

SISTEMA COMPACTO PARA MONITORAMENTO “IN VIVO” E “IN SITU” DA FOTOSÍNTESE. (CONSUMO DE CO₂ E EVOLUÇÃO DE O₂)

Claudia Souza Pires

Manuel Francisco Ribeiro

Marcos Dias da Silva

cpires@las.inpe.br; manuel@las.inpe.br; marcos@las.inpe.br

RESUMO

A partir do estudo da atividade fotossintética, em resposta à absorção de nutrientes e poluentes, intensidade luminosa e condições do ar e temperatura, que novas variedades, fertilizantes e pesticidas são avaliados. O Laboratório de Sensores Ambientais (LSA) do CTE-INPE vem desenvolvendo um sistema compacto para monitoramento da fotossíntese “in vivo” “in situ” (consumo de CO₂ e evolução do O₂). O consumo de CO₂ é monitorado por espectroscopia no infravermelho (4,26µm) de maneira convencional. A evolução de O₂ é monitorada por técnica fotoacústica. Esta metodologia consiste na utilização da própria câmara acústica frontal de um microfone de eletreto como câmara fotoacústica. O microfone é acoplado diretamente à folha vegetal em estudo e a fotossíntese é excitada através de luz modulada; dessa forma são produzidos pulsos de O₂ para o interior da câmara, gerando um sinal acústico proporcional a quantidade de O₂ evoluída. Esta medida é feita simultaneamente com a de absorção de CO₂, baseada na espectroscopia no infravermelho. Este trabalho consistiu em testes com amostras de palmito e bambu para comparar o desempenho entre a eletrônica dedicada ao sistema, que está sendo desenvolvida no LSA, e a eletrônica comercial disponível. Os testes indicam que a sensibilidade da eletrônica desenvolvida é compatível com a obtida utilizando-se equipamentos comerciais.

PIBIC/CNPq

Relatório Científico Parcial

Sistema compacto para monitoramento “in vivo” e “in situ” da fotossíntese.

(consumo de CO₂ e evolução de O₂)

Bolsista: Claudia Souza Pires
Aluna de graduação em Engenharia Ambiental
e Sanitária da Universidade de Taubaté.

Orientador: Marcos Dias da Silva
Tecnologista Sênior do Laboratório Associado de Sensores e Materiais Instituto
Nacional de Pesquisas Espaciais.



LAS/INPE
Fev. 2001

Introdução

O monitoramento da fotossíntese, baseado nas medidas de consumo de CO₂ e evolução de O₂, é de fundamental importância para os fisiologistas e geneticistas de vegetais. É a partir do estudo da atividade fotossintética¹, em resposta à absorção de nutrientes e poluentes, intensidade luminosa e condições do ar e temperatura, que novas variedades, fertilizantes, pesticidas e herbicidas são avaliados.

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

Neste primeiro relatório semestral apresentamos um resumo das atividades realizadas, de acordo com o cronograma de trabalho do projeto mencionado, conforme itens selecionados abaixo:

I - Fotossíntese

II - Construção e Calibração de uma Estufa para Cultivo Controlado

III - Analisador de CO₂

IV - Calibração do Analisador de CO₂

V- Comentários finais e continuidade do trabalho.

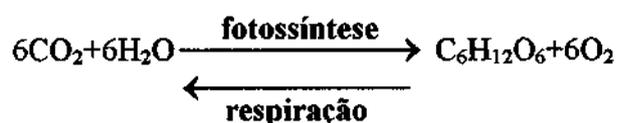
Fotossíntese

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

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

A absorção de luz incidente resulta em uma excitação elétrica captada por uma molécula de clorofila com propriedades especiais, capaz de iniciar e alterar a taxa de reações químicas. A energia luminosa absorvida pela clorofila causa fosforização (união de um radical fosfato a um composto orgânico); tal energia então é utilizada para quebrar fortes ligações entre o oxigênio e outros elementos. Açúcares são sintetizados a partir de dióxido de carbono e água, e os átomos de oxigênio se unem em pares formando o gás oxigênio(O_2) que é expelido para a atmosfera.

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



Os pigmentos encontrados nos cloroplastos, como clorofila e os carotenóides, são de fundamental importância para a fotossíntese. A clorofila, pigmento que dá a coloração verde na planta, pode ser encontrada na forma de diferentes isômeros, a, b, c e d, cada qual com espectros de absorção diferentes. Os mais importantes tipos são do tipo a e b.

Os coeficientes molares de absorção nos picos das clorofilas a e b são os mais altos observados em compostos orgânicos. A clorofila a, por exemplo, tem seu pico de absorção entre 400 e 450nm conforme mostra a fig.1 e está presente em todos os organismos que realizam a fotossíntese oxigênica. Esta clorofila é utilizada para realizar a fotoquímica, enquanto que outros pigmentos como os carotenóides auxiliam na absorção da luz e na transferência de energia radiante para centros de reação.

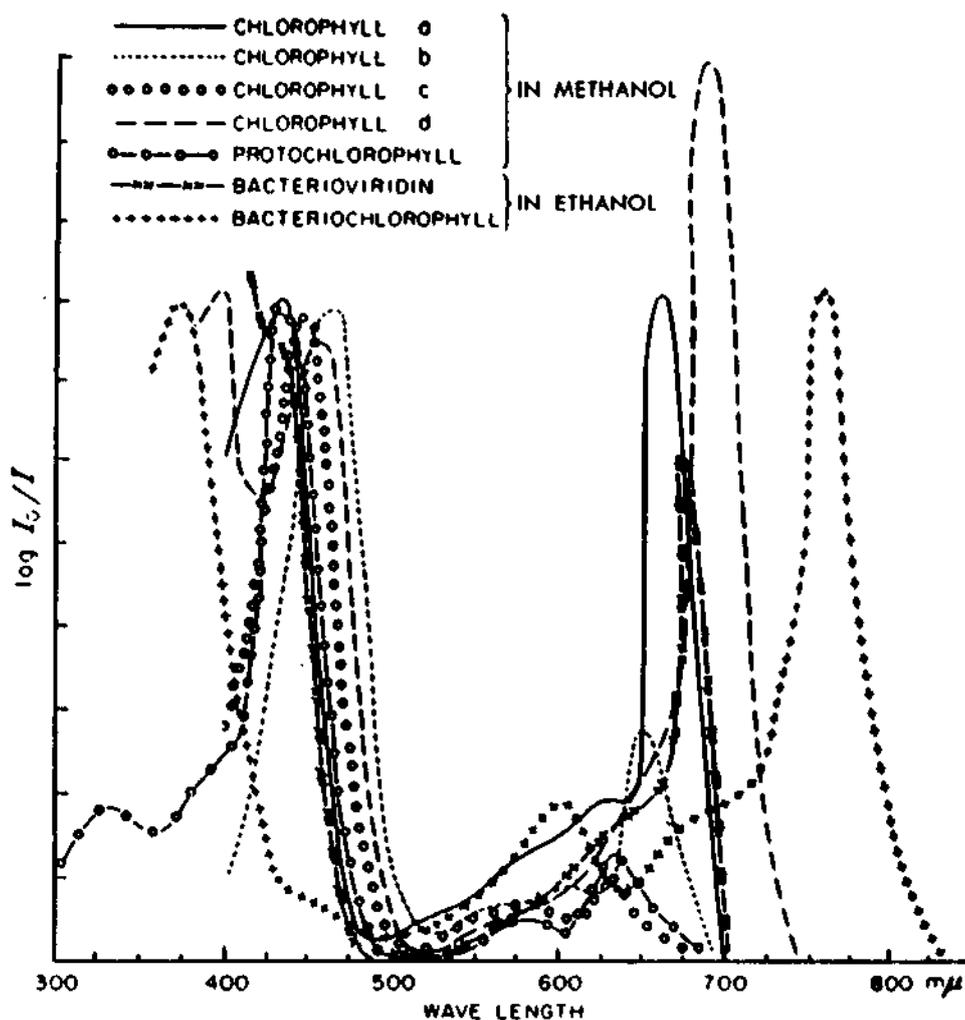


Fig. 1 : Espectros de absorção de vários tipos de clorofilas em solução (Bickford¹)

Tais dados são de extrema importância para este trabalho tendo em vista que o aparelho, um analisador de CO₂ funciona por absorção de radiação infra-vermelha.

Construção e calibração da Estufa

Foi construída uma estufa para o cultivo controlado das espécies a serem estudadas. Para que se obtenha resultados repetitivos ou passíveis de comparação nas medidas de consumo de CO_2 e evolução do O_2 da planta em estudo, é necessário trabalhar diariamente nas mesmas condições ambientais, ou seja, mesma irradiância, hidratação e temperatura.

Para construção e calibração da estufa, foi preciso conhecer os fatores limitantes da fotossíntese. A compreensão como cada um destes fatores afetam a fotossíntese, torna-se mandatoria quando almeja-se minimizar os seus efeitos adversos, a fim de obter uma maior produtividade.

De um modo geral, uma planta aclimatada a um ambiente de baixa irradiância³, por exemplo, possui características diferentes quando comparadas a uma planta aclimatada a um ambiente de alta irradiância. Há uma variação entre o tamanho e/ou número de unidades fotossintéticas, as folhas dos vegetais aclimatados de alta irradiância são mais grossos que as aclimatadas à baixa irradiância, diferença na capacidade fotossintética¹ e a atividade respiratória, além de outros fatores.

Para construção da estufa foram utilizados:

-3 suportes para lâmpada fluorescente⁴

-6 lâmpadas fluorescentes

-4 lâmpadas incandescentes¹

A perspectiva abaixo (fig.3) mostra como foi montada suas medidas : altura, largura, comprimento e a distância média em que a planta deve ficar da luz sabendo que um vaso com a mesma mede aproximadamente 18cm do chão ao topo da planta.

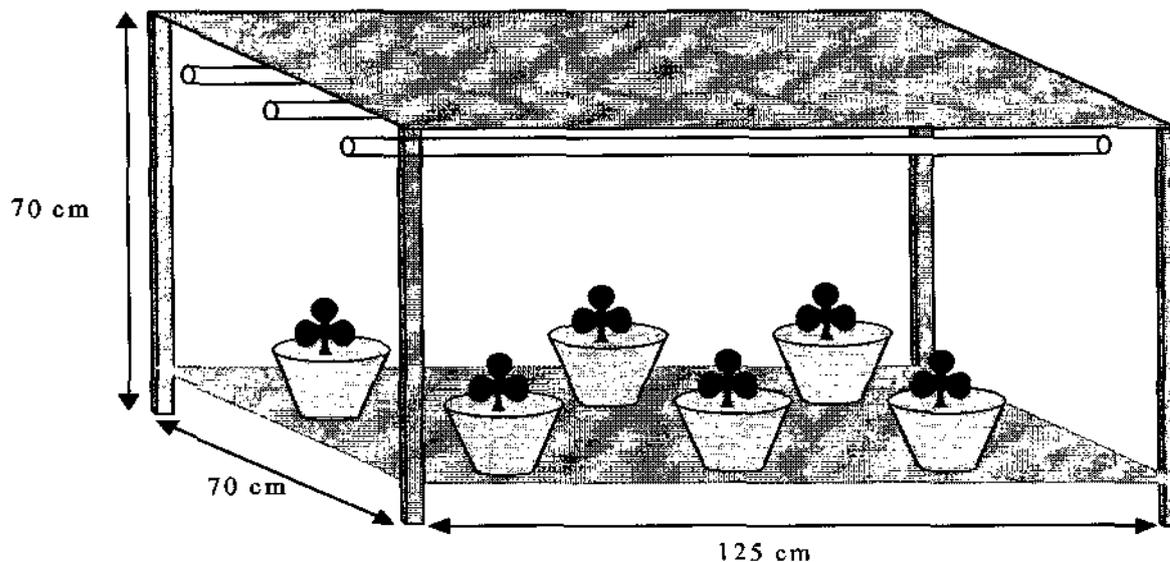


Fig.3: Perspectiva da estufa construída para cultivo controlado das plantas em estudo.

Para calibração da estufa foi feita a divisão de sua base em quadrados de 13,9cm cada um. Foram formados 45 quadrados, onde em cada um deles foi medida a quantidade de radiação emitida e temperatura.

O procedimento de medida de irradiação constitui em:

1. Medir a quantidade de radiação em cada quadrado numerados de 1 a 45 com as lâmpadas fluorescentes ligadas, através de um radiômetro modelo PSP da Epply Laboratory, com uma constante de $8,45 \cdot 10^{-6} \text{ V}/(\text{W}/\text{m}^2)$, conectado a um multímetro digital da Hewelett Pakard.
2. Desligar as lâmpadas fluorescentes e ligar as lâmpadas incandescentes para fazer no-va medida com a aparelhagem citada anteriormente.
3. Ligar as lâmpadas fluorescente e incandescentes simultaneamente e realizar nova medida.

Este procedimento, de medir separadamente e simultaneamente as lâmpadas fluorescente e incandescentes, é devido ao fato de que os espectros desses dois tipos de lâmpadas são diferentes, dessa forma é instrutivo conhecer as intensidades de cada tipo de espectro para cada tipo de lâmpada. Para montagem dos respectivos gráficos foi utilizado o programa Origin 5.0.

Os gráficos a seguir mostram a intensidade luminosa dos itens 1, 2 e 3.

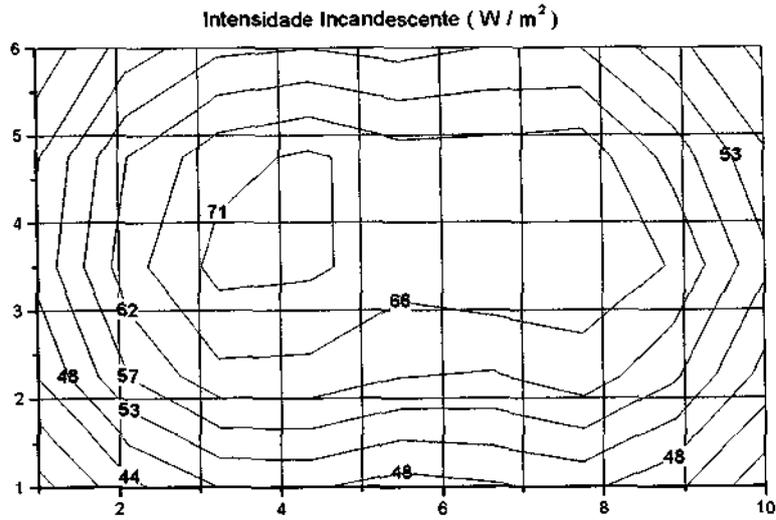


Gráfico 1: intensidade luminosa incandescente em cada divisão da estufa.

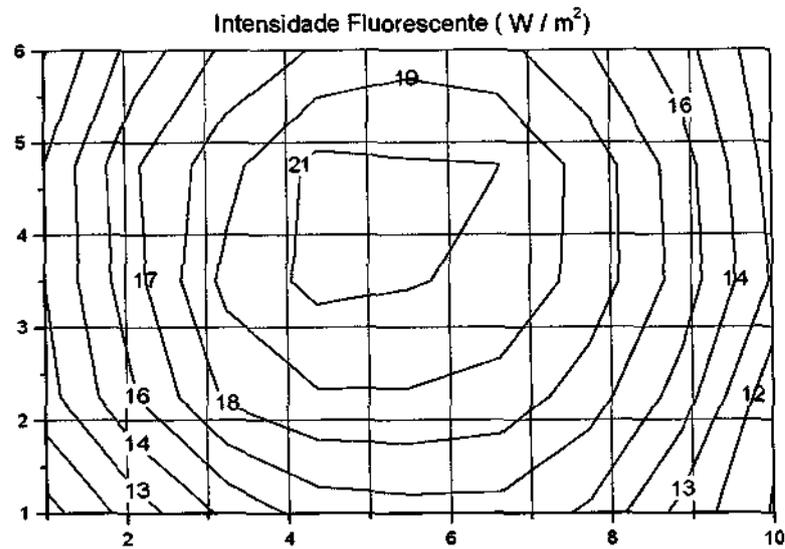


Gráfico 2: intensidade luminosa fluorescente em cada divisão da estufa.

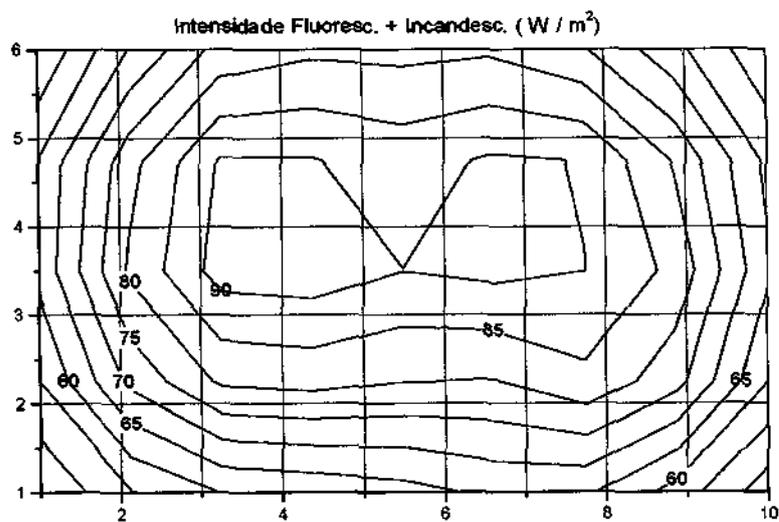


Gráfico 3 : intensidade luminosa incandescente e fluorescente em cada divisão da estufa.

Para as médias de temperatura da planta sob iluminação, foi fixado um termopar de cromel – alumel (tipo K) sob uma das folhas. O procedimento utilizado para medir a temperatura nos 45 pontos constituiu em :

1. Ligar as lâmpadas incandescentes e as fluorescentes simultaneamente.
2. Esperar 3 minutos para realização da medida a fim de que a temperatura se estabilize.
3. Mudar a planta para o próximo ponto e proceder da mesma forma.

A tabela abaixo mostra a temperatura da planta sob iluminação em cada divisão da estufa.

						33 ^o	33 ^o
33 ^o		33 ^o		33 ^o	33 ^o	33 ^o	
		33 ^o		33 ^o	33 ^o	33 ^o	
				33 ^o	33 ^o	33 ^o	
33 ^o				33 ^o	33 ^o	33 ^o	

Tabela de temperatura da planta (temperatura média de 32,7 °C e desvio padrão de 1,15 °C)

Analizador de gases (CO₂)

O analisador compacto de CO₂⁴ para monitoramento da fotossíntese é um analisador de gases convencional, adaptado para este tipo de aplicação, levando-se em conta a sensibilidade exigida, custo e simplicidade de manuseio para o experimento em questão.

O aparelho utilizado funciona através da absorção do infra-vermelho, e tem basicamente, em sua estrutura, uma fonte de infra-vermelho do tipo “glowbar”; duas câmaras de gases, as quais são seladas por janelas ópticas de safira, sendo uma câmara ativa, onde circula o ar com concentrações variadas do gás carbônico em contato com a planta em estudo, e uma câmara de referência, onde circula o N₂ puro; um par de detetores de radiação infra-vermelha (fotocondutores de PbSe), fixados após cada câmara; um par de filtros de interferência centrados em 4,26μm (pico de absorção do CO₂) com uma banda passante de 10nm; um chopper que modula a radiação infra-vermelha e controla a frequência, possibilitando que sinais de modulação diferente ao chopper sejam eliminados quando processados eletronicamente, melhorando a relação sinal-ruído, conforme mostrado na fig.2. Os sinais dos detetores são medidos por amplificadores síncronos e processados por um microcomputador.

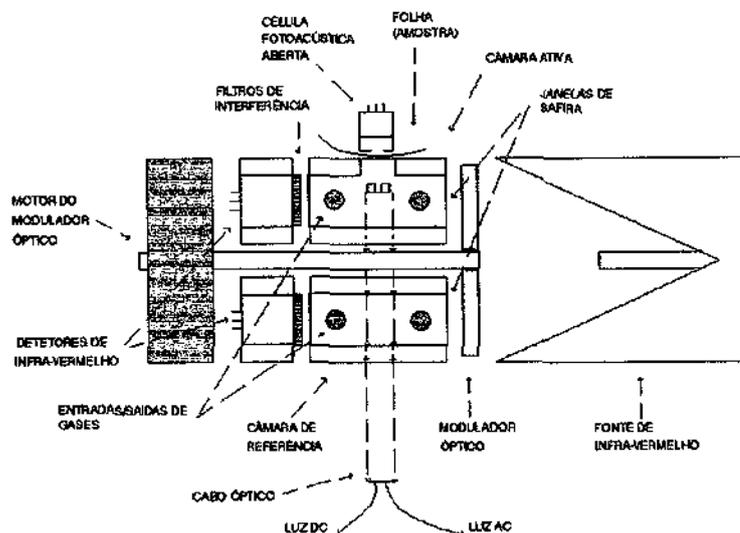


Fig.2: Analizador de CO₂ acoplado à uma câmara fotoacústica aberta.

Quando a fotossíntese é realizada, a concentração de CO₂ diminui na câmara ativa gerando um decréscimo de absorção do infra vermelho, resultando no aumento do sinal do detetor. O sinal do detetor da câmara ativa é normalizado pelo sinal da câmara de referência e os

dados são processados, armazenados em disquetes e mostrados na tela de um computador a curva característica da fotossíntese.

Para que houvesse uma calibração adequada deste analisador foi preciso conhecer e familiarizar-se com o aparelho mencionado.

Calibração do analisador de CO₂

Para calibração do analisador de CO₂ foi utilizada como gás na câmara de referência (**R**) o N₂ puro, tipo N50, com 99,999% de pureza, da Air Liquide; como gás na câmara ativa(**N**), foram utilizadas misturas padronizadas de CO₂ em N₂ tipo N50, onde as concentrações de CO₂ foram: 10, 50, 100, 500, 1000 e 2000ppm.

As medidas feitas para calibração do aparelho foram realizadas com dois equipamentos eletrônicos distintos, a saber: inicialmente foi utilizada a eletrônica dedicada ao sistema, desenvolvida no LAS pelo Eng^o Manoel Francisco Ribeiro, que consiste dos pré-amplificadores dos detetores, da fonte e do modulador da fonte de radiação infra- vermelha e dos filtros passa banda centrados em 148,5 Hz, interfaceados com o micro computador através do DaqBook /100 da Data Aquisition System.

Posteriormente a mesma série de medidas foi feita utilizando-se dois amplificadores “Lock-ins” comerciais (modelos SR830 DSP e SR 530) para efeito de comparação e validação da eletrônica desenvolvida no LAS.

Os dois procedimentos de medida foram realizados da seguinte forma :

- Fluxo constante de N₂ puro na câmara de referência.
- Fluxos de misturas padronizadas de variadas concentrações de CO₂ em N₂ na câmara ativa (N₂ puro, 10,50,100,500,1000 e 2000ppm).
- O modulador de sinais, chopper, a 148,5 hz.
- Ajuste dos gases com 0,5 bar de pressão e 150 ml/min nos fluxímetros .
- Aquecimento de todo o sistema por 10 minutos.

Inicialmente circula-se N₂ puro na câmara ativa e na de referência; após 5 minutos inicia-se as medidas feitas pelo programa de aquisição de dados que calcula as razões **N/R**, onde **N** é o sinal da câmara ativa com N₂ puro e **R** é o sinal da câmara de referência com N₂ puro. Posteriormente circula-se N₂ puro na câmara de referência e misturas com concentrações variadas de CO₂ em N₂ na câmara ativa. Para cada concentração de CO₂ em N₂ , o microcomputador calcula a razão **Y(x)/R(x)**, onde **Y(x)** é o sinal de uma mistura padrão primária com concentração **x** de CO₂ em N₂ na câmara ativa e **R(x)** é o sinal referente ao N₂ puro da câmara de referência. São tomados 75 pontos de 2 em 2 minutos onde os 5 primeiros pontos corresponde a circulação do N₂ puro na câmara ativa, no intervalo de tempo entre o 6^o e o 10^o ponto é realizada a troca para a próxima mistura (10ppm) na câmara ativa e espera para a troca

completa e homogeneização da nova mistura na câmara ativa; nos próximos cinco pontos (11° ao 15°) são tomadas as medidas. O mesmo procedimento é realizado para a próxima mistura (50ppm) e assim sucessivamente até serem realizadas as medidas em todas as amostras. A curva de calibração é construída a partir da expressão⁵ :

$$-\text{LN} \left[\frac{Y(x)/R(x)}{N/R} \right]$$

Os gráficos 4 e 5 mostram a curva da calibração do analisador de CO₂.

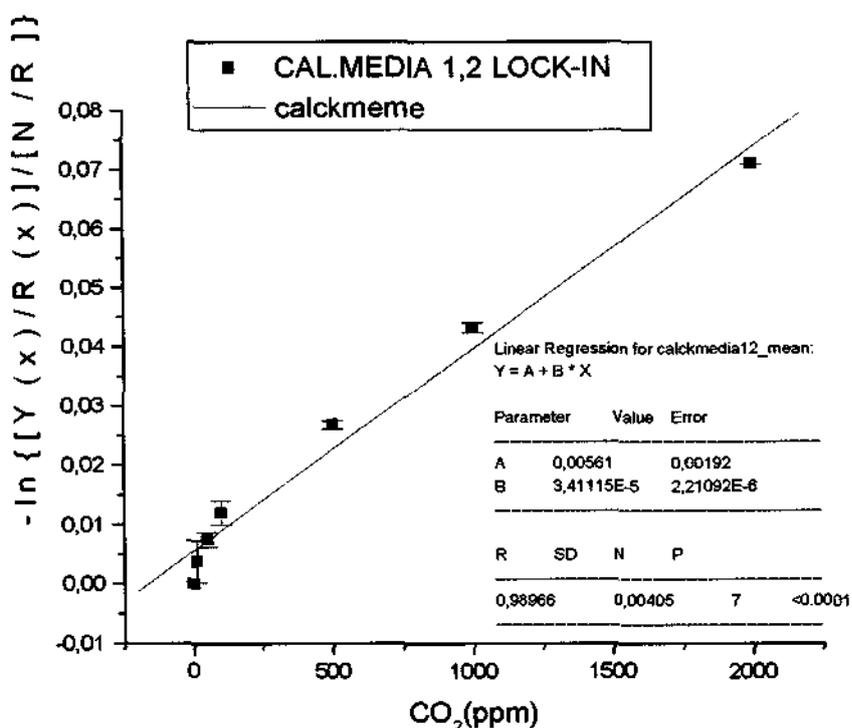


Gráfico4: Curva de calibração do Analisador de CO₂ para medidas realizadas com amplificadores "Lock-ins".

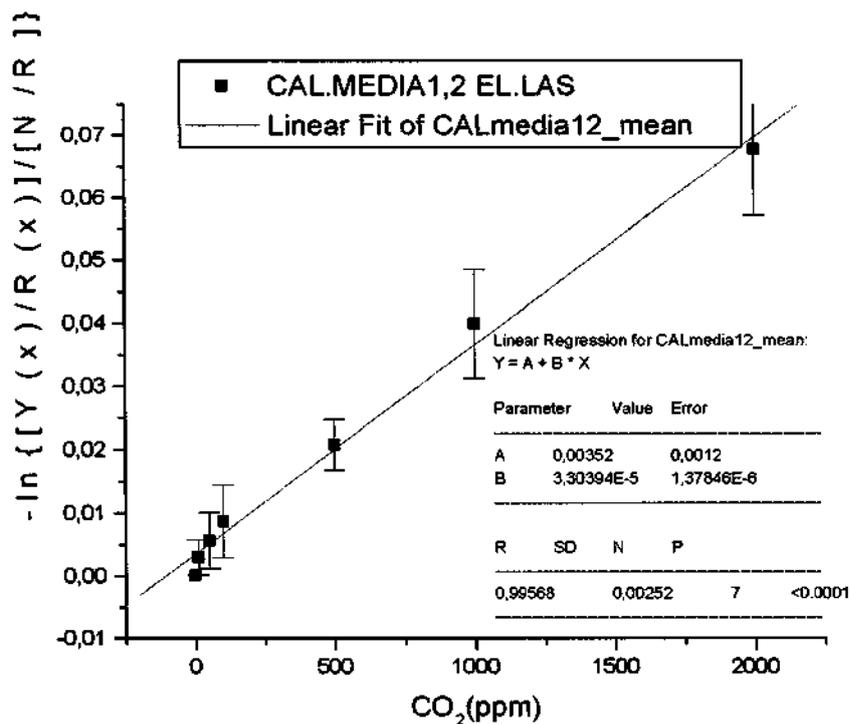


Gráfico 5: Curva de calibração do Analisador de CO₂ para medidas realizadas com a eletrônica desenvolvida no LAS.

Os resultados obtidos nos Gráficos 4 e 5, quanto aos erros e aos coeficientes de correlação dos ajustes lineares aos pontos experimentais, mostram que a eletrônica desenvolvida no LAS substitui satisfatoriamente os “lock-ins” comerciais, mantendo a resolução do equipamento em torno de 100 ppm de CO₂ em N₂.

Comentários Finais e Continuidade do Trabalho

Como foi mostrado, a Eletrônica desenvolvida pelo LAS substituiu satisfatoriamente o equipamento comercial de medida; o próximo passo será a realização de medidas em amostras de Violeta e ou Milho.

A estufa para cultivo das plantas ficou pronta e caracterizada, apresentando parâmetros ambientais compatíveis com os citados na literatura^{1,2}. A estufa permitirá o cultivo controlado das plantas a serem testadas.

A Eletrônica para as medidas de evolução de O₂ está sendo terminada pelo Eng. Manuel Francisco Ribeiro, do LAS, e será testada; os resultados serão apresentados no próximo relatório. Ainda, quanto às medidas de evolução de O₂ por fotoacústica, fizemos um levantamento bibliográfico (3-20).

Referências Bibliográficas

1. E.D.Bickford and S.Dunn ; in "*Lighting for Plant Growth*" (The Kent State University Press ,USA,1978.
2. P.S Nobel ; in "*Biophysical Plant Physiology and Ecology*" (W.H.Freeman and Company , USA ,1983.
3. J.A.Balderas-López;G.Gutiérrez-Juárez; J.J.Alvarado-Gil; J.Frias-Hernández; V.Olaide-Portugal; L.C.M.Miranda; M.D.Silva;I.Delgadillo; H.Vargas ; "*A new CO₂ analyser for measuring respiration rates in organic material*". Rev.Sci.Instrum. 67 (9), September 1996.
4. G.Ouzounidou; *Plant Science*.113 (1996) 229-237.
5. Relatório Científico FAPESP, processo N° 1995/9768-9
6. L.F. Perondi, L.C.M. Miranda; *J. Appl. Phys.* 62, 2955 (1987).
7. M.D. Silva, I.N. Bandeira, L.C.M. Miranda; *J. Phys. E* 20, 1476 (1987)
8. D.C.Mauzerall; *Plant Physiol.* (1990) 94,278-283.
9. H.Suzuki; N.Kojima;A.Sugama; F.Takei; *Sensors and Actuators B*, 2 (1990) 185-191.
10. D.C.Fork; S.K.Herbert; *Photosynthesis Research* 27 (1991) 151-156.
11. G.Ouzounidou; R.Lannoye; S.Karataglis; *Plant Science*, 89 (1993) 221-226.

12. L.Lapointe; N.P.A.Huner; R.M.Lebanc; R.Carpentier; *Biochimica et Biophysica Acta*, 1142 (1993) 43-48.
13. A.C.Pereira; G.O.Neto; H.Vargas; N.Cella; L.C.M.Miranda; *Rev. Sci. Instrum*, 65 (1994), (5).
14. A.C.Pereira; L.M.Prioli; W.J.Silva; G.O.Neto; H.Vargas; N.Cella; J.J.A.Gil; *Plant Science* 96 (1994) 203-209.
15. J.Szurkowski; Z.Tukaj; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29 (1995) 406-410.
16. W.J.Silva; L.M.Prioli; A.C.N.Magalhães; A.C.Pereira;H.Vargas; M.Mansanares; L.N.Cella; C.M.Miranda;J.A.Gil; *Plant Science* 104 (1995) 177-181.
17. P.R.Barja; A.M.Mansanares; “*Photosynthetic energy storage and oxygen evolution determined through open photoacoustic cell technique*”UNICAMP,13083-970.
18. 16-L.A.C.J. Voesenek, M. Banga, R.H. Thier, C.M. Mudde, F.J.M. Harren,
19. G.W.M. Barendse and C.W.P.M. Blom, *Plant Physiol.* **103**, 783 (1993).
20. 17-D.C. Fork and S.K. Herbert, *Photochemistry and Photobiology* **57(1)** ,207 (1993).