

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA**

**TÉCNICAS ÓPTICAS PARA A ANÁLISE DA MANI-
FESTAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO EM LARANJEI-
RAS**

por

EMERY CLEITON CABRAL CORREIA LINS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

ORIENTADOR: FREDERICO DIAS NUNES, Doutor

Recife, Setembro de 2005.

© Emery Cleiton Cabral Correia Lins, 2005

Lins, Emery Cleiton Cabral Correia

Técnicas ópticas para a análise da manifestação do estresse hídrico em laranjeiras / Emery Cleiton Cabral Correia Lins. – Recife : O Autor, 2005.

viii, 102 folhas. : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Engenharia Elétrica, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia elétrica – Fotônica – Análise em sinais biológicos. 2. Estresse hídrico em laranjeiras – Espectroscopia e imagem de fluorescência . 3. Estresse hídrico – Alterações na fluorescência. I. Título.

621.3
621.361

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-012



Universidade Federal de Pernambuco

Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO DE Mestrado Acadêmico de


EMERY CLEITON CABRAL CORREIA LINS


TÍTULO

“TÉCNICAS ÓPTICAS PARA ANÁLISE DA MANIFESTAÇÃO DO
ESTRESSE HÍDRICO EM LARANJEIRAS”

A comissão examinadora composta pelos professores:
FREDERICO DIAS NUNES, DES/UFPE, JOAQUIM FERREIRA MARTINS
FILHO, DES/UFPE e LUIZ GUSTAVO MARCASSA, IFSC/USP, sob a
presidência do prof. Joaquim Ferreira Martins Filho, Coordenador do Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, consideram o candidato **EMERY
CLEITON CABRAL CORREIA LINS APROVADO.**

Recife, 22 de setembro de 2005.


JOAQUIM FERREIRA MARTINS FILHO
Coordenador do PPGEE
Membro Titular Interno


FREDERICO DIAS NUNES
Orientador e Membro Titular Interno


LUIZ GUSTAVO MARCASSA
Membro Titular Externo

Dedico este trabalho, que representa todo o meu esforço e perseverança, aos meus pais, por participarem dessa jornada contribuindo para a minha formação intelectual e motivando-me para nunca desistir de um objetivo.

Audaces fortuna juvat, "A sorte ajuda os audazes" (Virgílio, Eneida, Livro X, 284).

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a DEUS, por me dar condições de desejar e batalhar por meus objetivos, além da minha motivação interior para não desistir de uma tarefa, mesmo que as dificuldades queiram provar o contrário.

Aos meus pais Itanajar A. C. Lins e M^o José C.C. Lins, que ofereceram aos filhos uma educação inquestionável em troca de seus esforços físicos e mentais durante boa parte das suas vidas.

A minha esposa Juliana L. S. V. C. de Oliveira, que nas horas de dificuldade teve complacência suficiente para entender e apoiar minhas decisões, acreditar no meu potencial e me ajudar das mais diversas formas para que meu trabalho pudesse continuar.

Ao meu filho Ian V. C. Lins, que mesmo inconscientemente contribuiu dando-me força e alegria em dias difíceis.

Aos demais familiares, em especial aos meus irmãos Eric A. C. C. Lins e Ellen Taiza C. C. Lins, pela força e apoio.

A CAPES, que me proveu o suporte financeiro durante o curso. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e ao Grupo de Fotônica pelo suporte para realizar as atividades experimentais.

Ao professor Frederico Dias Nunes, que me ajudou e orientou durante todo este trabalho.

Aos professores, amigos e colegas do Laboratório de Fotônica da UFPE e do DES/UFPE, em especial aos professores Eduardo Fontana e Joaquim M. Filho e aos amigos André Leite, Carmelo Bastos, Eric Arantes e Sérgio Campelo, pela cooperação e compartilhamento de informações, bem como a companhia e hombridade.

Aos professores Luis G. Marcassa e Vanderlei S. Bagnato do IFSC/SP por cederem o espaço físico e os equipamentos necessários para medir os experimentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biofotônica do IFSC/SP, em especial aos amigos Augusto C. Figueiredo e Fernando Florez, pela cooperação, motivação, companheirismo e hombridade; tenho certeza que sem companheiros do seu lado a tarefa se torna bem difícil.

Aos demais amigos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho. Agradeço a todos, por tudo!

Resumo da Dissertação apresentada à UFPE como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

TÉCNICAS ÓPTICAS PARA A ANÁLISE DA MANIFESTAÇÃO DO ESTRESSE HÍDRICO EM LARANJEIRAS

Emery Cleiton Cabral Correia Lins

Setembro/2005

Orientador: Frederico Dias Nunes, Doutor.

Área de Concentração: Fotônica.

Palavras-chave: Estresse hídrico, espectroscopia de fluorescência, imagens de fluorescência, clorofila, fotossíntese, quimiometria, razão de fluorescência.

Número de Páginas: 109.

RESUMO: Devido ao rendimento do agronegócio e à produção Brasileira de laranja para suco ser a maior do mundo, tornou-se necessário desenvolver técnicas capazes de detectar o desempenho das laranjeiras e o efeito dos problemas ambientais sobre elas. Neste trabalho foram avaliadas técnicas para detectar o déficit hídrico em laranjeiras através da fluorescência emitida por suas folhas. Foram propostas três análises:

- Espectroscopia de fluorescência através da figura de mérito de *razões de fluorescência*.
- Gradiente da intensidade da fluorescência através de imagens da fluorescência da folha.
- Técnica quimiometria aplicada aos espectros da fluorescência.

Os resultados da primeira proposta mostraram que algumas razões de fluorescência, naquelas condições experimentais, distinguiram as laranjeiras sem e com o estresse hídrico. A análise das imagens mostra que essa técnica foi capaz de caracterizar o estresse hídrico em diferentes regiões de uma folha, porém erros experimentais no estágio do uso da técnica impossibilitaram a comparação entre duas laranjeiras. Finalizando, os resultados da quimiometria mostraram ser possível distinguir amostras com e sem o déficit hídrico. As conclusões foram que usando a fluorescência é possível detectar o déficit hídrico através das técnicas propostas. Que os estudos devem continuar para identificar a influência de outros fatores ambientais, e que o modelo de estresse adotado era limitado por não prever o estresse de minerais.

Abstract of Dissertation presented to UFPE as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Electrical Engineering.

OPTICAL TECHNIQUES TO THE ANALYSIS OF THE HIDRIC STRESS MANIFESTATION IN ORANGE TREES

Emery Cleiton Cabral Correia Lins

September /2005

Supervisor(s): Frederico Dias Nunes, Doctor

Area of Concentration: Photonics.

Keywords: Spectroscopy, Fluorescence Spectroscopy, Image Processing, Chemometrics.

Number of Pages: 109.

ABSTRACT: Due the agribusiness's yield and the Brazilian's orange for juice production be the greater in world, one became necessary to develop techniques capable to detect the orange trees performance and the effects of environmental troubles on them. In this thesis techniques to detect the water stress in orange trees through the fluorescence emitted by your leaves were evaluated. Three analyses were proposed:

- Fluorescence spectroscopy through the merit figure of the fluorescence ratios.
- The fluorescence intensity gradient through the leaf fluorescence imaging.
- Chemometrics technique applied on the fluorescence spectrum.

The results of the first propose showed that some fluorescence ratios, in those experimental conditions, they distinguished the orange trees with and without water stress. The analysis of the images shows that this technique was capable to characterize the water stress at distinguishes regions of one leaf, however experimental errors in the procedure of use of this technique made impossible the comparison between two orange trees. Finally, the chemometrics results showed to be possible distinguish the sample with and without water deficit. The conclusions were that is possible to detect the water deficit using the fluorescence through the techniques proposed. The studies should continue for identify the influence of others environmental factors, and that the stress model was limited because it do not prevent the mineral stress.

SUMÁRIO

1. O PROBLEMA: A NECESSIDADE DE DETECTAR DEFICIÊNCIAS MINERAIS NAS CULTURAS AGRÍCOLAS	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 O OBJETIVO DA PESQUISA	1
1.3 O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	2
1.4 RESUMO DOS CAPÍTULOS	2
2. FOTOSSÍNTESE	5
2.1 INTRODUÇÃO	5
2.2 CARACTERÍSTICAS DA FOTOSSÍNTESE	5
2.3 AS REAÇÕES DA FOTOSSÍNTESE	11
2.4 A INFLUÊNCIA DO ESTRESSE HÍDRICO NA FOTOSSÍNTESE	16
3. TEORIA DA FLUORESCÊNCIA	19
3.1 INTRODUÇÃO	19
3.2 HISTÓRICO DA TEORIA QUÂNTICA	19
3.3 ABSORÇÃO, EMISSÃO E TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA PELA MATÉRIA	20
3.4 ENERGIAS ROTACIONAL E VIBRACIONAL	23
3.5 FLUORESCÊNCIA E FOSFORESCÊNCIA	25
3.6 A FLUORESCÊNCIA DOS PIGMENTOS DAS FOLHAS	29
4. PLANTAS AMOSTRAIS E O SEU MEIO AMBIENTE	34
4.1 INTRODUÇÃO	34
4.2 A CULTURA PESQUISADA	34
4.3 A IDADE DAS PLANTAS	35
4.4 MODELOS DOP ESTRESSE HÍDRICO ADOTADO NA PESQUISA	36
4.5 O MEIO AMBIENTE DAS MEDIÇÕES	37
4.6 LUMINOSIDADE, TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA	39
5. FERRAMENTAS DE ANÁLISE	40
5.1 INTRODUÇÃO	40
5.2 A ESPECTROSCOPIA DA FLUORESCÊNCIA DA FOLHA	40
5.3 RAZÕES DE FLUORESCÊNCIA	43
5.4 IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA	48
5.5 QUIMIOMETRIA APLICADA AOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA	51

6. EQUIPAMENTOS E TÉCNICA DA MEDIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA	60
6.1 INTRODUÇÃO	60
6.2 ESPECTROSCOPIA PONTUAL	60
6.3 IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA	68
7. RESULTADOS	73
7.1 INTRODUÇÃO	73
7.2 PRIMEIRO EXPERIMENTO – EXCESSO DE LUZ	73
7.3 SEGUNDO EXPERIMENTO – DETECÇÃO DO ESTRESSE	75
7.4 TERCEIRO EXPERIMENTO – REPETIÇÃO DOS RESULTADOS E APLICAÇÃO DA QUIMIO- METRIA	86
8. CONCLUSÕES, TRABALHOS FUTUROS E RESULTADOS PUBLICADOS ...	95
8.1 INTRODUÇÃO	95
8.2 SOBRE O USO DOS ESPECTROS E DAS RAZÕES DE FLUORESCÊNCIA NA IDENTIFICAÇÃO DO DÉFICIT HÍDRICO	95
8.3 SOBRE AS IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA	96
8.4 SOBRE A APLICAÇÃO DA QUIMIOMETRIA NOS ESPECTROS DA FLUORESCÊNCIA EMITI- DA	97
8.5 TRABALHOS FUTUROS	97
8.6 RESULTADOS PUBLICADOS	98
REFERÊNCIAS	99

1. O PROBLEMA: A NECESSIDADE DE DETECTAR DEFICIÊNCIAS MINERAIS NAS CULTURAS AGRÍCOLAS

1.1 Introdução

Atualmente o agronegócio tem sido um dos principais setores produtivos de alguns países, inclusive do Brasil; enquanto a concorrência do mercado de produtos manufaturados aumenta cada dia, alguns países dependem da sua forte tendência à produção agrícola para enriquecer.

Produzir alimentos para o mercado internacional torna-se mais e mais interessante, pois certamente essa é uma fonte de renda importante já que manter uma produtividade alimentícia alta e de qualidade atrai indústrias que visam o mercado externo. Nesse contexto, alguns países investem na tecnologia aplicada ao agronegócio para desenvolver ainda mais a sua produção.

Dentre os principais mercados do agronegócio está o da produção de laranjas, que fornece a fruta para consumo *in natura* e para as indústrias de suco de laranja. Atualmente o Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de laranja, sendo os EUA os maiores produtores de laranja *in natura* e o Brasil o maior produtor de laranja para suco.

Em 2004 a produção desses países juntos representou cerca de 40% da produção mundial de laranja, ou seja, 3,2 milhões de toneladas. Para o Brasil a laranja é ainda mais importante, porque ele exporta cerca de 1,1 milhões de toneladas [40]. Daí a importância da produção de laranjas para os dois países que buscam a cada ano incrementar ainda mais sua produção.

Combater as doenças cítricas e detectar os fatores ambientais que influenciam a produção agrícola é uma das formas de melhorar a produção das culturas, vindo daí a necessidade de se detectar as deficiências das laranjeiras, para saber se estão submetidas a algum tipo de estresse que possa influenciar a produção agrícola.

1.2 O Objetivo da pesquisa

O estresse hídrico é um dos principais fatores ambientais de agressão à produção agrícola. A água é um dos principais componentes para a fotossíntese por ser o principal fornecedor de prótons e elétrons para essa reação. A falta de água traz diversos problemas fisiológicos para as plantas, que culminam por secar suas folhas e provocar a sua falência funcional.

Por isso diagnosticar a falta de água nas laranjeiras antes que a planta manifeste qualquer problema dá a oportunidade de que um tratamento preventivo seja realizado para garantir a eficiência fisiológica da laranjeira.

Entre as técnicas disponíveis para um acompanhamento da saúde da planta, a fluorescência emitida pela folha é uma boa ferramenta para detectar o estresse hídrico e outros problemas. Ela é uma técnica não invasiva nem destrutiva das amostras e, além disso, a fluorescência emitida pela folha depende unicamente da concentração de pigmentos presentes na folha. Como o estresse hídrico provoca alterações no estado fisiológico da laranjeira, irá alterar a emissão da fluorescência.

Pelas razões acima anunciadas, o objetivo proposto para este trabalho foi o de aplicar algumas técnicas à fluorescência emitida pelas folhas das laranjeiras para diferenciar plantas sem e com um déficit hídrico. As técnicas envolvem teorias a respeito da fisiologia das folhas, mas o objetivo deste trabalho não inclui a descrição precisa dos acontecimentos fisiológicos da laranjeira, concentra-se na aplicação da fluorescência como um método de análise.

1.3 O desenvolvimento da pesquisa

O trabalho foi desenvolvido por pesquisadores do Departamento de Eletrônica e Sistemas da Universidade Federal de Pernambuco em cooperação dos pesquisadores do Instituto de Física de São Carlos - IFSC. Os experimentos foram todos realizados em São Carlos porque os laboratórios do IFSC dispunham do equipamento necessário para realizar os experimentos.

1.4 Resumo dos capítulos

Este trabalho possui oito capítulos que discorrem sobre a necessidade de detectar o estresse hídrico nas laranjeiras abordando temas como: a metodologia da medição, equipamento a utilizar, condições em que as laranjeiras devem se encontrar para fazer a medição, que modelos de estresse devem ser utilizados, resultados e conclusões.

Este, que é o primeiro capítulo, fala sobre a importância da produção de laranjas para o Brasil e sobre a necessidade de se fazer análises em laranjeiras, sendo este trabalho focado no estresse hídrico por ser um dos fatores ambientais importantes e que podem reduzir a produção de laranjas. Os estresses ocorrem por causa de um déficit mineral na planta que influencia diretamente sua fotossíntese.

O segundo capítulo discorre sobre a fotossíntese. Ele trata das principais características dessa reação que é importantíssima para as plantas, porque produz os açúcares que a planta necessita, para o seu desenvolvimento e a geração de biomassa, além disso, ela é de uma importância vital para a vida humana por produzir oxigênio.

No capítulo 2 ainda são vistos quais os agentes e os produtos que fazem parte da fotossíntese, em que locais da planta eles são produzidos e armazenados e quais são as principais moléculas envolvidas na fotossíntese. Para entender da fotossíntese, o capítulo apresenta a estrutura física da folha e

dos seus componentes. Finalizando, este capítulo aborda sobre as conseqüências da falta de água na planta.

O terceiro capítulo trata da teoria quântica e sua aplicação na explicação dos principais fenômenos da fotossíntese, a saber: a absorção e a transferência de energia por parte dos pigmentos que compõem a estrutura da planta. Este capítulo ainda apresenta as principais formas de dissipação de energia da estrutura molecular, e entre elas a fluorescência, esta será a ferramenta utilizada para diferenciar laranjeiras sem e com déficit hídrico.

Esse capítulo finaliza apresentando as características dos principais pigmentos envolvidos no processo de transferência de energia da fotossíntese, inclusive o seu espectro absorção e de fluorescência.

O quarto capítulo apresenta as características das amostras que sofreram o estresse e do seu meio ambiente. É abordada a espécie de laranja utilizada, a idade das plantas escolhidas, os modelos de estresse hídrico que serão adotados no trabalho e o ambiente em que as laranjeiras estavam alocadas. Por fim comenta-se sobre a influência da luminosidade, temperatura e umidade relativa nas medições.

O quinto capítulo mostra as ferramentas adotadas para a detecção do estresse hídrico. Inicialmente é apresentado de que forma a análise dos espectros da fluorescência emitida pode diferenciar uma laranjeira sem de uma com déficit hídrico. Neste capítulo também se comenta sobre a dependência do espectro de emissão com a excitação usada. Em seguida são apresentadas as razões de fluorescência, as quais relacionam a fluorescência emitida em regiões distintas do espectro eletromagnético.

Depois das razões da fluorescência, este capítulo apresenta as imagens de folhas a partir da fluorescência, emitida por elas em uma determinada região do espectro. Neste trabalho a região escolhida foi entre 650 e 800 nm porque é nesta região que as laranjeiras fluorescem usando qualquer uma das fontes de excitação. As imagens de fluorescência são importantes para observar o gradiente da emissão numa área da ordem da superfície da folha.

Finalizando, o quinto capítulo apresenta a quimiometria. Ela é uma técnica que usa conhecimentos estatísticos para buscar correlações entre os espectros com características semelhantes. A quimiometria será aplicada aos espectros de fluorescência medidos dos grupos sob estresse e fora do estresse hídrico para diferenciá-los.

O sexto capítulo trata dos equipamentos utilizados para medir o espectro e as imagens de fluorescência. Ele aborda a teoria de amostragem do espectro de fluorescência desde a teoria óptica aplicada à eletrônica necessária para a detecção; ele também trata das qualificações e das limitações do equipamento. Em seguida trata do equipamento e da montagem experimental necessário para fazer a aquisição das imagens de fluorescência.

O sétimo capítulo apresenta os resultados obtidos dos experimentos, dando ênfase à análise dos dados e não às mudanças fisiológicas das amostras. Entender da fisiologia das amostras e discutir sobre as mudanças que o estresse lhe causara não foi o objetivo do trabalho.

O oitavo capítulo trata das conclusões sobre os resultados, trabalhos futuros propostos e os resultados publicados.

2. FOTOSÍNTESE

2.1 Introdução

A fotossíntese provavelmente deve ser a reação físico-química mais importante para os seres vivos, pois é através dela que alguns organismos são capazes de utilizar a energia da luz solar para converter substâncias simples, como gás carbônico e água, em substâncias orgânicas complexas que servirão como fonte de energia tanto para animais como para plantas e moléculas estruturais.

Para os animais a fotossíntese representa ainda mais, ela é a principal reação fornecedora de oxigênio ao planeta. O oxigênio é importante para a respiração celular e para a síntese da *adenina trifosfato* – ATP, molécula fornecedora de energia. Além disso, nesta reação o organismo fotossintetizante consome gás carbônico para liberar o oxigênio [21].

A consequência é o equilíbrio existente entre os organismos fotossintetizantes e os não-fotossintetizantes. O primeiro precisa do gás carbônico e água para produzir energia, estas acumuladas em açúcares, e libera oxigênio como resíduo. Enquanto que os não-fotossintetizantes consomem os resíduos e os açúcares produzidos pelos anteriormente citados e libera gás carbônico para o meio ambiente.

Como a água é um dos principais compostos para ocorrer a fotossíntese, sua falta trará consequências cruciais para o desenvolvimento dos fotossintetizantes. Por isso a influência da falta de água na fotossíntese trouxe uma motivação especial para desenvolver-se este trabalho.

Os principais organismos fotossintetizantes são as plantas, as algas e algumas espécies de bactérias. Como este trabalho é um estudo sobre a influência do estresse hídrico nas laranjeiras é importante estudar as consequências da falta de água na fotossíntese. Neste capítulo, será apresentada a importância da fotossíntese, suas principais características, a descrição funcional de uma folha, as reações para ocorrer a fotossíntese e a influência do estresse hídrico nessas reações.

2.2 Características da fotossíntese

2.2.1 Reagentes e produtos da fotossíntese

Relatos indicam que os primeiros estudos sobre a fotossíntese datam do final do século XVIII, quando o cientista inglês Joseph Priestley mostrou que a presença de um ramo de hortelã num ambiente fechado tinha renovado o ar do ambiente prejudicado pela queima de uma vela de cera e era possível acender a vela novamente alguns dias depois.

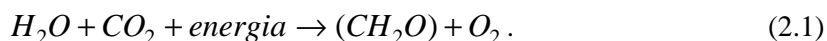
Em 1796 o médico holandês Jan Ingenhousz apresentava um trabalho onde sugeria que o gás carbônico (CO_2) fosse quebrado na fotossíntese devido à presença de luz e para liberar oxigênio (O_2) na forma de gás e carbono em algum outro estado.

Logo depois ficou comprovado que a proporção entre átomos de carbono e moléculas de água (H_2O) nos açúcares era unitária, e que uma grande molécula de açúcar sempre era composta por inúmeras moléculas menores de açúcar; então essa molécula, que servia como base para os outros açúcares maiores, foi denominado *carboidrato*.

De acordo com os biólogos os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza. Eles, além de compor uma variedade de estruturas e paredes das células são responsáveis pelo armazenamento da energia química das células dos seres vivos.

Os carboidratos são formados por pequenas moléculas denominadas *oses* e são divididos em três grupos [36]. Os monossacarídeos, que são os açúcares formados por uma única molécula (como a ribose e a glicose); os oligossacarídeos, que são formados por duas oses, e os mais conhecidos são dissacarídeos como a maltose ou a lactose; e os polissacarídeos, que são compostos por cadeias de oses ligadas entre si (como o amido).

Com o balanceamento entre CO_2 , H_2O e carboidratos foi possível formalizar a primeira equação da fotossíntese [21]:



A conclusão dos cientistas era que o gás carbônico era quebrado pela energia luminosa e se ligava à água formando os carboidratos e liberando o oxigênio. Essa teoria perdurou até 1931 quando van Niel provou em seus experimentos que era a água o fornecedor de oxigênio.

Seis anos depois Robin Hill mostrou que a luz induzia à formação de O_2 em cloroplastos isolados na ausência de CO_2 , mostrando realmente que o oxigênio viria da água. Esta reação passou a se chamar “reação de Hill”. Pesquisas posteriores provaram que os açúcares encontrados nos vegetais eram compostos por cadeias com três carbonos. Eventualmente trioses e glicose foram encontradas nos vegetais [36].

Tanto a triose como a glicose são monossacarídeos, sendo que a primeira é uma molécula de três carbonos e a segunda de seis carbonos. Os monossacarídeos são os açúcares mais simples por isso serve como molécula base para os açúcares maiores, como os polissacarídeos. A Figura 2.1 mostra uma molécula de Gliceraldeído representando uma triose e uma molécula de glicose.

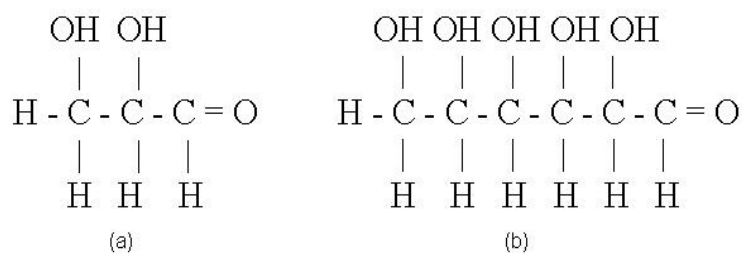
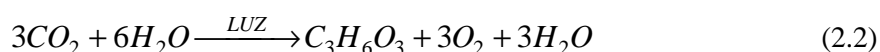


Figura 2.1 – À esquerda, molécula de Gliceraldeído (a). À direita, uma molécula de glicose (b).

Como a glicose é a forma com que os açúcares são transportados no sistema circulatório dos seres humanos [36] ela foi usada como molécula do balanceamento da equação reduzida da fotossíntese:



2.2.2 As folhas como ambiente para ocorrer a fotossíntese

Um dos principais temas apresentados nos cursos de introdução às ciências biológicas é o local da planta onde ocorre a fotossíntese. Uma planta é constituída de três estruturas principais: a raiz, para absorver do solo os minerais necessários; o caule, que dá sustentação e transporta todos os nutrientes para as folhas e as folhas que são responsáveis pelas funções vitais das plantas como respiração, fotossíntese, síntese de açúcares, etc.

Uma folha é uma estrutura dividida em camadas de tecidos biológicos importantes para as funções vitais da planta, como a parênquima, que é constituída pelo tecido fundamental da folha ou a xilema e o floema, que são camadas de tecidos vasculares [39]. Uma descrição detalhada das camadas da folha será encontrada na referência **Fisiologia Vegetal**, dos autores *Lincon Taiz e Eduardo Zeiger*, apresentado como referência [39] deste trabalho. A Figura 2.2 mostra o esquema de um corte transversal de uma folha mostrando suas camadas.

Apesar dos demais tecidos biológicos, o tecido fundamental é o mais importante das folhas, pois lá se encontram as células eucarióticas. As células vegetais são características por possuir um núcleo, um citoplasma e diversos organismos menores chamados “organelas”, todos delimitados por uma parede de celulose [39]. Cada organela tem uma função específica, como as mitocôndrias para a respiração celular ou os cloroplastos para a fotossíntese.

Das organelas celulares, os cloroplastos são os responsáveis pela realização da fotossíntese. É no cloroplasto que se realiza a captura da luz, pois lá estão os principais pigmentos absorvedores da luz solar como as clorofilas e os carotenóides. É também no cloroplasto que ocorre o transporte de elétrons para a síntese do ATP e as fases iniciais para formação de açúcar a partir do CO_2 [31].

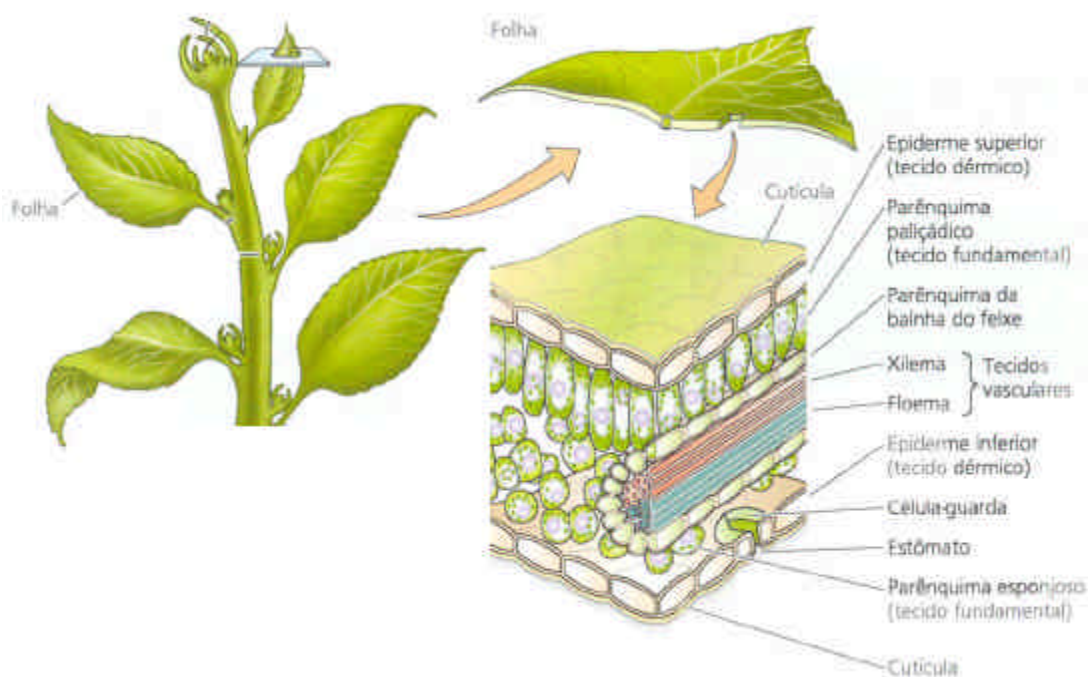


Figura 2.2 – Esquema de uma corte transversal de uma folha mostrando sua organização interna..

FONTE: (Taiz e Zeiger. *Fisiologia Vegetal*. 2004, pp 31).

A estrutura interna do cloroplasto, mostrada na Figura 2.3, é composta por três membranas; destas, as duas primeiras, uma externa e uma interna, atuam no controle do fluxo de moléculas de açúcares, proteínas e íons. A membrana externa é frágil e permeável, enquanto que a interna controla com mais rigor o fluxo de substâncias dentro da organela, tudo isso para deixar o ambiente propício para a realização da fotossíntese [32].

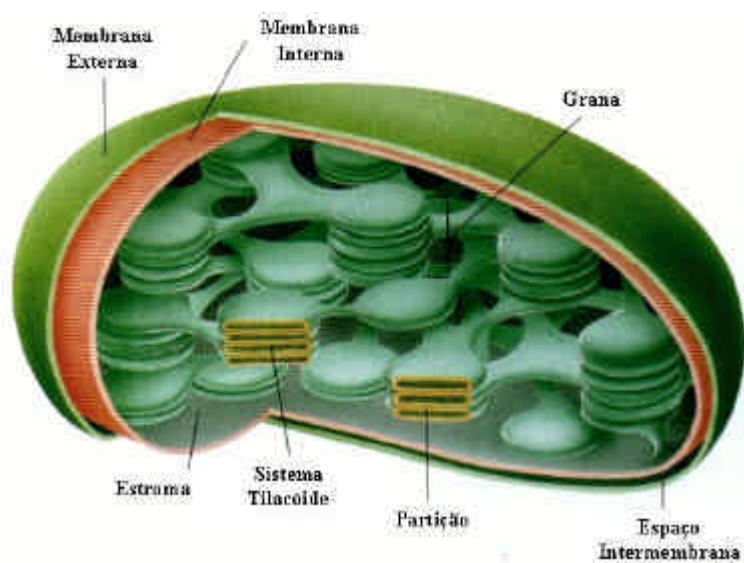


Figura 2.3 – Estrutura interna do cloroplasto.

FONTE: (Duarte. *Detecção óptica da eficiência quântica da fotossíntese*. 2003, pp 31).

Entre as membranas existe o espaço intermembranas onde as moléculas e íons ficam armazenados. A terceira membrana é formada por um conjunto de discos sobrepostos em formato de pilha denominado *tilacóide*. A tilacóide é a membrana em que estão localizados os pigmentos e onde parte da energia absorvida pela folha é usada para quebrar a água em oxigênio e hidrogênio. O conjunto de sistemas tilacóides interconectados é chamado grana [38].

O resto da energia absorvida pela folha é enviado ao estroma. O estroma é um fluido externo à tilacóide onde estão alocadas as moléculas ricas de energia. Também no estroma ocorre a síntese dos carboidratos a partir da fixação do gás carbônico absorvido pela planta [21].

2.2.3 Captura de luz e principais pigmentos da folha

O uso da radiação solar como fonte de energia pra realizar as reações físico-químicas de oxidação e redução dos compostos orgânicos é o fenômeno de destaque na fotossíntese, e a captura da radiação solar é feita por substâncias denominadas pigmentos. A Figura 2.4 mostra o esquema em blocos do processo de absorção de luz solar e transferência de energia.

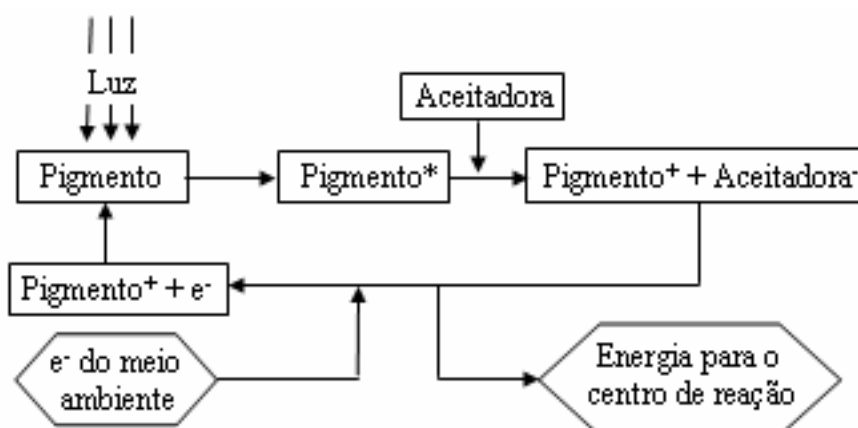


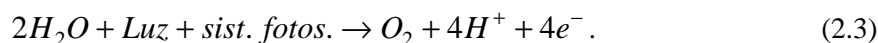
Figura 2.4 – Esquema do mecanismo de absorção e doação da energia luminosa pelos pigmentos.

Ao absorver a energia de um fóton o pigmento sai de seu estado fundamental para um estado excitado (Pigmento*) aumentando o potencial elétrico da molécula. No rearranjo eletrônico do estado excitado elétrons mais energéticos ficam propícios a serem removidos da molécula buscando potenciais menores.

Assim, havendo uma molécula propícia a aceitar elétrons na vizinhança do pigmento excitado (Aceitadora), os elétrons mais energéticos serão transferidos, o pigmento excitado se oxida (Pigmento⁺) e a molécula aceitadora será reduzida (Aceitadora⁻), ficando mais energética. O processo se repete entre substâncias aceitadoras e doadoras transferindo a energia do fóton aos centros de reação da planta [3].

Em seguida os pigmentos oxidados (Pigmento⁺) são recompostos por elétrons menos energéticos presentes no seu ambiente e voltam ao seu estado fundamental (Pigmento). Esse processo cíclico se repete absorvendo energia da iluminação externa e enviando para os centros de reação.

O principal doador de elétrons para a realização da fotossíntese é a água. Na presença de luz um sistema fotossintético remove elétrons da água os fornece para a fotossíntese junto com prótons e moléculas de oxigênio. A equação balanceada fica [31]:



Muitos pigmentos estão envolvidos no processo de captura de luz das plantas, dentre eles os principais são as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas. As ficobilinas são pigmentos presentes nas cianobactérias e nas algas vermelhas, e como não fazem parte da estrutura das folhas da laranjeira foge do interesse deste trabalho. Recomenda-se a referência [36] para leitura sobre o assunto.

Os pigmentos encontrados nas plantas são divididos em dois grupos devido à sua funcionalidade, os *pigmentos acessórios* e o *pigmento principal*. Os pigmentos acessórios têm a única função de absorver a luz do ambiente e entregar a energia para o pigmento principal, que conduz a energia aos centros de reação. O pigmento principal é a clorofila a (Chla). Ela também absorve luz do ambiente, mas sua principal função é capturar a energia dos pigmentos acessórios e entregá-la aos centros de reação.

O grupo de pigmentos acessórios é formado pelos demais pigmentos, porém os mais abundantes são a clorofila b (Chlb) e os carotenóides. As clorofilas são os pigmentos mais importantes da fotossíntese. Elas são altamente abundantes nas folhas da maioria das plantas e absorvem bem a luz azul e vermelha, logo refletem bem a luz verde. É devido à concentração de clorofila que as folhas também possuem a cor verde. A Figura 2.5 mostra o espectro de absorção das clorofilas e do beta-caroteno além do espectro da luz solar que atinge a Terra.

Os carotenóides são pigmentos acessórios importantes do sistema de captura de energia solar, isso porque eles podem absorver radiação numa região diferente da clorofila, e com isso conseguem ampliar o espectro de absorção de luz. Na Figura 2.4 vê-se que o beta-caroteno é importante para absorver radiações em torno de 500 nm.

Os carotenóides ainda têm outra função na fisiologia da folha, até porque o seu rendimento na absorção de radiação não ultrapassa 40%. Eles são responsáveis pela remoção de energia da membrana tilacóide através de calor; da absorção dos estados tripleto das clorofilas e principalmente pela antioxição das plantas atuando sobre as formas mais reativas do O₂ [31].

Os carotenóides dividem-se em *carotenos* e *xantofilas*, onde o principal caroteno é o beta-caroteno, pois é facilmente encontrado nos vegetais e é a principal fonte de vitamina A dos seres vivos. Já as principais xantofilas são o lutein, a violaxantin e o neoxantin.

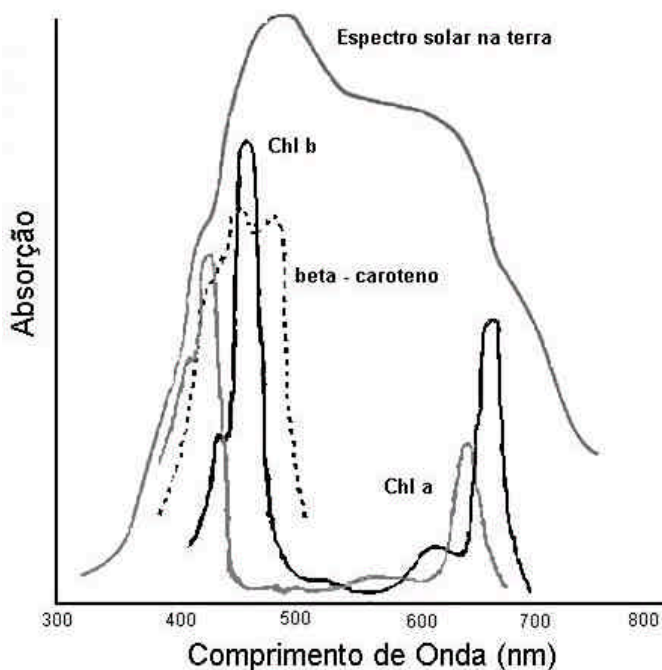


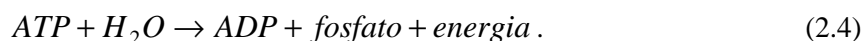
Figura 2.5 – Principais pigmentos da folha e espectro solar na terra.

FONTE: (Lehninger, Nelson e Cox. *Princípios de bioquímica*, 2ª edição, 1995, pp 427)

2.3 As reações da fotossíntese

Para ocorrer a fotossíntese dois conjuntos de reações se completam. O primeiro é formado por reações que dependem exclusivamente da absorção de luz e sua utilidade é a de liberar prótons e elétrons para formar ATP a partir do ADP e de reduzir o NADP^+ a NADPH. O NADP^+ , *nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato*, é um aceitador de elétrons e sua forma reduzida, NADPH, é utilizada pelas células para armazenar energia química.

Já o ADP, *adenosina difosfato*, forma o ATP, *adenosina trifosfato*, ligando-se a um íon fosfato livre sob consumo de energia. Vale lembrar que nos organismos vivos ocorre o inverso, o ATP em meio aquoso é convertido em ADP e energia é liberada [36].



Devido à necessidade de luz para realizar essas reações, esse conjunto é denominado de *reações de transdução de energia*, ou simplesmente “reações de claro”. O segundo conjunto não depende da energia solar para ocorrer, mas da energia química existente na planta, por isso são chamadas “reações de escuro”, embora funcionalmente são conhecidas como *reações de fixação do carbono*.

Para o desenvolvimento do trabalho apenas as reações de claro são estudadas, porque são as únicas que envolvem a participação da água na síntese. Para um estudo aprofundado das reações completas, recomendam-se as referências **Princípios de Bioquímica**, dos autores Albert Lehninger, David

Nelson e Michael Cox, e o livro **Photosynthesis**, de David Lawlor apresentado neste trabalho com as referências [32] e [31].

2.3.1 Reações de claro

Para que as reações de claro ocorram dois fotossistemas estarão envolvidos no processo. Um fotossistema é basicamente composto por um complexo antena e um centro de reação. O complexo antena é formado por um conjunto de pigmentos auxiliares que conduzem para o centro de reação a radiação capturada. Já o centro de reação é formado por proteínas e moléculas de clorofila que possibilitam a conversão de energia luminosa em energia química [21].

A participação dos dois fotossistemas foi detectada pela análise do rendimento quântico da fotossíntese. O rendimento quântico é a relação entre a velocidade de liberação de oxigênio e o número de fótons absorvidos no cloroplasto.

$$\Phi = \frac{\text{velocidade de O}_2}{\text{número de fótons}} \quad (2.5)$$

A Figura 2.6 mostra que o rendimento da fotossíntese depende do comprimento de onda da radiação absorvida, e que para comprimentos acima de 680 nm o rendimento cai rapidamente, mesmo sabendo que a clorofila b absorve radiação até 700 nm (Figura 2.3).

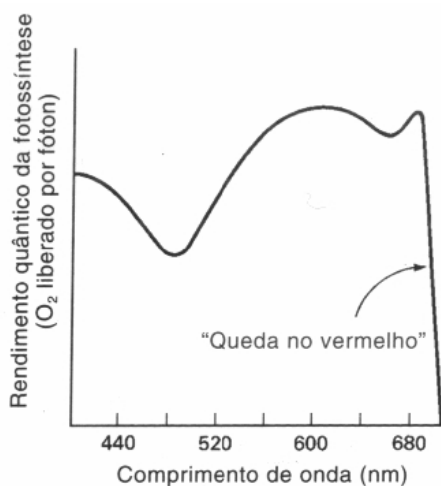


Figura 2.6 – Gráfico do rendimento quântico da fotossíntese em função do comprimento de onda absorvida.

FONTE: (Stryer. *Bioquímica*, quarta edição, 1995, pp 626)

Uma outra observação deste experimento foi que ao usar duas radiações juntas com dois comprimentos de onda de 600 nm e 700 nm, o rendimento aumentou significativamente, chegando a ser maior que a soma dos rendimentos individuais. A conclusão obtida foi que a fotossíntese depende de

dois sistemas, onde os dois sistemas absorvem radiação abaixo de 680 nm, mas só um deles absorve acima de 680 nm [38].

De fato, a fotossíntese depende de dois fotossistemas, chamados *fotossistema I* (FSI) e *fotossistema II* (FSII) devido à ordem de descoberta, porém em ordem de funcionalidade o FSII deve ser estudado primeiro. A Figura 2.7 mostra o espectro de absorção dos fotossistemas. O FSI possui máxima absorção em 700 nm, por isso o pigmento do seu centro de reação é chamado P700, enquanto que o FSII possui pico de absorção em 680 nm, e o pigmento do seu centro de reação é chamado P680.

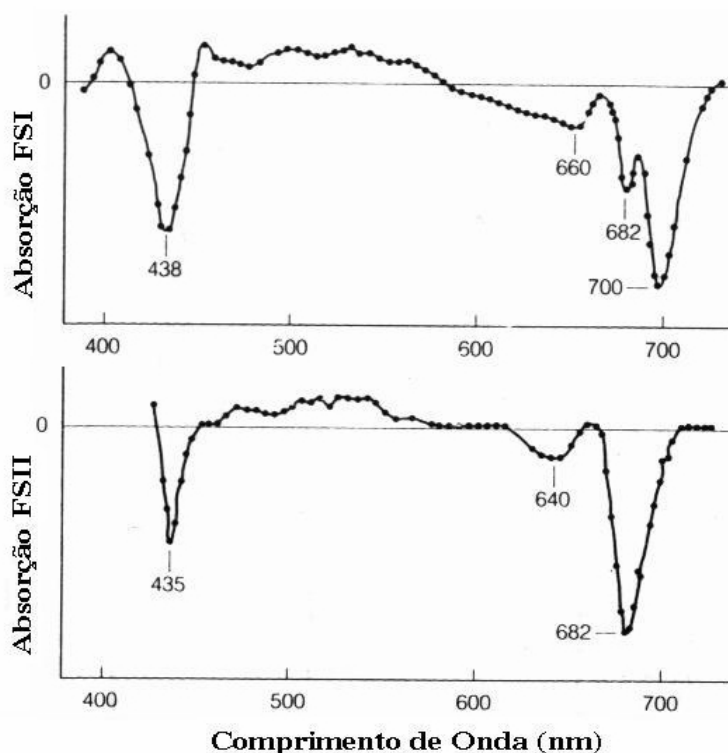


Figura 2.7 – Espectro de absorção dos fotossistemas FSI e FSII.

FONTE: (Lawlor, *Photosíntese*, 1ª edição, 2001, pp. 39)

A absorção de luz faz com que os pigmentos dos fotossistemas sejam excitados e impulsionem todas as reações que dependem da luminosidade externa. A Figura 2.8 mostra o esquema em Z das reações de claro, mostrando a transferência de elétrons entre as substâncias que fazem o seu transporte, a participação dos fotossistemas e de outros dois complexos importantes e a participação da luz impulsionando as reações.

A descrição do esquema Z começa tratando do FSII. O FSII é um complexo onde a absorção de energia é feita por uma proteína que contém sete moléculas de Chla, seis de Chlb e dois carotenóides [32]. A função do FSII é formar um oxidante que cinda a água liberando oxigênio, prótons e elé-

trons, além de formar um redutor e gerar um fluxo de prótons que estimula a formação do ATP. A esse conjunto de reações se dá o nome *fotofosforilação*.

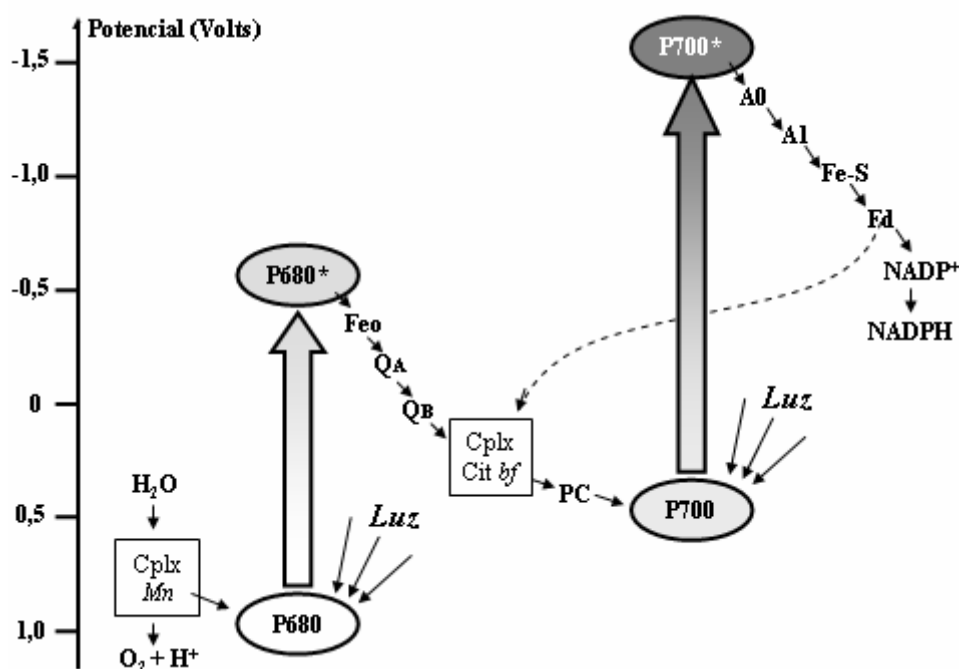


Figura 2.8 – Esquema dos subsistemas da reação de claro acoplados para montar a estrutura cíclica. Destaque para a organização em função do potencial de redução.

FONTE: (Lehninger, Nelson e Cox. *Princípios de bioquímica*, 2ª edição, 1995, pp 432)

O complexo que cinde a água da planta liberando oxigênio para o meio externo, prótons e elétrons é chamado complexo de manganês e será estudado na seção 2.4, que trata da influência do estresse hídrico na fotossíntese. Inicialmente basta saber que os elétrons liberados serão utilizados pelo P680 e que os prótons serão utilizados no *complexo citocromo bf*.

O próximo passo da fotofosforilação ocorre quando o pigmento P680 recebe a energia luminosa e muda para o estado excitado P680*. O P680* é um redutor forte que em alguns picosegundos doa um elétron à *feofitina*, um outro aceitador de elétrons presente na tilacóide, formando a feofitina reduzida e o P680⁺. Então, o P680⁺ volta ao estado fundamental recebendo elétrons menos energéticos do complexo manganês.

Elétrons energéticos passam a ser transferidos desde a feofitina até o complexo citocromo passando por substâncias como a *plastoquinona* e o *plastoquinol*. Essa última pode armazenar a energia de dois fótons em seu potencial redutor e libera elétrons para o complexo citocromo bf [38].

O FSI é um complexo composto por, no mínimo, 13 cadeias polipeptídicas. O seu complexo antena é quase idêntico ao do FSII, e o centro de reação é formado por uma proteína com um par de

moléculas especiais de Chla. Este sistema, que tem P700 como seu pigmento, tem a função é formar moléculas de NADPH e de um oxidante que será reduzido com os elétrons originados no FSII [39].

Assim que o pigmento P700 recebe luz do complexo antena é excitado para P700*; em seguida doa um elétron a uma molécula de clorofila aceptora formando P700⁺. Logo depois, P700⁺ captura um elétron da *plastocianina reduzida*, um doador de elétrons formado na membrana tilacóide com elétrons vindos do FSII, e é convertido de volta para P700 [32].

Os elétrons do FSI seguem uma cadeia de transporte desde a clorofila aceptora (A₀) até a *ferrodoxina*, passando por uma *quinona* (A₁) e por *aglomerados ferro-enxofre* (FeS_X, FeS_A e FeS_B). A ferrodoxina é uma proteína hidrossolúvel formada no FSI. Em seguida dois elétrons energéticos de duas ferrodoxinas são transferidos para o NADP⁺, que se une com um íon de H⁺ e forma o NADPH, altamente energético [31].

Finalizando os complexos das reações de claro temos o *complexo citocromo bf*. Ele é o responsável para a formação do ATP a partir de ADP e fosfato, através da contribuição dos dois fotossistemas. Ele é uma montagem de várias proteínas e conduz elétrons do redutor produzido pelo FSII, o plastoquinol, para o oxidante desenvolvido pelo FSI, a plastocianina, formando a plastocianina reduzida [39].

Essa transferência de elétrons propicia, concomitantemente, um gradiente de prótons na membrana tilacóide. E é esse gradiente que estimula a formação de ATP.

Em 1966, André Jangerdof em seu experimento colocou cloroplastos em uma solução com pH 4 durante quatro horas. Em seguida mudou para uma solução formada de moléculas de ADP e fosfatos e com pH 8. A mudança abrupta de pH resultou na formação de ATP até um pouco antes do equilíbrio de pH. A conclusão foi que a síntese de ATP é ativada por uma força próton-motriz [38].

De fato, com a transferência de elétrons entre os fotossistemas a parte interna da tilacóide torna-se ácida (pH próximo de 4). A energia luminosa também influencia no sistema induzindo a entrada de prótons no espaço tilacóide.

Com o meio ácido a ATP sintase, que é um complexo que conduz prótons através da membrana tilacóide, entra em ação adicionando e retirando os prótons do espaço tilacóide buscando neutralidade. O movimento de prótons cria um gradiente de pH nas proximidades da membrana tilacóide e quando o gradiente de pH é acima de 2 há *força próton-motriz* suficiente para sintetizar o ATP a partir do ADP e fosfato.

Segundo a teoria quimiosmótica, a energia eletroquímica devido ao gradiente de pH e à separação das cargas induz a força próton-motriz, que é a representação da conservação de parte da energia de oxidação. A força próton-motriz é usada para iniciar a síntese de ATP nas moléculas [32].

Um trabalho clássico sobre as relações entre potencial elétrico, gradiente de pH, o fluxo de prótons e a fotofosforilação na membrana fotossintética foi apresentado por P. Gräber e H. T. Witt em 1976 [15]. Seus experimentos mostraram que o gradiente de pH é proporcional à concentração de prótons e que a taxa de fotofosforilação (produção de ATP) dependia fortemente do gradiente de pH e do potencial elétrico da membrana.

Em seguida a energia acumulada no ATP e no NADPH produzidos nas reações de claro é consumida nas reações de escuro para sintetizar CO₂ e H₂O em açúcares.

2.4 A influência do estresse hídrico na fotossíntese

Como mencionado antes, a água é um dos componentes fundamentais da fotossíntese, pois ela é o principal fornecedor de prótons e elétrons para a síntese, além de liberar as moléculas de oxigênio que a maioria dos organismos necessitam. Vale lembrar que é no complexo de manganês que ocorre a quebra da água. Este complexo remove quatro elétrons de um par de moléculas de água e libera quatro prótons e uma molécula de oxigênio.



Para que o complexo de manganês volte a ser oxidado ele transfere os quatro elétrons para o P680⁺ e envia os prótons ao estroma. Por isso a falta de água no processo traria enorme prejuízo, pois não haveria transporte de elétrons para nem gradiente de prótons na síntese.

Segundo *Lawlor* em seu livro [31], o estresse hídrico atribui outros problemas fisiológicos. Um deles é o decréscimo do potencial osmótico das células das plantas, que é necessário para que ocorram as reações celulares. A resposta imediata do organismo é a redução da taxa de transpiração da região sob estresse, para isso diminui a hidratação dos tecidos locais e retarda o desenvolvimento de suas organelas.

O estresse hídrico também estimula a produção de ácido abscísico (ABA), que é regulador do crescimento da planta, mas em altas concentrações retarda seu desenvolvimento e provoca outros problemas como alterações genéticas e o fechamento dos estômatos. Os estômatos são os poros microscópicos presentes na superfície da folha que regulam o fluxo de gás carbônico e de vapor de água das folhas [36].

Problemas estruturais também são estimulados pelo estresse, como a diminuição da área das folhas e do tamanho das árvores, embora a principal reação seja a redução do rendimento fotossintético, que diminui a produção de ATP e conseqüentemente a taxa de assimilação de CO₂. Assim, nem toda energia luminosa capturada pelos pigmentos seria dirigida para a fotossíntese e deveria ser dissipada de outra forma, como fluorescência, por exemplo [31].

Duarte [21] em seu experimento com milho mostra que observou o aumento da fluorescência emitida pela clorofila de um ponto qualquer da folha por causa do estresse hídrico. Um dos resultados desta tese é apresentado na Figura 2.9.

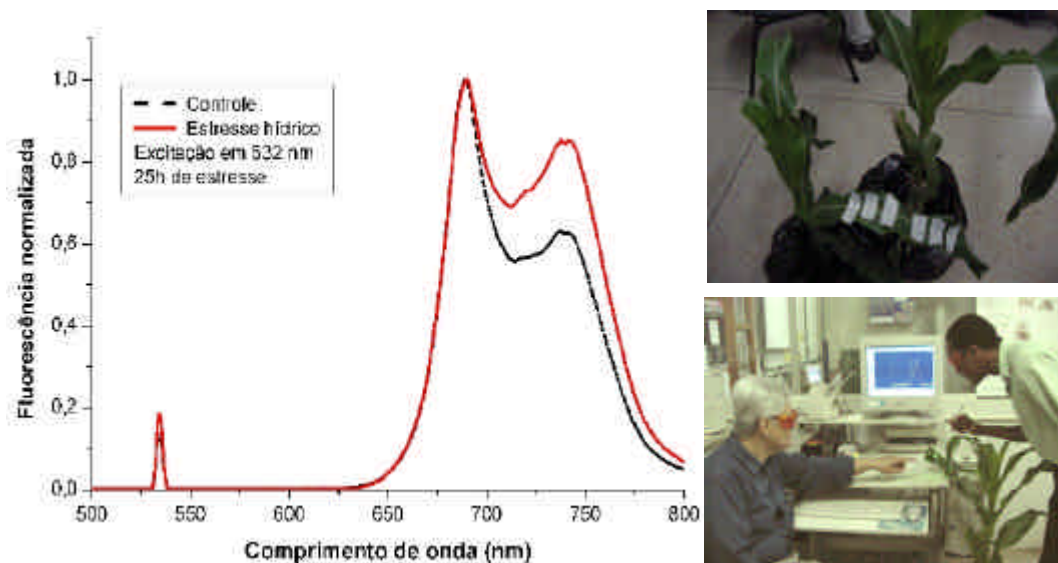


Figura 2.9 – Observação experimental do aumento da fluorescência do milho devido ao estresse hídrico.

FONTE: (Duarte. *Deteção óptica da eficiência quântica da fotossíntese*. 2003, pp 78).

Em Flexas *et al.* (2000) [13], pode-se analisar a influência do estresse hídrico em parreirais de uvas. O autor fez análises de relações entre características temporais da intensidade da fluorescência emitida e das condições ambientais do experimento. Neste trabalho foi possível distinguir folhas fora do estresse de folhas sob estresse.

Analisar a manifestação do estresse hídrico simplesmente através da observação da mudança do espectro da fluorescência também é possível. Broglia em seu trabalho com oliveiras [6] mostrou a mudança que ocorre no espectro quando uma planta está sob estresse hídrico (Figura 2.10). E já que o espectro muda, existe a possibilidade de fazer análises usando relações entre a fluorescência emitida em duas regiões distintas do espectro.

Cerovic em seu artigo de revisão [8] mostra que essas *razões de fluorescência* têm um significado especial porque a fluorescência em certas regiões do espectro é fortemente dependente da concentração de algumas substâncias particulares. Por isso se uma substância for escassa no organismo, seu espectro de fluorescência acusaria. Com isso alguns pesquisadores obtiveram êxito na detecção do estresse hídrico usando as razões de fluorescência.

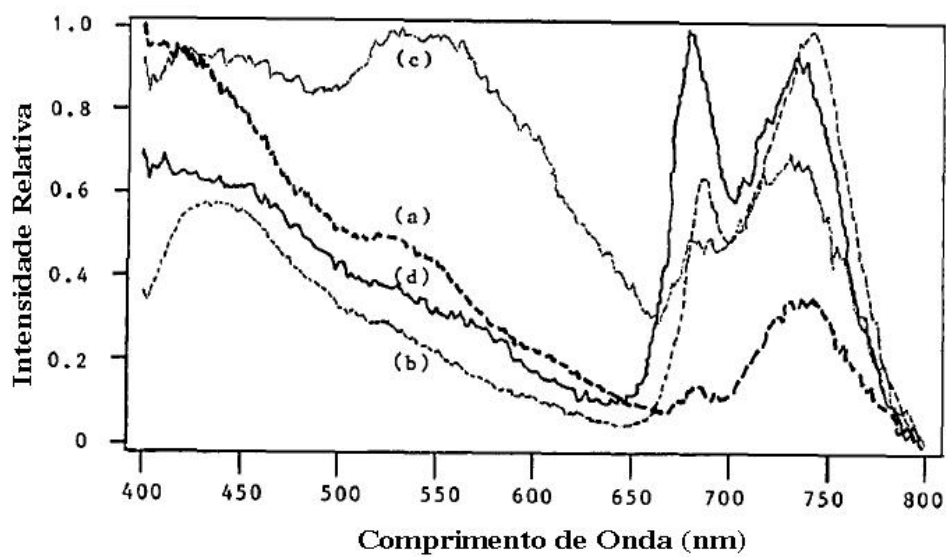


Figura 2.10 – *Espectros da fluorescência emitida por folhas com excitação UV: (a) Oliveira hidratada; (b) Medica; (c) Oliveira sob estresse hídrico e (d) Oliveira hidratada adicionada de um inibidor da fotossíntese.*

FONTE: (Broglia. *Blue-green laser-induced fluorescence from intact leaves: actinic light sensitivity and subcellular origins*, 1993).

3. TEORIA DA FLUORESCÊNCIA

3.1 Introdução

Durante o processo da fotossíntese alguns fenômenos como a absorção de luz pelos pigmentos e a transferência de energia absorvida para os centros de reação, contribuem para o início ou a manutenção da síntese. A teoria quântica explica como esses fenômenos ocorrem através de conceitos físicos sobre absorção e emissão de energia pela matéria.

A transferência da energia entre as moléculas talvez seja o fenômeno mais interessante explicado pela teoria quântica e que é observado na fotossíntese, pois envolve todo o processo de absorção de energia, mudanças na estabilidade molecular e emissão da energia. Esses três fenômenos também são importantes para explicar como ocorre a fluorescência.

A emissão da fluorescência é uma forma de dissipação de energia. Quando uma molécula precisa dissipar parte da sua energia para adquirir estabilidade, uma das formas de dissipação é através da emissão de radiação e a fluorescência é um tipo específico da radiação que foi emitida.

A principal característica da fluorescência emitida é que ela só depende da característica eletrônica da molécula que a emitiu. Assim, a fluorescência pode ser reconhecida como uma assinatura própria da molécula que a emitiu e também pode ser usada como uma ferramenta de detecção de moléculas.

Neste capítulo será apresentada a teoria da emissão da fluorescência molecular, e em particular, a fluorescência emitida pelos pigmentos da folha. A fluorescência da clorofila e dos carotenóides serão os mais estudados, pois essas substâncias são abundantes nas folhas e a fluorescência emitida pela folha depende quase que unicamente da fluorescência dessas substâncias.

3.2 Histórico da teoria Quântica

Até o final do século XIX os cientistas acreditavam que as descrições da física para o mundo real estavam praticamente completas e pouco se tinha a acrescentar. *Newton*, *Kepler*, *Lagrange* e *Hamilton* descreviam os principais movimentos da mecânica e hidrodinâmica, as leis de *Maxwell* descreviam os fenômenos eletromagnéticos e ópticos e a termodinâmica era governada pelas teorias de *Gibbs*, *Rumford*, *Joule* e *Carnot* sobre trabalho, calor e entropia.

A busca passou a ser pelo aprimoramento das *leis clássicas* buscando encontrar novas interpretações para resolver os problemas que ainda não tinham solução. O insucesso da física clássica mais conhecido era a descrição da radiação de um *corpo negro*. Um *corpo negro* é a idealização de

uma matéria capaz de emitir e absorver todas as radiações uniformemente e as teorias clássicas não tinham fundamento para descrever a solução matematicamente [1].

No final do século XIX *Max Planck* resolveu o problema do ponto de vista termodinâmico, por resultados semi-empíricos, ao ajustar as curvas das teorias de *Wien* e de *Rayleigh-Jean* [34], e notou que só haveria solução possível se ele considerasse que a matéria absorvia ou emitia radiação com uma quantidade discreta de energia, essa idéia contrariava a teoria clássica que afirmava que a energia deveria ser contínua. Planck denominou a menor unidade de energia emitida de *quantum*.

Ele também verificou que a relação entre a energia e a frequência de uma radiação era um múltiplo inteiro de um valor constante, que posteriormente foi denominado *constante de Planck*:

$$\frac{E}{\nu} = nh, \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (3.1)$$

$$h = 3.626 \cdot 10^{-34} \text{ Js.}$$

Apesar de sua descoberta Planck não acreditava que sua hipótese proposta fosse verdadeira, foi Einstein que no início do século XX a comprovou e acrescentou a idéia de que não só a matéria absorveria e emitiria quantidades discretas de energia, como esse *quantum* deveria se propagar agrupado pelo espaço.

Einstein buscava outras aplicações que pudessem ser explicadas pelo caráter discreto da luz e em 1905 ele publicou um trabalho para explicar a teoria do “Efeito Fotoelétrico quantitativamente e qualitativamente”. Esse trabalho tratava da natureza da luz e através dele Einstein concluiu que a luz, sob certas circunstâncias, se comportava de forma corpuscular. Foi este trabalho que lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1921.

Também neste trabalho, Einstein formulou a entidade *fóton*, que é a entidade física que carrega um *quantum* de energia e possui massa de repouso nula. Essas idéias revolucionaram o pensamento científico nas décadas que se seguiram, culminando com a origem da *Mecânica Quântica* e com uma nova teoria para o estudo da luz e da matéria, a *Eletrodinâmica Quântica* e a *Teoria Quântica de Campos*.

3.3 Absorção, emissão e transferência de energia pela matéria.

A teoria quântica também foi uma das ferramentas necessárias para o desenvolvimento do modelo atômico proposto por Niels Bohr em 1913, e que ainda está em vigor até hoje. Por este trabalho Bohr recebeu o Prêmio Nobel em 1922.

O átomo de Bohr é um assunto indispensável dos cursos de física e química fundamental, por isso não será abordado precisamente; para isso, o livro Física Quântica, de R. Eisberg R. Resnick é recomendado para um estudo mais aprofundado no assunto. Porém um dos postulados de Bohr tem importância fundamental para compreender a absorção e a emissão de energia pela matéria.

No seu quarto postulado, Bohr, baseado na teoria quântica, afirma que um átomo emitirá uma radiação de frequência ν se um elétron do átomo transitar entre uma camada mais energética E_f para uma menos energética E_i , e que essa frequência pode ser calculada pela relação entre a diferença energética entre as camadas $\Delta E = E_f - E_i$ e a constante de Planck. Essa definição também serve para a absorção de radiação, sendo que neste caso, a transição do elétron será da camada menos para a mais energética [28].

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{E_f - E_i}{h} \quad (3.2)$$

Essa é uma das formas de absorção e emissão de energia pela matéria, porém é a mais importante para explicar a fluorescência. Quando uma molécula está num nível energético menor e absorve energia na forma de radiação haverá um re-arranjo eletrônico nas camadas atômicas para que o átomo comporte a energia absorvida. Assim, cada fóton absorvido induzirá a transferência de um elétron do átomo de uma camada menos para uma mais energética.

Com o re-arranjo eletrônico o átomo vai para um estado excitado, o qual, eventualmente, é mais instável que o estado menos energético. Por isso, o átomo permanece pouco tempo num estado excitado e busca liberar o excesso de energia acumulada para transitar para um estado mais estável [21].

Esse excesso de energia do átomo pode ser dissipado por vibração, rotação, emissão de radiação ou das três formas conjuntamente e o processo de transferência de energia ocorre quando um átomo dissipa energia para se estabilizar e um outro átomo da vizinhança absorve essa energia e se excita. Neste caso a transferência de energia se dá de um átomo “doador” para um “aceitador” [21].

Um exemplo é a transferência de energia entre a clorofila a e a clorofila b. Aqui a clorofila b faz o papel de substância doadora de energia e a clorofila a é a aceitadora, como mostra a Figura 3.1; a clorofila a absorve energia dissipada pela clorofila b para a transferir para os centros de reação da planta. Este tipo de transferência de energia ocorre com um re-arranjo eletrônico é chamada *excitônica* e foi bastante estudada por *Föster* [21].

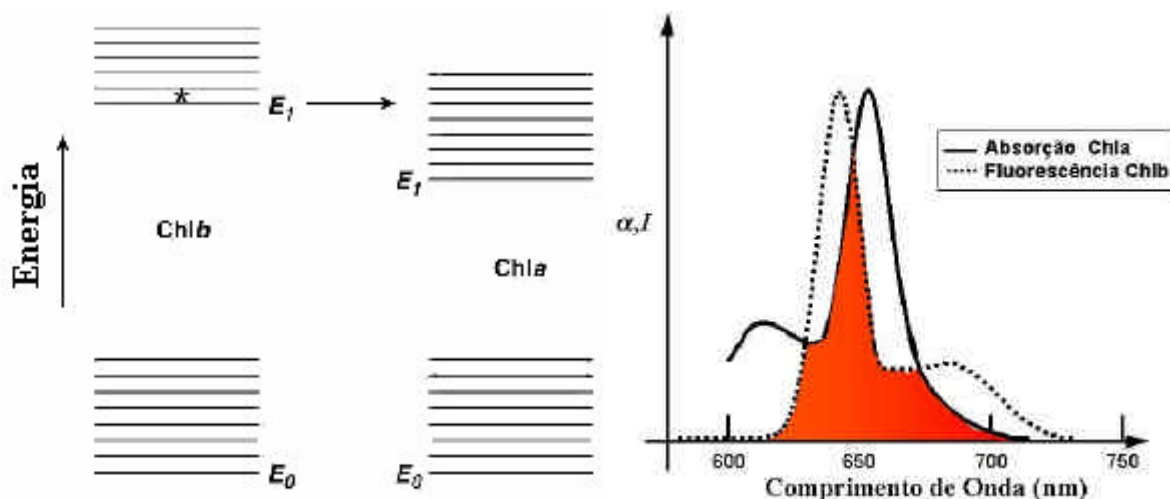


Figura 3.1 – Transferência energética da clorofila b (doadora), num potencial maior, para a clorofila a (aceitadora), num potencial menor.

FONTE: (Duarte, *Deteção óptica da eficiência quântica da fotossíntese*, 2003, pp. 21)

Segundo a teoria de *Föster* [20] a interação entre duas moléculas é do tipo dipolo-dipolo, dessa forma a taxa de energia transferida de um doador D para um aceitador A que estão a uma distância R é:

$$k(R) = \frac{1}{t_D} \cdot \left(\frac{R_0}{R} \right)^6, \quad (3.3)$$

t_D é o tempo de vida do doador na ausência do aceitador, R_0 é a distância de *Föster*, e vale:

$$R_0 = \left[\frac{9 \ln(10) Q_D k^2 J(I)}{128 \pi^5 N n^4} \right]^{1/6}, \quad (3.4)$$

onde Q_D é a emissão quântica do doador na ausência do aceitador, k^2 é o fator que descreve a orientação da transferência de dipolos, N é o número de Avogadro e n é o índice de refração do meio. Já $J(I)$ é o grau de *overlap* entre a emissão de D e a absorção de A, e é calculado usando a função da emissão de D, $I_D(I)$ e a absorção de A $a_A(I)$, através da equação:

$$J(I) = \frac{\int_0^{\infty} I_D(I) a_A(I) I^4 dI}{\int_0^{\infty} I_D(I) dI} \quad (3.5)$$

Essa teoria ainda afirma que a probabilidade da transferência de energia pode atingir 50% antes que as moléculas realmente se toquem; nesta situação as distâncias críticas calculadas são da ordem de 5 nm. Num cloroplasto, 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 [21].

3.4 Energias rotacional e vibracional.

Ao se comparar as grandezas de energia necessárias para fazer um átomo vibrar, rodar e emitir fótons, nota-se que elas são diferentes. Enquanto que um fóton emitido ocorre com energia da ordem de unidades de elétrons-volt, as vibrações correm em décimos de elétrons-volt e as rotações em centésimos de elétrons-volt [21]. Como essas energias estão associadas a frequências definidas, é possível relacionar as regiões do espectro eletromagnético com os fenômenos atômicos.

A Figura 3.2 mostra que a absorção de uma radiação na região das micro-ondas induz uma rotação na molécula; enquanto que a absorção de radiação no infravermelho distante induz um movimento vibracional na molécula.

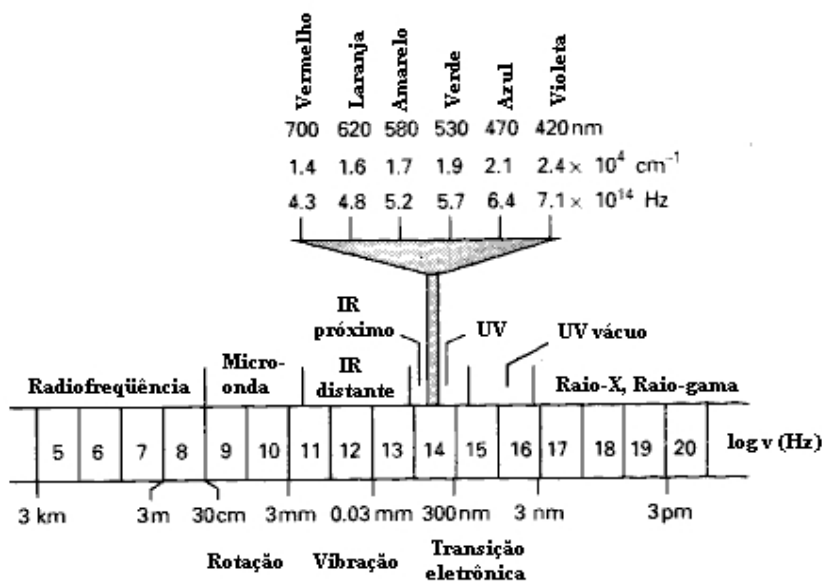


Figura 3.2 – Espectro da radiação eletromagnética associada ao fenômeno atômico.

FONTE: (Atkins, *Physical Chemistry*, sixth edition, 1998, pp. 454)

Por fim a absorção de radiação na região do infravermelho próximo, visível e ultravioleta induz uma emissão radiativa. Assim, a energia total de uma molécula pode ser representada pela soma das energias de rotação, de vibração e de transição eletrônica.

$$E_{total} = E_{rot} + E_{vib} + E_{elet} \quad (3.6)$$

A energia rotacional (E_{rot}) pode ser calculada a partir do modelo do rotor rígido para moléculas diatômicas rodando em uma única direção [34].

$$E_{rot} = \frac{\hbar^2}{4\pi^2 I} J(J+1) \quad (3.7)$$

$$= BJ(J+1) \quad \text{cm}^{-1}$$

$$B = \frac{\hbar^2}{4\pi^2 I} \quad (3.8)$$

onde B é a constante rotacional da molécula, I é o momento de inércia da molécula, J é o número quântico do momento angular, dado por [26]:

$$J = I\omega, \quad (3.9)$$

e ω é a velocidade angular do rotor rígido. Por fim a diferença de energia entre dois níveis rotacionais pode ser calculada por:

$$\Delta E = E(J) - E(J-1) = BJ(J+1) - BJ(J-1) = 2BJ. \quad (3.10)$$

Essa equação mostra que a diferença de energia entre dois níveis rotacionais cresce com o aumento do número quântico do momento angular, conforme mostra a Figura 3.3.

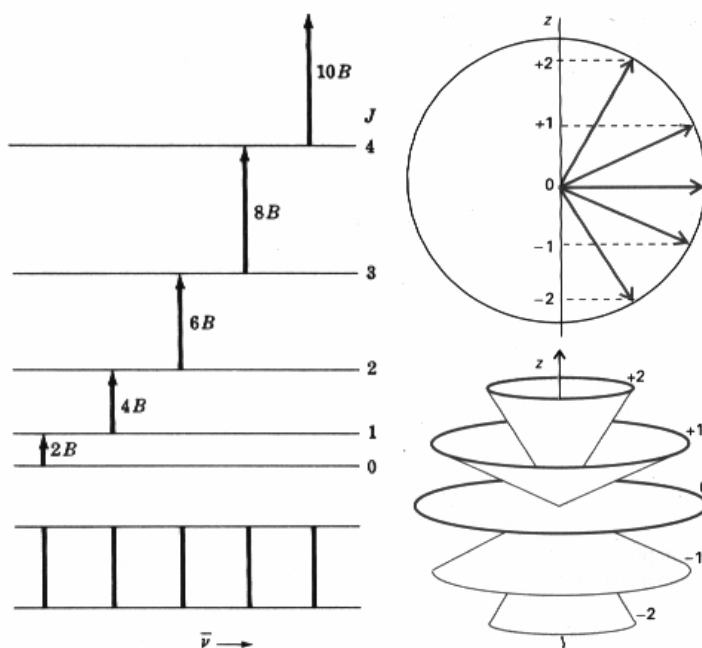


Figura 3.3 – À esquerda, diferença energética entre os níveis rotacionais, em função do número de onda. À direita, acima os possíveis valores de M_j e a orientação do momento angular, numa visão bidimensional, que pode ser melhor ilustrada na vista tridimensional

FONTE: (Chang, *Basic principles of spectroscopy*. 1971, pp 132) – figura à esquerda.

FONTE: (Atkins, *Physical Chemistry*, sixth edition, 1998, pp. 336) – figura à direita.

Um outro número quântico M_j também dá informação sobre a rotação da molécula. M_j se refere à componente de J que determina a direção da rotação da molécula. M_j pode assumir valores entre $0, \pm 1, \dots, 2J+1$. Isso mostra que uma molécula possui $2J+1$ possibilidades de rotacionar com a mesma energia [22].

Porém, uma transição para um nível rotacional obedece a uma regra de seleção que diz: “Para que ocorra a rotação pura da molécula, ela deve possuir um momento de dipolo elétrico permanente, ou seja, a molécula deve ser polar”. Isso porque um momento de dipolo rotacional cria um campo elétrico com componentes que interagem com a microonda podendo não ocorrer absorção da radiação [26]. Em termos dos números quânticos significa que:

$$\begin{aligned}\Delta J &= \pm 1 \\ \Delta M_j &= 0, \pm 1\end{aligned}\tag{3.11}$$

Dessa forma fica garantida a conservação do momento angular sempre que a molécula absorver uma microonda.

Quanto à energia vibracional (E_{vib}), ela pode ser calculada a partir do modelo do oscilador harmônico simples, de forma que [33]:

$$E_{vib} = \left(v + \frac{1}{2}\right) \cdot h\nu\tag{3.12}$$

onde v é o número quântico vibracional e ν é a frequência da radiação absorvida. A diferença entre dois níveis vibracionais será:

$$E(v+1) - E(v) = \left(v+1 + \frac{1}{2}\right) \cdot h\nu - \left(v + \frac{1}{2}\right) \cdot h\nu = h\nu\tag{3.13}$$

Isso mostra que a diferença entre dois níveis vibracionais é sempre constante e só depende da característica da molécula.

A regra de seleção para uma vibração molecular é que ela mude seu momento de dipolo elétrico durante uma vibração, dessa forma a molécula pode variar seu campo elétrico e vibrar [22]. Em termos quânticos significa dizer que:

$$\Delta v = \pm 1.\tag{3.14}$$

3.5 Fluorescência e fosforescência.

As transições eletrônicas ocorrem seguindo o modelo descrito nos postulados de *Bohr*, quando um fóton de energia $h\nu = E_f - E_i$ é emitido assim que um elétron pula da camada mais energética E_i para a camada menos energética E_f . Porém, a principal característica de uma transição eletrônica é que ela é sucedida por vibração atômica, por isso é chamado de nível vibrônico [28].

O princípio de *Franck-Condon* explica o fato. Segundo ele, como o núcleo é mais pesado que os elétrons, a resposta do núcleo a uma transição eletrônica será mais lenta que a do elétron. Assim, quando os elétrons absorvem energia e se deslocam para outras camadas, novas forças eletromagnéticas atuarão sobre o núcleo fazendo-o vibrar e dissipar energia enquanto busca aumentar a estabilidade atômica [34]. Junto com o núcleo todo o átomo vibra.

A vibração do átomo propicia dissipação de energia que repercute na transição dos elétrons para camadas menos energéticas do estado excitado.

A mecânica quântica explica o princípio através da transição entre duas curvas de potencial, como mostra a Figura 3.4. Nesta figura, no gráfico à esquerda, vê-se uma transição atômica do estado fundamental para um estado excitado quando um átomo absorve energia, através da mudança entre as duas curvas de potencial.

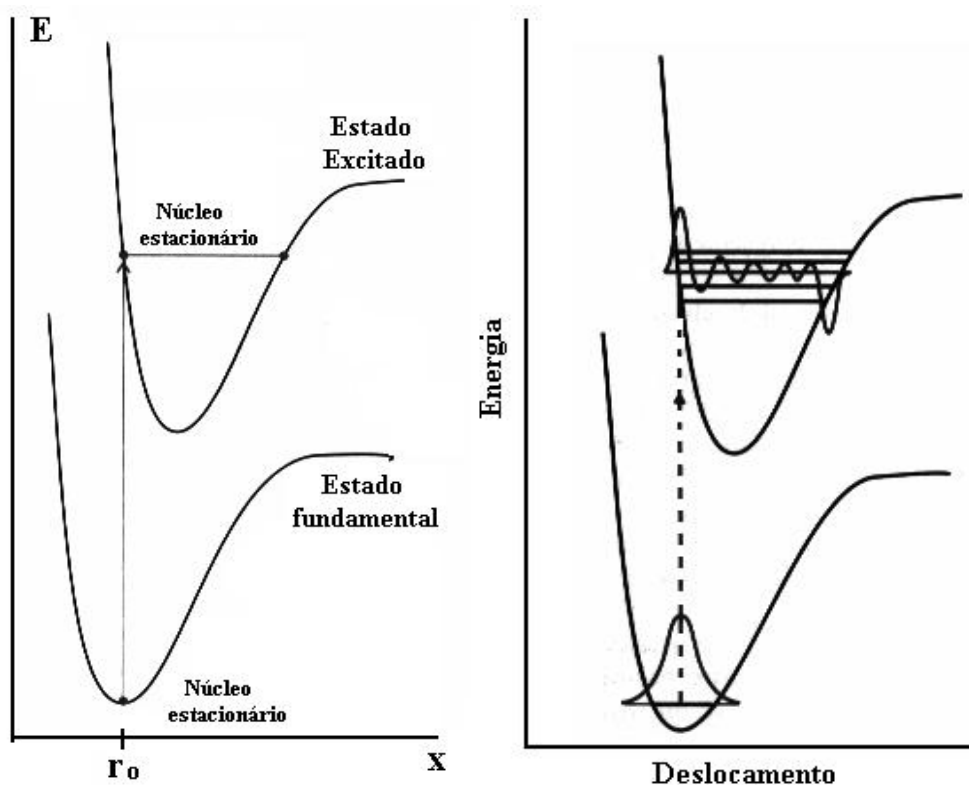


Figura 3.4 – À esquerda, transição vibrônica onde o núcleo permanece estacionário, mas o átomo muda para um nível energético vibracional segundo o princípio de Franck-Condon. À direita, uma transição mais detalhada do princípio de Franck-Condon, onde o átomo pode passar por mais de um nível vibracional.

FONTE: (Atkins, *Physical Chemistry*, sixth edition, 1998, pp. 498) – ambas figuras.

Como a resposta do núcleo é mais lenta que a do elétron na transição entre camadas eletrônicas praticamente não há alteração na distância internuclear de equilíbrio r_0 , o resultado é uma transição direta e linear entre as curvas de potencial [22]. Com isso, o átomo muda para um outro estado com

energia suficiente para desencadear vibração, já que a energia vibração é bem menor que a de transição eletrônica [34], como mostra o gráfico à direita na Figura 3.4.

O átomo segue em “vibração progressiva” passando por outros níveis energéticos até atingir o nível menos energético do estado excitado. Mesmo assim o átomo ainda está no estado excitado e para que o átomo transite de volta ao estado fundamental ocorre a emissão de um fóton [22]. Esse processo é chamado *fotoluminescência* e é composto por dois fenômenos, a *fluorescência* e a *fosforescência*.

A diferença entre os dois fenômenos é o tempo de ocorrência de cada um. Ambos ocorrem imediatamente após do átomo absorver energia, porém a fluorescência cessa imediatamente após que o átomo deixa de absorver energia; já a fosforescência permanece durante um longo tempo, mesmo depois que o átomo deixa de absorver energia.

A Figura 3.5 mostra a intensidade da fotoluminescência emitida em função do tempo, com e sem iluminação. Lá é visto que a fluorescência só ocorre enquanto houver excitação.

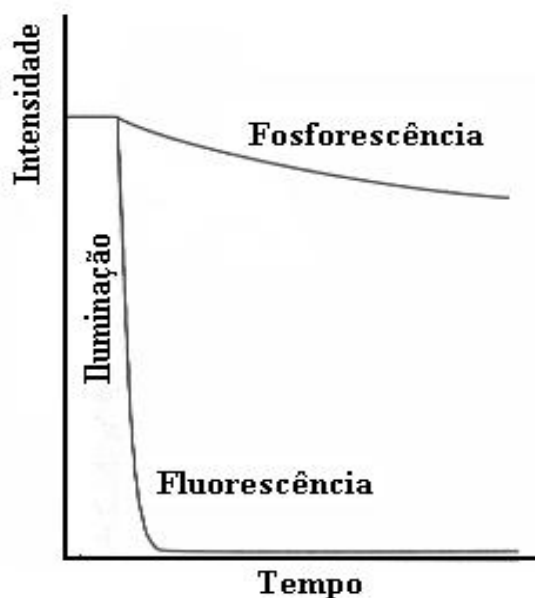


Figura 3.5 –Gráfico temporal da emissão da fluorescência e da fosforescência com e sem iluminação.

FONTE: (Atkins, *Physical Chemistry*, sixth edition, 1998, pp. 503)

A explicação física para a diferença no tempo de exposição dos dois fenômenos está relacionado aos tipos de camadas energéticas que ocorrerão a transição do elétron. Um singleto é um nível energético que comporta dois elétrons de spins opostos; a oposição dos spins torna o singleto estável e com alta probabilidade de ocorrência.

O tripleto é diferente do singleto porque ele é um nível energético que comporta dois elétrons de spins iguais; a falta da oposição entre os spins torna o tripleto instável e com baixíssima probabilidade de ocorrência [22].

Mesmo assim o potencial entre singletos e tripletos é semelhante. Se houver um Mecanismo no átomo que converta o singleto num tripleto quando o átomo estiver excitado, novos níveis de energia surgem, e o elétron passa por eles até atingir o de menor energia. Só depois acontece o decaimento vertical e então o átomo volta ao estado fundamental.

Se a transição de um elétron do átomo for entre dois singletos, o número de níveis eletrônicos percorridos será menor e o átomo logo volta ao seu estado de menor energia emitindo um fóton de luminescência. É por isso que ao cessar a energia de excitação do átomo num instante muito próximo a fluorescência também cessa, pois o átomo volta rapidamente ao estado fundamental. A Figura 3.6 mostra o esquema da emissão da fluorescência.

No caso da fosforescência a transição eletrônica ocorre entre um estado singleto e um tripleto. Sempre que o elétron transitar entre esses dois tipos de camada eletrônica um fóton fosforescente será emitido. O tempo de emissão fosforescente depende da probabilidade de ocorrência de estados tripletos, e podem durar desde segundos até horas. A Figura 3.6 também mostra o esquema da emissão da fosforescência.

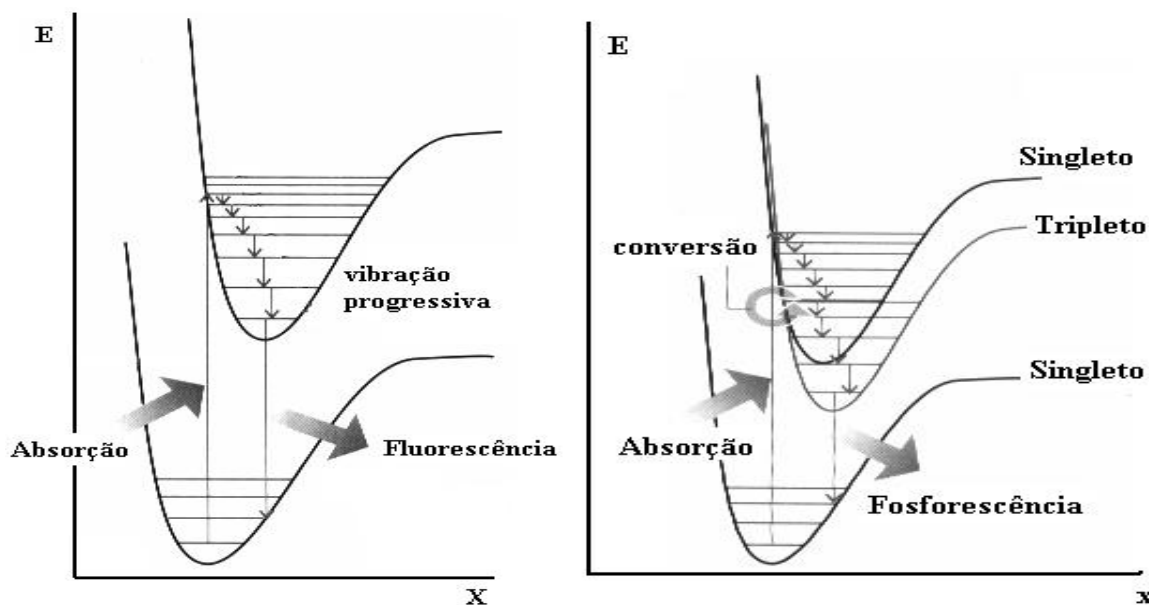


Figura 3.6 – À esquerda, esquema do processo quântico para emissão de um fóton da fluorescência, e à esquerda, é o esquema do processo de emissão de um fóton da fosforescência.

FONTE: (Atkins, *Physical Chemistry*, sixth edition, 1998, pp. 505) – ambas figuras.

A partir da Figura 3.6 também é possível observar que a energia absorvida será maior que a energia do fóton emitido, independente que seja fluorescente ou fosforescente, isso ocorre por causa da perda de energia por vibração e rotação. Assim, a frequência da radiação absorvida será maior que a da radiação emitida.

Uma molécula absorve radiação de várias frequências porque possui muitos elétrons que podem transitar para outras camadas, por isso é funcional analisar todo o espectro de absorção de uma molécula em um único gráfico. Do mesmo modo, essa molécula também fluoresce em várias frequências diferentes, de forma que é funcional analisar o espectro da fluorescência da molécula.

É interessante ver que é possível que um espectro de absorção e um de emissão possuam uma intersecção em alguma região do espectro possibilitando a transferência de energia. Neste caso o espectro de fluorescência de uma molécula doadora de energia coincidiria com o espectro de absorção de uma molécula aceitadora de energia, como mostra a Figura 3.7. Essa forma de transferência de energia é chamada *excitônica*.

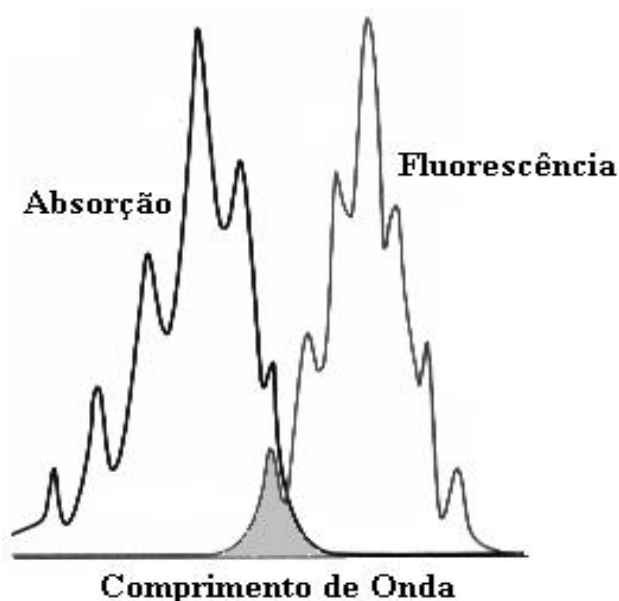


Figura 3.7 – Análise da transferência de energia pela intersecção dos espectros de absorção e fluorescência de duas moléculas.

FONTE: (Atkins, *Physical Chemistry*, sixth edition, 1998, pp. 503)

3.6 A fluorescência dos pigmentos das folhas.

Nas folhas a principal forma de transferência de energia é a excitônica, pois a principal forma de energia absorvida é luz e a transferência ocorre desde que haja uma molécula aceitadora na vizinhança de uma doadora de energia. Como foi mencionado antes (capítulo 2), a clorofila a (*Chla*) é o principal pigmento da folha porque absorve a energia solar e a energia emitida pelos demais pigmentos e a transfere para os centros de reação.

Porém nem toda fluorescência emitida pelos pigmentos é absorvida pela *Chla*, cerca de 5% é emitido para o ambiente e essa fluorescência será medida dos experimentos. A Figura 3.8 mostra o espectro de absorção (linha pontilhada), o comprimento de onda da excitação e o espectro da fluores-

cência (linha cheia) emitida por pigmentos presentes na folha, inclusive o da Chla, mostrando a possibilidade da transferência de energia na folha.

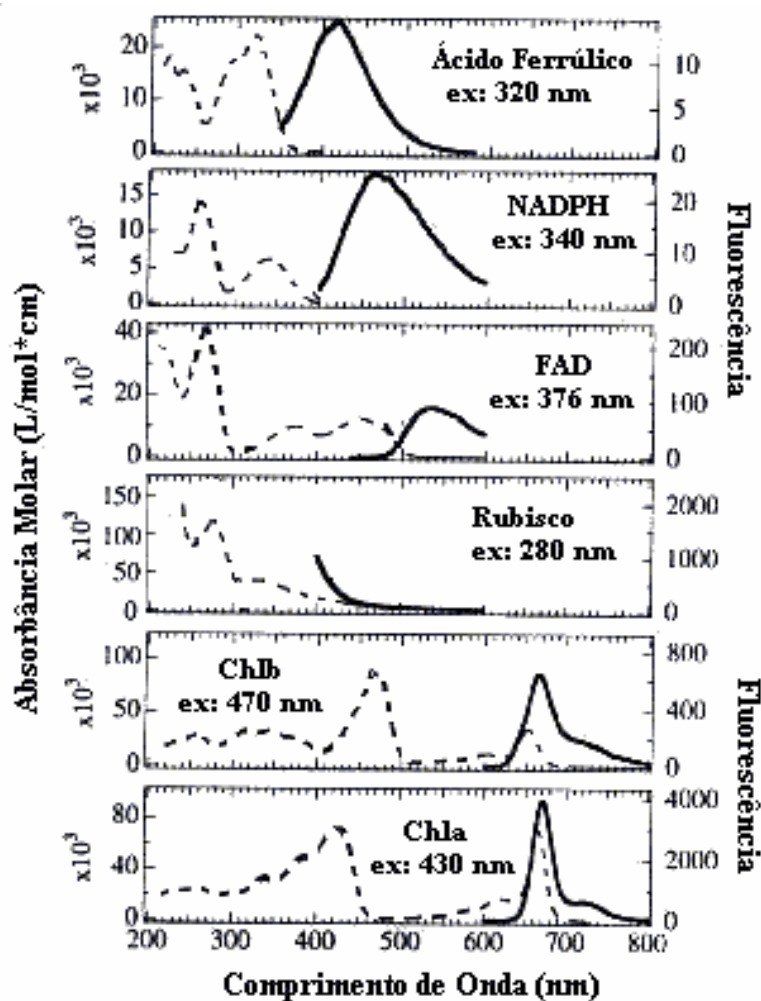


Figura 3.8 – Espectro de absorção e de fluorescência de alguns dos principais pigmentos da folha.

FONTE: (Cerovic et al., 1999).

A primeira informação extraída da Figura 3.8 é que a *Chla* e a *Chlb* juntas absorvem praticamente toda a fluorescência emitida pelo ácido ferrúlico e pelo NADPH, que absorvem fortemente na região do UV, e fluorescem na região entre o azul e o verde.

O ácido ferrúlico é um cromóforo encontrado na superfície das folhas e importante para a fotossíntese por absorver na região de UV. O NADPH, além de absorver radiação na mesma região, tem a função de armazenar energia para ser consumida no fotossistema I.

Outras substâncias como a flavina FAD e o Rubisco são melhores absorvedores na região do UV que o ácido ferrúlico e o NADPH, mas fluorescem menos, e em regiões de pouca absorção pelas clorofilas. No capítulo 2 também foi comentado sobre a importância do Rubisco para o FSI.

Apesar desses pigmentos comentados, a Chla a Chlb e os carotenóides constituem o conjunto de principais pigmentos da folha, pois eles são os pigmentos presentes em maior quantidade na estrutura de uma folha e conseqüentemente absorverão a maior quantidade de energia. As clorofilas ainda têm outro papel que é o de fluorescer na região onde os pigmentos dos centros de reação absorvem transferindo energia para eles.

Não é à toa que a fluorescência emitida na região do vermelho depende principalmente da concentração das clorofilas na folha, porque somente elas emitem nessa região. Vê-se na Figura 3.8, que parte da fluorescência emitida pela *Chla* pode ser absorvida pela própria *Chla* e pela *Chlb*, o que incrementaria o rendimento fotossintético porque essa energia, que antes seria dissipada, voltaria a ser utilizada no centro de reação.

Esse fenômeno de re-absorção energética é o responsável por apenas 5% da energia absorvida pela *Chla* ser liberada como fluorescência, além disso, o processo de re-absorção da fluorescência no vermelho pode ser uma forma de avaliar o potencial fotossintético da folha, visto que quanto mais fluorescência for emitida menor será a concentração de pigmentos na folha ou menor será a absorção dos pigmentos dos centros de reação [31].

Chapelle [10], analisando a deficiência de potássio em milho e o estresse hídrico em soja, observou o incremento da fluorescência emitida na região do vermelho, conforme mostra a Figura 3.9.

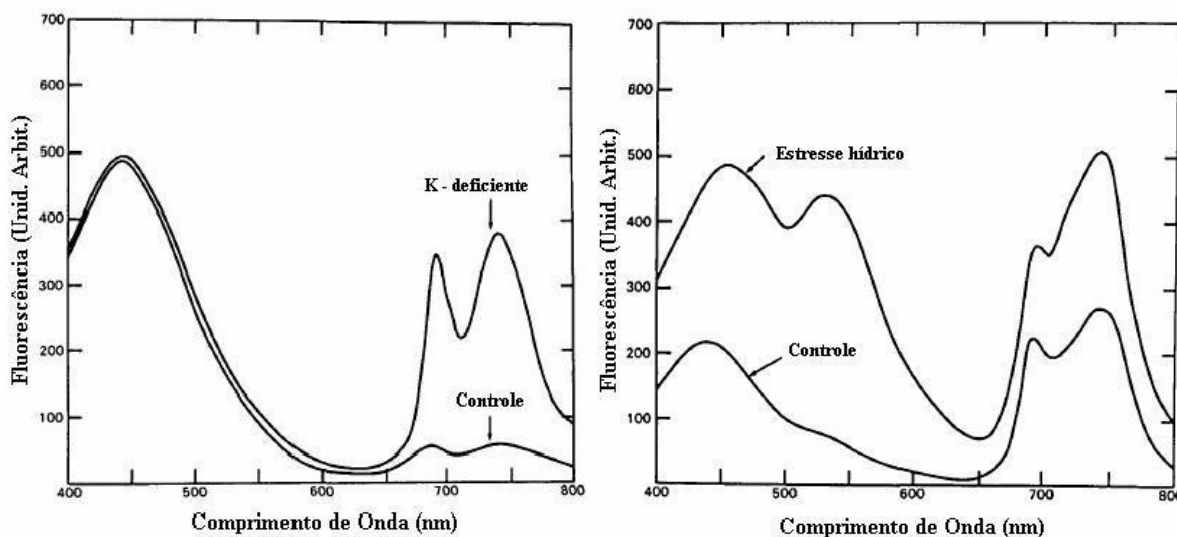


Figura 3.9 – À esquerda, espectro de fluorescência da folha do milho mostrando o incremento da fluorescência causado pela deficiência de potássio. À direita, espectro da fluorescência da soja mostrando que sob estresse hídrico todo o espectro muda.

FONTE: (Chapelle et al., 1984)

Sua conclusão foi que tanto a falta de potássio quanto o estresse hídrico diminuíram a eficiência fotossintética da folha aumentando fluorescência emitida, entretanto, a falta do mineral atingiu os

fotossistemas diretamente, enquanto que a falta de água afetou todo o transporte de energia para os centros de reação [10].

Uma característica específica da emissão de fluorescência pela folha é o comportamento temporal da emissão. A taxa de emissão da fluorescência da *Chla* de uma folha adaptada ao escuro obedece a um transiente de emissão assim que a folha absorve luz. O transiente ocorre devido à conversão da energia radiativa em energia química, que é caracterizado pela abertura dos centros de reação. A curva deste transiente é mostrada na Figura 3.10 e denominada de curva de Kautsky.

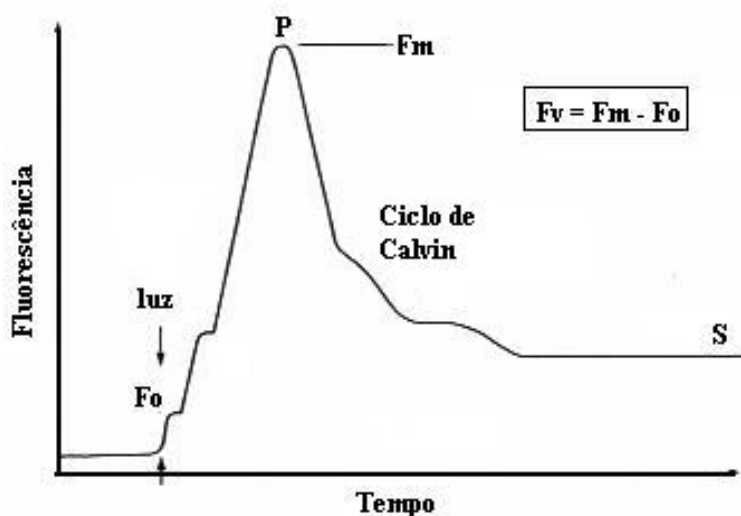


Figura 3.10 – Típico ciclo de Kautsky da fluorescência da clorofila *a*.

FONTE: (Lawlor, *Photosintesis*, tird edition, 2001, pp. 109)

Ao iluminar uma folha adaptada ao escuro, situação em que todos os componentes da cadeia transportadora de elétrons estão oxidados, a fluorescência imediatamente cresce para o nível F_0 . Quando a luz é absorvida provoca a separação de cargas no centro de reação, em seguida ocorrem as reações de oxi-redução até a formação da *plastoquinona reduzida*, logo após os centros de reação do FSII se fecham e a fluorescência atinge seu valor máximo, F_m (ponto P da figura) [21].

A diferença entre o máximo e o mínimo da fluorescência emitida e pode ser usada como parâmetro de avaliação da eficiência fotossintética. Ela reflete o balanço de energia transportado desde as antenas até os centros de reação e a energia usada nos processos fotoquímicos [31]. Esse parâmetro é chamado de fluorescência variável, F_v , e é dado por:

$$F_v = F_m - F_0 \quad (3.15)$$

Em seguida os elétrons da *plastoquinona reduzida* são transferidos ao *citocromo bf* e deste à *plastocianina*, iniciado o transporte de elétrons e o crescimento da fotossíntese, logo, a diminuição gradativa da fluorescência.

Outra mudança ocorre na fluorescência quando NADP é reduzido ao NADPH. Ele cede seus elétrons para propiciar o Ciclo de Calvin incrementando a fotoquímica e reduzindo a fluorescência [21]. Logo depois a fluorescência entra em estado permanente (ponto S). Todo o transiente pode durar até centenas de segundos [10].

4. PLANTAS AMOSTRAIS E SEU MEIO AMBIENTE

4.1 Introdução

A escolha da cultura a ser estudada é uma das mais importantes decisões a ser tomada. É importante que a cultura esteja apta ao clima do lugar onde ela será locada, adapte-se bem ao espaço físico disponível, seja de fácil transporte e que haja disponibilidade da cultura no local da pesquisa, pois uma análise estatística requer uma certa quantidade de amostras.

Para obter resultados precisos o meio ambiente ao qual as plantas estão expostas deve ser observado. Numa pesquisa de avaliações de estresse quaisquer grandezas como temperatura [18], fornecimento de água [8] entre outras, podem influenciar e até mascarar a medida. Eventualmente alguns equipamentos e dispositivos devem ser utilizados para fazer o monitoramento ou medições de algumas grandezas, para isso o ambiente deve propor condições para o uso dos equipamentos.

Neste capítulo será visto a cultura escolhida e seus principais motivos, além da descrição do ambiente ao qual foram expostas.

4.2 A cultura pesquisada

No estudo desenvolvido utilizaram-se laranjeiras como cultura de pesquisa. Seu uso se deu pela diversidade de espécies, pelo seu valor econômico bastante representativo para a produção nacional, visto que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de suco de laranja, e devido à facilidade de obter-se uma grande quantidade de amostras para os experimentos. A Figura 4.1 mostra a organização da produção de laranjas no Brasil.



Figura 4.1 – Fotos da organização das plantações de laranjas no Brasil

FONTE: (FUNDECITRUS, SP).

Das espécies disponíveis a escolhida foi a *Citrus Aurantium L.*, também conhecida como “laranja pêra”. Essa espécie é bem adaptada ao solo nacional e por isso sua produção é uma das maiores no país.

4.3 A idade das plantas

Um fator importante nesta pesquisa foi a idade das plantas, pois plantas ou árvores já envelhecidas dificultam o transporte devido à fixação das suas raízes, sua dimensão, em torno de 3 m de altura, e seu peso; além disso, plantas envelhecidas possuem um certo estoque de nutrientes que prolonga a resistência da planta a uma situação de estresse.

Por isso o uso de mudas de laranjeiras seria propício para a pesquisa. As mudas são compostas por uma única haste, eventualmente com 50 cm de altura, e algumas ramificações do caule onde crescem as folhas; as mudas são bem mais leves que as árvores, podem ser alocadas em vasos médios e elas também possuem menor resistência ao estresse.

Um outro fator importante para o uso das mudas é a freqüente presença de folhas novas devido ao seu desenvolvimento. As folhas novas possuem uma menor concentração de clorofila e por isso respondem rapidamente quando submetidas a um regime de estresse [8].

Entretanto, as mudas possuem um número muito menor de folhas que as árvores. Assim, todos os seus nutrientes são destinados a um pequeno número de folhas, enquanto que nas árvores os nutrientes são destinados a uma grande população de folhas. A escassez de nutrientes nas folhas enfatiza o regime de estresse.

O menor número de folhas também é um fator limitante da análise estatística do estado fisiológico da planta. A metodologia usada neste trabalho relaciona esse estado à média dos espectros de fluorescência emitida medidos em cada folha. Assim, quanto maior for o número de folhas numa planta mais precisa será a associação da média dos espectros ao estado fisiológico em que a planta se encontra.

Seguindo a mesma lógica capturar um único espectro em cada folha não mostra o comportamento real de cada folha, por isso a metodologia recomenda que sejam medidos muitos espectros em muitas folhas, assim a associação será precisa.

4.4 Modelos do estresse hídrico adotado na pesquisa

4.4.1 Generalizações dos modelos, recursos minerais e ambientais

A escolha de um modelo de estresse está associada ao possível controle das grandezas influentes sobre o estado da planta. As principais grandezas são de origem ambiental, como a temperatura, a umidade relativa, a velocidade dos ventos, a luminosidade e outras relacionadas com a transpiração das plantas; ou de origem mineral como a concentração dos nutrientes presentes no solo (nitrogênio, cálcio e potássio) e o fornecimento de água.

O objetivo deste trabalho foi estudar o estresse hídrico nas laranjeiras, e por isso, os modelos adotados têm influência direta no fornecimento de água. Entretanto, nem todas as grandezas ambientais puderam ser controladas devido aos recursos dispostos no laboratório.

As grandezas ambientais que não puderam ser controladas foram a temperatura, a umidade relativa e a luminosidade do ambiente. Embora não pudessem ser controladas elas foram monitoradas. O monitoramento dessas grandezas dá a possibilidade de buscar correlações entre as variações dos espectros de fluorescência das plantas e as medições das médias diárias das grandezas ambientais ao longo do período de estresse.

Para as variáveis minerais exceto a água, o controle estabelecido foi o de usar o mesmo material orgânico no mesmo volume para todas as plantas. Para isso foram usados vasos idênticos de 20 litros e o material orgânico foi adubo mineral produzido na FUNDICITRUS/SP.

Mesmo assim, não houve reposição dos minerais no material orgânico durante as medições, por isso não foi possível evitar a variação do teor de minerais no solo. A Figura 4.2 mostra a foto de uma muda preparada para o experimento.



Figura 4.2 – Foto de uma muda típica de laranjeira no vaso.

4.4.2 Particularidades dos modelos, secagem direta e hidratação periódica

Quanto ao controle no fornecimento de água, ele pode ser total ou parcial. No primeiro o fornecimento da água é suspenso totalmente e não há nenhum abastecimento dela até a secagem total da planta ou o fim das medições, enquanto que no segundo há o fornecimento com uma frequência estabelecida.

A diferença em usá-los está na resposta do organismo da planta. Com a secagem direta a planta altera suas propriedades funcionais e perde a capacidade de respiração, regeneração e produção de biomassa antes da concentração de clorofila da folha ser totalmente consumida [8].

Algumas características foram observadas quando a planta entra em fase de falência funcional causada pela secagem direta, como: o enrijecimento e enrugamento da folha; a mudança na forma da folha para evitar perdas por calor e a fraqueza na sustentação da folha ao ramo ligado ao caule. A Figura 4.3 apresenta uma folha submetida ao regime de secagem direta.

O uso da hidratação periódica vem para evitar as perdas funcionais da planta. Neste modelo o fornecimento de água à planta não é suspenso, mas é fornecido entre longos intervalos de tempo, normalmente entre três e cinco dias. Assim, é possível observar o comportamento do espectro de fluorescência da planta durante todo o período de estresse.



Figura 4.3 – *Folha de laranjeira submetida ao estresse hídrico.*

4.5 O meio ambiente das medições

O ambiente onde as plantas ficam alojadas também é de importância para o desenvolvimento da pesquisa. Como foi mencionado antes, algumas grandezas ambientais como luminosidade, temperatura, velocidade dos ventos, fornecimento de água, entre outros tem influência direta no estado fisiológico da planta, por isso podem induzir a planta a uma outra modalidade de estresse e assim mudar a forma do espectro da fluorescência emitida.

Além disso, diferentes espécies de plantas adaptam-se a diferentes localidades com condições climáticas e geográficas distintas; assim o desenvolvimento de uma planta pode ser afetado por uma condição imprópria para si.

Para este trabalho as plantas foram alojadas em duas localidades diferentes dentro do Instituto de Física de São Carlos, durante duas fases distintas da pesquisa. O uso dessas localidades é devido à proximidade aos laboratórios de medição.

Numa primeira fase as plantas estavam num local aberto ao meio ambiente, expostas diretamente à iluminação solar e as outras condições ambientais. Apesar do risco das chuvas nas plantas sob estresse o interesse era o aumento da transpiração das plantas. Esperava-se que dessa forma a manifestação do estresse hídrico nos vegetais fosse acelerada.

Como consequência houve uma acentuada alteração no padrão da fluorescência medida tanto para plantas sob estresse quanto sob controle. Com isso a análise da comparação entre ambos se tornou incompleta e foi necessário fazer novas medidas com um outro conjunto de amostras em um outro ambiente.

É possível que essa resposta da planta estivesse associada a um stress causado por excesso de luz. Segundo *Lawlor* [31], o excesso da luminosidade pode causar danos ao sistema de captura de luz das folhas, principalmente ao fotosistema II, e alterações genéticas na estrutura celular das folhas; por isso essa “fotoinibição” é comum entre as plantas que não estão adaptadas ao ambiente em que vivem.

Numa segunda fase as amostras foram alocadas numa área coberta que provia condições semelhantes a de uma estufa. Ali as plantas estavam protegidas do excesso de iluminação, das chuvas e da velocidade dos ventos. Com isso a transpiração das plantas foi atenuada e as análises dos resultados apresentaram conclusões consistentes. Fotos dessa área coberta são mostradas na Figura 4.4.



Figura 4.4 – Fotos da área similar a uma estufa próxima aos laboratórios de medidas.

4.6 Luminosidade, temperatura e umidade relativa

O próximo e último passo era o monitoramento da luminosidade, da temperatura e da umidade relativa. Para isso foram utilizados um luxímetro digital para medição da intensidade luminosa em lux e um termo-higrômetro digital para medição da temperatura do ambiente em graus centígrados e da umidade relativa em unidades adimensionais. A Figura 4.5 mostra fotos dos equipamentos utilizados.

Tabela 4.1 – Características dos equipamentos de medição dos agentes ambientais

Equipamento	Grandeza	Unidade	Leitura	Erro
Luxímetro	Intensidade luminosa	Lux	1 lux a 50.000 lux	4%
Termo-higrômetro	Temperatura	°C	0 °C a 50 °C	1 °C
	Umidade relativa	Adimensional	20% a 90%	5%



Figura 4.5 – À esquerda um luxímetro digital e à direita um termo-higrômetro digital; utilizados no monitoramento da luminosidade, da temperatura e da umidade relativa.

FONTE: (www.minipa.com.br, acesso em 05/06/2005).

5 FERRAMENTAS DE ANÁLISE

5.1 Introdução

Neste trabalho a fluorescência foi escolhida como o principal sinal a ser analisado porque ela traz informações precisas sobre as características moleculares. Nos últimos anos os pesquisadores vêm desenvolvendo novas técnicas para extrair da fluorescência das folhas algumas informações sobre as plantas, como a eficiência dos fotossistemas [7], a dependência da eficiência com a temperatura [18],[5], entre outras.

Neste capítulo serão expostas as técnicas utilizadas para extrair informações sobre a presença do estresse hídrico em laranjeiras, a partir do espectro da fluorescência emitida pelas folhas. Primeiro será analisado a espectroscopia da fluorescência emitida, que é composta por duas partes: o estudo do comportamento do espectro da fluorescência e do comportamento temporal de razões entre a fluorescência emitida em duas regiões diferentes do espectro eletromagnético.

Através do comportamento do espectro obtêm-se informação sobre a emissão de fluorescência em cada uma das regiões do espectro eletromagnético. E como a emissão nas regiões é independente uma das outras [8] é possível extrair alguma informação sobre o estado fisiológico da planta através do espectro da fluorescência emitida.

Uma razão de fluorescência facilita a análise do espectro porque relaciona a fluorescência emitida em diferentes regiões do espectro. Dessa forma fica mais evidente uma alteração no espectro da fluorescência emitida causado por algum agente ambiental [8].

Em seguida será abordada a interpretação das imagens de fluorescência, mostrando que o gradiente da fluorescência emitida mostra quais regiões da superfície da folha estão sendo mais afetadas por um agente ambiental.

Por último veremos a aplicação de uma técnica da quimiometria sobre os espectros de fluorescência medidos tentando diferenciar as amostras com e sem o déficit hídrico. A técnica será a *Análise dos Componentes Principais* ou *PCA* (do inglês, *Principals Components Analysis*), ela busca correlações entre as variáveis dos espectros medidos e agrupa as medições com comportamento semelhante em regiões de um gráfico.

5.2 A espectroscopia da fluorescência da folha

A espectroscopia é uma técnica tradicional aplicada nos mais diversos ramos do conhecimento consistindo no estudo da resposta de uma ou de um grupo de moléculas a uma excitação externa. Tan-

to a excitação quanto a resposta serão sempre radiações só que de comprimentos de onda diferentes. O resultado final obtido é o conjunto de medições das intensidades da fluorescência, que também é conhecido como espectro da fluorescência.

O espectro eletromagnético usual na espectroscopia é bastante vasto, indo desde as ondas de rádio frequência até os raios gama. Neste trabalho foi analisada apenas a fluorescência emitida na região do visível, pois até hoje esta tem sido a região mais rica em informações sobre a fisiologia das plantas [8].

É através da espectroscopia da fluorescência que é possível estimar a influência dos fatores ambientais no estado fisiológico das laranjeiras, e em particular a influência do estresse hídrico. A presença de um estresse ambiental como o estresse hídrico certamente alteraria os sistemas funcionais das laranjeiras, prejudicando o seu desenvolvimento e o seu rendimento.

5.2.1 O espectro da fluorescência

Na espectroscopia o estudo mais simples é a observação direta do comportamento do espectro das amostras. Se duas amostras forem submetidas a condições ambientais diferentes certamente a emissão da fluorescência será diferente. A Figura 5.1 mostra os resultados obtidos por *Chapelle* [10] analisando a falta de potássio em milho e o estresse hídrico em soja.

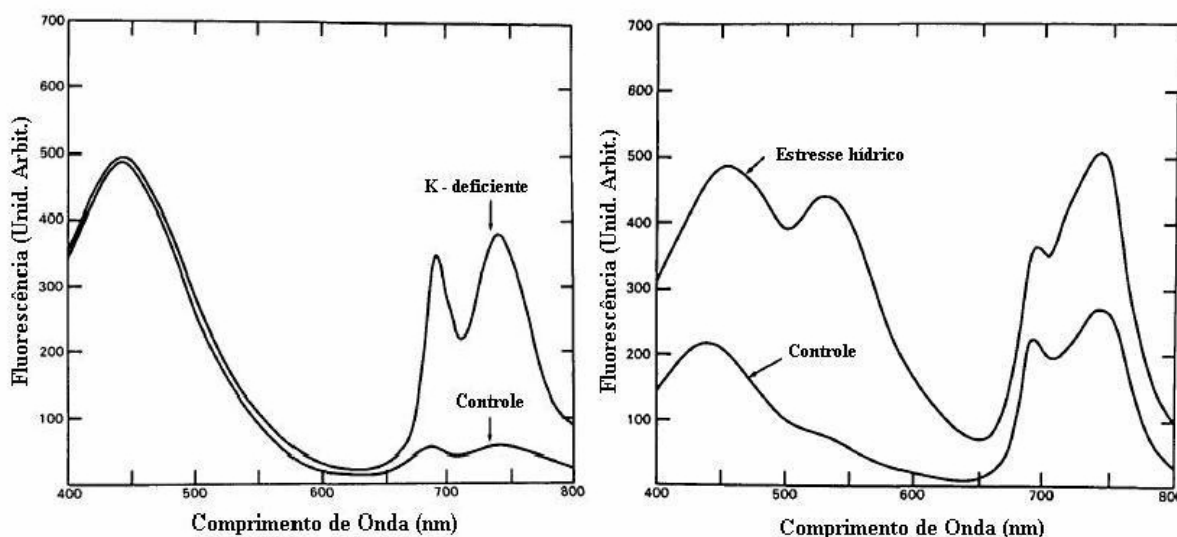


Figura 5.1 – Resultados obtidos por *Chapelle* analisando a deficiência de potássio em milho (gráfico à esquerda) e a falta de água em soja (gráfico à direita).

FONTE: (Chapelle et al., 1984).

Nos gráficos vemos que para ambos experimentos o espectro da fluorescência mudou. Para o milho, mudou apenas na região do vermelho, já para a soja a fluorescência mudou em quase todo o espectro [10].

Para facilitar a análise da fluorescência na região do visível, esta região foi dividida em outras regiões menores, que tem como principal característica uma banda de emissão de fluorescência de cerca de 20 nm de largura (FWHM). Assim, ficaria mais fácil se referir à fluorescência de uma região, e não de um comprimento de onda [8].

A primeira é a região do azul que compreende entre 400 e 500 nm. A fluorescência emitida ali é chamada fluorescência do azul, ou BF (do inglês, *blue fluorescence*). A próxima região é a do verde, GF (green fluorescence), que está entre 500 e 650nm. Juntos eles formam a BGF (*blue - green fluorescence*).

A outra região vai desde 650 até 800 nm, e é chamada de fluorescência da clorofila ou ChlF (do inglês, *chlorophyll fluorescence*). A ChlF ainda se divide em mais duas regiões, a da fluorescência no vermelho ou RF (*red fluorescence*) entre 650 a 700 nm, e a da fluorescência do infra-vermelho próximo ou FRF (*far red fluorescence*) entre 700 e 800 nm.

Essas regiões foram escolhidas porque há picos de emissão da fluorescência das folhas em cada uma delas; na BF o pico é em 440 nm, na GF é em 520, na RF ocorre em 690 e na FRF o pico está em 740 nm. A Figura 5.2 mostra essas regiões descritas acima e os picos nos respectivos comprimentos de onda.

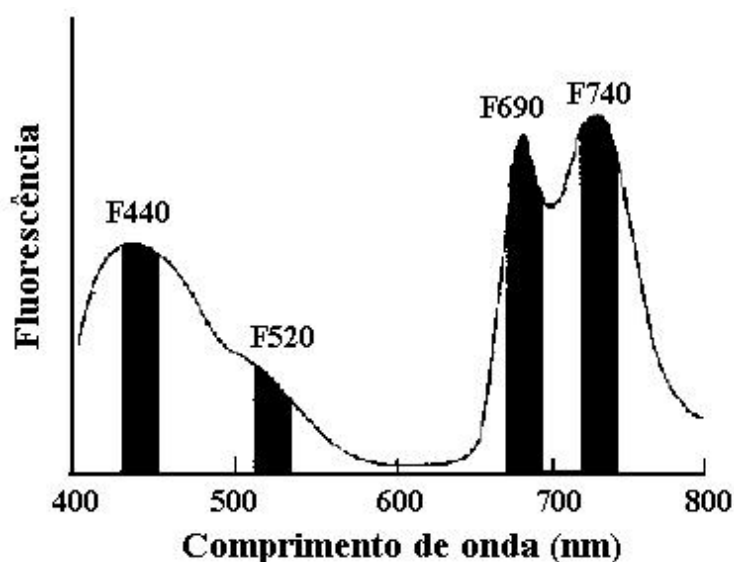


Figura 5.2 – Típico espectro de emissão de fluorescência da folha de uma espécie. Picos de fluorescência nas regiões do espectro BF, GF, RF e FRF.

FONTE: (Liechenthaler and Miehe, 1997)

Já na Figura 5.3 são mostrados os espectros da fluorescência da folha da laranjeira usando duas fontes de excitação, luz azul em 442 nm e luz verde em 532 nm. Lá vemos a mudança do espectro devido à excitação de duas fontes diferentes. Esta figura ainda mostra dois picos menores na região do azul e verde, esses picos são uma pequena porcentagem das radiações de excitação que não foi filtrada pelo equipamento.

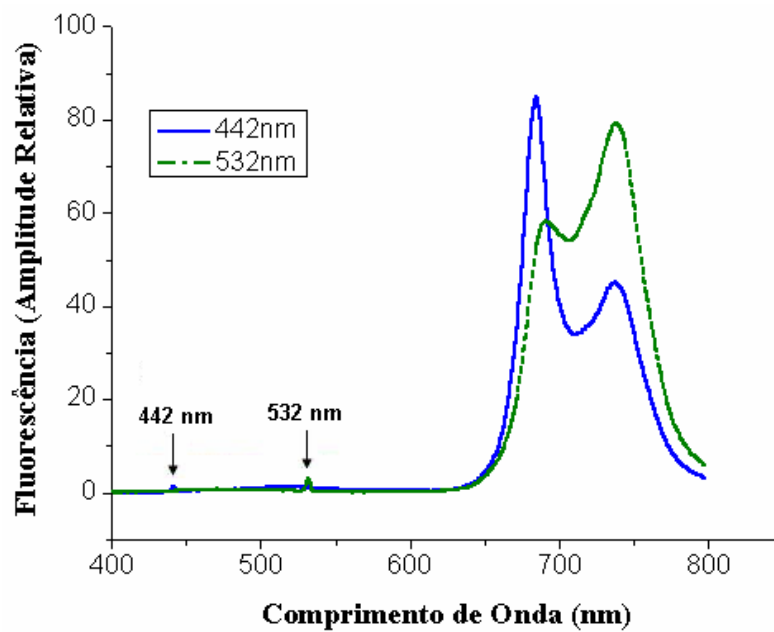


Figura 5.3 – Espectro da fluorescência emitida pela folha da laranjeira quando excitada com duas fontes de luz, uma emitindo em 442 nm e outra emitindo em 532 nm.

Para que seja feita a comparação entre as intensidades de cada espectro é necessário haver uma padronização no formato do espectro, por isso, todos os espectros foram normalizados pelo pico da excitação que não foi bloqueada. Assim, todos os espectros estarão numa mesma escala, onde o pico da excitação será unitário.

A análise dos espectros é feita de forma direta, comparando as intensidades relativas da fluorescência medida em cada comprimento de onda. Os espectros da Figura 5.3 não estão normalizados, mas conseguem mostrar a diferença no formato de um espectro de fluorescência quando a excitação é luz azul ou verde.

5.3 Razões de fluorescência

As razões de fluorescência são ferramentas importantes para identificar mudanças fisiológicas em uma laranjeira porque a emissão da fluorescência da folha em regiões diferentes do espectro de-

pende de um grupo específico de moléculas, logo, as emissões de fluorescência são independentes uma das outras.

Com isso, se uma mudança fisiológica de uma laranjeira tem maior representatividade para moléculas que fluorescem na região do azul que para as que fluorescem no verde, por exemplo, a razão entre a fluorescência das regiões azul e verde identificaria a mudança no estado da laranjeira [8].

As principais razões de fluorescência utilizadas são a RF/FRF, que é a razão entre a fluorescência em 685 nm e em 735 nm (F685/F735); e a BF/ChlF, que é composta por duas outras razões, BF/RF e BF/FRF; sendo a BF/RF a relação entre a emissão em 450 e 685 nm (F450/F685) e a BF/FRF a relação entre 450 e 735 nm (F450/F735).

Tabela 5.1 – Emissão da fluorescência nas regiões do espectro eletromagnético.

Região	Comprimento de onda	Pigmento principal	Característica
Azul	450 nm	Ácido ferrúlico, NADP e NADPH	Origem na superfície da folha. Dependente da temperatura
Verde	530 nm		
Vermelho	685 nm	Chla	Clorofila no FSII
	735 nm	Chla	Clorofila no FSI e no FSII

Fonte: (CEROVIC *et al*, 1999).

Obs: Os espaços em branco indicam que ainda não há conclusões sobre essas informações.

Tabela 5.2 – Razões de fluorescência

Razão	Razão	Utilidade
BF/ChlF	F450/F685	Alta sensibilidade para deficiência de nutrientes e de água.
	F450/F735	
RF/FRF	F685/F735	Conteúdo da clorofila na folha, estresses ambientais, rendimento dos fotossistemas.

5.3.1 RF/FRF

Essa foi a primeira razão de fluorescência usada porque depende unicamente do conteúdo da clorofila na folha e da anatomia da folha [8]. Ela é bastante precisa para monitorar o conteúdo da clorofila em folhas pálidas, mas perde a sensibilidade drasticamente quando aplicada a folhas verdes [14].

Alguns pesquisadores preferem trabalhar com a razão F690/F740, por causa do processo de re-absorção da fluorescência do vermelho, utilizando-a para avaliar a degradação da clorofila, dos carotenóides e do aparato fotossintético [11].

Porém, o principal uso dessa razão é na detecção de estresses. Um estresse ambiental provoca mudanças mensuráveis no desempenho dos fotossistemas, principalmente no FSII, que é diretamente influenciado pelos agentes ambientais por necessitar da água, luz e minerais para liberar prótons e elétrons para a tilacóide e o citocromo, respectivamente (capítulo 2).

Por isso, essa razão é utilizada com sucesso na detecção de estresses por temperatura [2] e [3], e é usado como ferramenta auxiliar para detecção de falta de nutrientes [8]. A RF/FRF também é utilizada para detectar a deficiência de água na folha. E de acordo com os resultados obtidos pelos pesquisadores o comportamento temporal desta razão varia com a espécie, podendo crescer ou decrescer.

Cerovic em seu artigo de revisão [8] cita o trabalho de *Theisen* em bordo (1988) [19], árvore típica da América do Norte, onde ele detecta um pequeno incremento da RF/FRF (0.8 – 1.1) . Ele também cita o trabalho de *Danh e colaboradores* em milho (1992) [12], que mediu o decrescimento da RF/FRF.

5.3.2 BF/ChlF

Certamente as razões BF/RF e BF/FRF que compõem a BF/ChlF são as mais sensíveis porque relacionam duas regiões em que as origens da fluorescência são bem distintas.

A fluorescência na região do azul depende principalmente da concentração de ácido ferrúlico na superfície da folha, pois o ácido ferrúlico é um dos principais pigmentos que emitem nessa região. Como o ácido ferrúlico absorve muito bem na região do UV, a folha usa-o como forma de proteção contra o excesso dessas radiações que podem deteriorar o sistema fotossintético e dissociar as moléculas.

Assim, o aumento da concentração de ácido ferrúlico na superfície da folha, e conseqüentemente a fluorescência na região do azul, mostra que a planta não está se adaptando ao meio ambiente externo [8].

Por outro lado, os principais pigmentos que absorvem nesta mesma região do azul são as clorofilas e os carotenóides, logo, uma planta adaptada ao ambiente em que vive incrementaria a fluorescência no azul se a concentração desses pigmentos diminuísse na folha. Por causa da alta sensibilidade aos fatores ambientais, as BF/ChlF também são usadas para detectar estresses ambientais, principalmente de minerais.

Chapelle [9] comparou a razão RF/BF do milho com deficiência em potássio, ferro, manganês, fósforo, nitrogênio e enxofre e plantas sem deficiência. A Figura 5.4 mostra os resultados obtidos pelo

pesquisador, que usou o inverso da razão apresentada para que os valores ficassem entre 0 e 1. A BF/RF também já foi usada para detectar estresse hídrico, quando *Theisen* [19], submeteu bordo ao estresse, e mediu um aumento da razão de 0.9 a 6.1.

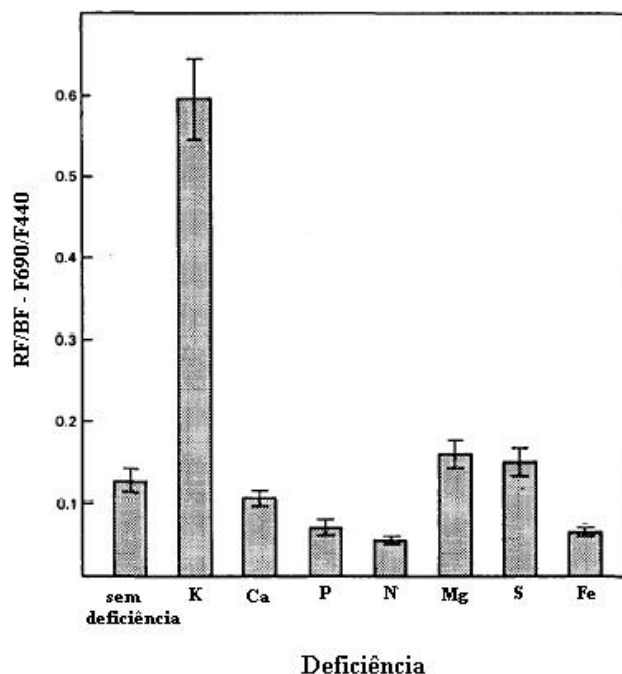


Figura 5.4 – O uso da RF/BF para avaliar a deficiência de minerais em milho.

FONTE: (Chapelle et al., 1984)

5.3.3 Limitações das razões de fluorescência

A principal limitação no uso da razão de fluorescência para observar mudanças no estado fisiológico das plantas é o ruído óptico embutido no espectro medido. O ruído óptico é característico da luz de fundo que acompanha a medida. Sempre que a medida é feita em lugares iluminados uma pequena parcela da luz do ambiente, que não é a fluorescência, entra como sinal medido, na forma de ruído óptico.

Uma forma de minimizar o ruído óptico é fazer medições em ambientes escuros, mas vale lembrar que uma vez adaptada ao escuro os fotossistemas fecham seus centros de reação, e a cinética da emissão da fluorescência passa a ser diferente da de uma planta adaptada à luminosidade (capítulo 3).

As medições foram feitas em um laboratório que possuem iluminação ambiental por lâmpada fluorescentes, que emitem luz branca num espectro quase uniforme. Por isso, podemos aproximar o ruído óptico como um ruído branco que terá a mesma intensidade em todos os comprimentos de onda do espectro visível.

Assim, a consequência da presença do ruído na medição é a existência de uma linha de base no espectro medido. Uma linha de base é um valor uniforme que é adicionado a todas as intensidades do espectro e mascaram o valor real de um valor medido da fluorescência, como mostra a Figura 5.5.

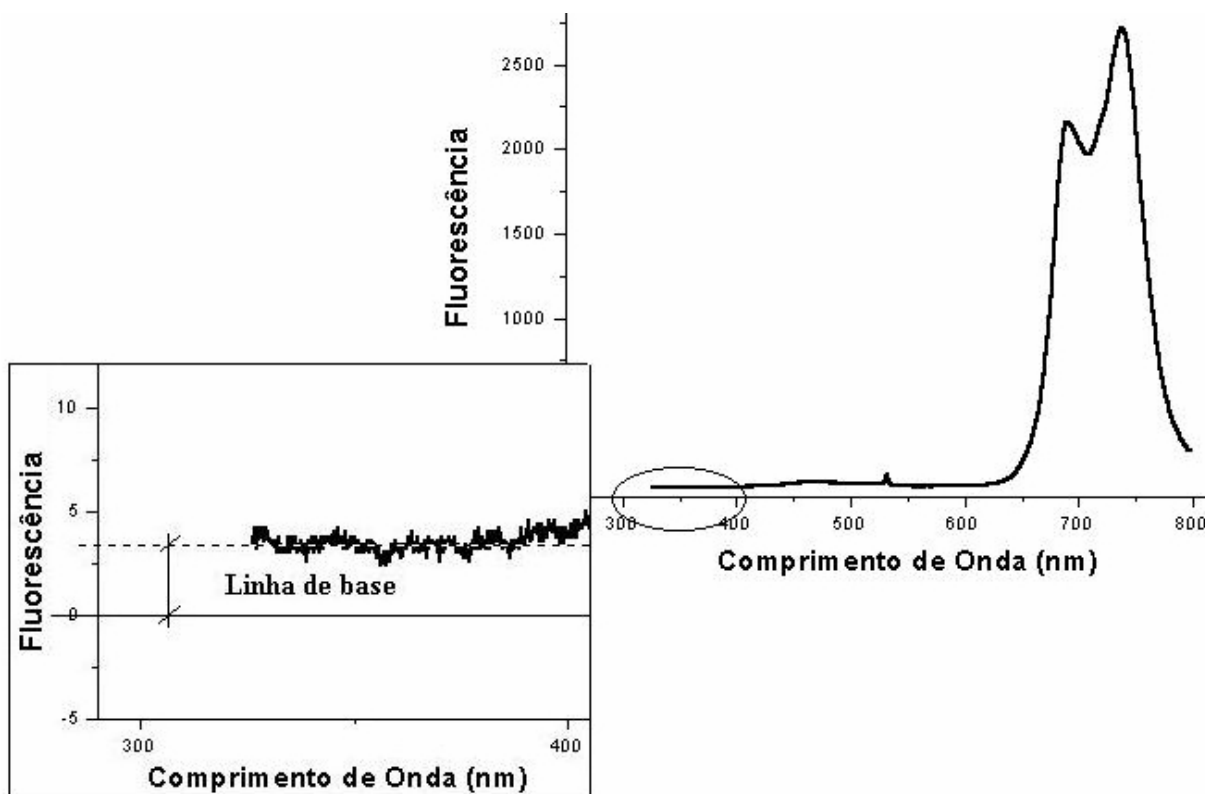


Figura 5.5 – Espectro de fluorescência em detalhe para destacar a linha de base.

Uma razão de fluorescência qualquer de duas emissões F_x e F_y , com variação ΔF_x e ΔF_y causadas pela linha de base, possui valor esperado (R) quando a linha de base é removida e valor calculado a partir da medição (R') quando há a linha de base. Podemos concluir que a relação entre R e R' será:

$$R = \frac{F_x}{F_y} \quad (5.1)$$

$$R' = \frac{F_x + \Delta F_x}{F_y + \Delta F_y} = \frac{F_x \left(1 + \frac{\Delta F_x}{F_x}\right)}{F_y \left(1 + \frac{\Delta F_y}{F_y}\right)} = \frac{F_x}{F_y} \left(1 + \frac{\Delta F_x}{F_x}\right) \left(1 - \frac{\Delta F_y}{F_y}\right) \quad (5.2)$$

$$R' = \underbrace{\frac{F_x}{F_y}}_R + \underbrace{\frac{1}{F_y^2} (F_y \Delta F_x - F_x \Delta F_y - \Delta F_y \Delta F_x)}_{\text{erro}}$$

Ou seja, há um erro no cálculo da razão sem a remoção da linha de base e ela pode ser removida ao subtrair de cada ponto do espectro o valor médio das menores intensidades de fluorescência emitida, mostrada na Figura 5.5. Dessa forma, os menores valores de emissão da fluorescência estarão em torno do zero.

Uma outra forma de eliminar o ruído óptico é através do uso de um amplificador *lock-in* que faz a detecção em sincronismo com um sinal de referência. Se um sinal elétrico com uma frequência definida ativa as fontes de excitação, na saída dos lasers haverá um feixe modulado que emite pulsos de luz com essa mesma frequência. Dessa forma a fluorescência também seria emitida pela folha com a mesma frequência do sinal de excitação.

E para fazer a detecção síncrona basta que o sinal de referência esteja locado, isto é na mesma frequência, que o sinal de modulação dos lasers. Dessa forma apenas o sinal com frequência, ou seja, a fluorescência, seria medida. O ruído óptico seria eliminado porque ele é emitido continuamente (com frequência nula).

O problema do uso desta técnica está no fato de que a emissão da fluorescência da folha tem uma dependência temporal mostrada na curva de Kautsky. Por isso um estudo mais aprofundado deve ser realizado para utilizar esta técnica com precisão. Neste trabalho não houve a utilização de detecção síncrona do sinal da fluorescência.

5.4 Imagens de fluorescência

A imagem de fluorescência é uma técnica usada para comparar a emissão da fluorescência numa área ampla, como uma superfície.

As imagens podem ser de dimensão macroscópica, onde mostra a emissão em áreas de dezenas a centenas de centímetros quadrados, ou microscópica, de uma área entre dezenas e centenas de micrômetros quadrados. Para ambas a qualidade da formação da imagem depende apenas da precisão do equipamento na ampliação da imagem.

A formação de imagens de fluorescência vem sendo uma das principais técnicas utilizadas na pesquisa, graças ao poder de resolução das câmeras atuais. Seguindo essa tendência, imagens da fluorescência das folhas vêm sendo usadas com frequência no agronegócio. Elas já foram utilizadas com sucesso para avaliação do metabolismo e do crescimento das plantas [4] e detecção de estresses [17].

Computacionalmente uma imagem é uma matriz de $m \times n$ pixels, onde m e n são os números de pixels nas direções vertical e horizontal; um pixel é a menor unidade da imagem computacional e possui uma cor específica que compõe a imagem.

Matematicamente a representação usual de uma imagem é através de uma matriz tridimensional $j \times k \times 3$, onde j e k são as coordenadas horizontal e vertical da matriz. Da mesma forma que uma cor qualquer pode ser decomposta em intensidades do vermelho, do verde e do azul (padrão RGB), uma imagem pode ser decomposta em três matrizes bidimensionais onde cada ponto de uma matriz representa a intensidade de uma das cores citadas [23].

Uma outra forma de analisar uma imagem é através da matriz de intensidades ou em escala de cinza. Seu formato matemático é de apenas uma única matriz $j \times k$ onde o valor de cada ponto pode variar entre 0 a 1 e representa a intensidade daquele ponto na imagem. Por definição a cor preta é relacionada à intensidade 0 e a cor branca ao valor 1, os demais valores são distribuídos na escala de cinza entre o preto e o branco [23].

A Figura 5.6 mostra a composição de uma figura colorida, formada por componentes azul, vermelha e verde, e uma matriz em escala de cinza.

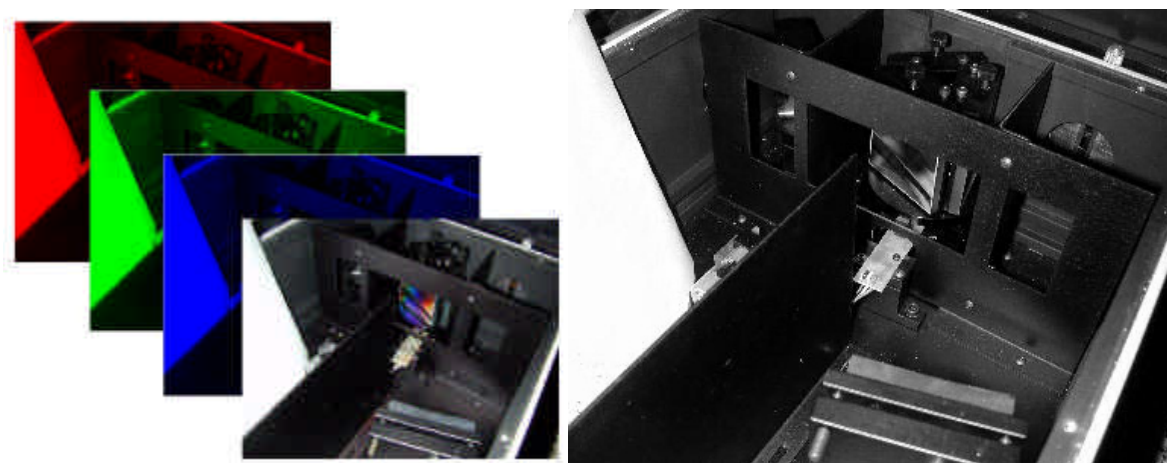


Figura 5.6 – Padrões usais de imagem. À esquerda o padrão RGB onde uma imagem é decomposta em três imagens das contribuições do vermelho, do verde e do azul na imagem colorida. À direita a mesma imagem no padrão de intensidades ou escala de cinza.

Liechtenthaler [17], um dos pioneiros nos estudos de imagens de fluorescência, escreveu trabalhos sobre a formação de imagens de fluorescência, usando folhas de tabaco e radiação UV como excitação, e sobre a análise dos resultados obtidos. A Figura 5.7 mostra os resultados obtidos neste trabalho de formação de imagens de fluorescência de folhas de tabaco.

As imagens feitas são da fluorescência da folha nos picos de emissão da BF, GF, RF e FRF. As imagens feitas são da intensidade emitida, e as falsas cores, que estão relacionadas com a intensidade da emissão, ajudam a melhorar a visualização do gradiente de emissão da superfície da folha.

A figura mostra que alguns dos resultados são imagens das razões de fluorescência, para isso é preciso um processamento matemático das imagens em um software específico como o MatLab®. Por

fim ele fez imagens do tabaco submetido ao estresse hídrico e estresse de temperatura. Os resultados são mostrados na Figura 5.8.

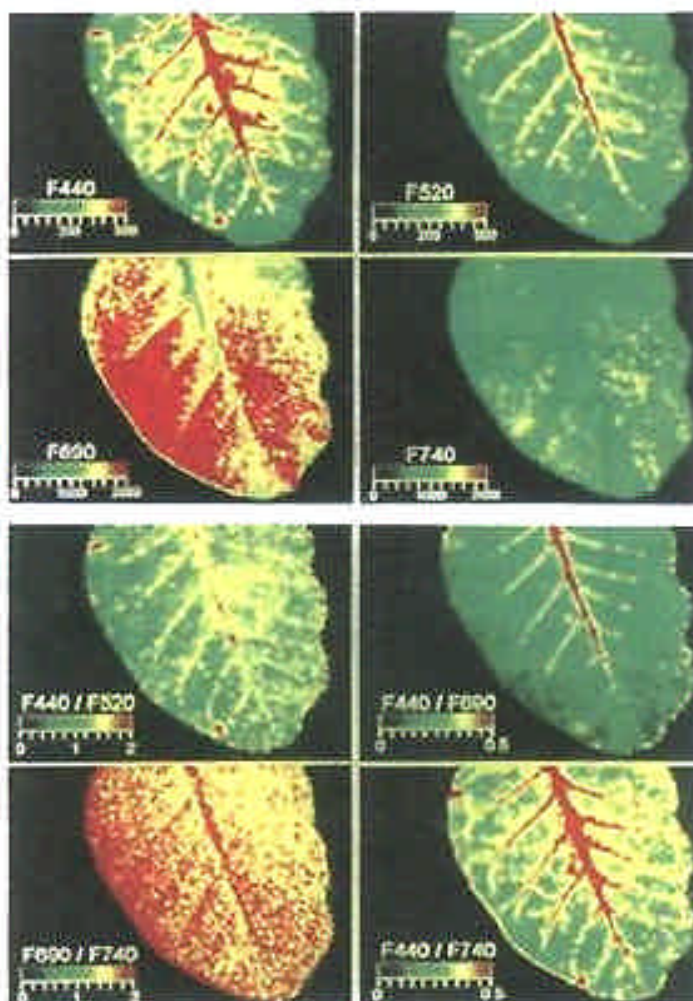


Figura 5.7 – Resultados obtidos por Liechenthaler ao fazer imagens de fluorescência de folhas de tabaco.

FONTE: (Liechenthaler and Miehé, 1997)

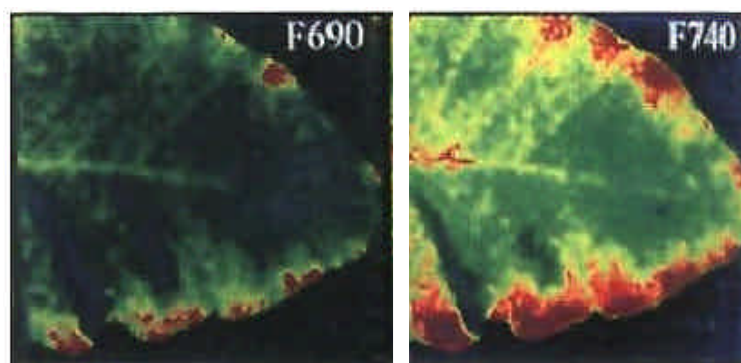


Figura 5.8 – Imagens de fluorescência de folha de tabaco submetida ao estresses hídrico e de temperatura.

FONTE: (Liechenthaler and Miehé, 1997)

5.5 Quimiometria aplicada aos espectros da fluorescência

A intenção dos pesquisadores ao realizar um experimento é extrair o máximo de informações sobre o fenômeno e sobre a montagem experimental. Porém, em alguns casos, não basta apenas fazer as medições, porque outros fatores como ruídos ou imperfeições dos equipamentos ou da montagem, podem mascarar a interpretação dos resultados.

Isso requer o uso de técnicas complementares capazes de retirar as informações desejadas dos dados medidos e técnicas estatísticas são um exemplo desse tipo de procedimento de seleção das informações.

O uso da quimiometria é um exemplo dessas técnicas estatísticas que passaram a ser adotada em face da necessidade de se obter o máximo de informações dos resultados experimentais.

Ela é uma ferramenta organizacional que propõe a organização e validação dos dados obtidos, busca correlações entre as variáveis da medição através de uma seqüência de tratamentos estatísticos e matemáticos, agrupa as medições com mesma característica em regiões específicas de um gráfico com novos eixos calculados a partir das variáveis do sistema medido; e finaliza o processo propondo um modelo matemático de reconhecimento de padrões.

Neste trabalho foram realizadas todas as etapas, exceto a modelagem reconhecimento de padrões, que foi proposto como trabalho futuro. O processamento da técnica foi realizado utilizando uma versão demonstrativa do software *Unscramble*[®].

5.5.1 Organização e validação dos dados

Esta etapa envolve o período antes e depois do experimento. Antes do experimento o pesquisador deve se precaver de informações do tipo:

- Saber como os dados foram originados
- Que método foi usado na medição
- A precisão de cada variável
- Conhecimento de análises anteriores
- A existência de informações úteis sobre a análise

Quanto aos dados obtidos neste trabalho a origem, o método e a precisão foram apresentados nos capítulos anteriores. Também não há análises anteriores nem informações pertinentes da aplicação da quimiometria a espectros de fluorescência das folhas publicadas em referências científicas.

De posse dos dados do experimento o pesquisador passa a avaliar se os resultados possuem ou não um comportamento esperado e elimina os resultados que não possuem, ou que faltam dados. Em

seguida os dados validados devem ser agrupados em uma matriz de dados $X(m,n)$, onde m são os números de resultados obtidos e n é o número de variáveis [37].

Os tipos de dados mais comuns que a quimiometria é aplicada são espectros e cromatogramas. Neste trabalho as variáveis são os comprimentos de onda do espectro e as amostras são as intensidades da fluorescência emitida.

$$X = \begin{matrix} \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & & \\ \vdots & & \ddots & \\ x_{m1} & x_{m2} & \cdots & x_{mn} \end{bmatrix} & \begin{matrix} \\ \\ \\ \\ \end{matrix} & \begin{matrix} \\ \\ \\ \\ \end{matrix} & \begin{matrix} \\ \\ \\ \\ \end{matrix} \\ \text{n variáveis} & \text{m amostras} & & \end{matrix} \quad (5.3)$$

5.5.2 Pré-tratamento estatístico dos dados

O próximo passo é o tratamento dos dados obtidos utilizando alguns métodos: A normalização das curvas, a suavização de cada curva (*smoothing*), a correção da linha de base, o peso de cada amostra e a centralização das curvas na média.

5.5.3 Normalização

A normalização da curva é a divisão de cada elemento de uma amostra por uma norma característica da curva da amostra e faz com que todas as curvas passem a ser observadas sob a mesma escala.

$$x_{ij(\text{normalizado})} = \frac{x_{ij}}{\|i\|}. \quad (5.4)$$

As normalizações mais utilizadas são a normalização pelo máximo emitido, pelo comprimento unitário e pela área unitária [24].

Quando a normalização é pelo máximo emitido, a norma é a máxima emissão na mesma variável:

$$\|i\| = \max_{j=1}^n |x_{ij}| \quad (5.5)$$

Já quando a normalização é feita com o comprimento unitário, a norma é calculada pela raiz quadrada da soma dos quadrados dos valores da amostra.

$$\|i\| = \sqrt{\sum_{j=1}^n x_{ij}^2} \quad (5.6)$$

Quanto à normalização pela área unitária, ela é obtida com a divisão dos elementos pela soma dos módulos dos valores de cada resultado da amostra. Essa normalização faz com que a área abaixo da curva tenha valor unitário.

$$\|i\| = \sum_{j=1}^n |x_{ij}| \quad (5.7)$$

5.5.4 Suavização (*smoothing*)

A suavização da curva é necessária quando um ruído aleatório de alta frequência está embutido nas medições. Ela é uma ferramenta matemática que tem a intenção de melhorar a relação sinal ruído da amostra, removendo os ruídos aleatórios de alta frequência, que pode ser causado pela temperatura ou pelo equipamento de medição [37].

Aqui serão apresentadas as principais formas de suavização, menos o algoritmo de processamento. Os principais métodos são a suavização pela média, a suavização pela média móvel e a suavização por filtros de *Fourier*, embora existam outros métodos menos aplicados como o uso da mediana e da mediana móvel, além da suavização por polinômios.

O procedimento da suavização pela média é separar a curva em grupos de k pontos (k variáveis) e calcular a média desses valores e das variáveis. Se o ruído é realmente aleatório sua média em toda a curva é nula e a curva que passa pela média dos pontos não tem ruído [24].

Uma consequência direta deste método é a redução do número de variáveis, já que em cada grupo será feita a média das variáveis e cada grupo terá um único valor representativo. Logo, a suavização terá n/k variáveis.

A precisão da suavização e da curva sem ruído depende da quantidade de pontos dentro de cada grupo, pois quanto maior é o número de pontos maior é a probabilidade da média M do ruído aleatório ser zero [37]. Porém o aumento de pontos em cada grupo diminui a resolução da curva, ou seja, aumenta a distorção entre a curva sem ruído e a alisada.

$$M = E(\bar{x}) = \frac{\sum_{j=1}^k x_j}{k} \quad (5.8)$$

Já suavização pela média móvel segue o mesmo procedimento que o anterior, porém existe um grupo de k elementos. No primeiro cálculo o grupo é formado pelos valores de 1 a k , em seguida o grupo desloca uma posição e calcula para os valores 2 a $(k+1)$, e assim sucessivamente. Dessa forma é possível obter uma curva com o mesmo número de variáveis [24].

A Figura 5.9 mostra a aplicação do método de suavização pela média e pela média móvel em duas curvas.

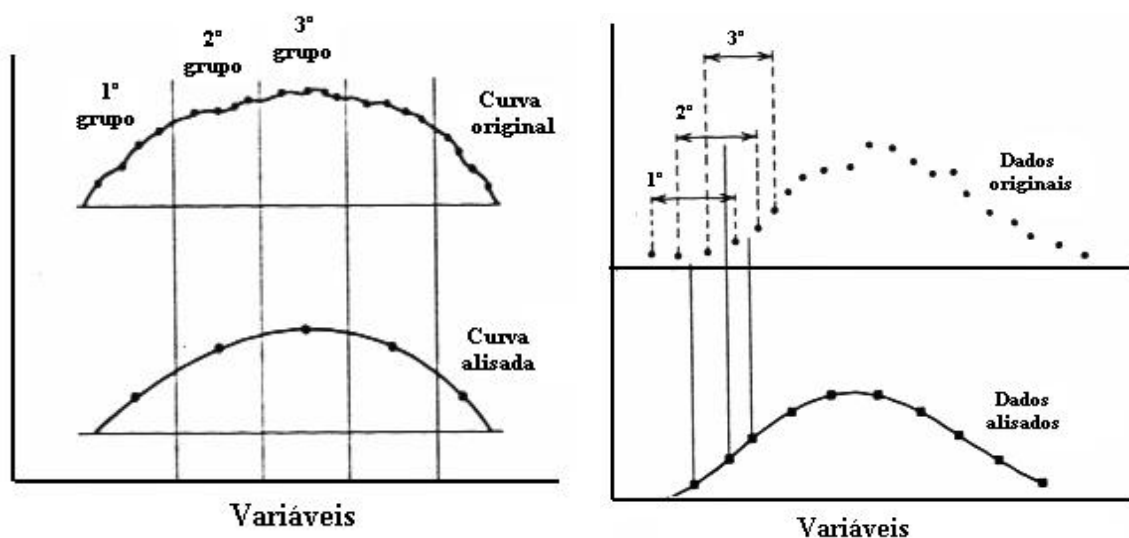


Figura 5.9 – Dois métodos de suavização de dados, à esquerda a suavização pela média, à direita a suavização pela média móvel.

FONTE: (Sharaf, Illman and Kowalski; *Chemometrics*, pp. 103)

Já a suavização por filtros de *Fourier* usa a transformada de *Fourier* para filtrar as componentes de alta frequência. Segundo *Fourier* o espectro medido $F(?)$ pode ser composto por uma função que é a resposta do fenômeno experimental e uma função ruído:

$$F(\mathbf{u}) = \int_{-\infty}^{\infty} F_R(\mathbf{u})N(\mathbf{u})d\mathbf{u}, \quad (5.9)$$

onde $F_R(?)$ é o espectro sem ruído e $N(?)$ é a função ruído associado à medida.

Fazendo a transformada de *Fourier* de cada um dos integrantes é possível encontrar a função $F_R(t)$ e depois $F_R(?)$ através da transformada inversa de *Fourier*, mas para isso a função ruído deve ser estimada *a priori*.

$$F(t) = \int_{-\infty}^{\infty} F(\mathbf{u})e^{j\mathbf{u}t} d\mathbf{u}, \quad (5.10)$$

$$N(t) = \int_{-\infty}^{\infty} N(\mathbf{u})e^{j\mathbf{u}t} d\mathbf{u}, \quad (5.11)$$

$$F_R(t) = \frac{F(t)}{N(t)}, \quad (5.12)$$

$$F_R(\mathbf{u}) = \int_{-\infty}^{\infty} F_R(t) e^{-j\mathbf{u}t} dt. \quad (5.13)$$

Uma outra forma é fazendo-se a transformada direto no espectro medido e aplicar um filtro passa-baixa que elimina o ruído desejado, como mostra a Figura 5.10. A curva sem ruído é obtida da transformada inversa.

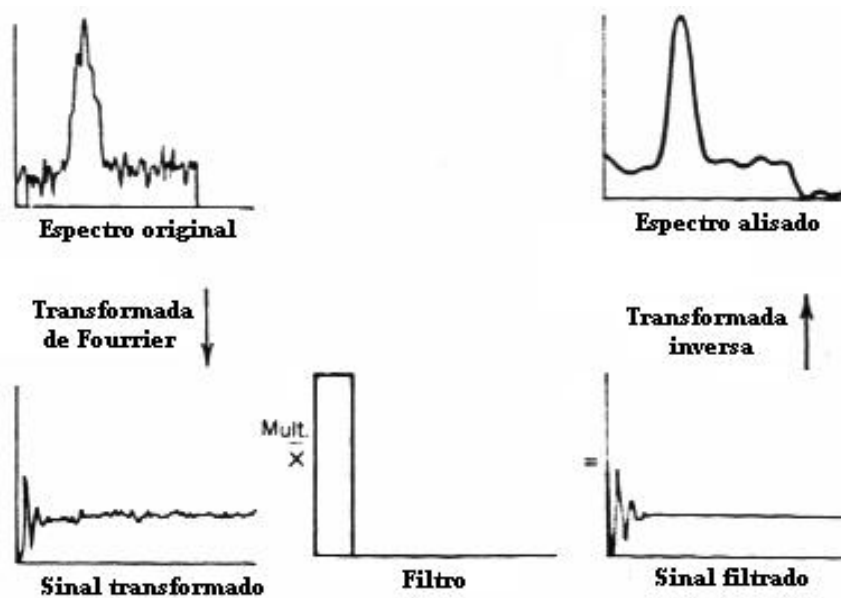


Figura 5.10 – Obtenção da curva alisada usando o método da filtragem de Fourier.

FONTE: (Sharaf, Illman and Kowalski; *Chemometrics*, pp. 109)

5.5.5 Linha de base

A linha de base é a manifestação de um ruído de baixa frequência presente no sinal e para remover a linha de base usamos um modelo de sinal. Podemos supor que o sinal medido $F(?)$ é composto pelo sinal sem ruído $F_R(?)$ e pela componente do ruído, assim:

$$F(\mathbf{u}) = F_R(\mathbf{u}) + \mathbf{a} + \mathbf{b}\mathbf{u} + \mathbf{j}\mathbf{u}^2 + \dots \quad (5.14)$$

Se o ruído for constante, como foi o ruído encontrado nesse trabalho e apresentado na secção 5.3.3, basta a subtração direta do valor \mathbf{a} para encontrar o sinal sem ruído, pois os demais valores do modelo do ruído serão nulos.

$$F_R(\mathbf{u}) = F(\mathbf{u}) - \mathbf{a} \quad (5.15)$$

Porém se o ruído apresentar um outro comportamento deverá se utilizar as derivadas do sinal medido, como é o caso apresentado na Figura 5.11, onde o ruído é linear com a variável. Casos como esse podem ocorrer nas medições de cromatografia.

$$F'(\mathbf{u}) = F'_R(\mathbf{u}) + 0 + \mathbf{b} \quad (5.16)$$

Agora basta subtrair a parte constante para encontrar a derivada do sinal sem ruído, e depois pode integrar essa função para encontrar o sinal sem ruído.

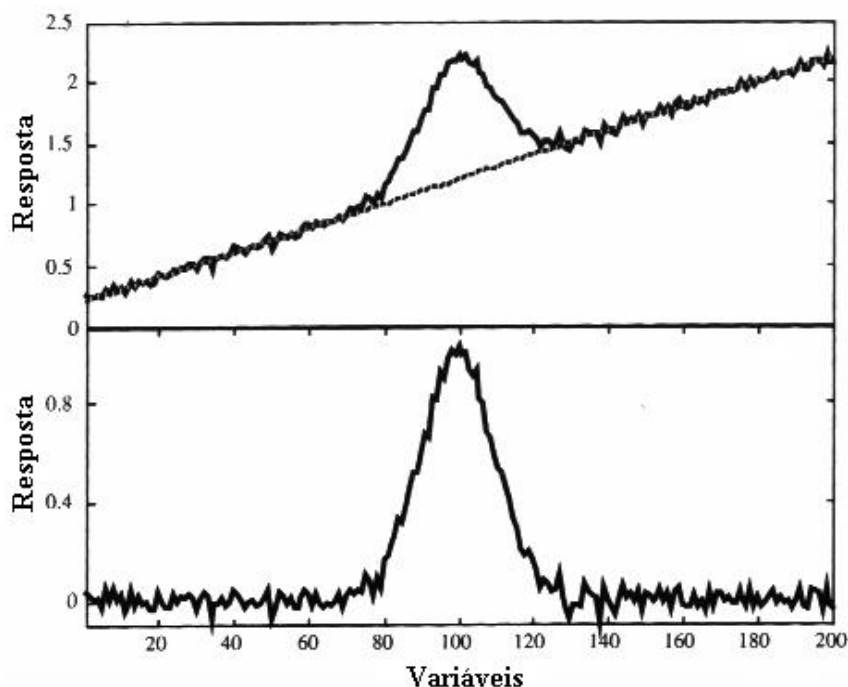


Figura 5.11 – Remoção de linha de base linear com a variável.

Fonte: (Beebe, Pell and Seasholtz; *Cmemometrics. A Practical Guide*, pp. 45)

5.5.6 Centralização na média e peso de cada amostra

O último passo é a centralização das medidas em torno da média e escolher o peso que cada amostra terá no processamento matemático. A centralização é possível subtraindo cada uma das medições da curva média das medições. A centralização é útil para diminuir o vetor distância entre os valores de uma mesma variável [37]. A Figura 5.12 mostra o agrupamento de um conjunto de espectros medidos em torno da média.

Já o peso é escolhido a critério do pesquisador e mostra que medição terá maior influência no processamento matemático de reconhecimento de padrões.

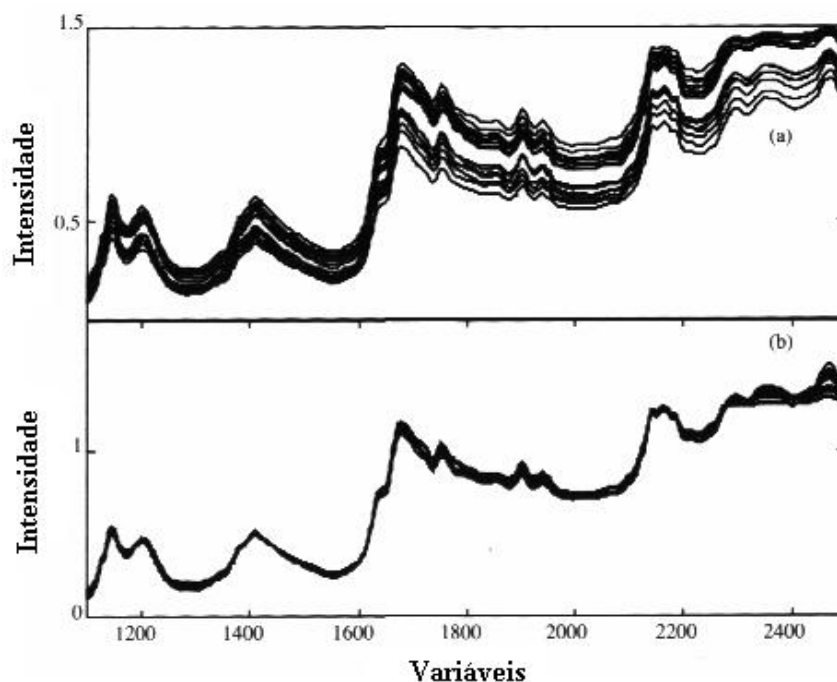


Figura 5.12 – Agrupamento das medições em torno da média.

Fonte: (Beebe, Pell and Seasholtz; *Chemometrics. A Practical Guide*, pp. 49)

5.5.7 Processamento matemático para reconhecimento de padrões

Dentre as técnicas de reconhecimento de padrões disponíveis uma das mais importantes é a *Análise das Componentes Principais*, (do inglês, PCA). Esta técnica será apresentada neste trabalho porque foi a única disponível para o processamento.

Para conhecer outras técnicas de reconhecimento de padrões é recomendado o livro: **Chemometrics, A Practical Guide**, de Kenneth Beebe, Randy Pell e Mary Beth Seasholtz, apresentado neste trabalho como a referência [24].

5.5.8 PCA - Análise das componentes principais

A técnica PCA é uma manipulação matemática dos dados com o objetivo de destacar a variação existente entre as medições, antes apresentadas num amplo número de variáveis, através de um espaço com um novo conjunto de eixos formado pelas componentes principais (PCs), que são calculadas a partir das variáveis originais [37].

O número de PCs fica a critério do pesquisador, porém cada componente principal está associada a um percentual da variação total dos dados das medidas. Torna-se inviável desenvolver um novo sistema onde o número de PCs seja maior que o de variáveis originais. A Figura 5.13 mostra que o

resultado da aplicação desta técnica em dados de um sistema qualquer origina novos eixos para melhor representar a variação entre as medições através das distâncias entre os pontos.

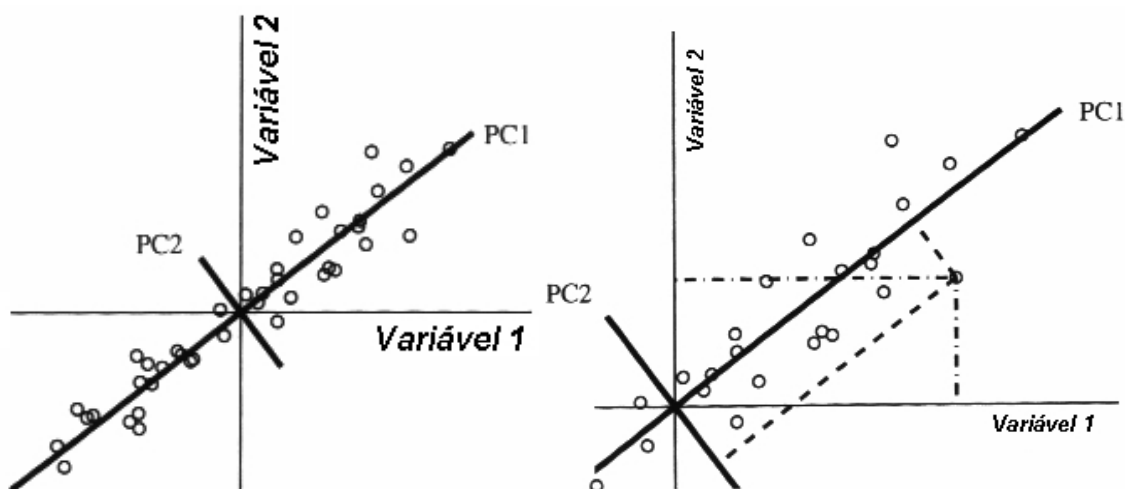


Figura 5.13 – Aplicação da técnica PCA criando novos eixos para melhor visualizar a variação entre as medidas. O gráfico à direita mostra as coordenadas do sistema das variáveis originais e do sistema PC1 e PC2.

FONTE: (Beebe, Pell and Seasholtz; *Cmemometrics. A Practical Guide*, pp. 83)

Essa técnica possui algumas características que independem do sistema avaliado ou do número de componentes principais. São elas [24]:

- A primeira componente principal (PC1) é posicionada ao longo do máximo de dados possíveis, logo, está associada à maior contribuição das variações do sistema.
- A variação total deve ser composta pelas participações de todos os PCs.
- Da mesma forma que uma amostra possui coordenada com as variáveis originais também possuirá com o novo sistema de eixos. Essas novas coordenadas são chamadas “scores”.
- A matriz de *scores* é encontrada a partir da aplicação de uma matriz de rotação sobre os dados medidos. Essa matriz de rotação é denominada de “loadings”. Cada *loading* que representa a rotação de um ponto possui valor entre -1 e 1 , e representa o co-seno do ângulo da rotação.

O procedimento de aplicação da técnica busca o cálculo da matriz de *loadings* para depois calcular os *scores* e em seguida montar o novo gráfico. Para isso é preciso inicialmente calcular a matriz de correlação dos dados C . Segundo *Sharaf*, C é calculado a partir da matriz de dados X , pela equação:

$$C = \frac{1}{n-1}(X^T \cdot X), \quad (5.17)$$

onde n é o mesmo número de colunas de X . Já a matriz de correlação C , é usada para encontrar os autovalores do sistema através da equação de correlação dos autovetores:

$$\begin{aligned} CR &= IR \\ (C - II)R &= 0 \end{aligned} \quad (5.18)$$

O sistema tem solução não-trivial, de forma que os autovalores são calculados por uma solução do determinante:

$$|C - II| = 0 \quad (5.19)$$

O número de autovalor será igual ao de PC escolhido pelo pesquisador. Calculado os autovalores do sistema, monta-se um sistema de equações lineares para calcular a matriz de *loadings* R . Essa matriz também representa os autovetores do sistema. E usando os *loadings* é possível calcular os *scores* do novo sistema de eixo, através da equação:

$$Y = X \cdot R \quad (5.20)$$

Para finalizar o processo o sistema computacional monta um gráfico com as novas coordenadas das medições e calcula a porcentagem de variância de cada PC, através da relação entre seu autovalor associado e a soma dos autovalores.

$$\% \text{var} = \frac{I_i}{\sum_i I_i} \quad (5.21)$$

6. EQUIPAMENTOS E TÉCNICA DA MEDIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA

6.1 Introdução

Neste capítulo serão apresentados os equipamentos necessários para fazer as medições do espectro da fluorescência, a teoria utilizada no processo de detecção e as limitações do equipamento, além da montagem experimental para a aquisição de imagens e as limitações dessa montagem.

Inicialmente serão discutidos o processo de funcionamento e a montagem do espectrofotômetro, que é o equipamento que mede o espectro de fluorescência das folhas numa área de aproximadamente $2,5 \text{ mm}^2$, daí a técnica ser chamada espectroscopia pontual. Em seguida será tratada da técnica de medição dos espectros, que apresentam detalhes sobre o posicionamento do equipamento em relação à amostra.

Depois disso serão apresentados as características da montagem experimental para a aquisição das imagens de fluorescência, suas limitações e as formas de montar as imagens para análise.

6.2 Espectroscopia pontual

A espectroscopia pontual é a técnica de medição do espectro de emissão da fluorescência de uma amostra numa área da ordem unidades de milímetros quadrados (mm^2). Isto ocorre porque tanto o transporte da luz de excitação da amostra quanto a fluorescência que a própria amostra emite é transportadas por fibras ópticas que conduzem a luz da fonte para a amostra e da amostra para o equipamento detector.

A vantagem desta técnica está na dinâmica da medição, onde o pesquisador tem uma certa liberdade de escolher que local da amostra deseja investigar. Uma outra vantagem é que o equipamento necessário para a medição, o espectrofotômetro, é um dispositivo compacto e de fácil transporte.

Quando há a necessidade de fazer medições numa área maior que a da ponta coletora do espectrofotômetro o pesquisador deve fazer várias medições na área e determinar que a média dos espectros coletados como espectro médio de toda a área. A Figura 6.1 mostra uma foto do espectrofotômetro e o seu uso na medição de espectros de folhas de milho.



Figura 6.1 –Foto do espectrofotômetro e medição de espectros de fluorescência das folhas do milho.

6.2.1 O espectrofotômetro

Um espectrômetro é um equipamento que pode medir, ao mesmo tempo, várias radiações de frequência diferentes e apresentar o espectro do resultado através de um gráfico da intensidade em função do comprimento de onda da radiação. Um subconjunto dos espectrômetros é útil na espectroscopia da fluorescência e são denominados espectrofotômetros.

O esquema do espectrofotômetro é mostrado na Figura 6.2. Ele é formado por quatro componentes principais: Uma fonte de radiação para excitar as moléculas da amostra; um guia de ondas para conduzir a radiação de excitação da fonte para a amostra e a fluorescência da amostra ao detector; um monocromador, que irá bloquear o ruído óptico, difratar a fluorescência capturada e detectar as intensidades em cada comprimento de onda; e uma base computacional para analisar e armazenar os dados.

6.2.2 Fontes de luz para excitação

Eventualmente a melhor forma de excitar moléculas biológicas são radiações da região do visível, UV ou infravermelho, isso porque a maioria das moléculas biológicas absorve essas radiações.

Por isso, lasers e leds são as melhores fontes de excitação para essas aplicações, pois esses dispositivos emitem naquelas regiões citadas com uma potência óptica suficiente para estimular uma amostra. O laser ainda leva uma vantagem sobre o led na questão de acoplamento de luz na fibra, pois a luz de um laser pode ser focalizada numa fibra óptica com um rendimento maior que a luz de um led.

Segundo *Cerovic* em seu artigo de revisão [8] a melhor radiação para estimular a fluorescência da folha possui comprimento de onda na região entre o UV próximo e o azul (aproximadamente entre 350 nm e 470 nm). Radiações nestes comprimentos de onda são absorvidas pela maioria dos pigmentos das folhas que transferem a energia absorvida para as clorofilas a e b.

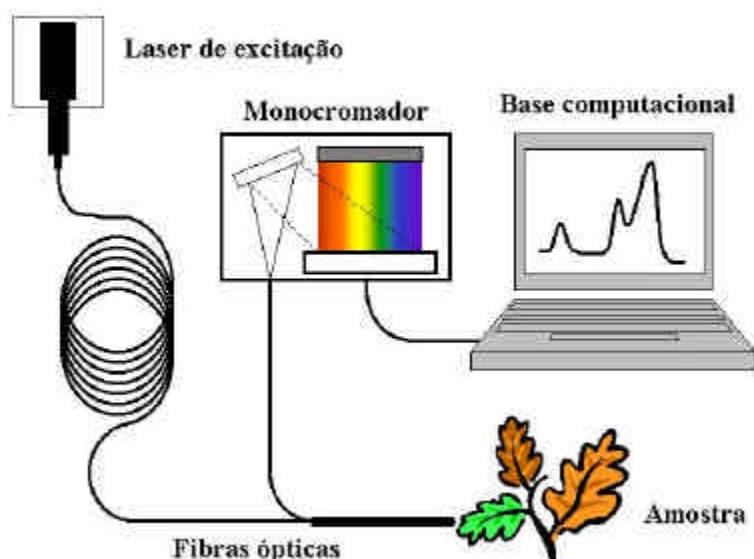


Figura 6.2 – Esquema do espectrofotômetro.

A Figura 6.3 mostra o espectro de absorção dos pigmentos mais importantes das folhas. Essa Figura foi apresentada na secção 3.6 do capítulo 3 onde se discutiu os espectros de absorção e de emissão daqueles pigmentos.

A Figura 6.3 ainda mostra que a radiação verde pode excitar diretamente as moléculas de clorofila a e b, pois apenas elas absorvem radiação nesta região. Por isso, neste trabalho, também foi utilizada luz verde como excitação da fluorescência por entregar energia diretamente às clorofilas.

Para estimular a fluorescência na região entre UV e azul foi utilizado um laser de descarga de gás de hélio-cádmio (He-Cd) que emite em 442 nm (azul). O modo de operação deste laser consiste em manter uma amostra do metal cádmio sob alta temperatura para formação do gás cádmio. Os gases cádmio e hélio são misturados e mantidos sob alta pressão em um recipiente propício.

Ao passar uma corrente elétrica no recipiente da mistura o hélio é excitado e o cádmio é ionizado. Para a formação do gás He-Cd radiações com 325 nm e 442 nm são emitidos [29]. A fonte usada filtra a radiação UV e deixa passar apenas a luz azul.

Esse laser emite luz num fluxo contínuo (*continuous wave, cw laser*), com comprimento de onda central da banda de emissão em 442 nm. A potência óptica do feixe na saída do laser é de 15 mW mas ao passar pelo guia de ondas é atenuado e entrega à amostra entre 5 e 7 mW. Ele é um laser tipo classe IV, pois causa danos à pele e aos olhos humanos e apresentam risco de incêndio se uma potência suficiente for usada [41].

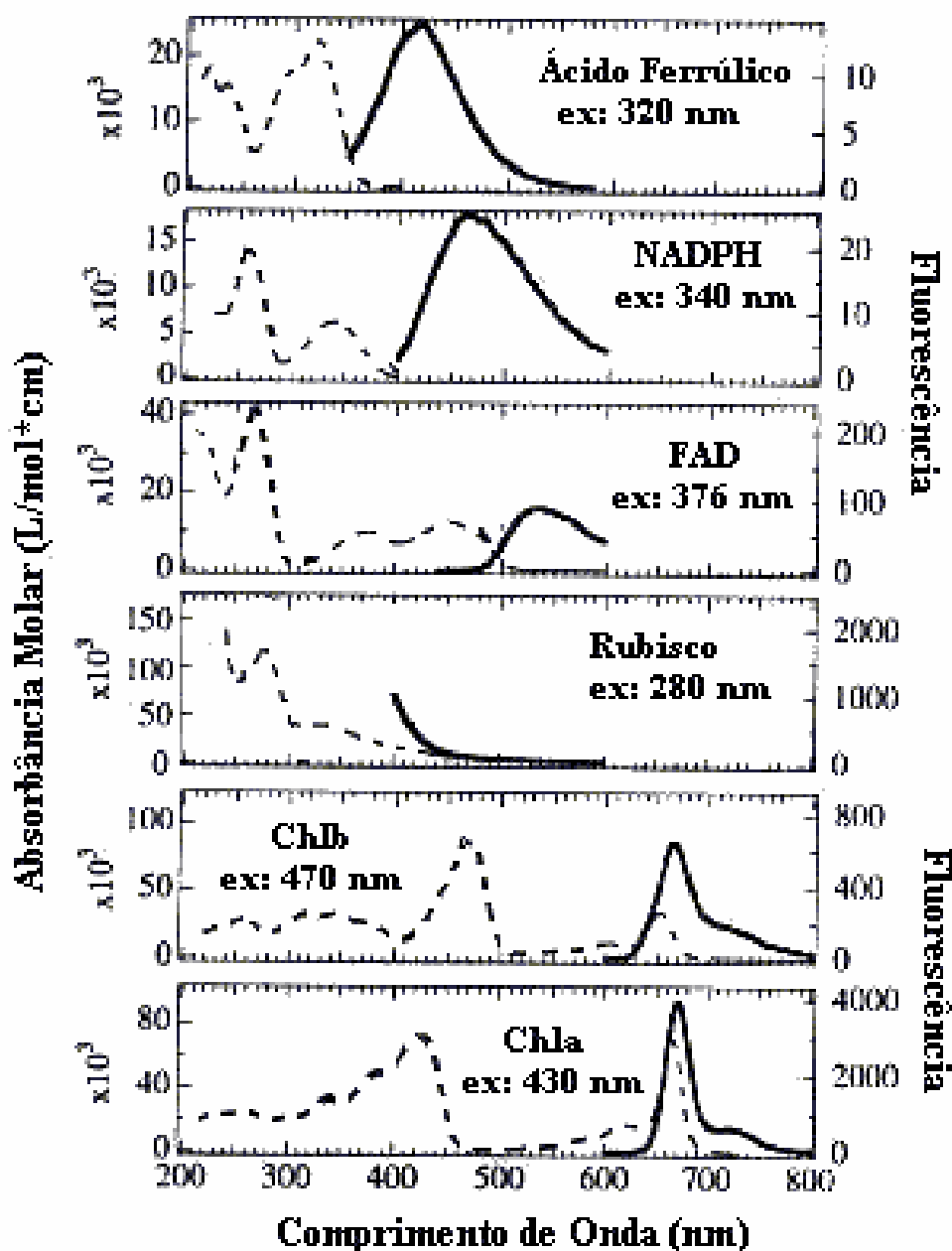


Figura 6.3 – Espectro de absorção dos principais pigmentos de folhas.

Fonte: (Cerovic et al., 1999).

A outra fonte de luz será um laser do estado sólido de neodímio no yttrium-alumínio-garnet (Nd:YAG dobrado) que emite luz verde de 532 nm de comprimento de onda. Neste laser o neodímio é adicionado como impureza num cristal de YAG, com concentração em torno de 1% do cristal [30].

A emissão deste laser se dá quando um feixe de bombeio externo ativa as impurezas (Nd) criando Nd^{3+} e força um re-arranjo eletrônico no YAG que resulta na emissão de várias linhas no infravermelho. A principal delas é em 1064 nm, conforme mostra a Figura 6.4 [30]. Em seguida faz-se o

feixe passar por cristais não-lineares gerando outros harmônicos. O segundo harmônico, em 532 nm, é obtido com uma eficiência acima de 50%.

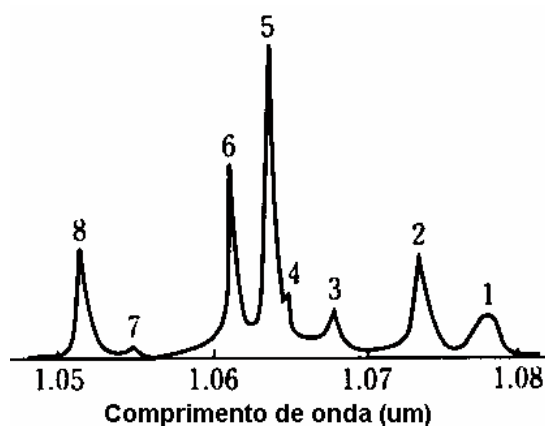


Figura 6.4 – Linhas de emissão do Nd:YAG.

FONTE: (Iga, *Fundamentals of Laser Optics*, 1994, pp 45).

Esse laser também emite um fluxo contínuo de luz verde (*cw laser*) com comprimento de onda central da banda de emissão em 532 nm; a potência óptica do fluxo de luz na saída do laser é de 10 mW e entre 5 mW e 7mW depois do guia. Ele é um laser tipo classe IIIb, que pode causar danos à pele e aos olhos humanos [41]. A Figura 6.5 mostra uma foto do laser de He-Cd e do Nd:YAG utilizados neste trabalho.



Figura 6.5 – À esquerda, foto do laser He-Cd e à direita do laser de Nd:YAG mostrando a radiação emitida.

6.2.3 Guia de ondas

O guia de ondas é utilizado para conduzir a radiação da fonte para a amostra e para coletar a fluorescência da amostra e entregá-la para a detecção. Ele é composto por um tubo composto de sete

fibras ópticas multimodo. As fibras multimodo podem transportar uma maior intensidade luminosa por poder guiar vários modos de propagação.

Das sete fibras uma delas, localizada no centro do tubo e com $110\ \mu\text{m}$ de diâmetro, é usada para conduzir a emissão da fonte para a amostra. As outras seis fibras ópticas, cada uma com $100\ \mu\text{m}$ de diâmetro e dispostas em torno da fibra central, são usadas para capturar a fluorescência da clorofila e a luz de retro-espalhamento causado pela superfície da amostra conduzindo-as ao monocromador.

A Figura 6.6 mostra um esquema da secção transversal do cabo de fibras ópticas enfatizando a distribuição das fibras no cabo.

O comprimento total do cabo é de 3 m e o seu diâmetro é de 1.8 mm. Cada uma das fibras tem o núcleo de quartzo e abertura numérica de 0.22 ou aproximadamente 12.7° . A abertura numérica informa o ângulo máximo de saída ou entrada de luz na fibra [35]. A casca da fibra é envolvida por uma camada de revestimento de plástico.

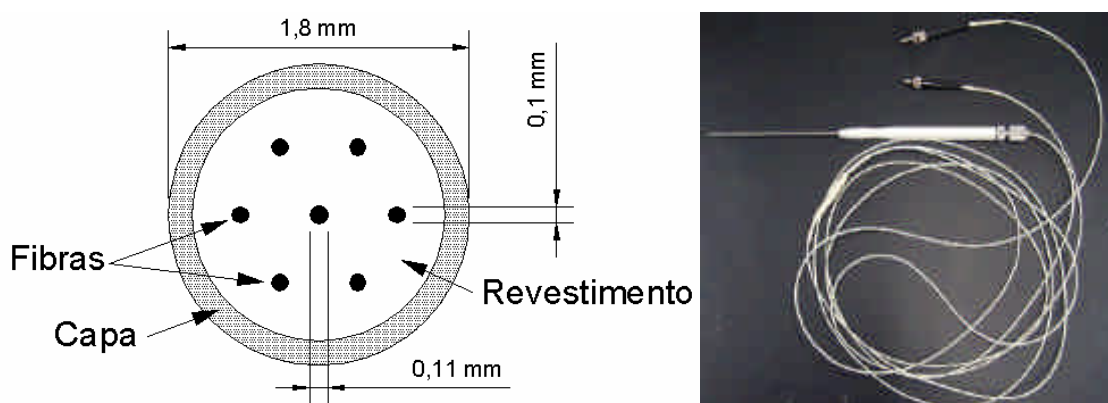


Figura 6.6 – À esquerda, seção transversal do cabo de fibras ópticas. À direita, foto do cabo de fibras ópticas para condução da luz de excitação e da fluorescência da amostra.

6.2.4 O Monocromador

Para completar a detecção do espectro da fluorescência da clorofila é preciso barrar o retro-espalhamento da fonte, separar a fluorescência coletada em conjuntos de discretos comprimentos de onda e detectá-los.

O retro-espalhamento é a reflexão da luz da fonte de excitação causada pela característica refletora da superfície da amostra. A intensidade dessa reflexão é muito maior que a intensidade da fluorescência emitida, por isso, o retro-espalhamento sobreporia o sinal da fluorescência caso não fosse bloqueado e seriam perdidas informações sobre o espectro da fluorescência.

Assim, o monocromador é equipado com filtros que bloqueiam essa luz exatamente nos comprimentos de onda das fontes de excitação. Cabe ao usuário selecionar o filtro adequado de acordo com a fonte escolhida.

Bloqueado o retro-espalhamento apenas a fluorescência da amostra passa para o próximo estágio deste equipamento que é da dispersão da fluorescência coletada.

Neste estágio uma grade de difração é utilizada. Essa grade difrata a luz que incide na sua superfície por causa da sua geometria de fabricação e dos fenômenos ópticos da interação da luz com a superfície.

O funcionamento de uma grade de difração segue a teoria de difração de Fraunhofer que é bastante discutida nos cursos de física básica das escolas de engenharia. Por isso seu funcionamento não será discutido neste trabalho e para uma abordagem mais detalhada são recomendadas as referências [25] e [27] deste capítulo.

O último estágio do monocromador é a detecção da luz, para isso será utilizada uma CCD linear de fotodetectores (*Charge Coupled Device - linear array*) que é composta por uma pastilha de 2048 fotodetectores em forma de circuito integrado. Um circuito eletrônico é necessário para fazer a varredura na CCD linear e digitalizar o sinal detectado.

Uma base computacional conectada ao monocromador finaliza o processo montando o espectro da fluorescência da clorofila. A Figura 6.7 mostra uma CCD linear comercial e a foto externa do monocromador.

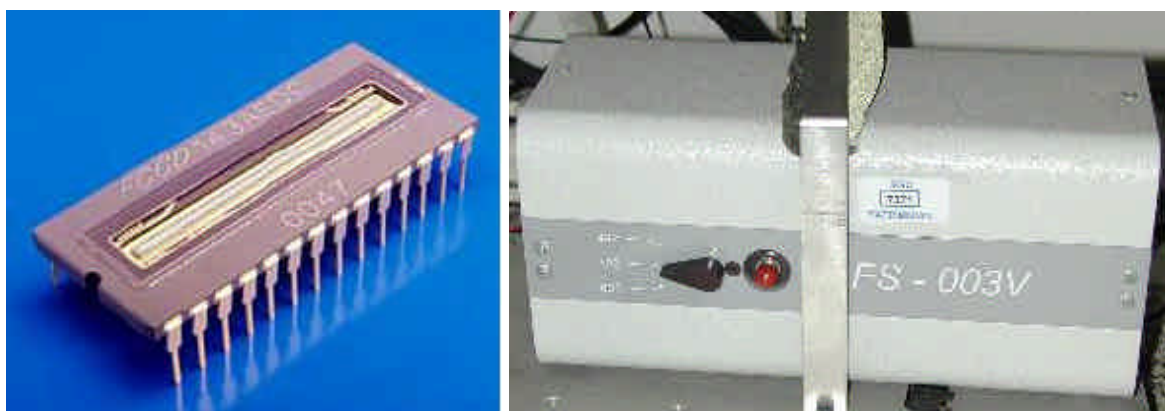


Figura 6.7 – Foto 1 à esquerda, CCD linear comercial de 2048 fotodetectores. Foto 2 à direita, parte externa do monocromador, destaque para o seletor manual de filtros.

FONTE 1: Toshiba datasheet – www.toshiba.com, acesso em fevereiro de 2005.

6.2.5 Técnica da medição dos espectros da fluorescência

A forma de medir a fluorescência foi um dos quesitos de cuidado neste trabalho, pois o formato do espectro muda com a posição da ponta do guia em relação à superfície da planta. Isto se dá porque com a inclinação as fibras do guia restringem ainda mais a entrada de luz por causa da abertura numérica. Nota-se que haverá uma angulação limite entre a ponta do guia e a superfície da planta onde a partir desta nenhuma luz será capturada.

Outra questão abordada é sobre a emissão da fluorescência por parte da folha. A dúvida é sobre a intensidade da fluorescência emitida em função do ângulo de emissão relativo à direção perpendicular da folha.

Seria interessante confirmar se a emissão da fluorescência pela folha segue a lei do co-seno, onde a intensidade numa direção qualquer é o produto da emissão perpendicular à folha multiplicado pelo co-seno do ângulo em relação à direção perpendicular. Dessa forma seria possível determinar a melhor direção de captura da fluorescência emitida.

Essa medida não foi realizada e esse experimento foi recomendado como trabalho futuro para determinar uma metodologia de detecção.

Outra questão levantada é em relação à distância entre a ponta do guia e a superfície da folha. Supondo que a emissão da fluorescência da folha obedeça à lei do co-seno será que aproximar ao máximo a ponta do guia na folha seria a forma de coletar a maior quantidade de fluorescência?

Este teste foi realizado fixando a ponta do guia numa haste com mobilidade vertical perpendicular à superfície onde se encontrava a folha e variando-se a distância entre a ponta do guia e a amostra desde o contato entre ambas até uma distância de 5 mm entre elas.

Foram feitas medidas de espectros em 12 pontos distintos de 3 folhas distintas, 4 pontos por folha, usando excitação azul e verde. As superfícies, em cada uma das folhas, eram o mais plano possível para evitar que um possível enrugamento da folha interferisse na medida.

Os resultados são apresentados nas Figuras 6.8 e 6.9 que mostram as médias dos espectros medidos naquelas distâncias escolhidas usando luz azul e do verde respectivamente, como fonte de excitação. Todas as médias dos espectros coletados foram normalizadas pelo pico de excitação.

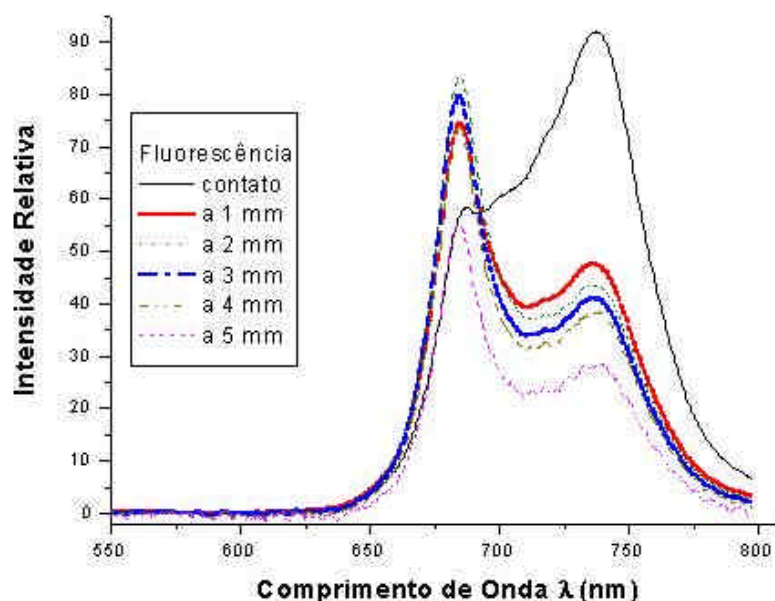


Figura 6.8 – Média das medições dos espectros da fluorescência da folha usando luz azul como excitação.

Os resultados para excitação azul mostram que fazer medições com a ponta do guia encostada na superfície da amostra implica na perda de informações da fluorescência em torno de 685 nm, enquanto que a qualquer outra distância a medição da fluorescência não apresentou problemas.

Usando a luz verde como excitação os resultados mostram que não houve problemas com as medições variando a distância entre a ponta do guia e a amostra.

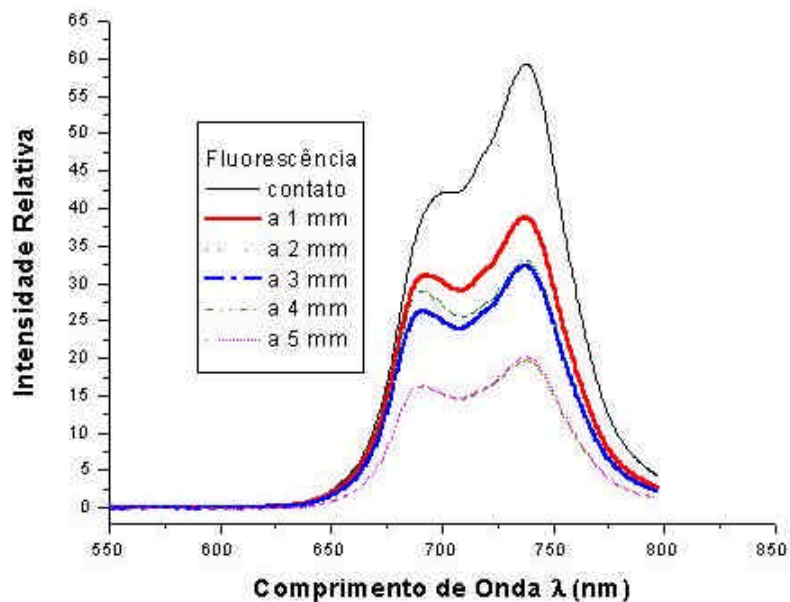


Figura 6.9 – Média dos espectros da fluorescência da folha usando luz verde como excitação.

A conclusão sobre este experimento é que para montar um sistema de medição da fluorescência da clorofila das folhas usando luz verde e azul alternadamente a ponta do guia não deve estar em contato com a superfície para evitar a perda de informações da fluorescência em torno de 685 nm.

6.3 Imagem de fluorescência

A outra forma de avaliar a emissão da fluorescência é através das imagens de fluorescência, que compõem uma imagem da folha apenas com a fluorescência capturada por uma câmera.

6.3.1 Montagem experimental

O sistema para aquisição de imagens da fluorescência seguiu o modelo proposto por *Lichtenhaler e Babani* [16], porém com algumas alterações.

Primeiro; foi usado um laser de descarga de gás argônio emitindo luz verde em 519 nm emitida com 2000 mW de potência óptica como fonte de excitação. Este laser foi escolhido devido à neces-

sidade de ampliar a área do feixe do laser para induzir a fluorescência numa área da folha de aproximadamente 20 cm^2 .

O objetivo foi tentar manter a densidade da intensidade luminosa em torno de $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ na área desejada, densidade suficiente para excitar a fluorescência e não queimar a folha; dessa forma a excitação da fluorescência seria padronizada. Para “abrir” o feixe do laser foi usada uma lente divergente com 2 cm de distância focal.

Segundo; a imagem foi feita da folha *in vivo*, assim, houve certa dificuldade na montagem para garantir que a folha permanecesse estática sobre uma mesa óptica e sem ameaça de ser arrancada do caule. Para isso um aparato com uma placa de alumínio e duas placas de vidro sobre uma base micro-métrica *x-y-z* fixada sobre a mesa óptica foi utilizada como suporte para sustentação e posicionamento da folha.

A placa de alumínio continha uma abertura circular de aproximadamente 5 cm de diâmetro e as placas de vidro, que estavam parafusadas na placa de metal, faziam a sustentação da folha. A placa de metal servia como filtro espacial para formação de imagens padronizadas.

Terceiro; na montagem apresentada em [16] foram usados filtros de precisão para a formação de imagens de específicos comprimentos de onda. Aqui foi utilizado um filtro de acrílico com corante vermelho que serviu de janela para a fluorescência no vermelho e no vermelho próximo (RF e FRF).

A Figura 6.10 apresenta o gráfico da banda passante do filtro óptico mostrando que ele barra os ruídos ópticos e deixa passar cerca de 80% da fluorescência da clorofila, desta forma a imagem formada é exclusivamente devido à fluorescência induzida.

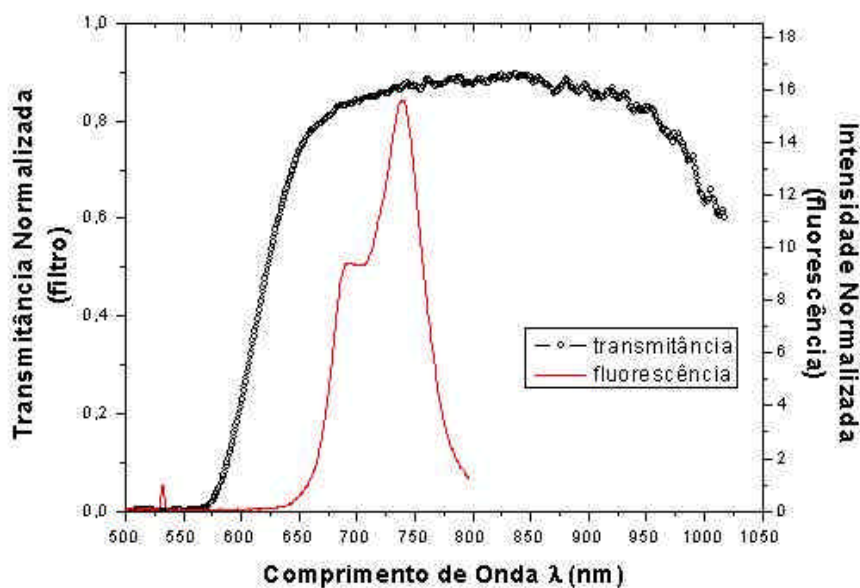


Figura 6.10 – Transmitância normalizada do filtro utilizado e espectro da fluorescência da folha usando excitação em 532 nm.

Para a aquisição das imagens foi usada uma câmera CCD de alta definição com 2048 x 2048 pixels e para o tratamento das imagens foi usado o software MatLab®.

Para fazer imagens macroscópicas frontais da folha foi preciso colocá-la entre a fonte e a câmera, dessa forma o feixe de excitação atinge a folha em seu verso, porém a intensidade é suficiente para induzir a fluorescência das camadas superiores da folha. O esquema do sistema de aquisição de imagens é mostrado na Figura 6.11.

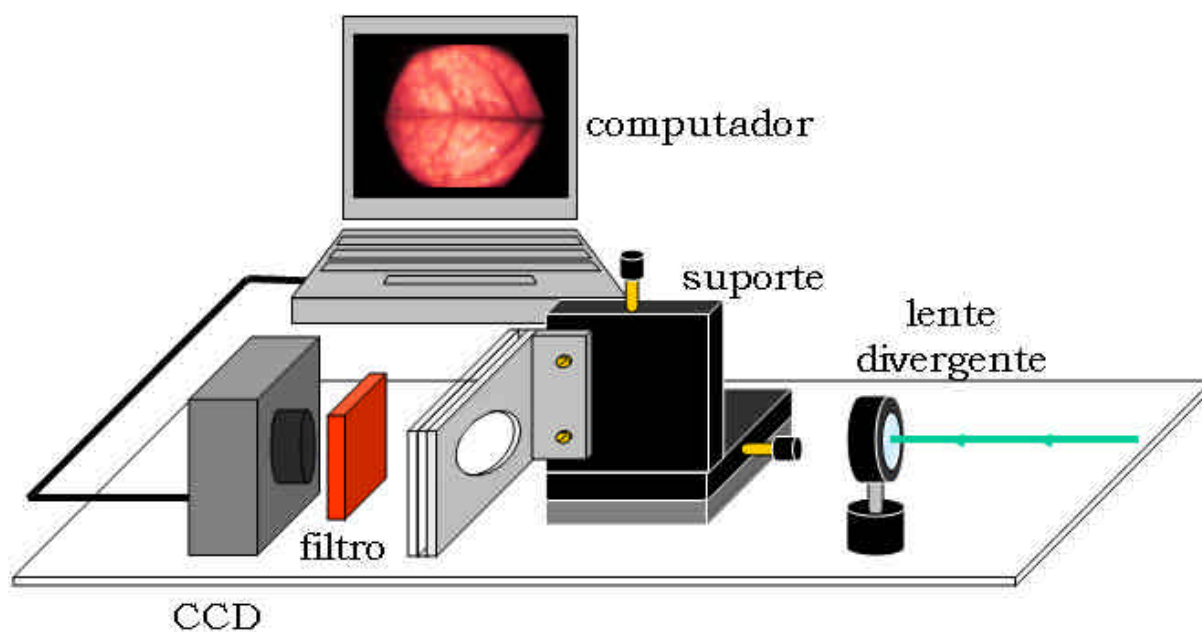


Figura 6.11 – Esquema do sistema para aquisição de imagens da fluorescência da clorofila. Na tela do computador está uma foto real capturada de folhas de laranjeiras e reduzida à escala da figura.

A Figura 6.12 mostra duas imagens obtidas da montagem; uma é a imagem da transiluminância da folha usando luz branca, e a outra é a imagem da fluorescência induzida com luz verde. A imagem da transiluminância serve como referência para o posicionamento da folha para que seja possível a comparação nas mesmas áreas.

6.3.2 Limitações da montagem experimental

Infelizmente alguns fatores limitam o uso da imagem de fluorescência como ferramenta de diagnóstico neste trabalho. Inicialmente ocorre um problema com a câmera de captura das imagens. A câmera CCD utilizada, por ser comercial e não uma câmera usual para imagens de fluorescência, possui uma autofunção de abertura da íris. Dessa forma a câmera regula a entrada de luz e evita uma possível saturação da CCD.

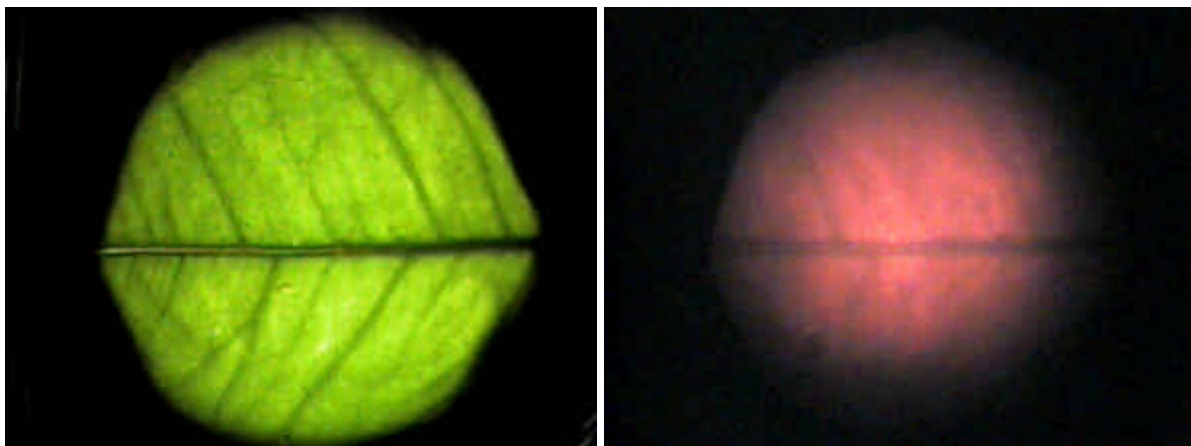


Figura 6.12 – *Imagens capturadas no sistema. À esquerda, foto da folha iluminada com luz branca. À direita, imagem da fluorescência induzida por luz em 519 nm.*

O problema é que não há uma referência fixa entre duas imagens de fluorescência, assim, se uma folha emitir mais fluorescência que outra a câmera ajusta a sua variação de iluminação e compõe a imagem; comparar duas imagens feitas pela mesma câmera seria um erro, porque provavelmente a variação da intensidade das imagens seria diferente.

Apesar disso, vale lembrar que é possível a comparação entre duas regiões diferentes na mesma imagem, pois na mesma imagem a variação permanece constante.

O outro problema é devido à distribuição espacial da luz do laser. O feixe de luz emitido pelo laser de argônio possui uma distribuição espacial orientado por uma *gaussiana*, devido à emissão de um único modo, o TEM_{00} [29]. Por isso a maior parte da energia do feixe de luz está concentrada na sua área central e a indução da fluorescência numa determinada área depende da intensidade luminosa nessa área.

Assim, para que seja possível a comparação do gradiente de fluorescência emitida nas diferentes regiões é preciso que a imagem analisada esteja normalizada pela excitação. A solução proposta é a coletar uma imagem da distribuição espacial da luminosidade do feixe do laser e fazer a normalização ponto-a-ponto entre as imagens no padrão da escala de cinza.

A imagem do feixe do laser foi possível colocando uma folha de papel ofício de $75 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ no lugar da folha da laranjeira. O papel foi escolhido por ser um material homogêneo. Para evitar divisões por zero na normalização foi desenvolvida uma rotina no MatLab[®], e para melhorar a visualização e a análise do resultado, usam-se falsas cores para enfatizar o gradiente fluorescência, como mostra a Figura 6.13.

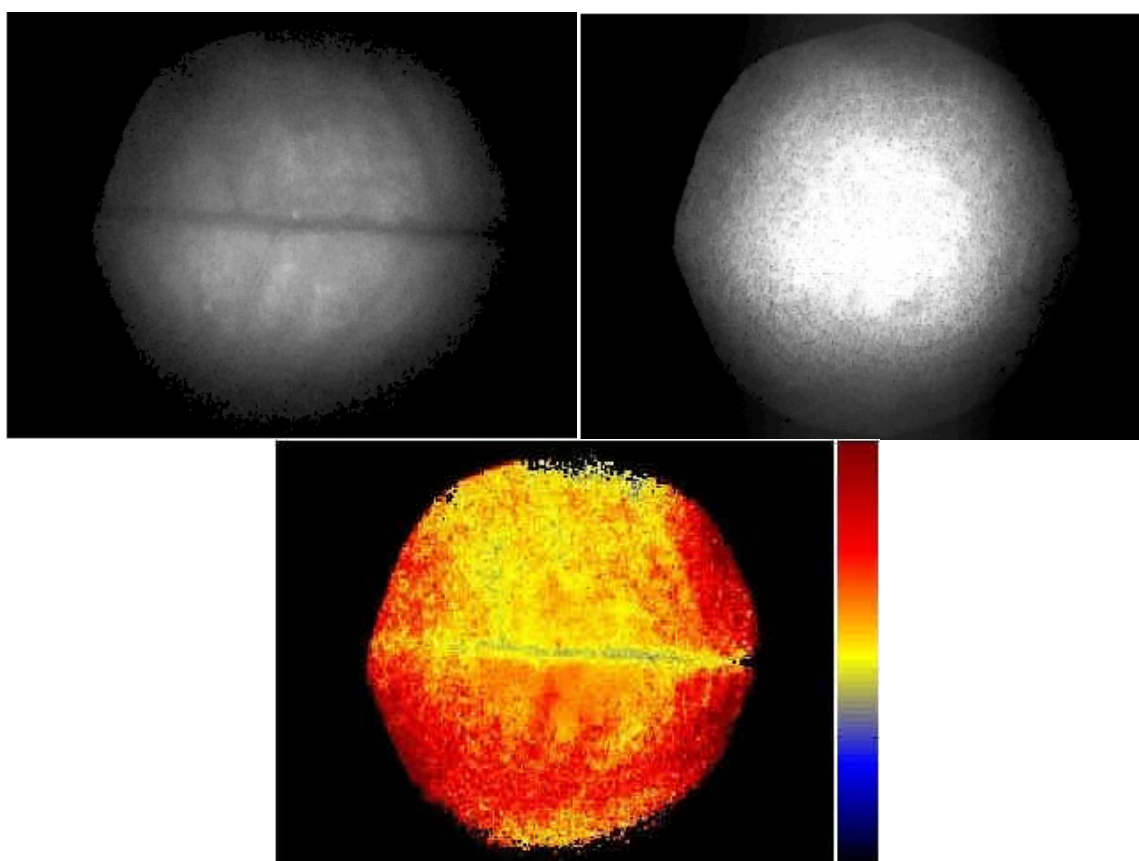


Figura 6.13 – Em escala de cinza, imagens da fluorescência de uma amostra (à esquerda) e da distribuição do feixe de excitação (à direita) e em falsas cores o resultado da normalização.

7. RESULTADOS

7.1 Introdução

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais obtidos com o desenvolvimento dos trabalhos da tese. Dois experimentos foram realizados, um de medição de espectros de fluorescência das folhas, e outro de aquisição de imagens da fluorescência das folhas. Como o objetivo foi a distinção de amostras sem e com déficit hídrico em ambos experimentos foi necessário submeter um grupo de laranjeiras a um período de falta de água.

O experimento das medições dos espectros foi repetido três vezes. No primeiro as amostras ficaram expostas diretamente à luminosidade solar e isso causou problemas no acompanhamento do desenvolvimento do estresse.

Já no segundo experimento o estresse pôde ser detectado porque as amostras foram alocadas na área apresentada no capítulo 4. Durante esse mesmo período de regime de estresse o experimento da aquisição das imagens da fluorescência foi realizado.

O terceiro experimento foi feito para observar se os resultados do segundo experimento se repetiriam; e foi neste experimento que foi aplicada a técnica da quimiometria sob os espectros de fluorescência das folhas.

7.2 Primeiro experimento - excesso de luz

Esse primeiro experimento, de expor um grupo de laranjeiras a um regime de estresse hídrico e comparar o seu comportamento com outras amostras fora do regime de estresse, foi realizado num total de 25 dias, destes 7 dias foram necessários para o repouso das amostras.

A chegada de quatro mudas de laranja ao laboratório do Instituto de Física de São Carlos, vindas da FUNDICITROS, em Araraquara-SP, deu início ao período experimental. Em seguida elas ficaram em repouso num lugar com baixa luminosidade e recebendo 1 litro de água por dia durante 7 dias. O período de repouso foi uma recomendação dos pesquisadores da FUNDICITRUS para que as mudas pudessem se adaptar ao seu novo ambiente.

Das quatro plantas apenas uma ficou sendo a representante do grupo controle e continuou a ser hidratada ainda com 1 litro por dia. Quanto às outras três, entraram em regime de estresse hídrico, onde o fornecimento de água foi cessado completamente. Este modelo é tradicionalmente usado nos trabalhos sobre estresse hídrico, e por isso foi escolhido [31]. Essas amostras compunham o grupo sob estresse direto porque não receberam mais água.

Esperava-se que a exposição direta à luz solar acelerasse o consumo da água das amostras por aumentar a sua transpiração, por isso todas elas foram deslocadas para uma área aberta ao meio ambiente externo, mas no horário das medições as amostras eram trazidas ao laboratório para a medição dos espectros.

Neste experimento foi usada apenas uma fonte de excitação da fluorescência das folhas, o laser de Nd:YAG que emitia em 532 nm. Devido a essa excitação apenas a razão de fluorescência RF/FRF foi obtida como resultado, pois as outras razões envolvem a fluorescência da região do azul (BF), que não era obtida com excitação de luz verde.

A Figura 7.1 mostra os resultados da RF/FRF para os grupos controle e sob estresse direto. O resultado do controle é a razão da única amostra do grupo enquanto que a resposta do grupo sob estresse direto é formada pela média das razões das três amostras deste grupo.

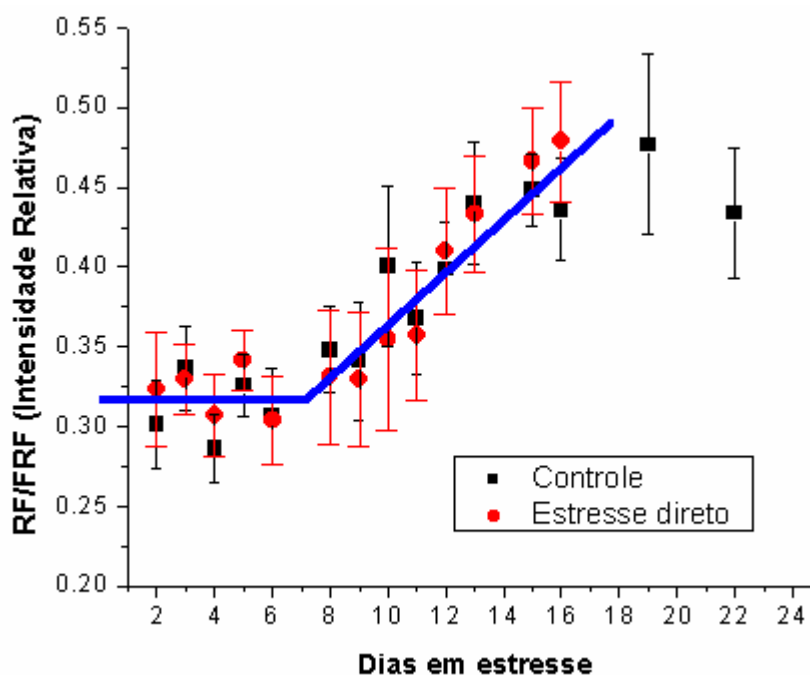


Figura 7.1 – *Comportamento da RF/FRF do grupo controle e do grupo sob estresse hídrico durante o período de estresse.*

Nela vemos que o comportamento dos dois grupos é bastante semelhante de forma que é impossível distingui-los. A linha azul no gráfico ajuda a mostrar o comportamento das razões que permanecem constantes até o sétimo dia e em seguida crescem até o décimo sétimo dia, quando foram finalizadas as medidas.

O motivo deste comportamento foi a exposição das amostras diretamente à luz solar, pois a partir do décimo oitavo dia do regime as amostras voltaram para o ambiente de repouso e outras medidas do controle foram feitas. De fato, a RF/FRF tornou a cair.

Um processo semelhante que ocorre por causa da exposição de uma planta a um excesso de luminosidade é denominado fotoinibição.

Segundo *Lawlor* [31], a fotoinibição ocorre porque a planta entra em regime de estresse por excesso de luz, pois a quantidade de energia transferida pelos pigmentos aos centros de reação passa a ser maior que a capacidade de absorção dos centros, e para evitar que o excesso de energia danifique sua estrutura os centros de reação do FSII se fecham e a maior parte da energia capturada pela folha é dissipada como fluorescência.

A conclusão obtida com este experimento é que seria necessário transferir as laranjeiras do local exposto diretamente à iluminação solar para outro local de menor luminosidade para evitar o estresse por excesso de luz.

7.3 Segundo experimento - detecção do estresse

Este experimento demorou um pouco mais que o anterior por causa do repouso das amostras. No total o experimento durou 47 dias, onde 30 dias foram dedicados ao repouso das amostras. Neste experimento já foi possível fazer medições com as duas fontes de excitação, uma no azul e uma no verde, possibilitando, assim, a análise de todas as razões de fluorescência. Também neste período foram iniciadas as detecções das imagens de fluorescência.

7.3.1 Repouso das amostras

O tempo total de repouso das laranjeiras foi de 30 dias por causa de um problema no seu transporte. Já tinha sido decidido trabalhar com um conjunto maior de amostras para fazer melhores comparações, porém, inicialmente, apenas quatro amostras foram cedidas.

Desta vez o período de repouso das laranjeiras foi aumentado para quinze dias para que as amostras tivessem uma recuperação maior. Cada uma delas era hidratada com 1 litro de água por dia, porém neste experimento as amostras foram alojadas numa área coberta das instalações do IFSC apresentada no capítulo 4. Esta área previa condições ambientais semelhantes a uma estufa.

Mesmo com a possibilidade das laranjeiras ainda não estarem adaptadas ao novo local, durante o repouso houve medições dos espectros da fluorescência emitida pelas amostras para observar se fora do regime de estresse elas possuem um comportamento constante.

A Figura 7.2 mostra os gráficos da RF/FRF das quatro amostras obtidos durante os primeiros quinze dias do repouso, enfatizando que cada organismo responde de forma independente às manifestações externas.

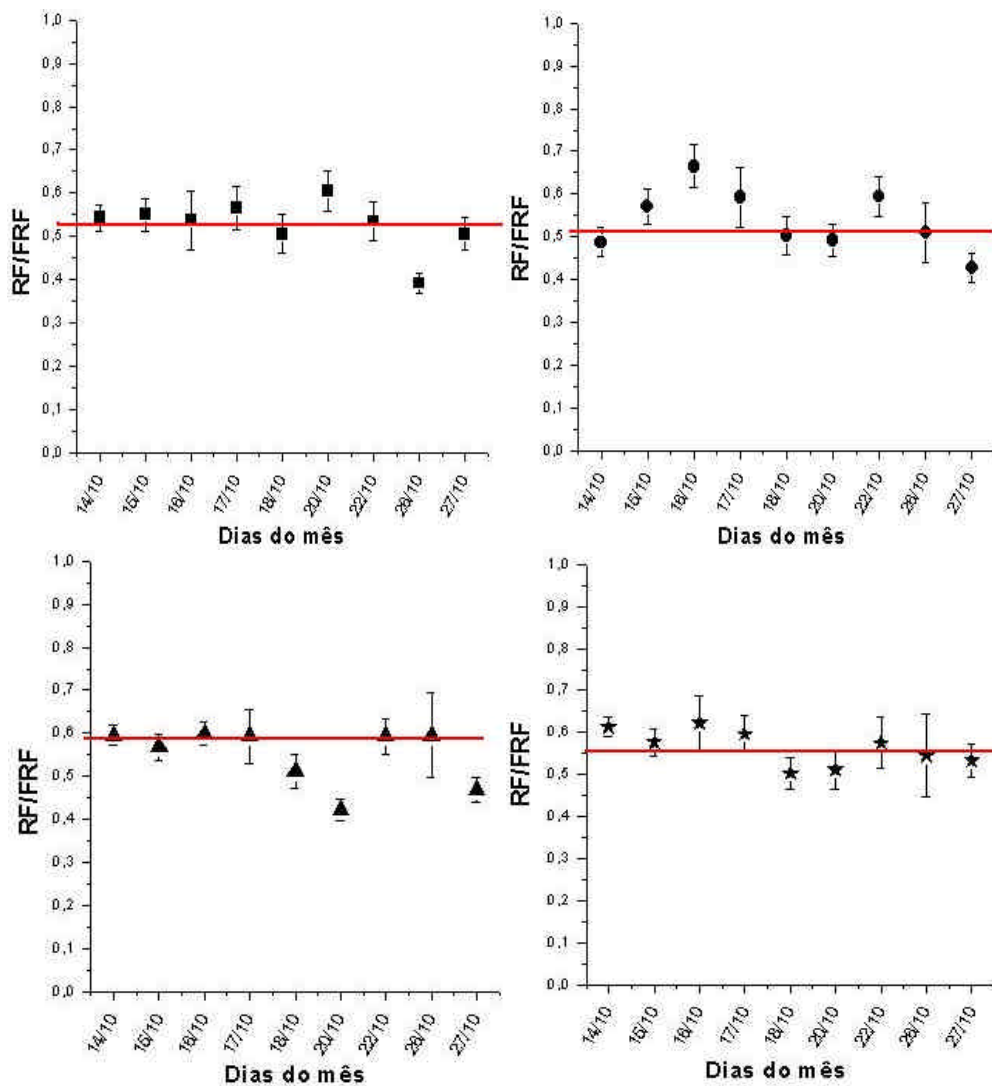


Figura 7.2 – RF/FRF de quatro amostras durante os primeiros 15 dias de repouso enfatizando a diferença dos comportamentos de cada laranja.

Após essa fase de repouso essas amostras estavam prontas para o experimento, porém no dia 26 de outubro novas amostras chegaram ao laboratório completando um grupo de nove laranjeiras. Daí esperou-se por mais quinze dias até que as novas amostras também repousassem. As novas amostras também foram colocadas no mesmo ambiente que as primeiras.

A Figura 7.3 mostra a média das RF/FRF das quatro primeiras laranjeiras, que repousaram por cerca de 29 dias, mostrando que o comportamento desta razão é aproximadamente constante durante o repouso. Depois deste período todas as laranjeiras estavam prontas para um novo regime de estresse hídrico.

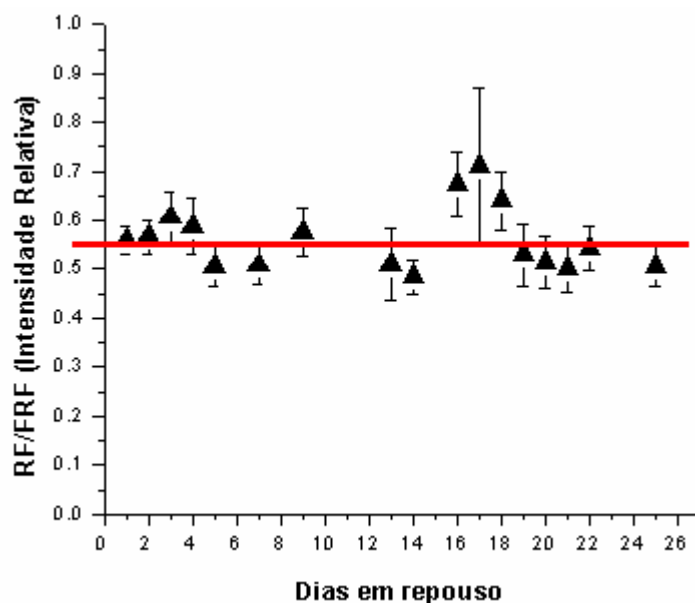


Figura 7.3 – Média das RF/FRF de todas as amostras durante o repouso.

7.3.2 O regime de estresse

O regime de estresse hídrico foi iniciado em 13/11/2004, este durou 17 dias. Depois desse período as folhas das laranjeiras já apresentavam sinais visíveis da presença do estresse e em alguns casos a medição não era mais possível porque as folhas já estavam duras e enrugadas.

A Figura 7.4 mostra fotos de uma amostra sob estresse depois de nove dias do regime. Uma das características da planta eram suas folhas murchas e sem sustentação no caule. Ao continuar no regime, as folhas das amostras começaram a secar, enrugar e cair.



Figura 7.4 – Laranjeira há nove dias sob estresse hídrico. Folhas murchas e sem sustentação no caule.

O problema ocorre quando as folhas escolhidas para medição dos espectros começam a cair, pois não pode haver a substituição dessas visto que cada folha possui uma resistência própria ao estresse. Assim, quando o número de folhas perdidas excedia 25% do total de folhas escolhidas para a medição, essa medição era cessada. A Figura 7.5 mostra fotos de uma folha de laranjeira seca e enrugada devido ao estresse.



Figura 7.5 – Folha de laranjeira submetida ao estresse hídrico após 17 dias de regime, a folha fica enrolada, enrugada e sem sustentação no caule, muitas vezes a folha chega até a cair.

Neste experimento três amostras fizeram parte do grupo controle enquanto seis amostras compunham o grupo do estresse hídrico.

7.3.3 Resultados obtidos

O primeiro resultado obtido foi a diferença entre o espectro da fluorescência excitada por luz azul e verde. A Figura 7.6 mostra um gráfico com a média dos espectros de fluorescência de uma laranjeira fora do estresse, medidos em laboratório no início do regime, com excitação de luz azul em 442 nm e de luz verde em 532 nm.

Nela vemos que o máximo de emissão da fluorescência muda com o comprimento de onda da excitação. Enquanto que ao usar excitação em 442 nm o pico de emissão da fluorescência ocorre na RF (em torno de 685 nm) usando excitação em 532 nm o pico de emissão da fluorescência ocorre na FRF (em torno de 735 nm). Infelizmente não foram encontradas referências que discutissem exclusivamente as diferenças dos dois processos, nem uma explicação para o formato dos espectros.

Buscando comparar o resultado das laranjeiras com o do milho apresentado por Duarte [21], a Figura 7.7 mostra o gráfico do espectro de fluorescência da folha do milho também no início de um regime de estresse hídrico. Vemos que para o milho as duas excitações implicam num espectro com

pico de emissão na RF, mostrando que o espectro de fluorescência também muda de acordo com a espécie estudada.

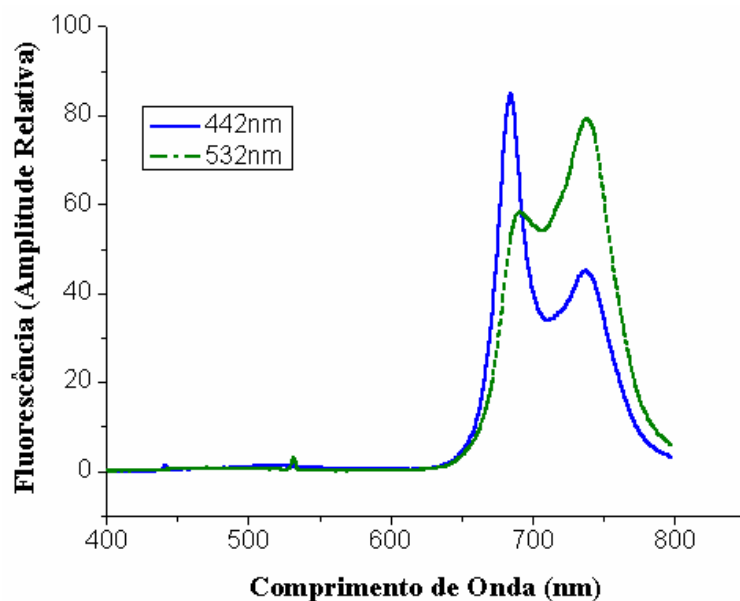


Figura 7.6 – Espectros de fluorescência da laranja usando duas fontes de excitação distintas. Uma emitindo luz azul em 442 nm e a outra emitindo luz verde em 532 nm.

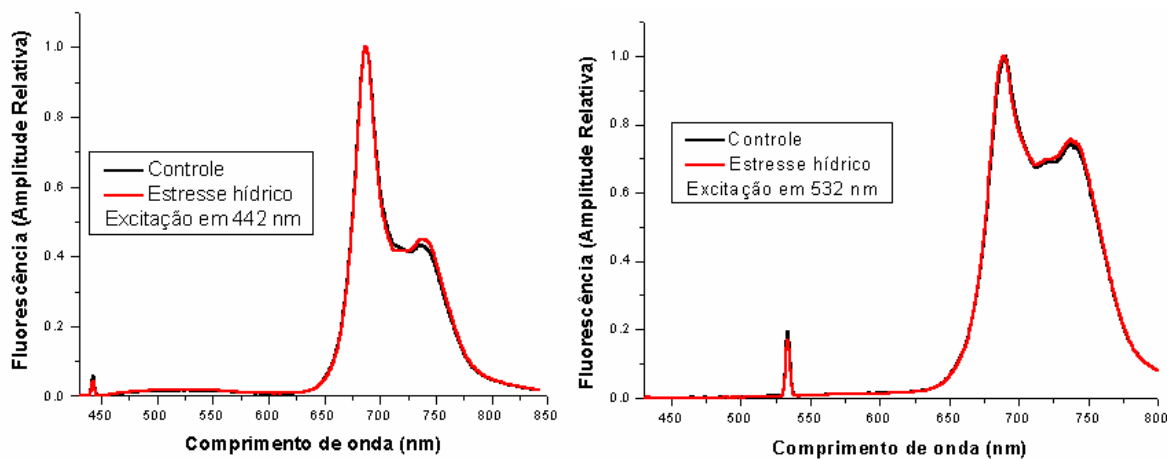


Figura 7.7 – Espectros de fluorescência do milho usando duas fontes de excitação distintas. Uma emitindo luz azul em 442 nm e a outra emitindo luz verde em 532 nm.

Em seguida os resultados apresentados dirão respeito à diferenciação da resposta das laranjeiras sob estresse hídrico das laranjeiras fora do estresse. Primeiro são apresentados os resultados usando luz azul em 442 nm como fonte de excitação. A Figura 7.8 mostra um gráfico da média da razão RF/FRF de todas as amostras do grupo controle e todas do grupo sob estresse ao longo do regime de estresse.

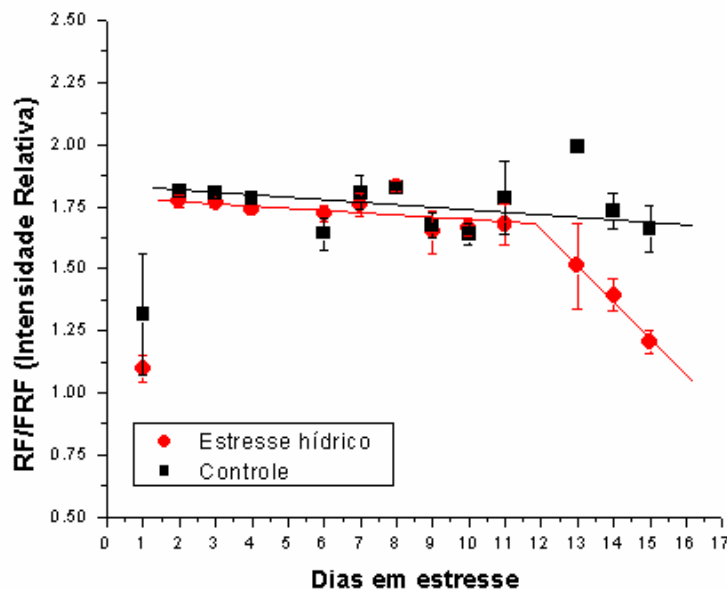


Figura 7.8 – Média da RF/FRF de cada um dos grupos controle e estresse hídrico.

A Figura 7.8 mostra que foi possível distinguir os dois grupos avaliados a partir do décimo segundo dia do estresse. As linhas vermelha e preta enfatizam o comportamento desta razão. Ela também mostra que o comportamento da razão dos grupos antes do 12º dia era semelhante mostrando que na média as amostras sob estresse resistiram 11 dias ao estresse hídrico.

O resultado se assemelha com o obtido por *Danh e colaboradores* [12] em milho, que também mediu o decréscimo da razão quando submeteu o milho ao estresse hídrico. Seu trabalho foi citado no artigo de revisão publicado por *Cerovic e colaboradores* [8] sobre a emissão da fluorescência das folhas como uma técnica para detecção de estresses.

Procurando enfatizar ainda mais a diferença entre a RF e a FRF, a Figura 7.9 mostra um gráfico da relação $(RF-FRF)/(RF+FRF)$. Nela vemos que o comportamento dessa relação é bem semelhante à RF/FRF, mostrando que essa relação também pode ser usada para diferenciar laranjeiras sob estresse hídrico de outras fora do estresse.

Em seguida são apresentados os resultados da BF/RF e da BF/FRF usando luz azul como excitação. A Figura 7.10 mostra o comportamento da média dessas razões do grupo controle e estresse hídrico onde se pode ver que tanto para a BF/RF quanto para a BF/FRF a resposta do grupo controle é bem semelhante a do grupo sob estresse durante todo o período.

Dessa forma não foi possível distinguir os dois grupos usando a média das razões das amostras, embora o gráfico mostre que a partir do décimo segundo dia de estresse os dados dos dois grupos estão mais separados, apresentando a mesma informação que a RF/FRF.

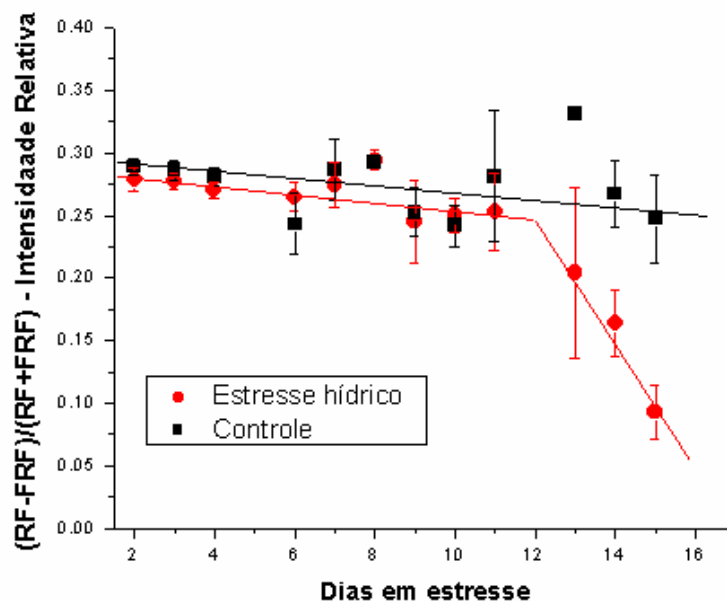


Figura 7.9 – Média da $(RF-FRF)/(RF+FRF)$ de cada um dos grupos controle e estresse hídrico.

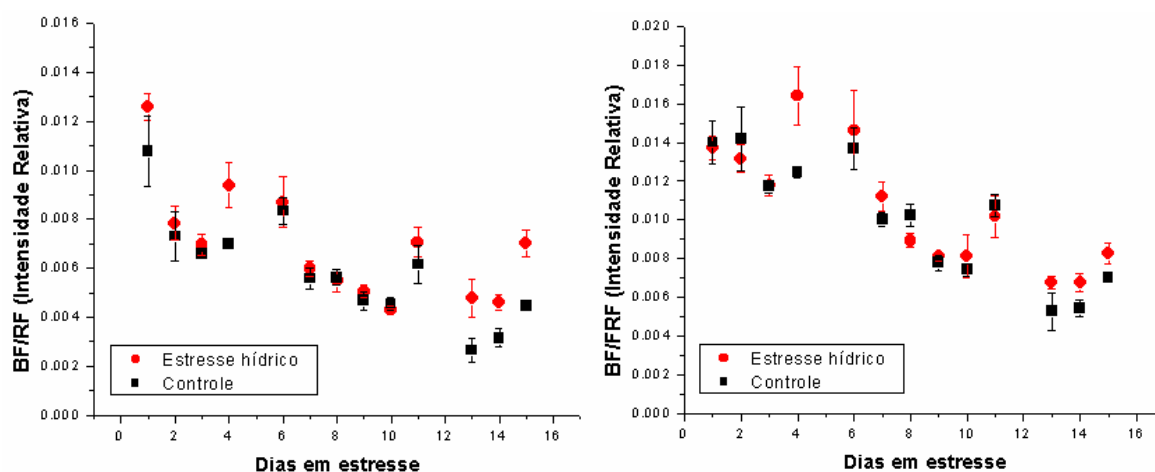


Figura 7.10 – Média das razões BF/RF e BF/FRF dos grupos avaliados

O problema é o comportamento decrescente da média das razões para os dois grupos até o 12º dia. Segundo *Cerovic* [8] essa razão é bastante útil para a detecção do déficit de minerais, e é possível que esse comportamento seja uma resposta ao consumo dos minerais dos vasos, pois a reposição dos minerais não foi prevista pelo modelo adotado. Uma análise mais precisa deveria considerar a possibilidade de um déficit de minerais e a sua reposição.

Finalizada a análise dos resultados usando a luz azul como fonte de excitação, serão apresentados os resultados usando a luz verde como fonte de excitação. Primeiro será apresentado o resultado da RF/FRF e em seguida as imagens de fluorescência.

A Figura 7.11 mostra o comportamento da média da RF/FRF das amostras dos grupos avaliados. Ela mostra que o comportamento da razão de ambos grupos é muito semelhante, de forma que não é possível diferenciar uma laranjeira sob estresse de uma sadia usando esta técnica. A conclusão obtida analisando o gráfico é que não é possível diferenciar o comportamento de uma laranjeira sob estresse hídrico de uma sadia utilizando a razão RF/FRF com excitação de luz verde em 532 nm.

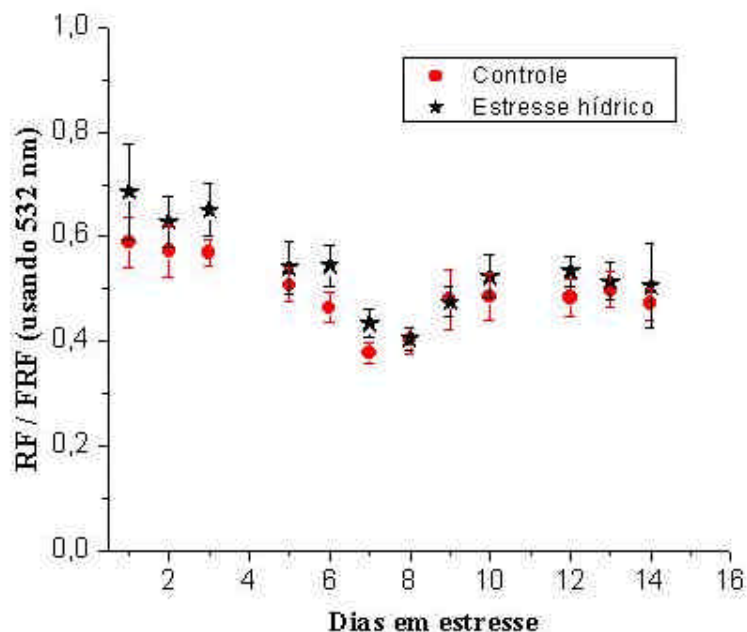


Figura 7.11 – Comportamento da RF/FRF durante o período de estresse hídrico, usando luz verde em 532 nm como fonte de excitação.

Quanto às imagens da fluorescência, um problema na montagem experimental impossibilitou a comparação entre as amostras dos dois grupos. Como mencionado no capítulo 6, a câmera utilizada na aquisição das imagens possuía uma função de regulação da entrada de luz para não saturar o detector e poder fazer as imagens, ou seja, ela regulava automaticamente e sem o controle do usuário a intensidade do sinal capturado.

Assim, a fluorescência emitida por duas laranjeiras distintas originaria duas imagens com a mesma intensidade, mesmo que as intensidades da fluorescência emitida fossem diferentes. Por isso, as imagens não foram usadas como uma ferramenta para diferenciar amostras com e sem o déficit hídrico, mas como uma ferramenta que pode detectar em que região da folha esta fluorescendo mais ou menos.

Esse dado é importante para identificar em que região da folha seria mais fácil detectar a presença do estresse hídrico, então o dado extraído das imagens é o gradiente de emissão da fluorescência na superfície da folha.

Inicialmente foram feitos testes para saber que potência do laser de excitação seria necessária para fazer as imagens. Como a área de iluminação era fixa para todas as imagens, o parâmetro analisado foi a densidade superficial de potência óptica ou iluminância.

Os valores da iluminância da folha variaram de 25 a 250 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ e já na última medição a iluminância na folha foi suficiente para queimá-la. A Figura 7.12 mostra quatro imagens da folha da laranjeira, onde as duas de cima são imagens da fluorescência emitida e as duas de baixo são imagens de referência feitas com iluminação de luz branca.

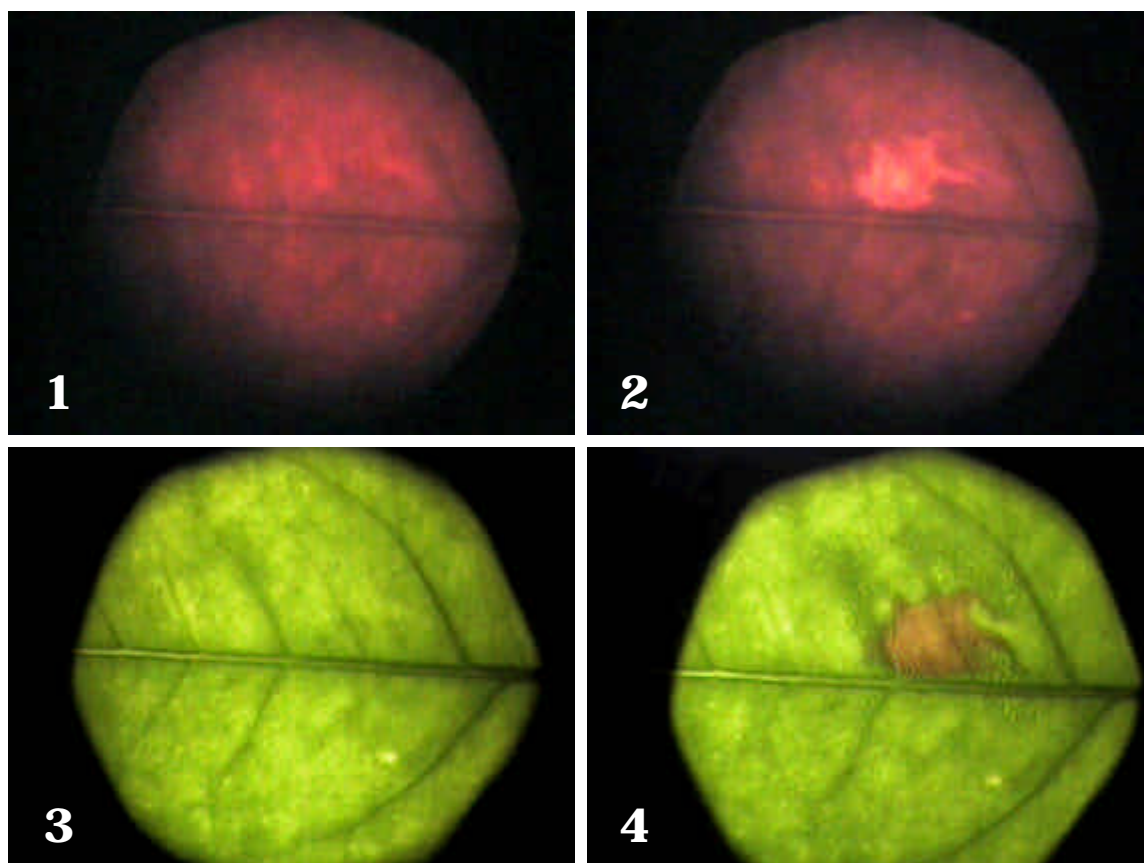


Figura 7.12 – Imagens de uma mesma folha ao testar a melhor iluminância para fazer as imagens de fluorescência. A imagem de fluorescência 1 foi obtida usando 200 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ de iluminância, enquanto a imagem 2 foi obtida com 250 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, esta segunda mostra a fluorescência da região queimada pela alta iluminância na folha. As imagens 3 e 4 são da folha antes e depois da queimadura, essas imagens foram feitas com luz branca.

As imagens de fluorescência foram excitadas com iluminância de 200 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ (imagem 1) e 250 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ (imagem 2). Quando exposta à última iluminância, durante um período de aproximadamente 30 segundos, a superfície da folha queimou. A densidade de energia entregue contabilizando todo o período foi de cerca de 7,5 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$. As duas imagens abaixo são referências para mostrar a folha antes e depois de queimada.

Para não correr o risco de queimar as folhas de medição a iluminância escolhida foi de $100 \text{ mW}\lambda\text{m}^{-2}$, dessa forma era possível obter imagens com intensidade suficiente para visualizar o gradiente de emissão e não perder as folhas de medida.

Um outro problema que envolvia a montagem experimental era sobre o posicionamento da muda em um local apropriado para que as folhas das mudas pudessem ser colocadas no suporte. Como o suporte que prendia a folha era fixo na mesa óptica qualquer posicionamento errado da laranjeira forçava demais o ramo de ligação entre a folha e o caule, que já era frágil por causa do estresse; e em algumas situações as folhas se desprenderam da muda.

Por isso só foram capturadas imagens até o décimo dia de estresse e mesmo assim em dias alternados para diminuir os acidentes do experimento. Por causa dessas precauções e dos acidentes as imagens obtidas são de três amostras que estavam sob estresse. Há imagens de uma amostra no sétimo dia, de outra no nono dia de estresse, e de uma terceira amostra no sétimo e no décimo dia de estresse.

O processamento das imagens é feito com o auxílio do Matlab[®]. Depois de capturadas a imagem de referência, a imagem da fluorescência e a imagem do feixe do laser as duas últimas são convertidas em escala de cinza e é feita a normalização da imagem de fluorescência pela imagem do feixe. Para evitar a divisão por zero uma rotina foi desenvolvida para fazer a normalização.

O resultado é a imagem da intensidade da fluorescência emitida em escala de cinza, e para melhorar a visualização do gradiente de fluorescência as cores falsas são utilizadas. A Figura 7.13 mostra imagens de folhas e imagens de fluorescência de folhas de amostras sob estresse hídrico. Essas imagens são úteis para mostrar o gradiente da fluorescência emitida pelas folhas.

A imagem 5 foi obtida de uma folha de uma amostra no sétimo dia de estresse iluminando-a com luz branca; essa imagem serve como referência para analisar a imagem 6, que é a imagem da fluorescência emitida por essa mesma folha depois do tratamento da imagem.

Essas imagens mostram que o lobo superior da folha, naquela posição escolhida, fluoresce mais que a parte inferior, pois a barra de cores pertencente à imagem 6 mostra que o máximo de fluorescência ocorre na parte superior. A barra de cores representa a intensidade relativa da fluorescência emitida.

As imagens 7 e 8 seguem a mesma descrição, só que foram obtidas de uma folha de outra amostra sob estresse, diferente da laranjeira das imagens 5 e 6, e no nono dia do regime de estresse. Elas também mostram o gradiente da fluorescência emitida por aquela folha.

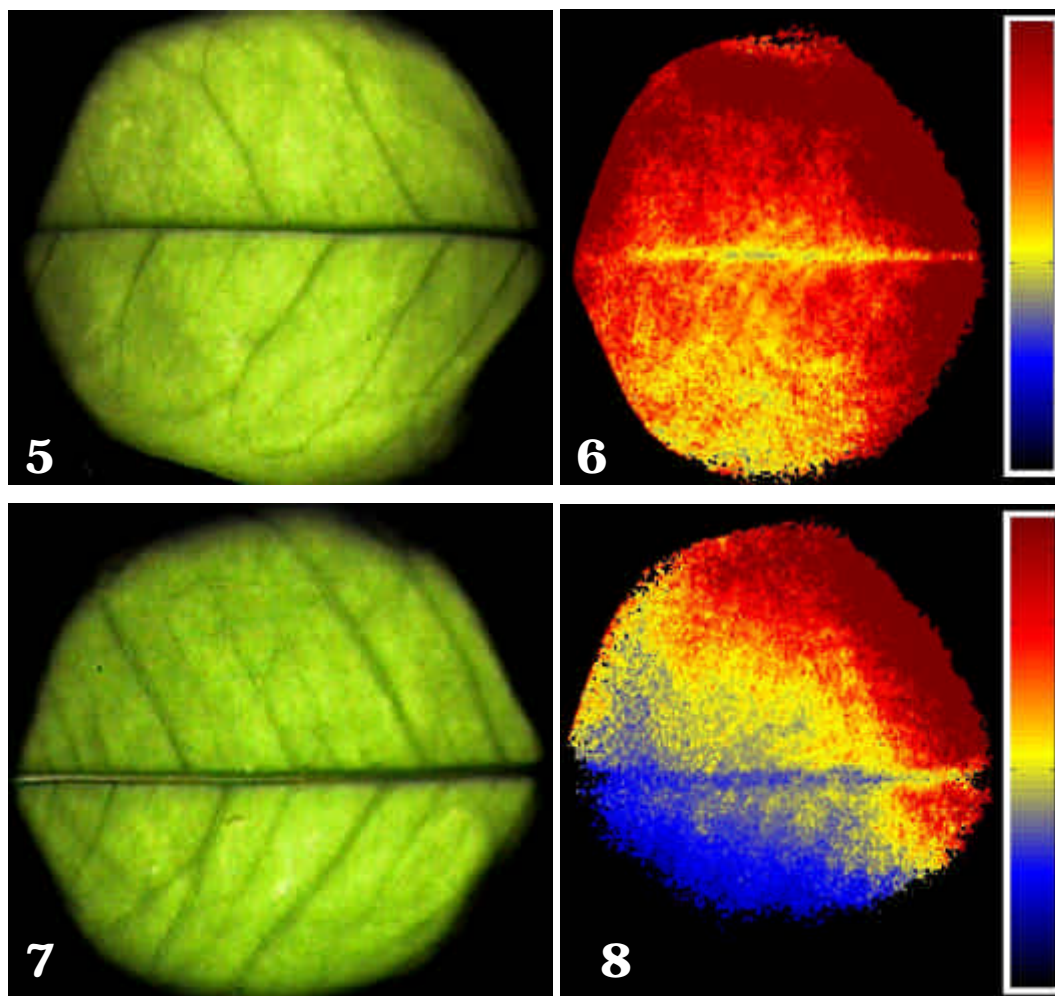


Figura 7.13 – *Imagens de referência e da fluorescência emitida por folhas de duas amostras distintas, mas sob estresse hídrico. As imagens 5 e 6 foram obtidas no sétimo dia e as imagens 7 e 8 foram obtidas no nono dia do regime de estresse.*

Mesmo sabendo que a comparação entre duas imagens feitas em dias diferentes não deve ser usada como parâmetro de informação por causa do problema da câmera de aquisição de imagens, a Figura 7.14 mostra a evolução da emissão de uma folha em um curto espaço de tempo.

As imagens foram obtidas de uma folha de uma amostra no sétimo (imagem 9) e no décimo dia de estresse (imagem 10) e mostram que em algumas regiões da folha a fluorescência aumentou bastante a emissão enquanto que em outras a emissão diminuiu. As linhas brancas nas imagens localizam o ramo central da folha e servem de referência para a análise.

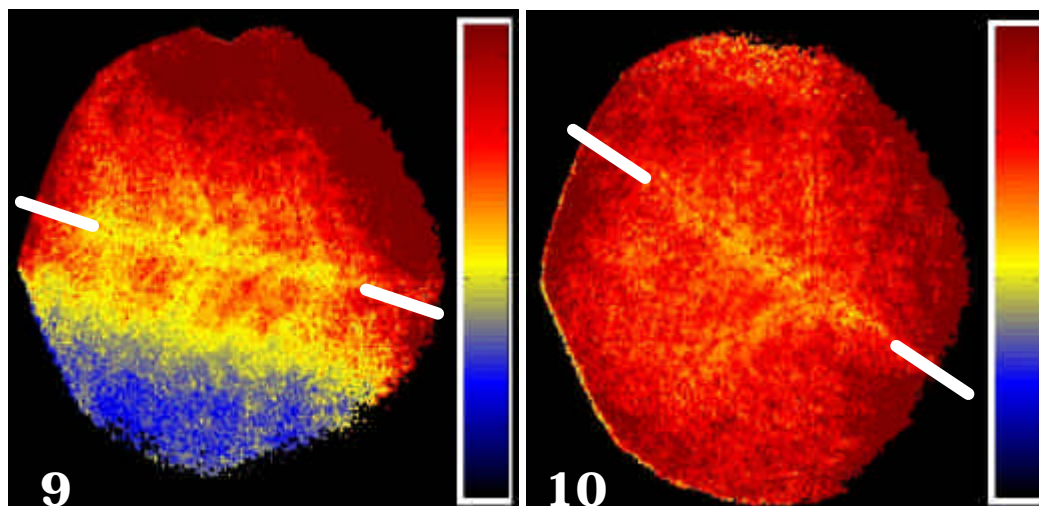


Figura 7.14 – Evolução da emissão da fluorescência de uma folha no sétimo dia de estresse (imagem 9) e no décimo dia de estresse (imagem 10).

7.4 Terceiro experimento – repetição dos resultados e aplicação da quimiometria

7.4.1 Alterações no experimento

O terceiro experimento tinha o objetivo de tentar repetir os dados do segundo experimento e algumas mudanças foram feitas na montagem experimental para certificar que a variação dos dados obtidos era causada pelo déficit hídrico.

Primeiro, a luminosidade, a temperatura e a umidade relativa do ambiente foram monitoradas para tentar buscar correlações entre os resultados e as variações desses fatores. Com isso seria possível certificar que influência os fatores ambientais estariam exercendo nas medições.

A segunda modificação feita foi na técnica de medição dos espectros, neste experimento a ponta do tubo de fibras ópticas foi fixado num suporte distante 3 mm da folha, o que não ocorreu no segundo experimento. Foi no segundo experimento que foi observada a influência do posicionamento da ponta do guia sobre os resultados, e em particular, viu-se que a ponta do tubo não deveria estar encostada na folha para fazer a medição.

Outra mudança foi a adição de um novo modelo de estresse hídrico onde a laranjeira era hidratada em períodos esparsos para não provocar a falência repentina dos órgãos funcionais da folha. Uma consequência desse novo modelo é que o aumento da resistência da laranjeira ao estresse, por isso o período de estresse que essas amostras foram submetidas durou 25 dias, além dos 15 dias de repouso já previstos. Esse modelo foi denominado de hidratação periódica.

Desta vez dez amostras de laranjeiras foram utilizadas, onde cinco faziam parte do grupo controle e cinco do grupo sob estresse hídrico. Dentro do grupo do estresse hídrico, três amostras eram aguadas com baixa frequência e duas amostras estavam em estresse direto.

Neste experimento não houve aquisição de imagens de fluorescência por devido à sua montagem experimental, no entanto a quimiometria foi avaliada como uma nova ferramenta para analisar a presença do estresse. Ela é uma técnica aplicada sobre os espectros medidos e que utiliza conhecimentos da matemática e da estatística para diferenciar os resultados de amostras sem e com um déficit hídrico.

7.4.2 Resultados

Inicialmente na Figura 7.15 são apresentados os gráficos da média da temperatura, média da luminosidade e média da umidade relativa no ambiente em que as plantas estavam localizadas durante o período de estresse. Estes gráficos são importantes para observar a influência que cada fator externo exerce na emissão da fluorescência.

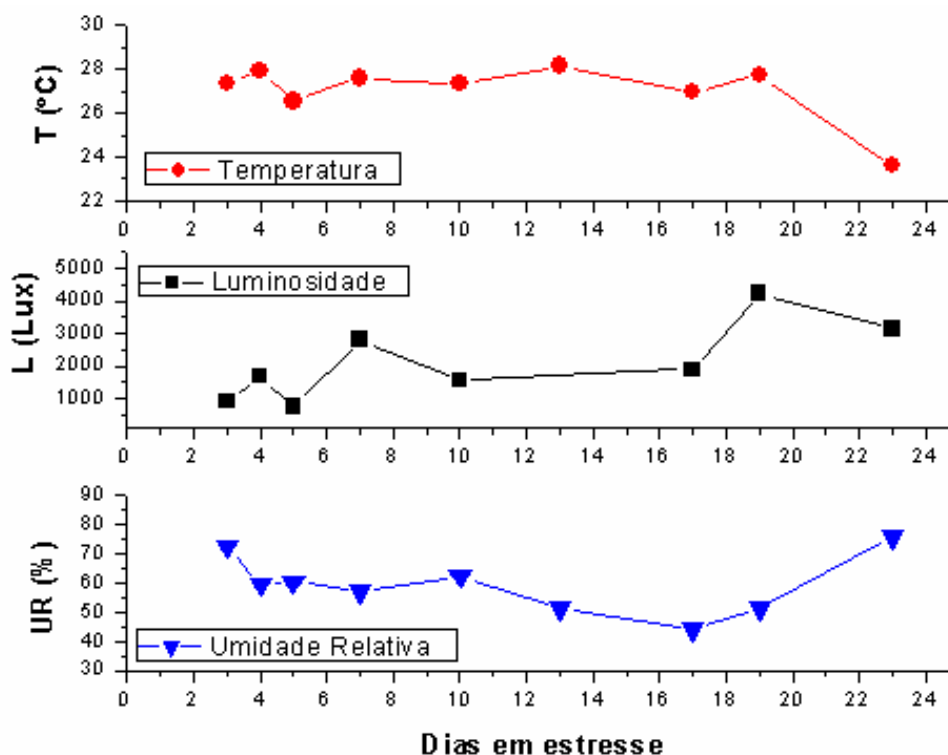


Figura 7.15 – Gráfico dos fatores ambientais temperatura, luminosidade e umidade relativa, no ambiente das amostras e durante o regime de estresse.

Agora serão apresentados os resultados das razões de fluorescência dos espectros medidos. Inicia-se, novamente, pelas razões com excitação por luz azul em 442 nm. A Figura 7.16 mostra o comportamento da média da RF/FRF de todas as amostras de cada um dos grupos avaliados.

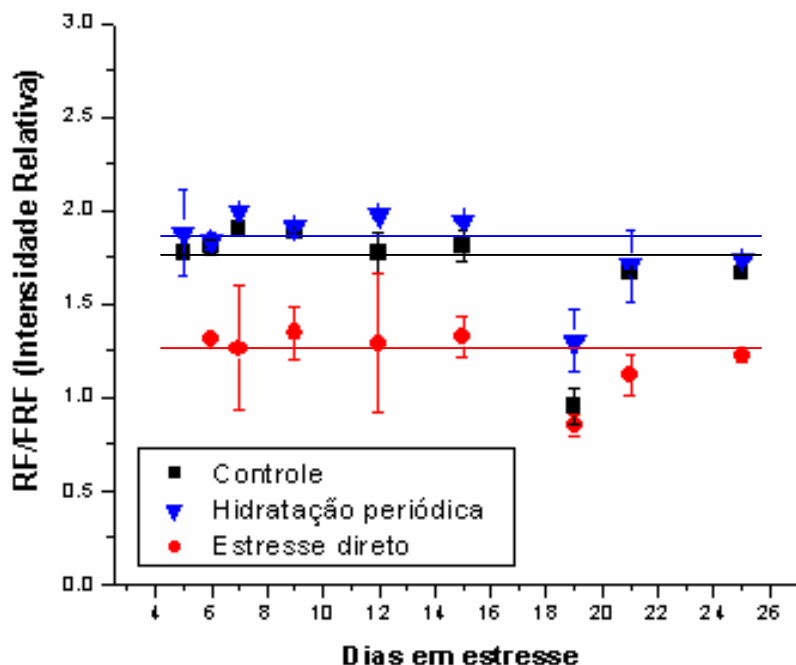


Figura 7.16 – Gráfico do comportamento da RF/FRF de todos os grupos avaliados durante o período de estresse.

Nesta figura vemos que as razões dos três grupos possuem um comportamento aproximadamente constante durante todo o período experimental e que é diferente do que ocorreu no segundo experimento quando a RF/FRF do grupo sob estresse direto iniciou constante e depois decaiu.

O gráfico também mostra que a RF/FRF do grupo sob estresse direto está bem separada dos demais grupos desde o início do estresse, assim, essa razão consegue diferenciar o grupo sob estresse direto, mas a variação dos dados não mostra a presença do estresse por causa do seu caráter constante.

Em relação ao grupo sob hidratação periódica o gráfico mostra que os resultados da sua razão estão mais próximos dos resultados do grupo controle que os resultados do estresse direto, de forma que não é possível distinguir o grupo controle do grupo sob hidratação periódica.

Quanto à razão do grupo controle o comportamento do segundo experimento foi repetido no terceiro por apresentar um caráter constante durante o período, inclusive com a mesma amplitude, em torno de 1,75. Já comparando os resultados da Figura 7.16 com os da Figura 7.15 vê-se que na média a razão RF/FRF de cada um dos grupos não têm o comportamento semelhante ao de algum dos fatores ambientais.

Mais uma vez dando ênfase à diferença entre os picos de fluorescência nas regiões da RF e da FRF, a Figura 7.17 mostra o gráfico da média razão $(RF-FRF)/(RF+FRF)$ dos grupos. A figura mostra um comportamento bem semelhante ao da razão RF/FRF, de forma que nenhuma informação adicional foi obtida.

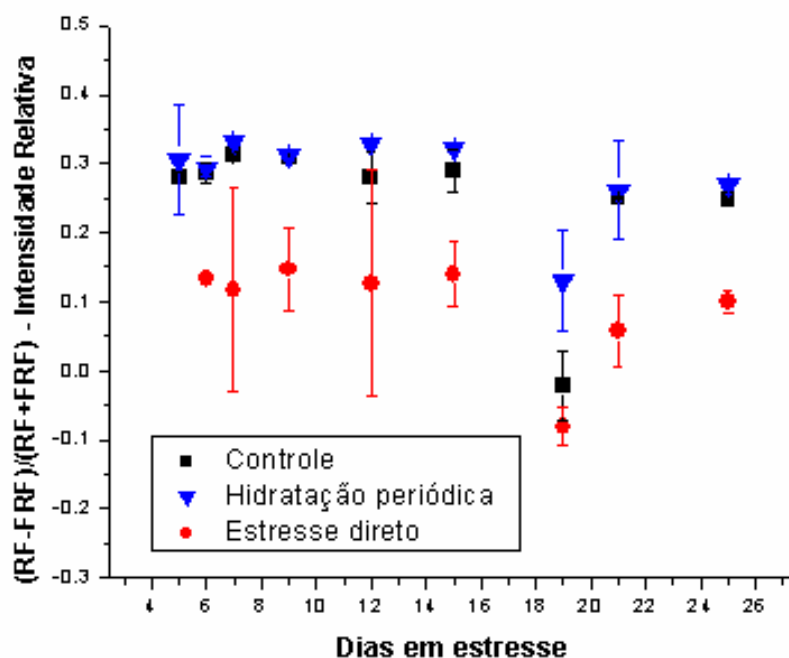


Figura 7.17 – Gráfico do comportamento da $(RF-FRF)/(RF+FRF)$ dos grupos avaliados.

Quanto às razões BF/RF e BF/FRF, o gráfico da média delas é apresentado na Figura 7.18. O gráfico da BF/RF mostra que na média não foi possível distinguir nenhum dos três grupos durante o estresse, pois os resultados são bem próximos.

Já a BF/FRF mostra um comportamento semelhante à RF/FRF, onde os dados do grupo sob hidratação periódica estão próximos dos dados do controle enquanto que os do grupo sob estresse direto estão bem separados. Assim, esta razão também consegue distinguir os grupos, mas não pode associar a mudança do seu comportamento ao estresse hídrico.

Em relação à variação dos fatores ambientais vale lembrar que foi discutido que eles influenciam a emissão da fluorescência inclusive na região da BF, da RF e da FRF, porém mais uma vez nenhuma das relações BF/RF e BF/FRF mostram um comportamento semelhante a algum daqueles fatores.

Um dado importante foi obtido casualmente durante a preparação dos dados para o processamento da quimiometria. Foi observado que algumas amostras do grupo sob estresse direto aumentaram a fluorescência na região do verde com pico em 524 nm. Esses resultados foram obtidos ao normalizar os espectros pela máxima emissão do espectro.

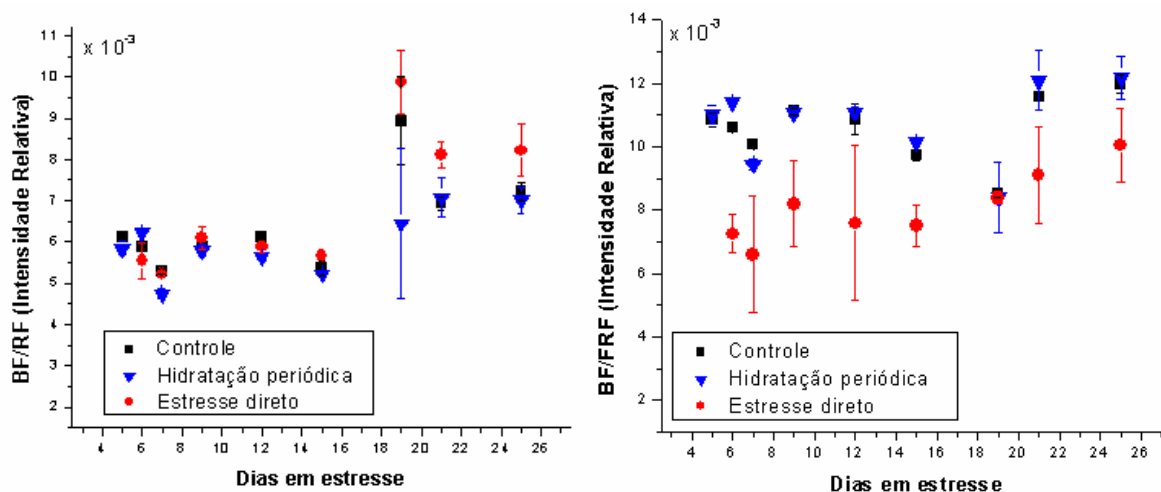


Figura 7.18 – Média das razões BF/RF e BF/FRF dos grupos avaliados

Acontece que a normalização da curva pelo pico máximo acentua a percepção da fluorescência nesta região do espectro porque coloca todas as curvas sob a mesma escala, enquanto que a normalização pelo pico da excitação da amostra, que foi a usada nas análises anteriores, destacava a fluorescência emitida na região da ChlF.

A Figura 7.19 mostra os gráficos dos espectros de fluorescência medidos no início e no final do regime de estresse hídrico, mostrando que esse comportamento é característico das amostras do grupo sob estresse direto.

Esse fenômeno também foi observado por *Chapelle* em seu trabalho sobre o estresse hídrico aplicado em soja [10] e citado em *Cerovic e colaboradores* [8]. Ele concluiu que a fluorescência era causada pelo acúmulo de compostos que fluorescem nessa região, como o FAD e o NADPH.

Em seguida são apresentados na Figura 7.20 os resultados da média da razão RF/FRF dos grupos, usando luz verde em 532 nm como excitação das laranjeiras. Este gráfico mostra que o comportamento da razão dos três grupos é bem semelhante de forma que não é possível distinguir os grupos no regime de estresse.

Esses resultados são semelhantes aos obtido no segundo experimento porque as razões de todos os grupos permanecem bem próximas durante todo o regime, de forma que os grupos são indistinguíveis usando esta técnica.

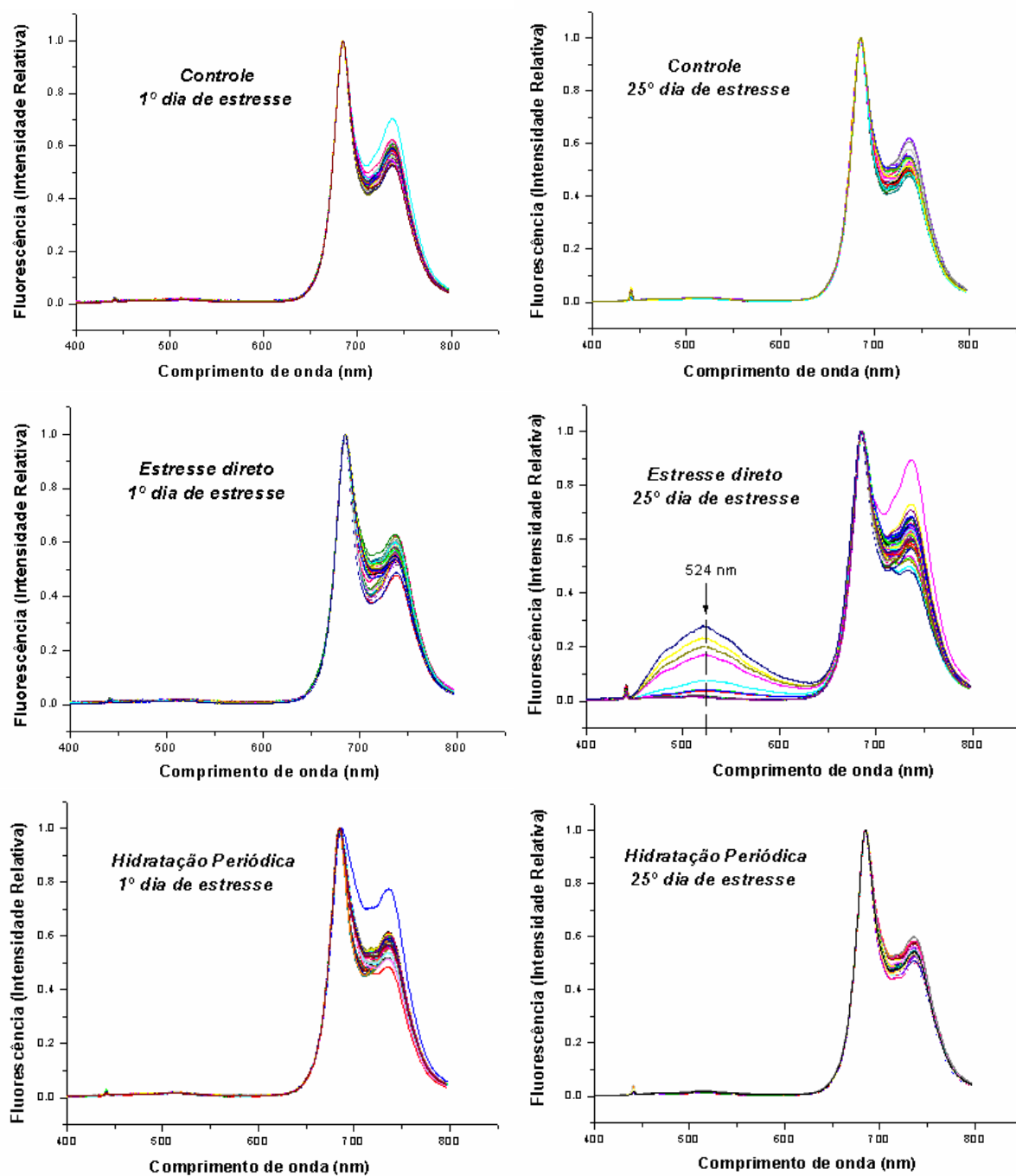


Figura 7.19 – Média das razões BF/RF e BF/FRF dos grupos avaliados

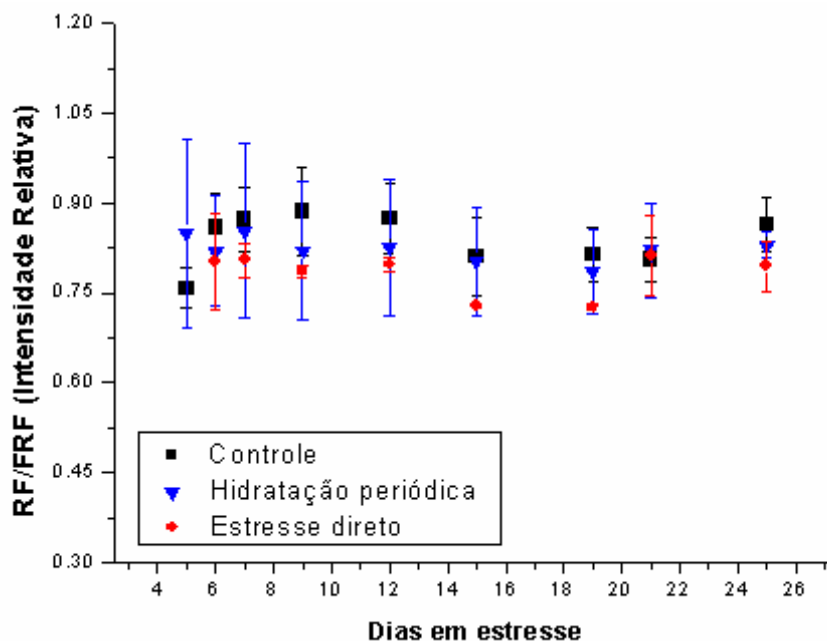


Figura 7.20 – Gráfico da RF/FRF e para as amostras dos grupos quando a excitação da fluorescência é luz verde em 532 nm.

7.4.3 Análise com a Técnica da Quimiometria

Para finalizar os resultados são apresentados os gráficos da aplicação da quimiometria aos espectros da fluorescência. Os gráficos são dos espectros do 1º e do 25º dia de estresse, ou seja, no início e no final do regime. A fluorescência foi excitada por luz azul em 442 nm e os gráficos são de amostras dos três grupos dispostos da seguinte forma:

- Cor azul ? grupo controle
- Cor vermelho ? grupo sob hidratação periódica
- Cor verde ? grupo em estresse direto.

Para o processamento cada um dos espectros foi normalizado pela máxima emissão e possui peso unitário, assim como cada comprimento de onda. Dessa forma, cada comprimento de onda e espectro contribui igualmente nos resultados. Nesta análise foram calculados quatro componentes principais (PC1, PC2, PC3 e PC4). O processamento foi realizado nos dados entre 450 e 850 nm de cada espectro para evitar os dados da excitação da fluorescência

A Figura 7.21 mostra os resultados da quimiometria do 1º dia obtidos depois do processamento pelo software *Unscramble*® enquanto que a Figura 7.22 mostra os resultados do 25º dia do regime de estresse.

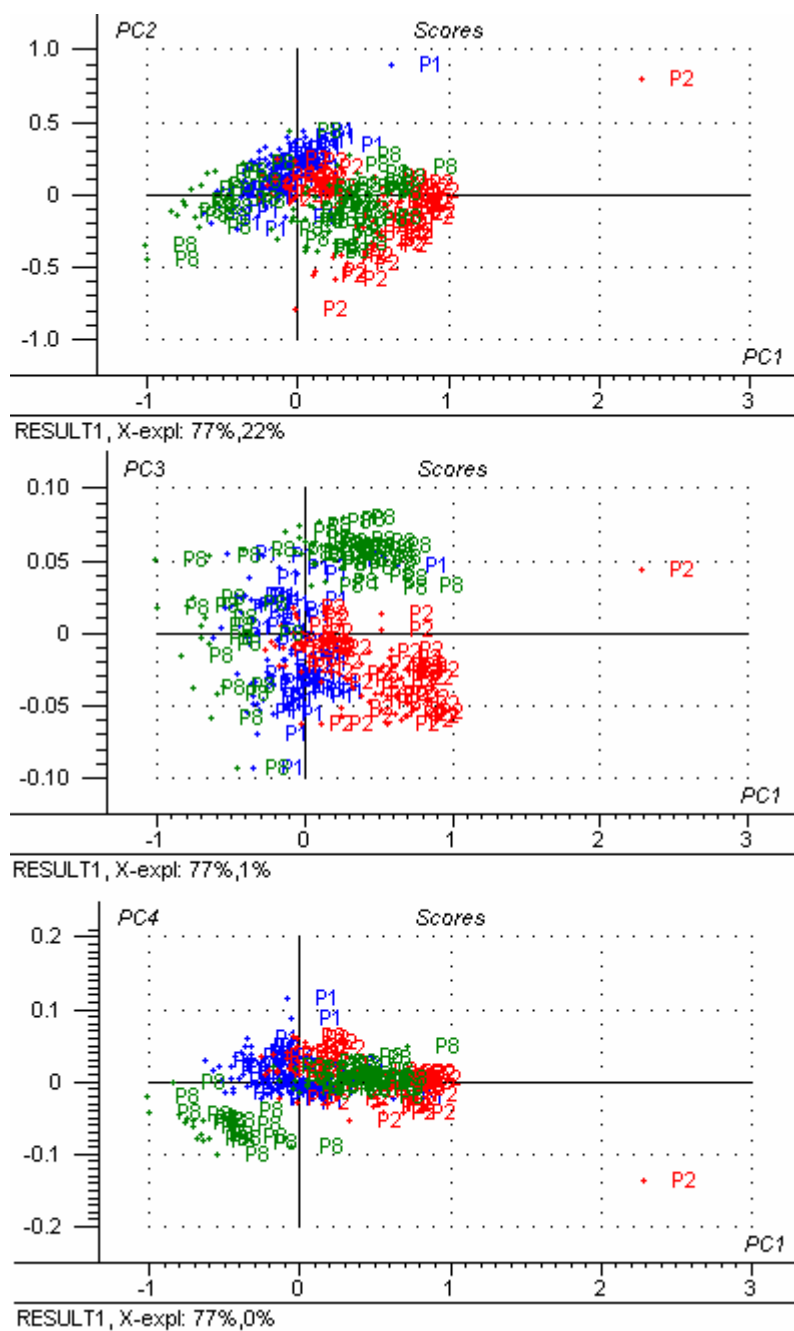


Figura 7.21 – Gráficos da quimiometria aplicada aos espectros medidos no 1º dia do regime de estresse.

Nestas duas figuras é possível ver que PC1 e PC2 são as componentes principais mais importantes porque o gráfico PC1 x PC2 representa 99% da variância dos dados no 1º dia e 95% no 25º dia do regime de estresse. As figuras 7.21 e 7.22 também mostram os dados dos gráficos estão mais agrupados no início que no final do regime, mostrando que inicialmente as amostras estão num mesmo estado fisiológico.

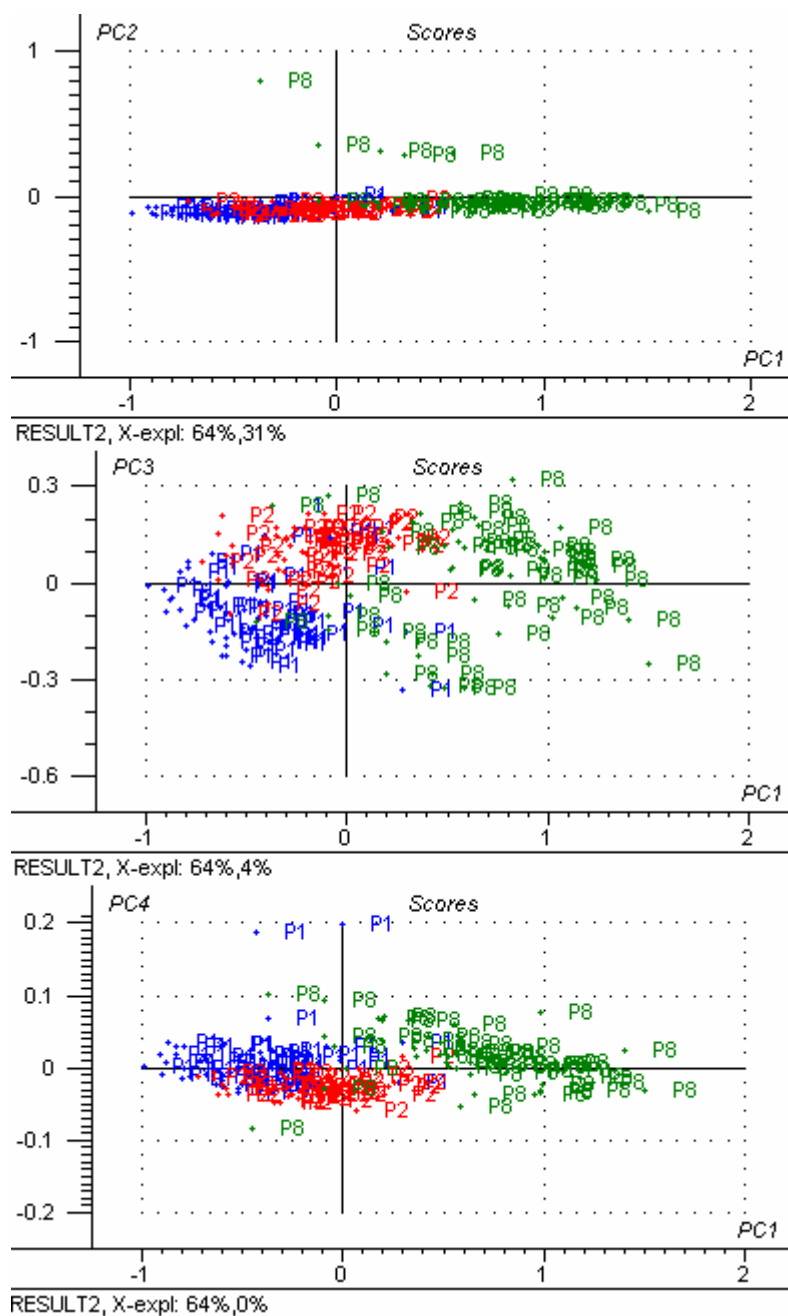


Figura 7.22 – Gráficos da quimiometria aplicada aos espectros medidos no 22º dia do regime de estresse.

A Figura 7.22 também mostra que foi possível separar bem cada um dos grupos no último dia do regime, para validar um modelo de reconhecimento de padrões. Esta mesma figura ainda mostra que os dados do grupo sob estresse direto estão mais separados do controle que os do grupo sob hidratação periódica, mostrando a clara distinção entre amostras sob estresse e fora do estresse.

8. CONCLUSÕES, TRABALHOS FUTUROS E RESULTADOS PUBLICADOS

8.1 Introdução

Além das conclusões sobre as análises das técnicas, dos métodos científicos, dos modelos aplicados e dos resultados obtidos, este trabalho trouxe um pouco mais do que o conhecimento técnico sobre o assunto estudado.

Durante oito meses foram feitos experimentos sobre um tema difícil de interpretar por causa do seu caráter multidisciplinar, obtendo dados hora satisfatórios, hora não, mas que foram bastante úteis para desenvolver a disciplina necessária para atingir os objetivos.

A paciência e a persistência foram integrantes essenciais no desenvolvimento desta disciplina, pois são requisitos primordiais na pesquisa científica. Organizar as idéias e criar uma metodologia também foram ações importantes para tentar alcançar o sucesso.

A recompensa foi maior que a experiência obtida com o esforço da pesquisa. Além da aprendizagem do tema a organização das idéias é essencial para a formação pessoal; com certeza “o todo é muito maior que a soma das partes”.

8.2 Sobre o uso dos espectros e das razões de fluorescência na identificação do déficit hídrico

Pode-se concluir que o uso dos espectros e das razões da fluorescência emitida pra diferenciar laranjeiras que estão sofrendo um déficit hídrico de outras laranjeiras sem o déficit, é uma prática de sucesso. Como foi mostrado nos resultados, naquelas condições foi possível diferenciar as amostras dos dois grupos.

Embora as conclusões sobre quais fenômenos fisiológicos estão ocorrendo na folha não serem apresentadas, pois este não era o objetivo do trabalho, as técnicas aplicadas conseguiram, de alguma forma, contribuir para o entendimento sobre o que ocorre com a fluorescência emitida pela folha quando a planta está submetida a um estresse ambiental.

Sobre o comportamento dos espectros, concluímos que ele é realmente rico em informações sobre o estado fisiológico das plantas, mas que é extremamente sensível aos diversos fatores ambientais, e que utilizar apenas o espectro da fluorescência para observar a resposta de uma planta a um estresse ambiental pode tornar a tarefa difícil, por isso deve-se utilizar uma outra ferramenta adicional para a análise.

Ainda sobre os espectros medidos, conclui-se que a forma de apresentação do espectro pode facilitar a observação de mudanças em outras regiões do espectro, como na detecção da fluorescência no verde, que só foi possível por causa da normalização de cada um dos espectros pelo pico de emissão da fluorescência.

Sobre as razões de fluorescência, pode-se concluir que são bastante importantes para detectar qualquer alteração fisiológica na laranjeira, exatamente por relacionar a fluorescência de origens diferentes.

Usando excitação azul, a média da RF/FRF conseguiu representar o estado aproximadamente constante das amostras fora do estresse do segundo e do terceiro experimento, e conseguiu diferenciar as amostras do grupo controle das amostras sob estresse. Quanto ao uso da $(RF-FRF)/(RF+FRF)$ foi proveitoso, pois ela veio dar uma maior ênfase à diferença de emissão entre os picos da RF e da FRF, e serviu como boa ferramenta para auxiliar a RF/FRF.

Ainda com a excitação azul as BF/RF e BF/FRF não foram proveitosas para a detecção do estresse. Talvez por ela ser bastante sensível aos fatores ambientais, como foi descrito pelas referências do trabalho, o comportamento de ambas razões foi bastante oscilatório nos dois últimos experimentos, por isso a conclusão sobre as BF/ChlF é que na média elas não são úteis para detecção do déficit hídrico.

Por fim a conclusão sobre o uso da RF/FRF dos espectros da fluorescência excitada por luz verde em 532 nm é que novos experimentos precisam ser realizados para confirmar a sua utilidade, mas que na média não foi possível diferenciar os grupos com ela.

No segundo e no terceiro experimento o comportamento da média desta razão foi idêntico entre os grupos avaliados, porém esta razão teve sucesso na diferenciação do grupo sob estresse quando a excitação foi luz azul, por isso novos experimentos podem confirmar se esta razão não obtém sucesso quando a excitação é verde.

A conclusão final sobre essas razões avaliadas é que, nas circunstâncias experimentais em que as amostras foram submetidas, apenas a razão de fluorescência RF/FRF usando luz azul em 442 nm como fonte de excitação obteve sucesso na diferenciação de laranjeiras com déficit hídrico de laranjeiras sem o déficit.

8.3 Sobre as imagens de fluorescência

A conclusão sobre as imagens de fluorescência é que ela é uma técnica eficaz e foi capaz de cumprir o seu propósito que era mostrar a variação da fluorescência emitida existente entre as regiões da folha. A utilização desta técnica para obter outras informações foi impedida por um erro na monta-

gem experimental, na escolha da câmera de aquisição, então, aprimorar a montagem experimental melhoraria o uso das imagens de fluorescência.

No entanto, melhorar a montagem não fica restrito apenas à troca da câmera, usar outros filtros ópticos de banda de transmissão específica traria informações precisas da emissão da BF, da RF ou da FRF através de imagens e seria possível construir imagens das razões de fluorescência. Vale lembrar que as imagens apresentadas nesta tese são de toda a fluorescência emitida entre 600 e 800 nm, e não nas regiões dos picos da fluorescência.

Por fim, esta técnica é promissora e pode ser uma das opções para montar um equipamento de avaliação de estresse e outros fatores ambientais diretamente na plantação, pois depende de uma montagem experimental de fácil acesso ao campo.

8.4 Sobre a aplicação da quimiometria nos espectros da fluorescência emitida

A aplicação da quimiometria nos espectros de fluorescência das laranjeiras também obteve êxito na diferenciação dos grupos, e ainda mais, na diferenciação dos dois tipos de estresse propostos no terceiro experimento.

Como foi visto nos gráficos os resultados da quimiometria mostraram que a resposta das laranjeiras sob hidratação periódica é semelhante à resposta das laranjeiras fora do estresse, mas a resposta das laranjeiras sob estresse hídrico direto é bem diferente, por isso o estresse direto pode ser diferenciado com mais precisão.

Conclui-se, então, que esta técnica é eficaz e bastante promissora para ser usada no diagnóstico das deficiências hídricas de laranjeiras, pois ela separa as respostas das amostras com e sem a carência em regiões distintas e bem definidas.

Mesmo assim, esse estudo apresentado da aplicação da quimiometria em espectros de fluorescência ainda não está completo porque falta o desenvolvimento do modelo de reconhecimento de padrões das amostras.

8.5 Trabalhos futuros

Os trabalhos futuros visam desenvolver um equipamento de detecção remota das deficiências das plantas diretamente nas plantações, para isso é necessário refazer os experimentos para detecção de estresse hídrico e iniciar experimentos com deficiência de minerais no solo e nas plantas, buscando

avaliar a melhor forma de tratamento dos dados, além de avaliar o uso de outros equipamentos que melhor se adaptariam às condições do campo.

Quanto aos experimentos de avaliação das ferramentas de detecção, deve-se dar uma maior importância à fluorescência na região do verde e usar ferramentas que relacionam a emissão no verde com a emissão em outras regiões do espectro, pois como foi visto nos resultados apresentados, a fluorescência na região do verde aumenta a medida em que o estresse hídrico se desenvolve.

Um outro experimento a ser realizado avaliará uma outra ferramenta de detecção através da análise da reflexão da folha, já existem alguns trabalhos na literatura que mostram a possibilidade de usar a reflexão da folha para observar mudanças fisiológicas, mas não existe nenhum trabalho que compare a eficiência dos dois fenômenos ópticos.

Um outro experimento que envolve técnica e equipamento é a formação das imagens das raízes de fluorescência. Provavelmente fazer imagens das folhas seja uma das melhores formas de avaliar o estado fisiológico de uma planta envelhecida ou uma árvore porque ela analisa ao mesmo tempo diversas regiões das folhas.

Em relação aos equipamentos, um dos trabalhos futuros será tentar detectar os estresses usando leds como fonte de excitação. Em geral os leds são mais baratos que os lasers e de manuseio mais fácil, o que facilitaria no desenvolvimento de equipamentos para uso nas plantações.

Por fim, também é necessário desenvolver uma ferramenta computacional própria para aplicação da quimiometria, pois assim seria possível ter uma ferramenta voltada para as aplicações no agro-negócio. Vale lembrar também que existem outras técnicas de reconhecimento de padrões além do PCA.

8.6 Resultados publicados

Graças aos resultados obtidos foi possível publicar o artigo “Fluorescence Spectroscopy to Detect Water Stress in Orange Trees”, dos autores: Emery C. Lins, Frederico D. Nunes, Maria C. Gasparoto, J. Belasque Jr., Vanderlei S. Bagnato e Luis G. Marcassa. O artigo foi apresentado na *International Microwave and Optoelectronics Conference – IMOC*, realizado em julho de 2005 em Brasília-BR.

REFERÊNCIAS

Apostila:

- [1] NUNES, Frederico Dias *Mecânica Quântica Aplicada*. Apostila e referência literária do curso *Mecânica Quântica* do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica/UFPE, 2004.

Artigos:

- [2] AGATI, G.; MAZZINGHI, P.; DI PAOLA, M. L.; et al. The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as indicator of chilling stress in plants. *J. Plant Physiology*, 148, pp. 384-390, 1996.
- [3] AGATI, G.; MAZZINGHI, P.; FUSI, F. et al. The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as a tool in plant physiology: response to physiological and environmental factors. *J. Plant Physiology*, 145, pp. 228-238, 1995.
- [4] BARBAGALLO, R. P.; OXBOROUGH, K. PALLETT, K. E. et al. Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging, *Plant physiology*, vol. 132, pp 485-493, junho de 2003.
- [5] BONGI G., PALLIOTTI A., ROCCHI P. et al. Blue-green fluorescence by UV laser on leaves of different species originates from cutin and is sensitive to leaf temperature. *Plant Cell Environment*, 17, pp 777-780, 1994.
- [6] BROGLIA, M. Blue-green laser-induced fluorescence from intact leaves: actinic light sensitivity and subcellular origins, *Applied Optics*, vol. 32, nº 3, janeiro de 1993.
- [7] BUTLER, W. L. and Kitajima, M. Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*. 376, pp 116-125, 1975.
- [8] CEROVIC, Z. G.; SAMSON, G.; MORALES, F. et al. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects, review article, Elsevier *Agriculture and Environment*, vol. 19, pp. 543-578, setembro de 1999.
- [9] CHAPELLE, E. W.; MCMURTREY, J. E.; WOOD, F. M. et al. Laser-induced fluorescence of green plants. 2: LIF caused by nutrient deficiencies in corn. *Applied Optics*, 23, pp. 139-142, 1984.
- [10] CHAPELLE, E. W; WOOD Jr., F. M.; MCMURTREY III, J. E. et al. Laser-induced fluorescence in green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation. *Applied Optic*. vol 23, nº 1, janeiro de 1984.

- [11] CSINTALAN, Z.; TUBA, Z. and LICHTENTHALER, H. K. Changes in laser-induced chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 in the poikilochlorophyllous desiccation tolerant plant *xerophyta scabrida* during desiccation. *J. Plant Physiology*, 152, pp. 540-544, 1998.
- [12] DAHN, H. G.; GÜNTHER, K. P. and LÜDEKER, W. Characterization of drought stress of maize and wheat canopies by means of spectral resolved laser induced fluorescence. *Adv. Remote Sensing*, 1, pp. 12-19, 1992.
- [13] FLEXAS, J; BRIANTAIS, J-M; CEROVIC, Z. et al. Steady-state and maximum chlorophyll fluorescence response to water stress in grapevine leaves: A new remote sensing system. *Remote sensing of environment*, vol 73, pp. 283-297, 2000.
- [14] GITELSON, A. A.; BUSCHMANN, C. and LICHTENTHALER, H. K. Leaf chlorophyll fluorescence corrected for reabsorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiology*, 152, pp. 283-296, 1998.
- [15] GRÄBER, P. and WITT, H. T. Relations between the electrical potential, pH gradient, proton flux and phosphorylation in the photosynthetic membrane, *Biochimica et Biofysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, vol 423, Issue 2, pp. 141-163, 1976.
- [16] LICHTENTHALER, H. K. and BABANI, F. Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence, *Plant Physiology Biochemistry*, n° 38, pp 889-895, agosto de 2000.
- [17] LICHTENTHALER, H. K. and MIEHÉ, J. A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in plant science*, vol 2, n° 8, pp 316-320, agosto de 1997.
- [18] MORALES, F., CEROVIC, Z.G., MOYA, I. Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet leaves. Temperature-induced changes and consequences for the potential use of blue-green fluorescence as a signature for remote sensing of plants, *Aust. J. Plant Physiology*, vol. 25, pp. 325-334, 1998.
- [19] THEISEN, A. F. Fluorescence changes of a drying maple leaf observed in the visible and near-infrared. In: LICHTENTHALER, H. K. (Ed.), *Applications of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis Research, Stress Physiology, Hydrobiology and Remote Sensing.*, Dordrecht, 1988, Kluwer Academic Publisher, pp. 197-201.
- [20] XU, Qing-Hua; GAYLORD, Brent S.; WANG, Shu et al. Time-resolved energy transfer in DNA sequence detection using water-soluble conjugated polymers: The role of electrostatic and hydrophobic interactions. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of EUA*, vol 101, n° 32, pp. 11634-11639, agosto de 2004.

Dissertações:

- [21] DUARTE, C. H. *Detecção Óptica da Eficiência Quântica da Fotossíntese*. Recife, 2003. Dissertação para o grau de Mestrado em Engenharia Elétrica – Departamento de Eletrônica e Sistemas - UFPE.

Livros:

- [22] ATKINS, P. W. *Physical Chemistry*. Sixth edition, Oxford, Oxford Press, 1998.
- [23] AWCOCK, G. W. and THOMAS, R. *Applied Image Processing*. New York, McGraw-Hill, 1996.
- [24] BEEBE, Kenneth; PELL, Randy and SEASHOLTZ, M. Bety; *Chemometrics. A Practical Guide*. New York, John Wiley & Sons, 1998.
- [25] BORN, Max and WOLF, Emil. *Principles of Optics*. Seventh edition, New York, Cambridge University Press, 1999.
- [26] CHANG, Raymond. *Basic Principles of Spectroscopy*. Mc Graw-Hill, 1971.
- [27] DAVIS, Summer P. *Diffraction Grating Spectrographs*. Berkeley, Holt, Rinehart and Winston, Inc. 1969.
- [28] EISBERG, R and RESNICK, R. *Física Quântica*. Rio de Janeiro, Campus, 1979.
- [29] HECHT, Jeff. *The Laser Guide Book*. Second edition, Mc Graw Hill, 1992.
- [30] IGA, Ken-ichi. *Fundamentals of Laser Optics*. New York, Plenum Press, 1994.
- [31] LAWLOR, David W. *Photosynthesis*. Third edition, New York, BIOS Scientific Publishers Ltd., 2001.
- [32] LEHNINGER, Albert; NELSON, David e COX, Michael. *Princípios de bioquímica*. Segunda edição, São Paulo, Sarvier editora de livros médicos, 1995.
- [33] MACHALE, Jeanne L. *Molecular Spectroscopy*. New Jersey, Prentice Hall, 1999.
- [34] MACQUARRIE, Donald. and SIMON, John D. *Physical Chemistry A Molecular Approach*. California, University Science Books, 1997.
- [35] PALAIS, Joseph C. *Fiber Optic Communications*. Fourth edition, New Jersey, Prentice Hall, 1998.
- [36] RAVEN, Peter, EVERT, Ray and EICHHORN, Susan. *Biologia Vegetal*. Sexta edição, Editora Guanabara Koogan SA, 2001.

- [37] SHARAF, Muhammad; ILLMAN, Deborah and KOWALSKI, Bruce; *Chemometrics*. New York, John Wiley & Sons, 1986.
- [38] STRYER, Lubert. *Bioquímica*. Quarta edição, Editora Guanabara Koogan SA, 1995.
- [39] TAIZ, Lincoln and ZEIGER, Eduardo. *Fisiologia Vegetal*. Terceira edição, Porto Alegre, Artmed Editora, 2004.

Páginas eletrônicas:

- [40] FAO – Food and Agriculture Organization; www.fao.org, acesso em 25 de abril de 2005.
- [41] IEC – International Electrotechnical Commission; 60825-1: 2001 Edition 1.2. Safety of laser products Part 1. Equipment classification, requirements and user's guide. IEC, Geneva. Consultado a partir de <http://domino.iec.ch/preview.html>, acessado em 23 de maio de 2005.
- [42] TOSHIBA; www.toshiba.com, acesso em fevereiro de 2005.