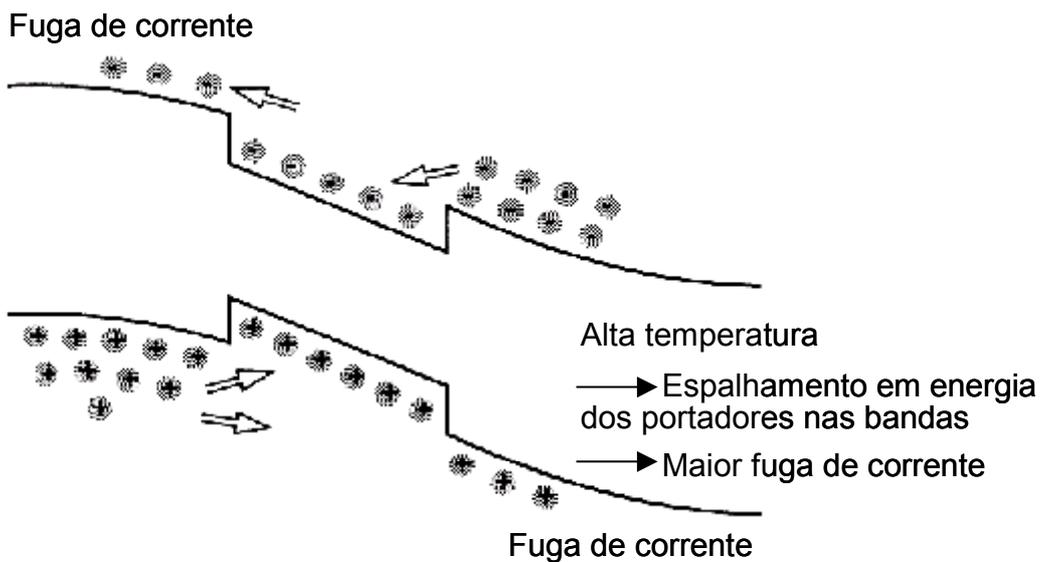


Figura 7.4. Sob altas temperaturas, devido ao espalhamento em energia dos portadores nas bandas de condução e de valência, há uma fração de fuga da carga, reduzindo a eficiência radiativa.

Assim para a operação do dispositivo necessita-se de uma unidade de controle de temperatura, esquematizada na figura 7.5 e constituída, no mínimo, das seguintes partes:

- sistema a ser controlado – elemento qual a temperatura influencia de maneira hostil as suas características e, neste caso, trata-se do laser de diodo semiconductor;
- sensor de temperatura – elemento sensível ou termistor seguido de um amplificador;
- atuador – sendo o seu principal dispositivo um Peltier que atua de modo a aumentar ou diminuir a temperatura do laser;
- controlador – bloco funcional que recebe como dado de entrada as informações do sensor de temperatura. Estas informações são processadas por uma função de transferência, originando um sinal de tensão que controla a corrente que alimenta o atuador (Peltier), possibilitando regular o funcionamento adequado do sistema;
- estágio de potência - é uma fonte de corrente controlada por tensão que fornece ao Peltier a potência necessária à sua operação.

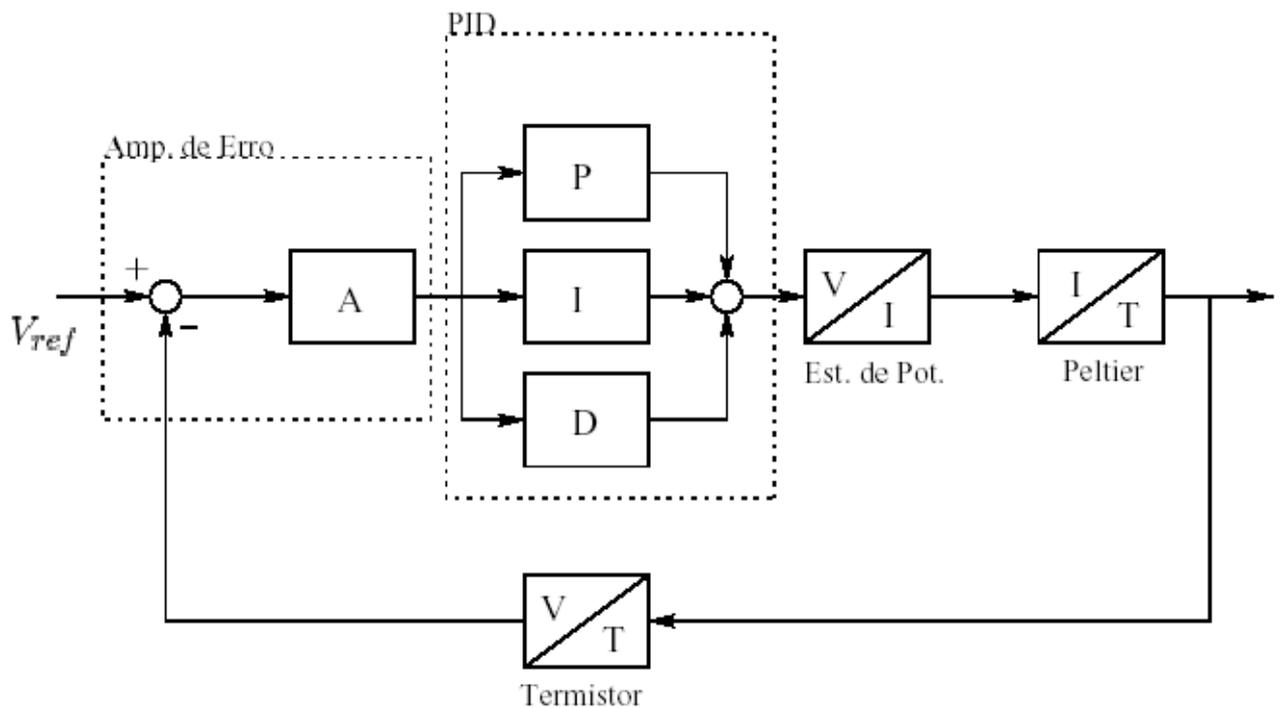


Figura 7.5. Planta do controlador de temperatura.

7.2.2. Planta de Controle

O termistor, feito de material semicondutor, possui uma resistência que varia em função da temperatura, com coeficiente de temperatura negativo (NTC – *negative temperature coefficient*). Neste caso, quanto maior a temperatura menor a resistência. O termistor recebe o sinal de saída (temperatura do elemento controlado), fornecendo um sinal de realimentação (V_{temp}) que será comparado ao valor de referência da entrada (V_{ref}). Na nossa montagem o termistor é o elemento sensor da temperatura do laser semicondutor. Ele converte este sinal de temperatura em um sinal de tensão que é comparado ao sinal de tensão de entrada (V_{ref}) possibilitando manter a temperatura na saída constante num intervalo aceitável de erro.

O Peltier é um trocador de calor do estado sólido constituída de duas faces entre as quais estão elementos semicondutores do tipo P e N, com conexão elétrica em série e térmica em paralelo. A figura 7.6 mostra as camadas N e P do Peltier. Nesta configuração, enquanto uma das faces aquece, a outra arrefece para uma corrente num dado sentido. Quando da mudança do sentido da corrente, invertem-se as capacidades de aquecimento e de arrefecimento entre as faces.

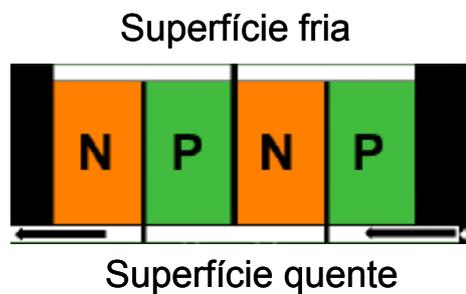


Figura 7.6. Camadas N e P do Peltier.

O Peltier utilizado suporta uma corrente de até 5A e atuou como um resfriador de temperatura do laser semicondutor. A figura 7.7, mostra à esquerda o sistema de resfriamento do laser semicondutor, tendo o Peltier sido inserido entre a superfície metálica onde está fixado o laser semicondutor e um reservatório de calor (massa maciça de alumínio), para possibilitar a transferência de calor entre estas duas faces. Nesta figura à direita é mostrado o Peltier em detalhe.

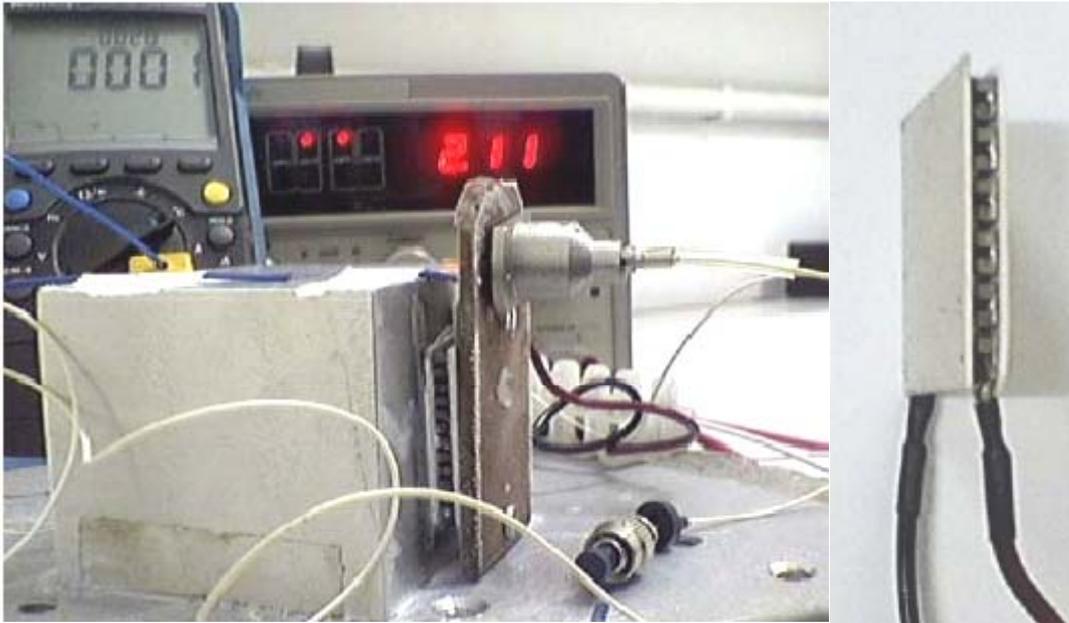


Figura 7.7. Sistema de resfriamento do laser semiconductor.

O sistema de controle utiliza uma função de transferência PID objetivando combinar as características dos seguintes efeitos: (i) de um controlador proporcional, reduzindo o tempo de subida e o erro de estado estacionário; (ii) de um controlador integral que elimina o erro em estado estacionário, mas pode piorar a resposta transiente; (iii) de um controlador derivativo que aumenta a estabilidade do sistema e melhora a resposta transiente. O esquema da planta de controle de temperatura está mostrado na figura 7.8.

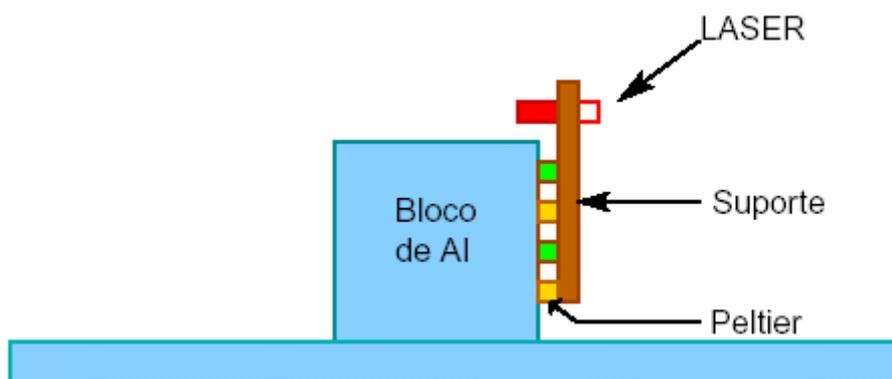


Figura. 7.8. Esquema da planta de controle de temperatura.

Por se tratar esta configuração de um modelo térmico, ela pode ser aproximada por uma função de transferência de primeira ordem do tipo dada na equação 7.2 (OGATA, 1985).

$$G = A \frac{1}{Ts + 1} \tag{7.2}$$

A resposta ao degrau unitário para este sistema é dados pela equação 7.3.

$$C(s) = A \frac{1}{Ts + 1} \cdot \frac{1}{s} \longrightarrow c(t) = A(1 - e^{-\frac{t}{T}}) \tag{7.3}$$

T é a constante de tempo em que o valor máximo decai de $\frac{1}{e}$.

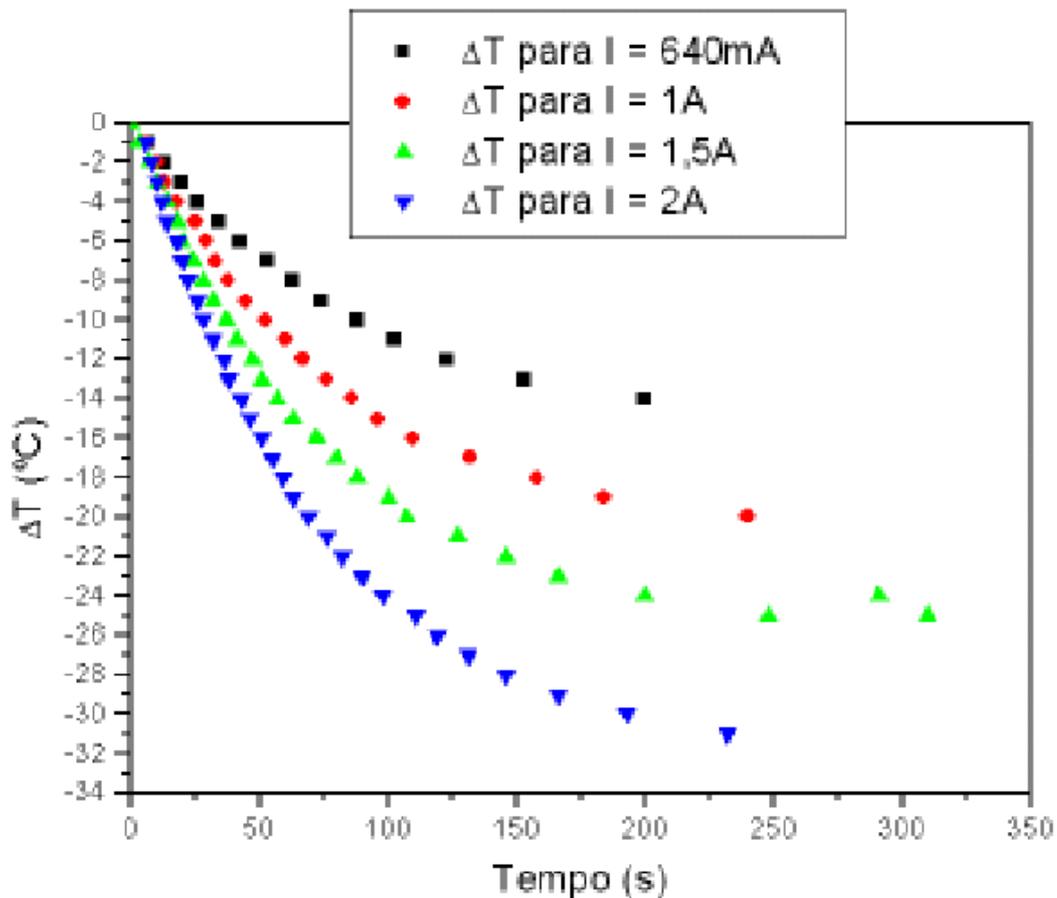


Figura 7.9. Temperatura em função do tempo para diversas correntes de entrada.

A metodologia empregada para a determinação da constante de tempo foi alimentar o Peltier com várias correntes (640 mA, 1A, 1.5A e 2A) e para cada uma delas amostrar os valores de temperatura em função do tempo. Para isso foi utilizado um multímetro digital possuindo um cronômetro e sensor de temperatura. Assim, para cada mudança de 1° C na temperatura anotou-se o tempo transcorrido. Seguindo este procedimento foram obtidas as curvas mostradas na figura 7.9. As constantes de tempo para 640 mA, 1A, 1.5A e 2A, foram, respectivamente, 68 s, 70 s, 69 s e 64 s. A constante A é a temperatura inicial do sistema e determinada pela temperatura ambiente em 25 °C.

Assim, pode-se controlar a temperatura do laser semiconductor.

7.3. Projeto da Instrumentação de Determinação da Eficiência Quântica

A instrumentação óptica da eficiência fotossintética de uma planta, esquematizada na figura 7.10, divide-se em uma fonte de luz de excitação (um conjunto de leds vermelhos de potência) e de um circuito de detecção da fluorescência emitida, constituindo-se das seguintes partes:

- filtro óptico: para separar a emissão de fluorescência do sinal retro-espalhado pela superfície da folha;

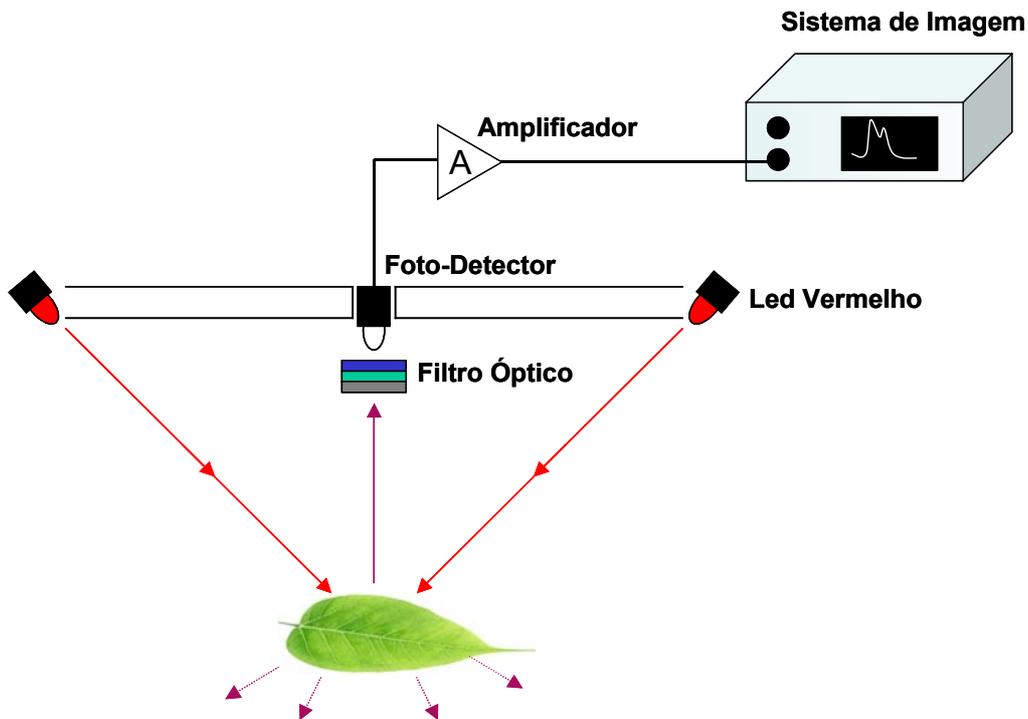


Figura 7.10. Sistema de detecção da eficiência quântica da planta devido à emissão de fluorescência.

- foto-detector: que fornecerá um sinal de tensão de saída em função da potência óptica incidente após o filtro;
- amplificador: responsável por uma amplificação de até 20 vezes no sinal vindo do detector;
- sistema detector de imagem: que utilizará uma placa A/D para permitir a visualização do sinal amplificado no vídeo de um computador.

7.3.1. Fonte de Luz

O equipamento em desenvolvimento usará um led de potência, modelo luxeon emitter LXHL-BD01 da Lumileds, mostrado na figura 7.11.



Figura 7.11. Led de potencia luxeon emitter.

O comprimento de onda central do led é de 638,9 nm e sua largura de banda de 20 nm, considerando uma redução de 50% da máxima potência de saída. O espectro do led, apresentado na figura 7.12, foi medido com a utilização de um OSA (Optical Spectrum Analyzer) marca Ando modelo AQ-6315A.

A curva do led foi ajustada por uma função lorentziana, dada pela equação 7.3.

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x - x_e)^2 + w^2} \quad 7.3$$

onde

$$y_0 = 0.857$$

$$w = 18.271$$

$$A = 599.5$$

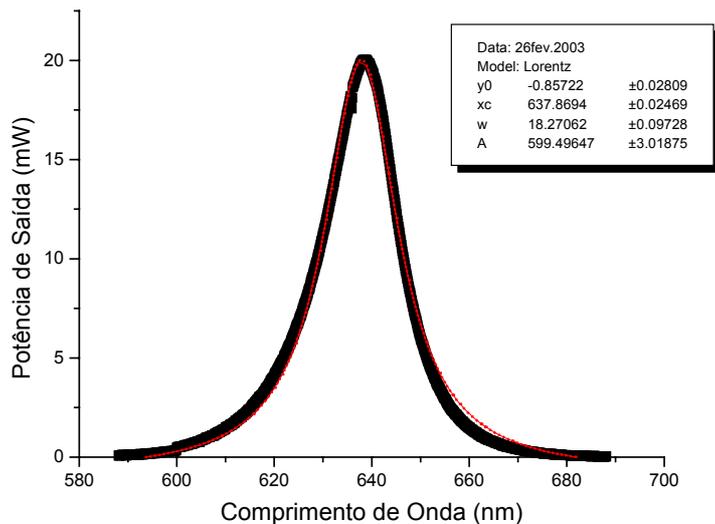


Figura 7.12. Espectro do led de potência mostrando a curva real e a curva ajustada (mais estreita) por uma função lorentziana.

Também foi avaliado o comportamento da potência do led em função da corrente de alimentação. A corrente de saturação, sem a utilização de dissipador térmico, ocorreu em 120 mA, correspondendo a uma potência de 20 mW, conforme os pontos obtidos na figura 7.13 pela leitura no medidor de potência óptica.

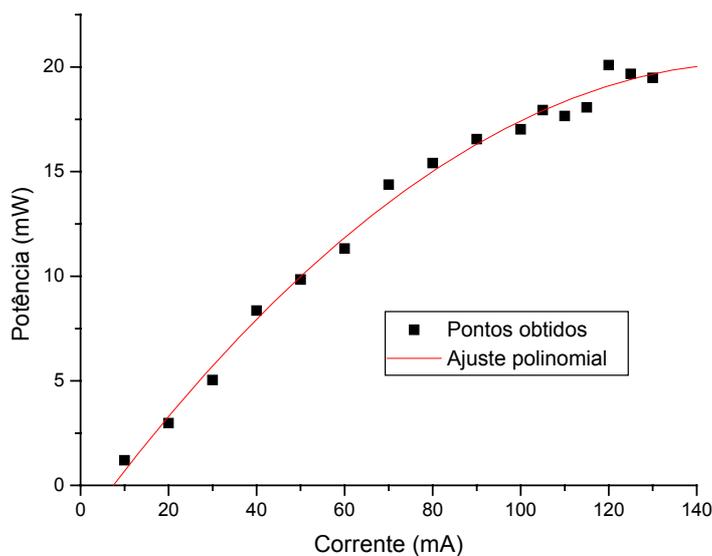


Figura 7.13. Potência óptica de emissão do led em função da corrente e o ajuste polinomial.

7.3.2. Circuito de Detecção e Amplificação

Como pode-se observar nos espectros obtidos no Capítulo 6 – Espectroscopia da Fluorescência, o primeiro máximo da curva de fluorescência ocorre em torno de 690 nm, enquanto o segundo máximo por volta de 740 nm. O filtro de comprimento de onda deverá ter as características do modelo FSR - RG 715 da Newport, sendo do tipo passa alta. A figura 7.14, mostra o comportamento de vários filtros onde se vê o comportamento do filtro escolhido (FSR – Rg 715), com comprimento de onda de corte inferior em 715 nm.

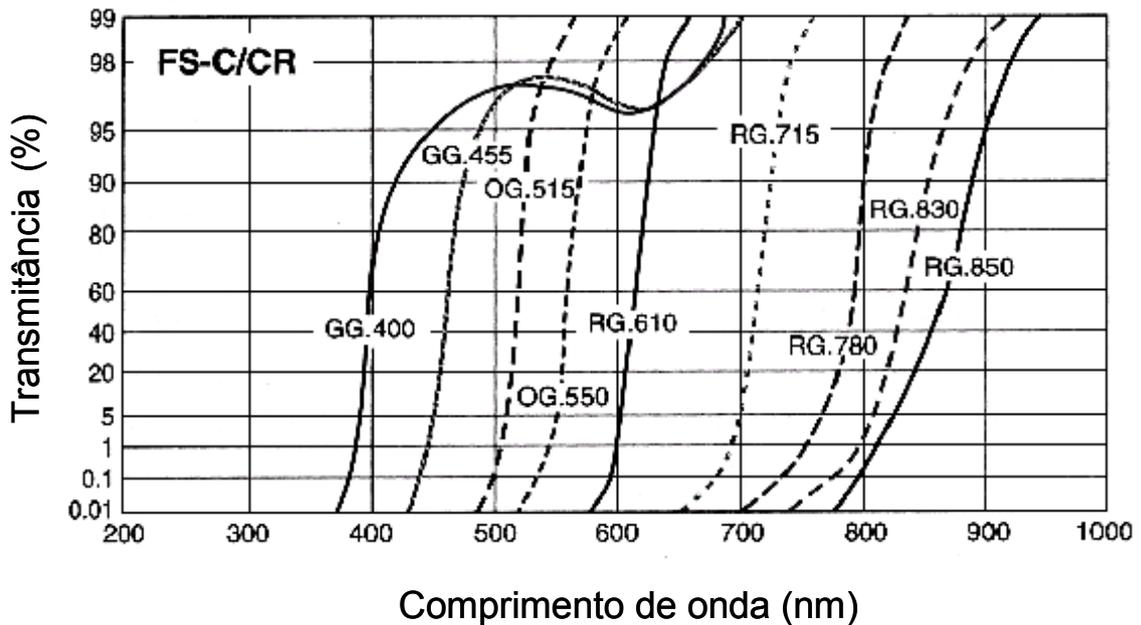


Figura 7.14. Espectros de filtros de comprimento de onda.

O foto-detector deverá ser um fotodiodo PIN de grande área efetiva, 10 x 10 mm, com resposta espectral na faixa de 320 a 1100 nm. A função deste dispositivo é detectar o sinal óptico da fluorescência e transforma-lo num sinal elétrico de tensão ou de corrente. A figura 7.11 mostra a resposta espectral do fotodetector escolhido, modelo S5107 da Hamamatsu.

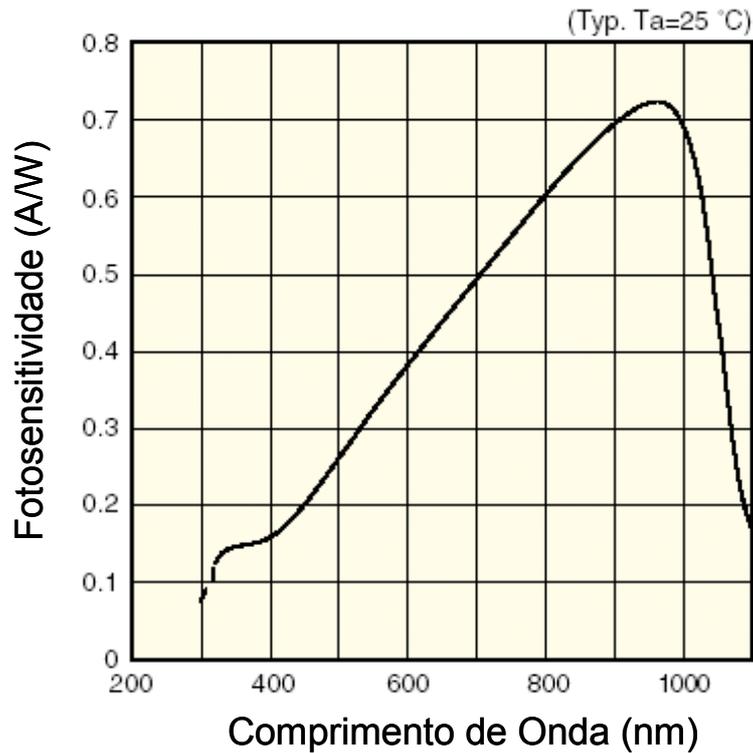


Figura 7.11. Resposta espectral do fotodetector.

No detector Pin não há ganho na conversão do sinal, de modo que torna-se necessário a inserção de um circuito amplificador logo após o detector. Como os fótons absorvidos pelo fotodetector são partículas discretas, existem flutuações no número de partículas incidindo neste dispositivo. Este ruído, denominado de ruído balístico, tem como resultado um ruído na corrente de saída do fotodetector. Uma outra fonte de ruído produzida pelos circuitos receptores de amplificação é o chamado ruído térmico. Este ruído torna-se considerável quando a corrente e saída do fotodetector flui através de um resistor para prover a amplificação do sinal.

Assim, torna-se fundamental a confecção de um circuito amplificador que possibilite alto ganho e baixo ruído. O circuito de amplificador, mostrado na figura 7.12, foi desenvolvido para atender a estes requisitos e proporciona um ganho de 20 vezes o sinal de tensão provido pelo fotodetector.

$$Ganho = 20 \frac{R_s}{R_G}$$

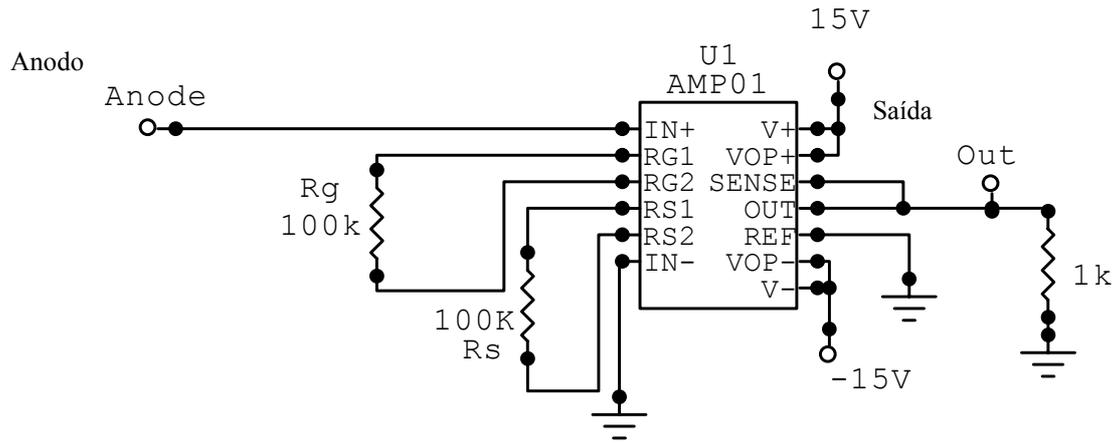


Figura 7.12. Circuito amplificador do sinal de tensão do fotodetector.

7.4. Bibliografia do Capítulo 7

OGATA, **Engenharia de Controle Moderno**, Rio de Janeiro, Prentice-Hall do Brasil, 1985.

SILVA, WELSON SIQUEIRA. **Espectrômetro de Alta Resolução com Laser de Diodo**. 2001. 90 f. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Elétrica) – Departamento de Engenharia Elétrica e Sistemas de Potência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SINGH, JASPRIT (1995). **Semiconductor Optoelectronics Physics and Technology**. MacGraw-Hill, Inc. New York.

Capítulo 8 – Considerações Finais

8. Conclusões

8.1 Introdução

A motivação deste trabalho advém do efeito multiplicador da produção de grãos na última década, impulsionado pela biotecnologia brasileira, associada à mecanização moderna. Isso que propiciou um elevado crescimento do agronegócio brasileiro. A próxima etapa deste ciclo de desenvolvimento está na agricultura de precisão, pelo uso de instrumentação para análise no campo, em tempo real, do estresse hídrico ou déficit de minerais e a possibilidade de acoplar modernos sistemas de telecomunicações para transmissão dos dados.

A pesquisa dos processos físico-químicos envolvidos na fotossíntese envolve áreas multidisciplinares tais como fisiologia vegetal, física e química quânticas, bioquímica e óptica. Motivados pela possibilidade da implementação de um instrumental optoeletrônico para medição da eficiência quântica da fotossíntese, esta dissertação aborda, teórica e experimentalmente, estas diversas áreas envolvidas, sendo a base para o desenvolvimento de inúmeros outros trabalhos.

8.2. Desenvolvimento do Trabalho

O trabalho iniciou-se em abril de 2002, com a adequação do módulo de controle de corrente e de temperatura para um laser semiconductor, utilizado por Silva (2001). Simultaneamente, foram feitos os primeiros contactos com os professores Everardo Sampaio, especialista em fotossíntese do Departamento de Engenharia Nuclear da UFPE, e Rejane Mansur, especialista em fisiologia vegetal da UFRPE, objetivando a compreensão dos processos biológicos das plantas verdes, assim como as técnicas e procedimentos utilizados em pesquisa nesta área, além do conhecimento da instrumentação em uso corrente. Em seguida, contactamos o professor Luiz Carvalho do LIKA e o professor Diogo Simões do Departamento de Bioquímica da UFPE, para o entendimento dos aspectos bioquímicos do transporte fotossintético de elétrons.

Numa segunda etapa, foi realizada uma experiência de campo, na fazenda da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas – MG, para estimação da eficiência quântica da fotossíntese de duas linhagens de milho sob alto e baixo teor de nitrogênio utilizando o PEA (Plant Efficiency Analyzer), um fluorímetro da Hansatech Instruments Co. Este trabalho de campo, em que tivemos apoio do doutorando em agronomia Rogério Machado

da Unesp, e supervisão do pesquisador Paulo César, da Embrapa, durou cerca de 40 dias, desde a semeadura à obtenção dos dados, e propiciou-nos uma experiência prática do manuseio de uma cultura vegetal que foi submetida à análise por meio de instrumentação óptica.

Neste período em Minas Gerais, estivemos no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde pudemos conhecer em maiores detalhes as possibilidades da utilização do MINI-PAM (Pulse Amplitude Modulation), um fluorímetro da Walz que realiza as medições da eficiência quântica da fotossíntese sob a incidência da luz solar, sem a necessidade da adaptação ao escuro do tecido foliar. Também estivemos no Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, onde obtivemos uma considerável literatura acerca da fluorescência.

Finalmente, estivemos no Instituto de Física da USP-São Carlos para avaliarmos mudanças no espectro de fluorescência de folhas de uma cultura de milho submetida a condições de estresse hídrico quando comparada a folhas da planta irrigada. Também fizemos esta comparação entre as folhas da planta irrigada e folhas cortadas. Aproveitando a proximidade, estivemos ainda no Instituto de Química da UFRJ, onde o professor Ricardo Chaloube pesquisa a fluorescência de algas.

8.3. Conclusões

Reunimos neste trabalho uma sólida literatura como elo de ligação entre a biologia, a físico-química e à fotônica. Além do embasamento teórico, também realizamos atividades experimentais: a estimativa da eficiência quântica da fotossíntese utilizando o fluorímetro PEA e a obtenção das curvas de espectroscopia de culturas de milho submetidas, respectivamente, ao alto/baixo teor de nitrogênio e ao estresse hídrico.

Mostramos que os valores medidos da eficiência quântica pelo PEA estavam de acordo com a previsão teórica e que também é possível determinarmos o estresse hídrico pela análise das curvas de espectroscopia de fluorescência das folhas de milho.

Um outro resultado muito importante foi o desenvolvimento deste trabalho em equipe, dada a interdisciplinariedade de temas e atividades a serem desenvolvidas. Contamos com a participação efetiva de alunos de graduação de engenharia eletrônica, como também com o apoio de professores e pesquisadores de outras universidades e centros de pesquisa em Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Assim, abrimos caminho para a continuidade desta dissertação por outros alunos de mestrado

ou de doutorado. Também propiciamos a possibilidade de integração com as outras áreas afins, anteriormente mencionadas.

8.4. Perspectivas

Esta dissertação não encerra o tema, muito pelo contrário abre inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de outras dissertações de mestrado e teses de doutorado. A pesquisa da fotossíntese iniciada desde 1776 até hoje ainda não conseguiu esclarecer totalmente este processo de absorção e de conversão de energia fotoquímica. Como a realização da fotossíntese envolve a captação de CO₂ e a liberação de O₂, afetando a composição atmosférica, o seu entendimento é essencial para a compreensão do ciclo do CO₂ e outros gases, que causam o efeito estufa, modificando o clima global do planeta.

Os segredos da absorção de energia pelas plantas podem propiciar um aproveitamento mais eficiente da coleta e armazenamento da energia solar para geração de energia. Além disso, o esclarecimento dos mecanismos de proteção da planta à excessiva radiação solar pode beneficiar áreas como a medicina quanto ao tratamento e prevenção do câncer de pele.

Como a luz tem um papel vital, por ser a energia que conduz a realização da fotossíntese, a pesquisa em óptica e fotônica será um processo chave para desvendar estas incógnitas.

Como sugestões de trabalhos futuros podemos propor:

1. conclusão da instrumentação para detecção óptica síncrona da eficiência quântica da fotossíntese;
2. avaliação do estresse hídrico e do déficit de nutrientes pela comparação dos resultados obtidos, simultaneamente, pela estimação da eficiência quântica e pela obtenção do espectro de fluorescência utilizando excitação de luz nas regiões próximas de 450 nm, 550 nm e 650 nm;
3. avaliação do estresse hídrico e do déficit de nutrientes pela comparação dos resultados obtidos, simultaneamente, pela estimação da eficiência quântica e pela obtenção do espectro de fluorescência utilizando excitação de luz nas regiões próximas de 450 nm, 550 nm e 650 nm;

4. comparação entre as excitações por fontes a laser e a led numa cultura vegetal;
5. análise da espectroscopia molecular da molécula de clorofila, abordando a transferência de energia da antena aos centros de reação e os processos de conversão de energia fotoquímica, tendo em vista a concepção de novos modelos para esta molécula no centro de reação;
6. desenvolvimento de um espectrômetro para obtenção da fluorescência da fotossíntese.

Artigos Submetidos a Eventos

DUARTE C.H., LINS C.E., NUNES F.D., MACHADO R.A., MARCASSA L.G.,
Fluorescence of Maize Under Nutrient and Water Stress, Submitted to **IMOC 2003**.

ANEXO

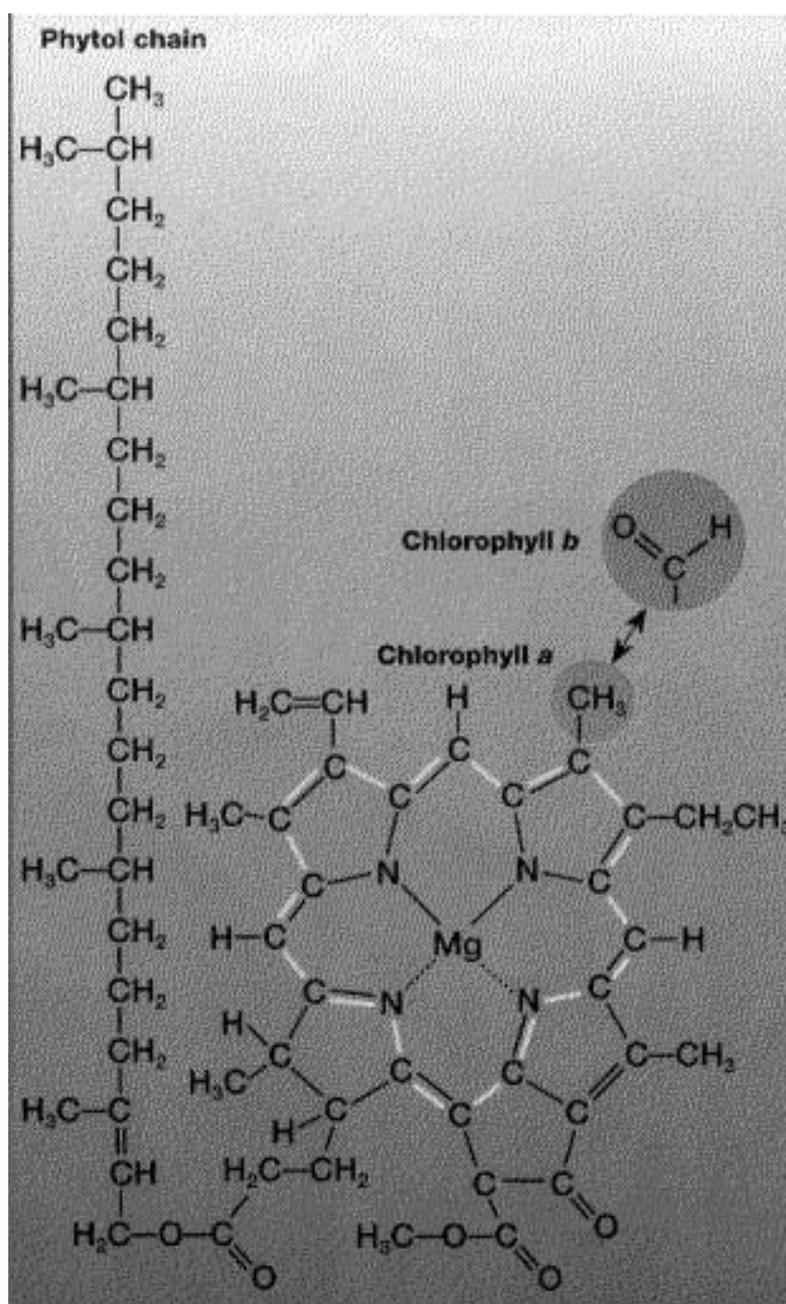


Figura A.1. Clorofilas *a* e *b*.

Ambas as clorofilas absorvem luz maximamente na regiões vermelha e violeta do espectro. Luz verde é fracamente absorvida. Assim, quando luz branca incide numa estrutura contendo clorofila, tal como nas folhas verdes, a luz verde é transmitida e refletida fazendo com que a estrutura se pareça verde.

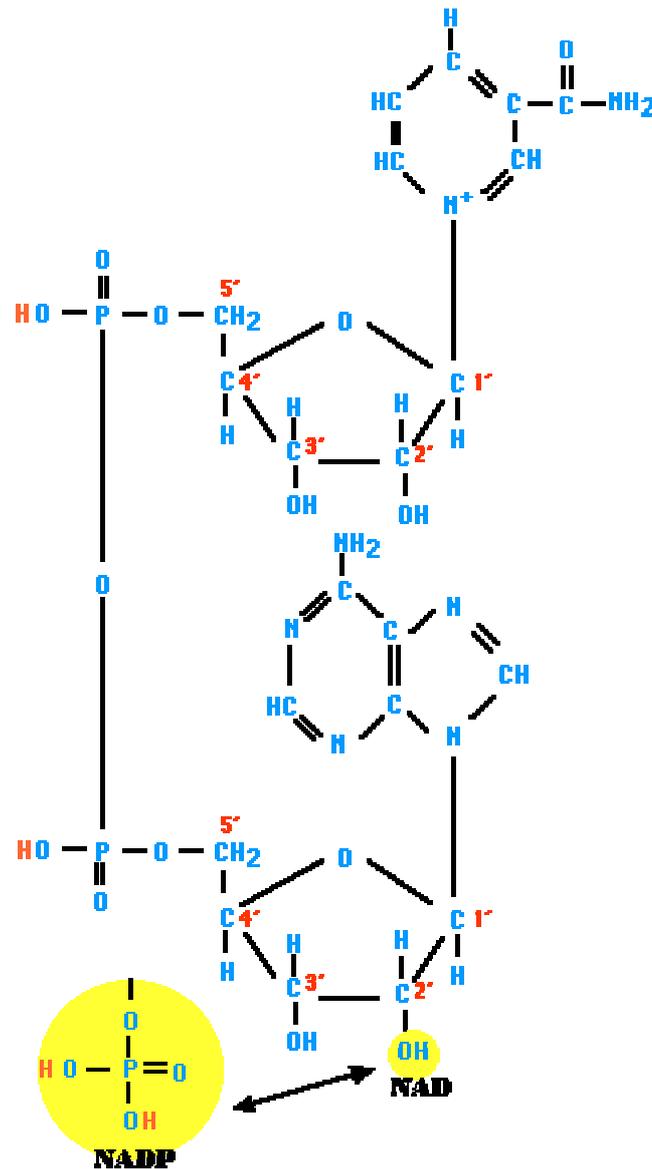


Figura A.2. Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato.

Nas células, a maioria das oxidações são acompanhadas pela remoção de átomos de hidrogênio. Cada molécula de NADP^+ pode adquirir dois elétrons, ou seja, pode ser reduzida por dois elétrons. Entretanto, somente um próton acompanha a redução. O outro próton produzido, quando dois átomos de hidrogênio são removidos da molécula de água, é liberado no meio.

Energia Média de Ligação kcal/mole	
C-H	98
O-H	110
C-C	80
C-O	78
H-H	103
C-N	65
O=O	116 (2 x 58)
C=O	187* (2 x 93.5)
C=C	145 (2 x 72.5)
(*Como no CO ₂)	

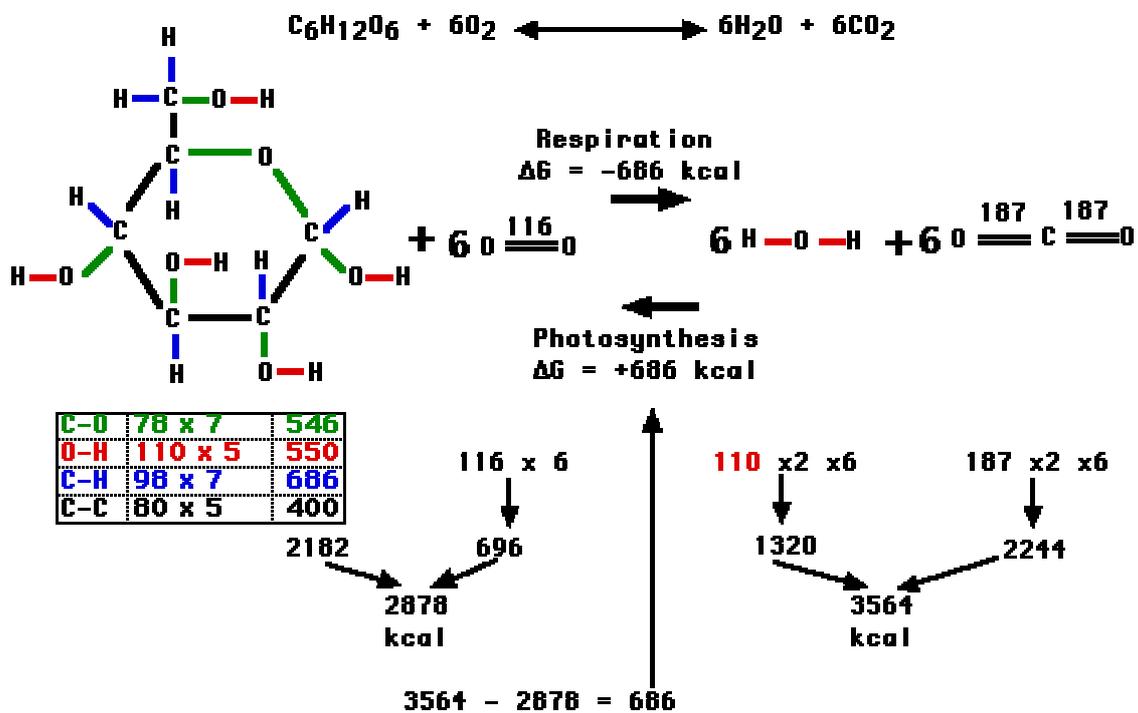


Figura A.3. A fotossíntese de um mol de glicose requer a entrada de 686 kcal de energia.

(<http://users.rcn.com/~jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/B/BalanceSheet.html>. Acesso em: 27 dez. 2002.)