

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA PARA A DETECÇÃO  
DAS MOLÉCULAS GASOSAS ETILENO, ÓXIDO NÍTRICO, AMÔNIA E  
DIÓXIDO DE CARBONO EM SISTEMAS ARTIFICIAIS E BIOLÓGICOS**

**LUISA BRITO PAIVA**

“Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.”

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Gomes da Silva**

**Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angela Pierre Vitória**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**ABRIL – 2012**

*FICHA CATALOGRÁFICA*

Preparada pela Biblioteca do **CCT / UENF**  
**42/2012**

Paiva, Luisa Brito

Aplicação da espectroscopia fotoacústica para a detecção das moléculas gasosas etileno, óxido nítrico, amônia e dióxido de carbono em sistemas artificiais e biológicos / Luisa Brito Paiva. – Campos dos Goytacazes, 2012.

xiv, 110 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) --Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Físicas. Campos dos Goytacazes, 2012.

Orientador: Marcelo Gomes da Silva.

Co-orientador: Angela Pierre Vitória.

Área de concentração: Química e física do meio ambiente.

Bibliografia: f. 93-110.

1. Espectroscopia fotoacústica 2. Etileno 3. Óxido nítrico 4. Amônia 5. Laser de cascata quântica I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Físicas II. Título

CDD 535.84

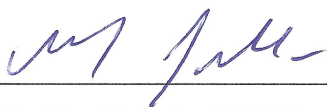
APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA PARA A DETECÇÃO DAS  
MOLÉCULAS GASOSAS ETILENO, ÓXIDO NÍTRICO, AMÔNIA E DIÓXIDO DE  
CARBONO EM SISTEMAS ARTIFICIAIS E BIOLÓGICOS

LUISA BRITO PAIVA

“Tese apresentada ao Centro de Ciência e  
Tecnologia da Universidade Estadual do Norte  
Fluminense, como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Naturais.”

Aprovado em 13 de Abril de 2012

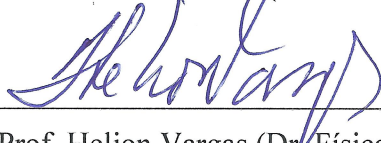
Comissão examinadora:



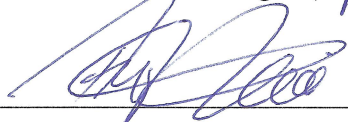
Prof. Norberto Cella (Dr. Física) - UERJ/Instituto Politécnico (IPRJ)



Prof.<sup>a</sup>. Claudete Santa-Catarina (Dra. Biotecnologia) - UENF/LBCT




Prof. Helion Vargas (Dr. Física) - UENF/LCFIS



Prof.<sup>a</sup>. Angela Pierre Vitória (Dra. Biologia Vgetal) - UENF/LCA

(co-orientadora)



Prof. Marcelo Gomes da Silva (Dr. Física) - UENF/LCFIS

(orientador)

**“E se alguém ama a justiça,  
seus trabalhos são virtudes,  
ela ensina a temperança e a prudência,  
a justiça e a força,  
não há ninguém que seja mais útil aos homens na vida”.**

(Livro da Sabedoria 8,7).

## **Agradecimentos**

A Deus pelas dificuldades, porque sei que Ele sempre esteve comigo nesses momentos e pela alegria do trabalho realizado, porque também sei que humildemente fiz o meu melhor com o auxílio Dele.

Aos meus maravilhosos pais, Maria da Penha e Clementino, pelo amor incondicional, por serem exemplos de luta e perseverança. Por acreditarem em mim e me concederem liberdade para o meu amadurecimento.

Ao meu querido e amado esposo, Jorge, do qual a compreensão, o amor, a paciência, o carinho, o zelo, a maturidade foram indispensáveis durante o desenvolvimento do meu trabalho e são na minha vida.

Aos meus orientadores, os professores Marcelo e Angela, fundamentais na condução deste trabalho. Fundamentais pelos valores éticos a mim passados, sobretudo na importância de se desenvolver um trabalho com seriedade, entre outras coisas.

Aos amigos Milton, Wily, Sávio, Paulo Sérgio, Sâmylla, Israel e Leonardo, mesmo não sendo suficiente, eu agradeço muito por tanta ajuda prestada, pelos conhecimentos passados e trocados, pela companhia, pela amizade e pelo respeito com que sempre me trataram.

Aos técnicos Luiz Antônio e Sérgio. Ao engenheiro Israel pela disposição com que me ajudou a colocar em prática parte da ideia deste trabalho e cujos conhecimentos foram essenciais na realização do mesmo.

Aos professores András Miklós e Judit Angster, por me receberem em seu instituto de pesquisa, o *Fraunhofer Institut für Bauphysik* (Stuttgart - Alemanha), durante os nove meses de trabalho pelo doutorado sanduíche.

A todos os funcionários, colegas e professores do LCFIS, que embora não citados, não deixaram de ser importantes para minha formação.

Aos amigos Douglas e Frederico do LCA pela amizade de longos anos, pela ajuda e pelas experiências e conhecimentos compartilhados.

À professora Claudete do LBCT pelo tempo e disposição dedicados a uma parte deste trabalho.

Aos professores que compõem a banca examinadora deste trabalho.

Às agências financiadoras CAPES E FAPERJ.

**MUITO OBRIGADA A TODOS!!!**

## Sumário

<b>Lista de figuras.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de abreviaturas, siglas e símbolos .....</b>	<b>xi</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1 – Fundamentos básicos da espectroscopia fotoacústica utilizando laseres para a detecção de moléculas gasosas .....</b>	<b>18</b>
1.1 Espectroscopia no infravermelho à laser .....	18
1.2 Laseres à gás.....	19
1.3 Diodos laseres.....	21
1.3.1 Laser de cascata quântica .....	22
1.4 Espectroscopia fotoacústica .....	25
1.5 Moléculas gasosas detectáveis pela espectroscopia fotoacústica .....	27
1.5.1 Óxido nítrico .....	27
1.5.1.1 Metodologias de detecção de NO em plantas .....	29
1.5.2 Etileno .....	32
1.5.3 Amônia.....	34
1.5.4 Dióxido de carbono .....	35
<b>CAPÍTULO 2 - Espectroscopia fotoacústica aplicada à detecção de etileno em plantas de amendoim bravo cultivadas em Cr<sup>+6</sup> .....</b>	<b>38</b>
2.1 Justificativa.....	38
2.2 Material e métodos .....	41
2.2.1 Crescimento das plantas e tratamento.....	41
2.2.2 Detecção de etileno e CO <sub>2</sub> .....	42
2.2.3 Emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	43
2.2.4 Conteúdo dos pigmentos fotossintéticos .....	43
2.2.5 Conteúdo relativo de água da folha .....	43
2.2.6 Área foliar específica .....	44
2.2.7 Determinação de NO .....	44

2.2.8	Determinação do conteúdo de poliaminas .....	44
2.2.9	Análises estatísticas .....	45
2.3	Resultados .....	45
2.4	Discussão.....	48
2.5	Conclusão .....	53
<b>CAPÍTULO 3 - Detecção de óxido nítrico utilizando a espectroscopia fotoacústica e um laser de cascata quântica .....</b>		<b>55</b>
3.1	Justificativa .....	55
3.2	Material e métodos .....	58
3.2.1	Material e equipamentos .....	58
3.2.2	Detector fotoacústico .....	58
3.2.3	Fonte de luz e caracterização elétrica do laser .....	59
3.2.4	Identificação das linhas de absorção do NO (modulação em amplitude) .....	59
3.2.5	Determinação do limite inferior de detecção para NO utilizando a modulação em amplitude .....	60
3.2.6	Determinação dos parâmetros da modulação em comprimento de onda .....	60
3.2.7	Determinação do limite inferior de detecção para NO utilizando a modulação em comprimento de onda.....	61
3.3	Resultados .....	61
3.4	Discussão.....	67
3.5	Conclusão .....	70
<b>CAPÍTULO 4 - Espectroscopia fotoacústica aplicada à detecção simultânea de moléculas em misturas gasosas .....</b>		<b>71</b>
4.1	Justificativa .....	71
4.2	Material e métodos.....	71
4.2.1	Material e equipamentos .....	71
4.2.2	Detecção simultânea utilizando três frequências .....	72
4.2.2.1	Arranjo experimental.....	72
4.2.2.2	Configurações dos equipamentos para a detecção simultânea.....	75

4.2.3 Curvas de frequências de ressonância .....	76
4.2.4 Resposta do microfone da célula fotoacústica para baixas frequências.....	76
4.3 Resultados .....	77
4.4 Discussão.....	88
4.5 Conclusão .....	90
<b>CAPÍTULO 5 - Considerações finais e perspectivas .....</b>	<b>91</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>93</b>



## Lista de figuras

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1.1</b> - Níveis de energia em um laser de CO <sub>2</sub> .....	20
<b>Figura 1.3.1</b> - Esquema do princípio de funcionamento de um laser de cascata quântica baseado em poço quântico e tunelamento .....	23
<b>Figura 1.4</b> - Processos que ocorrem durante a geração do sinal fotoacústico numa amostra gasosa. A absorção da energia do fóton é parcialmente transformada em energia térmica e sonora.....	26

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 2.1</b> - Árvore tropical <i>Pterogyne nitens</i> Tul. ....	40
<b>Figura 2.2.1</b> - Plântulas de <i>Pterogyne nitens</i> Tul. com dois meses de idade. ....	41
<b>Figura 2.2.2</b> - Esquema da montagem experimental utilizada para as medidas fotoacústicas de etileno e CO <sub>2</sub> em plantas de amendoim bravo após sete dias em 500 μmol L <sup>-1</sup> de Cr <sup>+6</sup> .....	42
<b>Figura 2.3.1</b> - Medidas de espectroscopia fotoacústica de: A) Etileno (μL h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) e B) CO <sub>2</sub> (mL h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) em plantas de amendoim bravo do controle e após exposição em 500 μmol L <sup>-1</sup> em Cr <sup>+6</sup> durante sete dias.....	45
<b>Figura 2.3.2</b> - Fluorescência de NO intracelular em raízes de plântulas de amendoim bravo tratada com 500 μmol L <sup>-1</sup> de Cr <sup>+6</sup> durante duas horas e sete dias.....	47
<b>Figura 2.3.3</b> - Concentração de poliaminas livres (μg g <sup>-1</sup> MF) em plântulas de amendoim bravo expostas a 500 μmol L <sup>-1</sup> de Cr <sup>+6</sup> durante sete dias.....	48

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 3.1.1</b> - Esquema para representação das modulações em amplitude e comprimento de onda.....	56
<b>Figura 3.1.2</b> - Amplitude do sinal fotoacústico (u.a) em função da profundidade de modulação da corrente (mA) .....	57
<b>Figura 3.1.3</b> - Perfil da linha de absorção para um regime dominado pela modulação em comprimento de onda obtida para o primeiro ( <i>1f</i> ) e segundo harmônico ( <i>2f</i> ) .....	57
<b>Figura 3.2.1</b> - Esboço da célula fotoacústica. F1-4 representam filtros acústicos.....	58
<b>Figura 3.3.1</b> - Curva de tensão (V) x corrente (mA) x e potência (mW) obtida para o laser de cascata quântica para NO à temperatura de - 20°C.....	61

<b>Figura 3.3.2</b> - Espectro experimental da molécula de NO obtido com um padrão comercial certificado de 5 ppmv de NO e um laser de cascata quântica para NO .....	62
<b>Figura 3.3.3</b> - Espectro para as moléculas de NO e de H <sub>2</sub> O retirados da base de dados HITRAN (2008).....	62
<b>Figura 3.3.4</b> - Limite inferior de detecção para o NO em N <sub>2</sub> obtido com modulação em amplitude para o laser fixado na linha 1900,1 cm <sup>-1</sup> (- 15 °C e 6 mW de potência) .....	63
<b>Figura 3.3.5</b> - Sinal fotoacústico (μV) em função da temperatura do laser (°C) para NO (5 ppmv). .....	64
<b>Figura 3.3.6</b> - Espectro experimental da molécula de NO obtido com um padrão comercial certificado de 5 ppmv de NO de acordo com os parâmetros utilizados na modulação 3 (figura 3.3.5 c). .....	66
<b>Figura 3.3.7</b> - Espectros para as moléculas de NO e H <sub>2</sub> O retirados da base de dados HITRAN (2008).....	66
<b>Figura 3.3.8</b> - Limite inferior de detecção para o NO em N <sub>2</sub> obtido com a modulação em comprimento de onda para o laser fixado na linha 1903,13 cm <sup>-1</sup> (-34°C e 15 mW de potência) .....	67

#### CAPÍTULO 4

<b>Figura 4.2.2.1</b> - Esquema experimental da configuração dos lasers e da célula fotoacústica para as medidas simultâneas de C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +NH <sub>3</sub> ou C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> utilizando três frequências.....	72
<b>Figura 4.2.2.2</b> - Esquema para determinação do ciclo de trabalho de um LCQ pulsado .....	73
<b>Figura 4.2.2.3</b> - Esquema da montagem experimental para as medidas simultâneas de C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +NH <sub>3</sub> ou C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> +CO <sub>2</sub> utilizando três frequências.....	75
<b>Figura 4.3.1</b> - Sinal fotoacústico (μV) em função da temperatura do laser (°C) para amônia (10 ppmv) e para o N <sub>2</sub> (sinal de fundo) obtido com a modulação em amplitude (constante de tempo: 300 ms e frequência de ressonância da célula: 3800 Hz).....	77
<b>Figura 4.3.2</b> - Sinal fotoacústico (μV) em função da temperatura do laser (°C) para etileno (100 ppmv) e para o N <sub>2</sub> (sinal de fundo) obtido com a modulação em amplitude (constante de tempo: 300 ms e frequência de ressonância da célula: 3800 Hz) .....	77
<b>Figura 4.3.3</b> - Espectros teóricos (HITRAN 2008) para as moléculas de: (a) NH <sub>3</sub> (amônia) e (b) C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (etileno).....	78

<b>Figura 4.3.4</b> - Resposta do microfone ( $\mu\text{V}$ ) da célula fotoacústica diferencial em função de baixas frequências (Hz) para um sinal senoidal de 100 mVrms. ....	79
<b>Figura 4.3.5</b> - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) para etileno (100 ppmv) em função de baixas frequências (Hz) na temperatura de pico ( $T = 29,3^\circ\text{C}$ ) .....	80
<b>Figura 4.3.6</b> - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) para etileno (100 ppmv) em função da temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) do laser para etileno. As curvas comparam os sinais para diferentes frequências baixas: 11, 15 e 17 Hz.....	80
<b>Figura 4.3.7</b> - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) para etileno (100 ppmv) em função das amplitudes da função seno (mV) na temperatura do pico ( $T = 29,3^\circ\text{C}$ ).....	81
<b>Figura 4.3.8</b> - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) para etileno (100 ppmv) em função da temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) do laser para etileno. As curvas comparam os sinais obtidos para dois pares de constantes de tempo: 1ms e 1s ou 3ms e 3s.....	82
<b>Figura 4.3.9</b> - Comparação entre os sinais fotoacústicos obtidos para etileno (100 ppmv) e $\text{N}_2$ (sinal de fundo) com dupla modulação e uma modulação (em amplitude) .....	83
<b>Figura 4.3.10</b> - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) para diferentes concentrações de $\text{CO}_2$ (100, 50, 25 e 12,5 %) em função da frequência de ressonância de célula fotoacústica (Hz).....	84
<b>Figura 4.3.11</b> - Sinal fotoacústico medido simultaneamente para etileno (50 ppmv) e $\text{CO}_2$ (50%) e individualmente para etileno (100 ppmv) e $\text{CO}_2$ (100%) com dupla modulação .....	85
<b>Figura 4.3.12</b> - Sinal fotoacústico medido simultaneamente para etileno (50 ppmv) e amônia (5 ppmv) e individualmente para etileno (100 ppmv) e amônia (10 ppmv) com dupla modulação .....	85
<b>Figura 4.3.13</b> - Limite inferior de detecção para etileno (100 ppmv) em $\text{N}_2$ obtido com modulação em amplitude pura para a temperatura do laser de $29,3^\circ\text{C}$ . ....	86
<b>Figure 4.3.14</b> - Limites inferiores de detecção simultânea para (a) etileno (100 ppmv) em $\text{CO}_2$ (100%) e (b) $\text{CO}_2$ (100%) em etileno (100 ppmv).. ....	87

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AFE - Área Foliar Específica

Al - alumínio

C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> - etileno

CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio

Cd - cádmio

Cl<sup>-</sup> - cátion cloreto

Clo - clorofila

Clo *a* - clorofila *a*

Clo *b* - clorofila *b*

CO - monóxido de carbono

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

Cr - cromo

Cr<sup>+3</sup> - cromo trivalente

Cr<sup>+6</sup> - cromo hexavalente

CRA - Conteúdo Relativo de Água

Cu - cobre

DAF-FM-DA - 4,5-diacetato diaminofluoresceína

DMSO - dimetilsulfoxido

*E<sub>g</sub>* - energia do *gap*

Fe - ferro

F<sub>v</sub> - fluorescência variável

F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> - rendimento quântico máximo

F<sub>v</sub>/F<sub>0</sub> - fluorescência variável/fluorescência inicial

HITRAN - High resolution transmission molecular absorption database

Hz - Hertz

K<sup>+</sup> - cátion potássio

K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> - dicromato de potássio

KOH - hidróxido de potássio

LASER - Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LCQ - laser de cascata quântica

LHC - Light-harvesting complex

MF - massa fresca

NaCl - cloreto de sódio

N<sub>2</sub>O - óxido nitroso

Ni - níquel

NH<sub>3</sub> - amônia

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - íon amônio

NO - óxido nítrico

NPQ - coeficiente de extinção não-fotoquímico

Pb - chumbo

ppbv - parte por bilhão em volume

ppmv - parte por milhão em volume

pptv - parte por trilhão em volume

PUT - putrescina

qP - coeficiente de extinção fotoquímico

RNS - Reactive Nitrogen Species

ROS - Reactive Oxygen Species

SPD - espermidina

SPM - espermina

TTL - transistor-transistor logic

V - vanádio ou volt

Vrms - Volt root mean square

Zn - zinco

kHz - kilohertz

kW - kilowatts

μm - micrometro

μmol - micromol

## Resumo

Metodologias espectroscópicas de absorção baseadas em fontes de radiação laser combinadas a um detector fotoacústico como, por exemplo, a espectroscopia fotoacústica, tem mostrado alta sensibilidade e seletividade para a detecção de diferentes moléculas gasosas em tempo real. O presente trabalho utilizou a espectroscopia fotoacústica para detectar etileno ( $C_2H_4$ ), óxido nítrico (NO), amônia ( $NH_3$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ), justificado pelos importantes papéis que essas moléculas gasosas desempenham em sistemas biológicos. Nesse sentido, por meio de um laser de  $CO_2$ , a produção de  $C_2H_4$  foi monitorada em plantas de amendoim bravo (*Pterogyne nitens* Tul.), uma árvore tropical, cultivadas durante sete dias em  $500 \mu mol L^{-1}$  de  $Cr^{+6}$ . Os resultados para a emissão de  $C_2H_4$  revelaram a espectroscopia fotoacústica como uma técnica inovadora e eficiente para avaliar o nível de estresse induzido pela presença do metal pesado. Adicionalmente, outras técnicas mais comumente utilizadas para acessar estresse em plantas, tais como a fluorescência da clorofila *a*, a fluorescência do NO e o conteúdo de poliaminas foram empregadas no presente estudo. Quanto à detecção de NO, um espectrômetro fotoacústico foi montado e seu limite inferior de detecção foi aferido modulando em comprimento de onda e em amplitude um laser de cascata quântica. O limite inferior de detecção alcançado com a modulação em comprimento de onda foi bastante significativo (na faixa de ppbv). Adicionalmente, a modulação em comprimento de onda se mostra mais eficiente na elucidação de estruturas de absorção estreitas. Esses resultados indicam que o sistema é apropriado para estudos de amostras biológicas. Para a detecção de  $NH_3$ ,  $C_2H_4$  e  $CO_2$ , uma montagem experimental foi feita para que essas moléculas pudessem ser simultaneamente detectadas em misturas binárias utilizando apenas um único sensor (célula fotoacústica). Os resultados mostraram que o método de medida simultânea foi capaz de diferenciar os espectros das espécies gasosas presentes nas misturas. Os limites de detecção das moléculas na mistura não foram afetados quando comparados com o limite obtido para a cada molécula em  $N_2$ . Embora a metodologia tenha sido testada para  $NH_3$ ,  $C_2H_4$  e  $CO_2$ , apenas substituindo a fonte de radiação, qualquer outra molécula pode ser simultaneamente detectada em uma mistura.

**Palavras-chave:** espectroscopia fotoacústica, etileno, óxido nítrico, amônia e laser de cascata quântica.

## Abstract

Absorption spectroscopic methods such as photoacoustic spectroscopy based on infrared radiation sources, as lasers, combined with a photoacoustic cell, have shown a high selectivity and sensitivity for the detection of various gas molecules in real time. In the present study the photoacoustic spectroscopy was applied to detect ethylene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), nitric oxide (NO), ammonia (NH<sub>3</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). These molecules play important roles in biological systems. In this sense, by means of a CO<sub>2</sub> laser, the production of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> was monitored from brave peanuts (*Pterogyne nitens* Tul.), a tropical tree, cultivated during seven days in 500 μmol L<sup>-1</sup> Cr<sup>+6</sup>. The results obtained for the emission of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> revealed the photoacoustic spectroscopy as an innovative and efficient method to assess the stress induced by heavy metal. Additionally, techniques commonly used to access stress in plant tissues like the chlorophyll *a* fluorescence, NO fluorescence and polyamine contents were employed in this study. Concerning to the detection of NO, a photoacoustic spectrometer was assembled and its lower detection limit was assessed by modulating the quantum cascade laser in wavelength and amplitude. The lower detection limit achieved by the wavelength modulation was highly significant (in the ppbv range). The wavelength modulation is more efficient in elucidating narrow absorption structures. These results indicate that the system is suitable for the study of biological samples. For NH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> sensing, a new experimental setup was used to detect these molecules simultaneously in a binary mixture using only one sensor (photoacoustic cell). The results showed that this method was able to single out the spectra of a molecule in mixtures. The detection limits of each molecule in the mixture were the same compared to the detection limit of a unique molecule in N<sub>2</sub>. Although the simultaneous method has been tested for NH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>, just replacing the source of radiation, any other molecule can be simultaneously detected in binary mixture.

**Keywords:** photoacoustic spectroscopy, ethylene, nitric oxide, ammonia and quantum cascade laser.

## Introdução

A espectroscopia fotoacústica é um método amplamente reconhecido por suas diversas aplicações, como no monitoramento da poluição ambiental (Rocha *et al.*, 2011; Berrou *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2009; Ferus *et al.*, 2008; Grossel *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2006; Schilt *et al.*, 2004; Marinov e Sigrist, 2003), no processamento de materiais (Chrobak *et al.*, 2010; El-Brolossy e Ibrahim, 2010; Albor-Aguilera *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2008), em diagnósticos médicos (Dumitras *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2007; Bakhirkin *et al.*, 2006; Mccurdy, 2006; Mcmanus, 2006; Narasimhan *et al.*, 2001; Menzel, 2001; Liang e Knox, 2000; Loscalzo e Vita, 2000), no controle de processos industriais (De Gouw *et al.*, 2009; Besson *et al.*, 2006; Howieson, 2006; Wysoc ki *et al.*, 2005), no estudo de solos e vegetais (Du e Zhou, 2011; Schrier-Uijl *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2009; Baptista-Filho *et al.*, 2008; Bernardi *et al.*, 2008; Baptista-Filho *et al.*, 2006; Webber *et al.*, 2005), entre outras.

Todas as aplicações acima citadas requerem alta sensibilidade, alta seletividade, e tempo real e, muitas vezes, instrumentos portáteis. Esses requisitos podem ser preenchidos pela espectroscopia fotoacústica, fazendo dessa técnica uma opção bastante adequada para diferentes aplicações.

A espectroscopia fotoacústica de alta seletividade depende da utilização de fontes de radiação que tenham boas propriedades espectrais, por exemplo, largura de linha estreita, alta densidade espectral e boa colimação, sendo a radiação laser uma candidata natural. Uma grande variedade de fontes de lasers atualmente disponíveis (lasers semicondutores, lasers à gás, entre outros) cobrindo quase todo o espectro infravermelho, faz a detecção de múltiplas espécies gasosas possíveis (Baptista-Filho *et al.*, 2011; Corrêa *et al.*, 2011; Corrêa *et al.*, 2008; Baptista-Filho *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2003).

Outros fatores importantes envolvidos na detecção de gases pela espectroscopia fotoacústica são as metodologias empregadas para modulação da fonte de radiação e de processamento do sinal gerado. Em particular, os lasers semicondutores podem ser modulados através da corrente de alimentação (modulação em intensidade ou em comprimento de onda) (Curl *et al.*, 2010). A modulação realizada pela variação da intensidade da radiação é denominada por modulação em amplitude. Para este caso, o sinal fotoacústico gerado é diretamente proporcional ao coeficiente de absorção da molécula



e, assim, quando monitorado em função da variação do comprimento de onda fornece, diferentemente da espectroscopia de transmissão convencional, o espectro de absorção da molécula. Um segundo método de interesse é a modulação em comprimento de onda, que, em função da oscilação gerada sobre o comprimento de onda, produz a derivada do espectro de absorção da molécula. Este método é especialmente utilizado quando o espectro da molécula apresenta linha de absorção bastante estreita (Besson, 2006). Quanto ao processamento do sinal gerado, amplificadores síncronos, do tipo *Lock-in*, são amplamente utilizados. Estes equipamentos permitem não somente a determinação da intensidade do sinal, como também fornecem a resolução temporal. A partir deste parâmetro, os espectros de absorção de duas espécies químicas diferentes podem ser separados pelo método de separação pela fase, por exemplo.

De modo geral, o presente trabalho teve como objetivo aplicar a espectroscopia fotoacústica, utilizando lasers como fonte de radiação, na detecção das moléculas gasosas de etileno, dióxido de carbono, óxido nítrico e amônia. Para melhor entendimento e, em virtude das diferentes aplicações e estudos metodológicos realizados, este trabalho foi dividido em capítulos, compreendendo cinco no total. O primeiro capítulo traz uma abordagem dos principais temas aqui estudados. Tais temas compreendem principalmente a espectroscopia fotoacústica, seus fundamentos teóricos, os tipos de fontes de radiação utilizados e suas aplicações. Uma breve descrição sobre as moléculas gasosas estudadas também foi feita.

No capítulo 2, os resultados para etileno e dióxido de carbono, detectados utilizando um laser de CO<sub>2</sub> e um analisador de gás comercial, a partir de plantas de amendoim bravo (*P. nitens*) tratadas com Cr<sup>+6</sup> foram mostrados. Técnicas usuais para acessar estresse (fluorescência da clorofila *a*, conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, conteúdo relativo de água, conteúdo de poliaminas e fluorescência do óxido nítrico) foram também utilizadas.

O capítulo 3 teve como objetivo caracterizar um espectrômetro fotoacústico baseado em um laser de cascata quântica para detecção de óxido nítrico. As caracterizações basearam-se, por sua vez, nos métodos de modulação em amplitude e em comprimento de onda para o laser e na determinação dos limites inferiores de detecção para cada método.

O capítulo 4 descreve uma metodologia para detecção simultânea de gases. Utilizando dois lasers de cascata quântica, uma única célula fotoacústica e três frequências

de modulação distintas, as misturas binárias etileno+amônia e etileno+dióxido de carbono puderam ser detectadas simultaneamente.

O capítulo 5 traz as considerações finais, bem como uma perspectiva para os estudos realizados.

# CAPÍTULO 1

## Fundamentos básicos da espectroscopia fotoacústica utilizando lasers para a detecção de moléculas gasosas

### 1.1 Espectroscopia no infravermelho à laser

A espectroscopia no infravermelho é um método eficiente para detectar espécies gasosas, já que muitas delas absorvem nesta faixa espectral (Jia *et al.*, 2009; Gossel *et al.*, 2006; Veres *et al.*, 2003; Martin, 2002).

A espectroscopia no infravermelho é fundamentada na teoria explorada por Albert Einstein em 1905 e por Niels Bohr em 1913, os quais postularam a quantização do campo eletromagnético e dos níveis de energia atômicos, respectivamente (Zilio, 2009).

Em 1915, Einstein descreveu em detalhes a interação entre luz e absorção através dos coeficientes de probabilidades de transição entre dois níveis de energia (Zilio, 2009). Outro importante avanço foi alcançado naquele mesmo ano com a contribuição de Gerhard Herzberg para a descrição de transições moleculares (Herzberg, 2003).

Paralelamente às investigações teóricas, investigações experimentais foram realizadas já no início da década de 20. Naquela época, os espectrômetros desenvolvidos eram usados com fontes de banda larga em combinação com filtros para detectar os gases de interesse. Entretanto, a baixa seletividade e sensibilidade desses sensores limitaram o seu uso (Besson, 2006).

Um avanço tecnológico bastante relevante para a espectroscopia ocorreu com o advento dos lasers nos anos 60 (Martin, 2002). Essas fontes de radiação são particularmente bem adaptadas à espectroscopia no infravermelho, uma vez que elas oferecem muitas vantagens como, por exemplo, alta densidade de energia, colimação e emissão monocromática (Sigrist, 2003). Atualmente, em função da existência de uma grande variedade de fontes lasers (lasers semicondutores, lasers à gás, entre outros), que juntos cobrem uma grande faixa do espectro infravermelho, a detecção de múltiplas espécies gasosas se torna viável. Uma metodologia baseada em lasers oferece muitas outras vantagens, além das citadas anteriormente: ela é imune a interferências, possui alta sensibilidade, permitindo a detecção de ppbv (partes por bilhão em volume) ou concentrações ainda em pptv (partes por trilhão em volume); a linearidade e a faixa de detecção são geralmente maiores do que seis ordens de magnitude, a partir de 100 pptv até 100 ppmv (partes por milhão por volume), permite a análise da amostra em tempo

real, com medições contínuas ou não, e portabilidade relativa para medições *in situ* (Dumitras *et al.*, 2010). Laseres à gás e semicondutores emitindo na faixa do infravermelho são excelentes fontes de radiação, preenchendo de forma bastante conveniente esses requisitos. Adicionalmente os laseres de semicondutores podem ser facilmente modulados através da corrente de alimentação (modulação em intensidade ou em comprimento de onda) (Curl *et al.*, 2010).

## 1.2 Laseres à gás

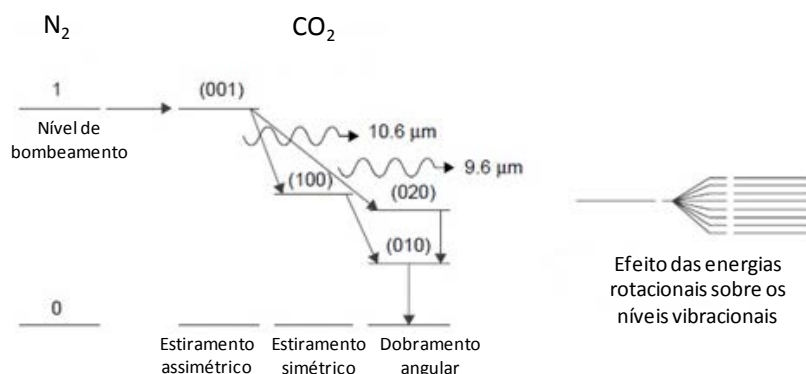
Os laseres à gás podem ser classificados em três grupos de acordo com a região do espectro eletromagnético em que emitem: laseres à gás no ultravioleta, no visível ou no infravermelho. De todos os laseres à gás no infravermelho, o laser de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o mais comumente usado, enquanto que outros gases, como o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e monóxido de carbono (CO), são usados com menor frequência (Csele, 2004).

O laser de CO<sub>2</sub> emite sua radiação em um comprimento de onda na faixa do infravermelho médio, tendo, por exemplo, uma emissão com comprimentos de onda em torno de 10,6 μm. Existe um número razoável de moléculas (hexafluoreto de enxofre, amônia, etileno, etc) que absorvem na faixa de emissão do laser de CO<sub>2</sub>. Quanto a potência do laser, ela é relativamente alta quando comparada aos laseres mais comuns, como o Hélio-Neônio (HeNe), podendo ser superior a 50 kW. Mesmo os menores laseres fornecem alguns watts de potência. Além da potência alta, outro distintivo dos laseres de CO<sub>2</sub> é sua alta eficiência (mais de 10%), própria para aplicações industriais. Esses recursos se combinam para tornar o laser de CO<sub>2</sub>, de fato, um laser padrão em processamento de materiais, com aplicações, incluindo corte e soldagem de materiais como metais endurecidos e cerâmicas (Csele, 2004).

Laseres de CO<sub>2</sub> usam uma mistura de CO<sub>2</sub>, nitrogênio (N<sub>2</sub>) e hélio (He) na proporção aproximada de 1: 2: 8, com cada gás assumindo um papel específico na mistura. O funcionamento quântico do laser de CO<sub>2</sub> é semelhante ao do laser de HeNe, ou seja, quatro níveis quânticos estão envolvidos no processo de geração de radiação, onde o nível de bombeamento para este sistema está em uma outra espécie química. A molécula de N<sub>2</sub> é excitada com a energia da descarga elétrica e seu primeiro nível excitado (energia vibracional) tem valor muito próximo ao nível superior de energia da molécula de CO<sub>2</sub> (primeiro modo de estiramento assimétrico - 001). Por meio de colisões das moléculas de N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, a energia de seus respectivos estados excitados é

transferida de uma molécula para a outra. Uma maior quantidade de  $N_2$ , isto é, uma proporção mais elevada do que o  $CO_2$ , garante que as moléculas de  $CO_2$  no estado fundamental sejam bombeadas rapidamente para o nível de mais alta energia (Figura 1.1) (Csele, 2004).

A emissão mais comum e de maior potência que ocorre no laser de  $CO_2$  tem comprimento de  $10,6 \mu m$ . Essa emissão é gerada pela transição entre o nível vibracional de estiramento assimétrico (001) e o nível vibracional de estiramento simétrico (100) (Figura 1.1). A partir deste nível, a molécula decai para o nível vibracional 010 (“flexão” ou dobramento angular) e, em seguida retorna ao estado fundamental. A adição de He à mistura de gás garante que os níveis excitados de menor energia das moléculas de  $CO_2$  sejam rapidamente despovoados. O He também serve para conduzir o calor da descarga para as paredes do tubo, uma vez que ele desempenha melhor esse papel do que a maioria dos gases (Csele, 2004). Assim como os níveis "puramente" vibracionais, as rotações da molécula de  $CO_2$  são responsáveis pelo espectro de emissão deste laser, uma vez que os níveis de rotação dividem cada nível vibracional principal em múltiplos níveis muito próximos entre si. Como resultado, a emissão real do laser é composta por uma série de linhas com comprimentos de ondas espaçados, abrangendo a faixa de  $9,2 \mu m$  à quase  $11 \mu m$ , centradas em torno de  $9,6 \mu m$  e  $10,6 \mu m$ . O grupo de emissões centrado em  $10,6 \mu m$ , por exemplo, é composto por mais de 20 linhas de emissão na faixa de comprimento de onda  $10,44$  à  $11,02 \mu m$ . Com uma rede de difração adicionada à cavidade do laser, a emissão do laser pode ser sintonizada em qualquer uma dessas vinte linhas, tornando assim o laser de  $CO_2$  uma fonte de radiação interessante para a espectroscopia no infravermelho (Csele, 2004).



**Figura 1.1** - Níveis de energia em um laser de  $CO_2$ .

### 1.3 Diodos laseres

Diodos laseres emissores de luz em comprimentos de onda que vão desde o infravermelho próximo ao visível fazem parte de uma das tecnologias mais difundidas no cotidiano da sociedade, por exemplo, em telecomunicações, em processos de gravação óptica, scanners de supermercado, impressoras, faxes, apontadores laser, entre outros (Numai, 2004).

O princípio de funcionamento dos diodos laseres é fundamentalmente simples: portadores de cargas opostas (elétrons e buracos) são eletricamente injetado em uma região ativa feita de materiais semicondutores (nas bandas de condução e valência, respectivamente), onde se recombinam, emitindo fótons de energia próxima a diferença de energia entre as bandas de condução e valência da região ativa. Em outras palavras, a recombinação de elétrons e buracos produz luz de frequência  $\nu = Eg/h$ , sendo  $Eg$ <sup>1</sup> a energia que separa o menor nível energético da banda de condução do maior nível energético da banda de valência e  $h$  é a constante de Planck (Sands, 2005).

Uma decorrência direta disto é que, quando se pretende construir diodos laseres emitindo em comprimentos de onda muito diferentes, é necessário escolher materiais com  $Eg$  muito diferentes e, portanto, propriedades eletrônicas e ópticas diferentes. Este fato limita, entretanto, uma aplicação mais ampla destes dispositivos. Por exemplo, para os diodos laseres emitindo em comprimentos de onda usados em telecomunicações (em torno de 1,3 e 1,5  $\mu\text{m}$ ), ligas quaternárias feitas de gálio-índio-fósforo-arsênio são utilizadas. Já para os diodos laseres emitindo na região do azul, as ligas de alumínio contendo apenas gálio e índio devem ser escolhidas (Curl *et al.*, 2010; Sands, 2005).

A dependência da emissão de luz com o  $Eg$  é um fator que limita severamente a emissão no infravermelho médio, especialmente na maior parte da região de impressão digital molecular (de 2 à 20  $\mu\text{m}$ ). A dificuldade é combinar materiais diferentes que forneçam diferenças entre as bandas de condução e a de valência para fornecer o comprimento de onda desejado (Tittel *et al.*, 2003).

Com o desenvolvimento dos laseres de cascata quântica, as limitações anteriormente citadas relacionadas ao laseres convencionais foram superadas, tornando possível a utilização desses novos dispositivos na chamada região de impressão digital molecular (Curl *et al.*, 2010).

---

<sup>1</sup> A letra “g” vem da palavra inglesa “gap” de “bandgap”, que poder ser traduzida como separação de bandas.

### 1.3.1 Laser de Cascata Quântica

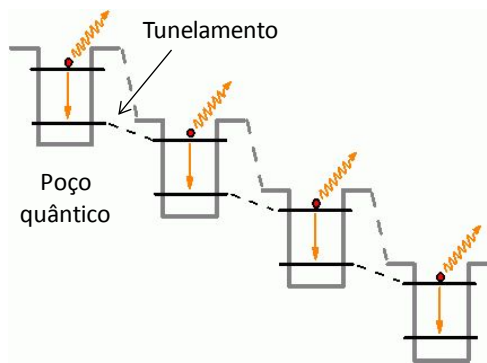
O laser de cascata quântica (LCQ) é um laser semiconductor que emite radiação na região do infravermelho médio (4 - 17  $\mu\text{m}$ ) do espectro eletromagnético. O desempenho desses dispositivos foi primeiramente demonstrado nos Laboratórios Bell em 1994 (Faist *et al.*, 1994).

O princípio de funcionamento de um LCQ contrasta com o princípio de funcionamento dos lasers semicondutores convencionais, baseando-se em um processo totalmente diferente para a emissão de luz, que é independente da separação entre as bandas de condução e valência (Curl *et al.*, 2010).

Os LCQ utilizam apenas um único tipo de portador de carga (elétrons), que são submetidos a saltos quânticos (tunelamento) entre os níveis de energia gerando fótons. Estes níveis de energia não existem naturalmente nos materiais constituintes da região ativa, mas são criados artificialmente pela estruturação da região ativa em camadas muito finas (de espessura nanométrica), conhecidas como poços quânticos. O estado dos elétrons nessas camadas é quantizado e caracterizado pelos níveis de energia, cuja diferença é determinada pela espessura dos poços e pela altura das barreiras de energia que os separa (Gmachl *et al.*, 2001).

Em um LCQ um elétron permanece na banda de condução depois de emitir um fóton. O elétron pode, portanto, ser facilmente reaproveitado, ao ser injetado em uma região ativa adjacente idêntica, onde ele emite outro fóton, e assim por diante. Para atingir esta emissão de fótons em cascata, regiões ativas são alternadas com materiais dopados e uma tensão de polarização adequada é aplicada. Os estágios das regiões ativas existentes em um LCQ fornecem, quando polarizados, uma “escada de energia”, na qual os fótons são emitidos em cada um desses estágios (Figura 1.3.1). Este efeito cascata é responsável pela intensidade da radiação de saída que um diodo LCQ pode fornecer (Gmachl *et al.*, 2001).

A implicação deste efeito independe da separação entre as bandas de condução e valência, mas que se utiliza das transições ópticas entre os estados eletrônicos quantizados, é de grande relevância para um laser com características de funcionamento completamente diferentes dos diodos laser convencionais e muito superiores ao desempenho destes (Curl *et al.*, 2010).



**Figura 1.3.1** - Esquema do princípio de funcionamento de um laser de cascata quântica baseado em poço quântico e tunelamento.

O primeiro passo para a produção de LCQ é a escolha de materiais com alta capacidade para o efeito de cascata quântica. A heteroestrutura AlInAs/GaInAs crescida em substrato de InP é normalmente o material de escolha para a região do infravermelho médio. Para o crescimento de alto desempenho de heteroestruturas, vários requisitos devem ser cumpridos. O mais importante deles é a capacidade de formar atômica e interfaces (regiões ativas) entre camadas de espessura nanométrica. O segundo passo em processamento de materiais com capacidade para o efeito de cascata quântica, fazendo-os úteis a emissão de luz com alta eficiência, é confinar o meio ativo em um guia de onda óptico. Isso faz com que seja possível dirigir a luz em um feixe colimado (Curl *et al.*, 2010). O meio ativo é mais comumente usado em combinação com uma cavidade óptica para formar um laser Fabry-Pérot ou um laser de realimentação distribuída (do inglês *Distributed-Feedback laser – DFB laser*) (Numai, 2004).

A cavidade mais simples usada para os lasers de cascata quântica é o de Fabry-Pérot. Um guia de onda óptico é primeiro fabricado a partir do material escolhido para promover a cascata quântica para o meio ativo. As extremidades dos dispositivos semicondutores cristalinos são então clivadas para formar dois espelhos paralelos. A refletividade residual sobre as faces clivadas, a partir da interface semiconductor-ar, é suficiente para criar um ressonador (conhecido como ressonador de Fabry-Pérot). Diodos LCQ Fabry-Pérot são capazes de produzir potências relativamente altas (na ordem de dezenas de miliwatts) e o comprimento de onda pode ser alterado, principalmente, alterando a temperatura do dispositivo de controle de temperatura (Numai, 2004).

Um LCQ de realimentação distribuída é um laser onde a região ativa é estruturada como uma rede de difração. A estrutura cria uma rede de interferência



unidimensional (espalhamento de Bragg), fornecendo uma resposta (feedback) óptica para o laser (Numai, 2004). Tais tipos de diodos lasers não usam dois espelhos para formar a cavidade óptica. A rede de difração atua como um elemento seletivo de comprimentos de onda, refletindo a luz para dentro da cavidade para formar o ressonador. A rede é construída de forma a refletir apenas uma estreita faixa de comprimentos de onda, e assim produzir um único modo longitudinal de luz. Isto está em contraste com um laser de Fabry-Perot, onde as faces clivadas, que formam os espelhos fornecem o *feedback*. Nesse caso, vários modos longitudinais são simultaneamente fornecidos (Numai, 2004).

Alterar a temperatura do diodo faz com que a separação entre as linhas da rede de difração seja alterada, como também, o valor do índice de refração. Uma mudança no índice de refração altera a seleção de comprimento de onda da estrutura da rede e, portanto, o comprimento de onda de saída do laser, produzindo um laser de comprimento de onda continuamente sintonizável. Uma alteração na corrente de alimentação do laser também “sintoniza” o dispositivo, já que a mudança de corrente altera a temperatura do laser (Sands, 2005).

Em função da tecnologia dos primeiros diodos, quase todas as suas aplicações eram restritas à pequenas moléculas gasosas com estruturas bem resolvidas. Tudo o que era necessário era um laser que pudesse ser ajustado para uma linha de absorção que não sobrepusesse uma linha de absorção de uma outra molécula presente em uma amostra. A partir do desenvolvimento dos diodos LCQ foi possível fornecer, através da tecnologia empregada na fabricação desses dispositivos, uma linha de emissão bastante estreita, isto é, comprimentos de onda específicos para absorção de determinadas moléculas (Curl *et al.*, 2010).

Os LCQ possuem as vantagens adicionais de serem compactos, operarem à temperatura ambiente, e terem vida útil longa. Como mencionado anteriormente, o ajuste de frequência de um LCQ de realimentação distribuída é realizado por meio do ajuste térmico do índice de refração. Uma vez que os LCQ são muito pequenos e, portanto, têm capacidades calorífica muito pequenas, a temperatura pode ser alterada rapidamente pela modulação da corrente de operação, o que confere mais uma vantagem ao LCQ (Normand *et al.*, 2007).

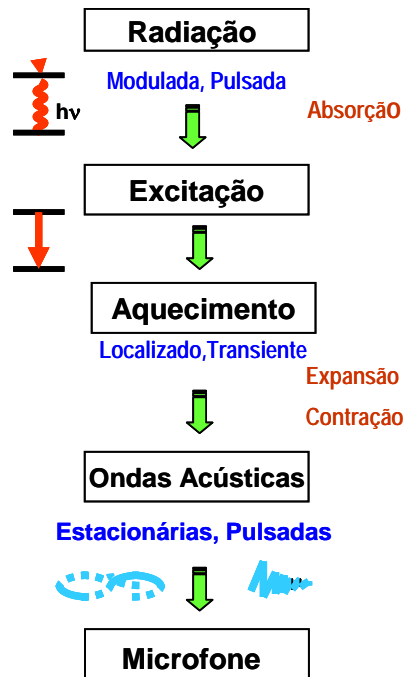
Neste sentido, os lasers de cascata quântica de realimentação distribuída representam a fonte ideal para aplicação em detecção de gases. Entre suas propriedades mais úteis, a possibilidade de sintonizar eletricamente o comprimento de onda de

emissão e aplicar diferentes tipos de modulações, são fundamentais para o aumento da sensibilidade, da seletividade e do tempo de resposta dos detectores nas medidas envolvendo a espectroscopia fotoacústica.

#### **1.4 Espectroscopia fotoacústica**

A espectroscopia fotoacústica é um método no qual a energia ótica absorvida por uma espécie gasosa é transformada em calor. A conversão de energia ótica em calor é induzida pela absorção molecular de fótons em um comprimento de onda específico e subsequente relaxação não radiativa do estado excitado (relaxação colisional). A pequena variação de temperatura na amostra é associada a uma variação de pressão. Quando a energia ótica é modulada, um aquecimento periódico é produzido, gerando, assim, uma modulação da pressão da amostra. Isto resulta em ondas acústicas. Apenas a relaxação não radiativa contribui para a geração sinal fotoacústico (Altuzar *et al.*, 2006).

Em gases, o efeito fotoacústico é produzido como resultado da seguinte sequência: i) modulação da radiação laser (tanto em amplitude, comprimento de onda ou em frequência) de comprimento de onda relacionado a uma característica espectral da espécie química a ser estudada; ii) excitação de uma fração da população do estado fundamental molecular da molécula-alvo pela absorção da radiação laser incidente; iii) processos não-radiativos de perda de energia ; iv) expansão e contração do gás em um volume fechado (célula fotoacústica), que origina uma variação de pressão e v) monitoramento das ondas acústicas resultante com um microfone e um amplificador síncrono *lock-in* (figura 1.4).



**Figura 1.4** - Processos que ocorrem durante a geração do sinal fotoacústico numa amostra gasosa. A absorção da energia do fóton é parcialmente transformada em energia térmica e sonora.

Em um sistema fotoacústico para gases, a concentração do gás medido ( $C$ ) é dada por:

$$C = S / (P \cdot C_e \cdot N_{TOT} \cdot \delta) \quad (1)$$

sendo o sinal fotoacústico  $S$  (dado em Volts) gerado dentro da cavidade da célula fotoacústica depende da potência do laser  $P$  (dado em Watts), da constante da célula fotoacústica  $C_e$  (dada em  $V \cdot cm/W$ ), da densidade total de moléculas  $N_{TOT}$  (número de moléculas por  $cm^3$ ) e da seção de choque  $\delta$  (em  $cm^2$ ). A constante da célula depende de fatores geométricos do ressonador e das características eletrônicas do microfone.

Quando  $S = S_{min}$  (razão sinal-ruído = 1), a concentração mínima detectável ( $C = C_{min}$ ) do gás é obtida por:  $C_{min} = S_{min} / (P \cdot C_e \cdot N_{TOT} \cdot \delta)$ . A partir desta fórmula, pode-se observar que para diminuir a concentração mínima detectável, existem três possibilidades: (a) reduzir os ruídos no sistema; (b) aumentar a responsividade da célula fotoacústica e / ou (c) aumentar a potência do laser.

Os ruídos que limitam a sensibilidade na espectroscopia fotoacústica podem ser classificados em três categorias:

- 1) Ruído elétrico incoerente: qualquer flutuação aleatória, eletrônica ou acústica (turbulência), que não têm uma relação de fase fixa com a modulação da intensidade do laser;
- 2) Ruído acústico coerente: um sinal causado pelo processo de modulação, mas que não é atribuído à presença do feixe de luz na célula fotoacústica;
- 3) Sinal fotoacústico de fundo coerente: um sinal sempre presente no detector fotoacústico, causado pelo feixe do laser, mas não devido à absorção de luz na maior parte do gás. Pelo contrário, é devido ao feixe de laser aquecer as janelas da célula e das absorções em suas paredes internas, devido à luz refletida ou espalhada pelas imperfeições da lente de focalização, das janelas, pelo gás e paredes internas do ressonador fotoacústico. Este sinal está em fase e na mesma frequência com a modulação da intensidade do laser, não sendo filtrado pelo amplificador *lock-in* conectado ao microfone.

Desta forma, um sinal de fundo proporcional à potência do laser torna-se o principal fator que limita a sensibilidade do sistema na detecção de moléculas gasosas (Dumitras *et al.*, 2010).

## 1.5 Moléculas gasosas biológicas detectáveis pela espectroscopia fotoacústica

### 1.5.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO), conhecido também por monóxido de nitrogênio ou monóxido de azoto, é uma molécula heterodiatômica que participa de diversas reações bioquimicamente relevantes para a maioria dos organismos vivos. O NO é produzido por uma ampla variedade de tipos celulares que incluem células epiteliais, nervosas, endoteliais e inflamatórias (Filho e Zilberstein, 2000).

Para plantas, foi apenas a partir de 1996 que o NO foi descrito como molécula sinalizadora (Leshem, 1996). Alguns estudos apontam o NO como molécula sinalizadora com funções variadas, como no controle das trocas gasosas, na regulação dos canais de  $K^+$  e  $Cl^-$  da membrana das células-guarda, na emissão de raízes laterais (Correa-Aragunde *et al.*, 2004) e em respostas ao estresse abiótico, incluindo por metais pesados (Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2011; Kopyra e Gwózdź, 2004; Xiong *et al.*, 2010).

Em animais, NO é gerado principalmente por óxido nítrico sintase (NOS), a qual catalisa a oxidação da L-arginina, dependente de NADPH, à L-Citrulina e à NO (Besson-Bard *et al.*, 2008). Em plantas, os dados da literatura sugerem que a síntese de NO é

realizada por duas vias enzimáticas distintas (Besson-Bard *et al.*, 2008): uma dependente de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )/nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e outra dependente da L-arginina. A primeira via envolve a nitrato redutase citosólica (NR) e uma nitrito-NO redutase (Ni-NOR). Uma primeira visão para o papel de NR como fonte de NO em processos de transdução foi fornecido pela *Arabidopsis thaliana* mutante deficiente em NR. Além disso, a NR e a Ni-NOR estão envolvidas na formação de NO a partir de nitrito exclusivamente nas raízes. A atividade da Ni-NOR é coordenada de modo que a NR ligada à membrana plasmática reduza nitrato à nitrito. Embora não haja nenhum homólogo da NOS de animais no genoma da *Arabidopsis*, a via dependente da L-arginina pode envolver uma enzima como a NOS em plantas (Besson-Bard *et al.*, 2008).

O radical livre do NO, o radical óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) é lipofílico, podendo se difundir através das membranas, reagindo prontamente com ânions superóxidos ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), metaloenzimas e oxigênio. A vasta gama de reações das quais o  $\text{NO}\bullet$  pode participar é largamente atribuída as diferentes espécies de óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ) encontradas em sistemas aquosos. Nestes sistemas ele pode ser rapidamente oxidado à  $\text{NO}^+$  (cátion nitrosônio), ou reduzido à  $\text{NO}^-$  (ânion nitroxil) (Loscalzo e Vita, 2000).

Os estudos com NO não revelam apenas a sua reputação de gás tóxico, de estar na lista de gases de poluição ambiental, de ser um dos precursores da chuva ácida, destruidor da camada de ozônio, entre outros (Tsuji *et al.*, 2003). Por outro lado, os estudos também descrevem o NO como um importante marcador biológico em seres humanos (Mccurdy, 2006). Esta pequena e simples molécula, talvez a menor produzida pelos mamíferos, tem efeitos desde a manutenção inicial da vida, através do controle da circulação placentária, ou a indução do início da vida através da regulação das contrações uterinas no trabalho de parto, como também efeitos letais demonstráveis, por exemplo, no choque séptico (Filho e Zilberstein, 2000). O NO é um importante neurotransmissor com capacidade potencializadora, atuando na memória e no aprendizado. Esta molécula tem obrigado a revisão de muitos paradigmas da física, da química, da biologia e da medicina (Filho e Zilberstein, 2000). Em 1998 no *Karolinska Institute* em Estocolmo (Suécia), os cientistas Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad foram premiados com o Nobel em Fisiologia e Medicina pelas suas descobertas em relação ao NO como molécula sinalizadora no sistema cardiovascular (Furchgott, 1999).

Frente a gama de conhecimentos adquiridos sobre o NO nas diferentes áreas da ciência, o desenvolvimento de métodos para a detecção desta molécula se faz, portanto, cada vez mais necessário.

### 1.5.1.1 Metodologias de detecção de NO em plantas

Muitos métodos têm como foco a determinação do conteúdo de NO endógeno (produzido dentro da planta) e o emitido pela planta em concentrações em nível de traço, mas com impacto sobre os processos celulares e fisiológicos. Os métodos utilizados para avaliação do conteúdo endógeno de NO em plantas atualmente descritos são: reação de Griess, oxiemoglobina, corantes fluorescentes (diaminofluoresceína - DAF), ressonância paramagnética eletrônica, análise eletroquímica e espectrometria de massas (artigo de revisão de Mur e colaboradores de 2011).

Um dos primeiros métodos de detecção de NO endógeno, a reação de Griess, é normalmente utilizado na forma de *kits* comerciais relativamente baratos para medidas de NO. Trata-se de um método colorimétrico desenvolvido por Johann Peter Griess (1829-1888), um químico alemão, que sugeriu que  $\text{NO}_2^-$  poderia ser detectado pela reação com ácido sulfanílico e  $\alpha$ -naftlamina sob condições ácidas para fornecer um corante *azo*. O corante estável resultante pode ser quantificado por espectrometria de absorção em 520 nm. O NO é rapidamente oxidado a  $\text{NO}_2^-$ , de modo que a reação básica de Griess é usada como um método indireto para análises de NO (Schmidt e Kelm, 1996). A sensibilidade relatada para esta técnica (na faixa de micromol) (Hetrick e Schoenfisch, 2009) pode ser um dos motivos pelo qual a técnica está caindo em desuso. No entanto, através de uma aplicação nova da reação de Griess, sensibilidades na faixa de nanomol foram relatadas (Vitecek *et al.*, 2008).

A oxiemoglobina é um método espectroscópico baseado na reação da oxiemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) com NO para produzir metemoglobina (MetHb) e  $\text{NO}_3^-$ . Esta reação resulta em um deslocamento da absorbância de 415 – 421 ( $\text{HbO}_2$ ) para 401 nm (MetHb). Embora a oxiemoglobina seja um método robusto e sensível (limite de detecção já alcançado de  $1,3 \text{ nmol L}^{-1}$ ) (Murphy and Noak, 1994), a produção de  $\text{HbO}_2$  é tecnicamente exigente, uma vez que requer a oxigenação da hemoglobina seguida por isolamento através da cromatografia. Além disso, espécies reativas de oxigênio (*ROS*) podem oxidar a  $\text{HbO}_2$ , fornecendo leituras falsas para o ensaio.

Corantes DAF têm sido amplamente utilizados na determinação de NO, possibilitando ainda que as propriedades dos sítios de geração do NO sejam reveladas (Balestrazzi *et al.*, 2011; Santa-Catarina *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2006; Hilderbrand *et al.*, 2005; Pallini *et al.*, 1998). Corantes DAF foram primeiro descritos por Kojima *et al.* (1998a) para reação com o trióxido de dinitrogênio ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), um subproduto da oxidação de NO, com um aumento significativo da fluorescência. Esse tipo de corante foi

inicialmente comercializado na forma diacetato (DAF-2DA), a qual permite uma rápida absorção por células vivas. Os limites de detecção alcançados para padrões de imagem de produção de NO celular por fluorescência de microscopia foram muito baixos ( $5 \text{ nmol L}^{-1}$ ) (Kojima *et al.*, 1998b), porém o pH tem influência direta sobre os limites atípicos e devem ser considerados na interpretação dos resultados.

A ressonância paramagnética eletrônica (também conhecida como ressonância do *spin* do elétron) é baseada na observação de elétrons desemparelhados sob um campo eletromagnético, que exibe uma ressonância entre orientações paralelas e antiparalelas do *spin* do elétron (Kleschyov *et al.*, 2007). A intensidade do campo magnético é verificada até que a ressonância entre os estados paralelos e antiparalelos do *spin* do elétron seja atingida a uma dada frequência de microondas (que será específica para um dado radical) até que um sinal seja observado. Como só as espécies de radicais livres são detectadas, a técnica é altamente seletiva para NO sobre todos os outros produtos de oxidação de N (Kleschyov *et al.*, 2007). No entanto, a natureza do radical  $\text{NO}^{\bullet}$  implica na utilização de armadilhas de *spins* específicas, isto é, compostos químicos que dão longevidade ao sinal do radical dependente do NO. Complexos de ditiocarbamato de ferro têm sido frequentemente utilizados em função da afinidade do NO com o ferro (Hilderbrand *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 2005). Os limites de detecção da ressonância paramagnética eletrônica são da ordem de picomol (Weaver *et al.*, 2005). No entanto, a técnica não tem sido amplamente utilizada por cientistas de plantas devido aos custos inerentes dos ressonadores e a experiência considerável exigida para interpretar os dados obtidos, de tal forma que a maioria dos estudos biológicos envolvem colaborações com departamentos de física. Experimentalmente, a ressonância paramagnética eletrônica é excelente para médias não-contínuas, porém de difícil aplicabilidade às medidas de longo prazo de uma mesma amostra de planta (Muer *et al.*, 2011).

Análises eletroquímicas baseadas em eletrodos de NO têm sido amplamente utilizadas por cientistas clínicos, já que elas representam um meio relativamente barato e fácil de detectar NO (Davies e Zhang, 2008). O eletrodo de NO consiste de uma micropipeta com a extremidade aberta e coberta com uma membrana permeável ao NO. Eles podem ser feitos a partir de borracha de cloropreno, acetato de celulose, poliestireno, politetrafluoretileno (PTFE) e fenilenodiamina. Após a passagem de uma corrente elétrica, o NO é detectado com base na sua oxidação em + 0,8 à + 0,9 V em relação ao eletrodo de referência (Pallini *et al.*, 1998; Hampl *et al.*, 1996; Shibuki *et al.*,

1990). Sensibilidades relatadas para eletrodos de NO atingiram a ordem de  $10^{-20}$  mol de NO em células (Malinski e Taha, 1992). O posicionamento dos microeletrodos revelou que a geração de NO é restrita ao local da lesão (Arasimowicz *et al.*, 2009), no entanto, eles próprios podem ser elementos estressantes, interferindo na produção de NO.

A utilização da espectrometria de massa por introdução via membrana (*MIMS*, do inglês *membrane inlet mass spectrometry*) acoplada a um cromatógrafo à gás permite a detecção *on-line* de NO a partir de culturas de tecidos de plantas e de plantas inteiras (Tsikas *et al.*, 2010; Tsikas, 2004). Nesta técnica, uma membrana separa o espectrometro de massa a partir da cultura de tecidos, permitindo a difusão de gases de pequenas massas moleculares, tais como o NO. Um particularidade da MIMS é que ela é capaz de distinguir entre diferentes isótopos de N, de modo que a suplementação de culturas com substratos específicos para enzimas geradoras de NO pode ser estimada quando o NO é produzido (Mur *et al.*, 2011).

Métodos que podem oferecer medidas em tempo real da emissão de NO por plantas são, atualmente, a quimioluminescência e a espectroscopia no infravermelho à laser (Mur *et al.*, 2011). É importante salientar que, com o emprego desses métodos, existe a possibilidade de leituras de outros produtos voláteis, principalmente vapor de água, e que este deve ser considerado.

A quimiluminescência é um dos métodos mais bem estabelecidos para determinação de NO, baseando-se na sua reação com o  $O_3$ , gerando luz e  $O_2$  (Planchet e Kaiser, 2006; Hilderbrand *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 1999). A reação do NO com  $O_3$  produz estados excitados de dióxido de nitrogênio ( $NO_2^*$ ), que emitem fótons ao retornarem para o estado fundamental de energia. A luz emitida (maior que 600 nm) é medida através de um tubo fotomultiplicador. A intensidade observada é proporcional à quantidade de NO. O processo de quimioluminescência também pode resultar da reação do NO com compostos de etileno e enxofre, estas reações emitem comprimentos de onda entre 440 e 470 nm (com etileno) e menores que 400 nm (com enxofre), porém os resultados são menos específicos do que para o caso da reação com o  $O_3$ . A quimioluminescência apresenta excelente sensibilidade, com limites de detecção muito baixos (na faixa de picomol) (Byrnes *et al.*, 1996), necessitando apenas de um equipamento comercializável com plataforma robusta para as medidas, embora indiretas de NO.

A determinação de NO emitido por plantas, por exemplo, utilizando a espectroscopia no infravermelho à laser pode ser feita com base em um laser à gás (laser



de CO, cobrindo a faixa de 4,6 à 8,2  $\mu\text{m}$ ) e em um LCQ (linha principal centrada em torno de 5,2  $\mu\text{m}$ ). Um limite de detecção de 20 pmol (comparável à quimioluminescência) foi alcançado quando um laser de CO foi utilizado. O atraso de apenas 2,5 min entre a emissão da planta e a detecção dentro da célula fotoacústica faz desse tipo de medida quase simultânea e contínua (Mur *et al.*, 2005). Um LCQ para NO em combinação com uma célula de multipassagem foi aplicado para determinação do limite inferior de detecção de NO para esse sistema, sendo de 0,8 ppbv o limite atingido com tempo de 1s de resposta da célula fotoacústica (Cristescu *et al.*, 2008). Além dessa rápida resposta, uma das principais vantagens deste sistema de detecção de NO é a possibilidade de operação automatizada em longo prazo. Concentrações de 3 à 16 ppb de NO provenientes de ar exalado foram atingidas por Menzel e colaboradores (2001) ao utilizarem um LCQ para essa molécula. Um sensor para NO baseado também em um LCQ termoeletricamente resfriado foi desenvolvido para determinar baixas concentrações de NO. Um limite mínimo de 0,7 ppbv foi alcançado (Bakhirkin *et al.*, 2006).

Comparando os resultados obtidos por espectroscopia no infravermelho, utilizando um laser de cascata quântica, e os obtidos por quimioluminescência (Cristescu *et al.*, 2008; Byrnes *et al.*, 1996), o método quimioluminescente exige uma fluxo de gás de arraste muito maior ( $14 \text{ L h}^{-1}$ ), o que representa uma diluição considerável do sinal em comparação com o fluxo habitual de 1 à  $1,5 \text{ L h}^{-1}$  para a metodologia envolvendo o LCQ. Portanto, a escolha de um ou do outro método para detecção de NO dependerá da concentração característica emitida por um sistema biológico, de modo que o método satisfaça as condições da própria amostra sem que haja diluição da mesma.

### 1.5.2 Etileno

O etileno ou eteno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ) é uma molécula gasosa que funciona como hormônio e está presente em todos os órgãos vegetais (Ecker, 1995). Sintetizado a partir da S-adenosilmetionina (SAMdoMet) e do 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) (Yang e Hoffman, 1984), o etileno está envolvido em muitos processos do ciclo de vida de plantas, incluindo a germinação de sementes, desenvolvimento de raízes, senescência das flores, abscisão e maturação dos frutos (Johnson e Ecker, 1998).

Além do NO, etileno é uma molécula sinalizadora relacionada ao estresse em plantas. Muitas das reações adversas às plantas causadas por metais pesados, como o crescimento atrofiado, torção de folhagem, nanismo de raízes e outros parecem estar

ligadas ao etileno (Arteca e Arteca, 2007).

A exposição a estresses físicos, químicos ou biológicos é uma característica intrínseca das plantas. De acordo com Levitt (1980), o termo estresse é usado para qualquer fator externo capaz de induzir prejuízos potenciais às plantas. O estresse pode ser descrito como um estado em que demandas crescentes feitas sobre a planta podem levar a uma desestabilização inicial de suas funções, seguido por respostas adaptativas para a normalização, podendo até levar a um excesso de compensação de funções e a maior resistência (Gazzarrini e McCourt, 2003). No entanto, a tolerância aguda ou a capacidade de adaptação sobrecarregada podem levar à danos permanentes e à morte. Dentro de uma rede hormonal, a produção de etileno e os processos de sinalização estão altamente envolvidos, não apenas por sintomas induzidos por estresse, mas também nos processos de aclimação do desempenho da planta e ajuda à sobrevivência (Khan, 2006).

Embora o estresse envolvendo metais pesados, tais como cobre, zinco, níquel, entre outros, tenham mostrado um efeito na produção de etileno, esses não são muito bem esclarecidos (Arteca and Arteca, 2007; Poschenrieder *et al.*, 1993; Pezzarossa *et al.*, 1991; Fuhrer, 1982). Alguns trabalhos reportaram tanto um aumento quanto um decréscimo na produção de etileno na presença de metais pesados, parecendo ser o cádmio o íon inorgânico mais fitotóxico (Fuhrer, 1982; Pezzarossa *et al.*, 1991).

A cromatografia gasosa tem sido a técnica mais utilizada para a detecção de etileno em plantas sob estresse, especialmente por metais pesados (Arteca e Arteca, 2007; Poschenrieder *et al.*, 1993; Pezzarossa *et al.*, 1991; Fuhrer, 1982). Embora a cromatografia gasosa seja a mais comumente utilizada, a espectroscopia fotoacústica tem mostrado vantagens em termos de sensibilidade e acurácia, medidas em tempo real e não destrutivas, como no caso do acompanhamento de amadurecimento de frutos (Corrêa *et al.*, 2011; Alvez *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2009; Corrêa *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2003). A aplicação da espectroscopia fotoacústica, portanto, na detecção de etileno a partir de plantas sob estresse por metal pesado é viável e, ela não foi reportada até o presente momento, vindo a ser uma inovação nesse sentido.

### 1.5.3 Amônia

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para as plantas e limitante à produtividade agrícola. O grande reservatório de N é representado pelo gás atmosférico  $N_2$  ( $N_2$ ) (cerca de 78%). Antes de ser incorporado aos compostos orgânicos (aminoácidos e nucleotídeos) presentes em sistemas biológicos, o  $N_2$  atmosférico é reduzido a amônia ( $NH_3$ ). Seres humanos e animais obtêm N através de suas dietas alimentares. Entretanto, as plantas não possuem aparato enzimático para quebrar a tripla ligação da molécula e utilizá-la como fonte de proteína (Puppato *et al.*, 1987).

O processo de conversão do nitrogênio molecular em amônia é conhecido como fixação de nitrogênio. Existem, basicamente, duas alternativas para a realização desse processo: a fixação química (industrial) e a fixação biológica do nitrogênio (FBN). A fixação química corresponde a reação do nitrogênio com hidrogênio, sob alta temperatura e pressão, conhecido como processo de Harber-Bosch, desenvolvido no início do século XX na Alemanha, e tem sido a base de produção dos adubos nitrogenados para a agricultura moderna (Felix e Cardoso, 2004; Puppato *et al.*, 1987).

A FBN é um processo biológico de quebra da ligação tripla do  $N_2$  através de um complexo enzimático, denominado nitrogenase. Este processo ocorre no interior de estruturas específicas, denominadas de nódulos, onde bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (geralmente conhecidas por rizóbios) convertem o  $N_2$  atmosférico em amônia, que é incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização nas rotas metabólicas de produção de biomassa por plantas da família das leguminosas (De Araújo e Carvalho, 2006).

As indústrias têm sintetizado cada vez mais fertilizantes baseados em nitrogênio amoniacal, visando atender o desenvolvimento e a produção máxima da agricultura nas terras agriculturáveis. A vegetação consegue reter apenas parte do material incorporado ao solo, o restante é perdido para o ambiente por processos de erosão, ou através de emissão para a atmosfera, criando-se um sistema aberto que requer frequente adição de fertilizante (Felix e Cardoso, 2004). A principal fonte de fertilizante nitrogenado usado em pastagens é a ureia. Entretanto, ela possui grande propensão a perder N por volatilização da amônia presente. O uso de aditivos para reduzir as perdas de N da ureia pela volatilização de amônia tem aumentado recentemente. A zeólita é um mineral que vem sendo estudado como um desses aditivos, pois apresenta alta porosidade e alta capacidade de troca catiônica e também auxilia a liberação lenta de nutrientes. Essas características facilitam o aumento da capacidade de absorção de nutrientes e de retenção de

água no solo. O princípio da ação da zeólita na conservação do íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) envolve a diminuição da concentração do nitrogênio na solução por meio da troca catiônica. Além de reter grandes quantidades do íon amônio, esse mineral interfere no processo de nitrificação (Bernardi *et al.*, 2008).

Um laser de cascata quântica pulsado de baixa potência (2 mW) com temperatura variando de  $-41,0\text{ }^\circ\text{C}$  à  $+31,6\text{ }^\circ\text{C}$  e um detector fotoacústico diferencial ressonante foram utilizados para medir concentrações de amônia em nível de traço. Boa concordância entre o espectro experimental e o espectro simulado HITRAN foi encontrada na faixa espectral entre  $1046$  e  $1052\text{ cm}^{-1}$ . Um limite de detecção de 30 ppbv de amônia e uma razão sinal-ruído de 1 foram obtidos (Baptista-Filho *et al.*, 2006).

Um tipo de zeólita sedimentar da região do centro-norte do Brasil foi caracterizada pela determinação de suas propriedades físicas e químicas (área de superfície, volume de poros, dinitrogênio e as taxas de dessorção de amônia, entre outros), e comparado com outras duas zeólitas naturais comerciais. Utilizando a espectroscopia fotoacústica, o desempenho desses materiais microporosos na adsorção e dessorção de fertilizantes contendo nitrogênio foi estudado através do monitoramento da taxa de emissão de amônia após o tratamento com sulfato de amônio (Baptista-Filho *et al.*, 2011).

Análise da respiração pode ser uma ferramenta não invasiva valiosa para o diagnóstico clínico de uma série de condições patológicas. A detecção de amônia no ar expirado é de particular interesse e tem sido associada ao mau funcionamento renal e úlceras pépticas (Manne *et al.*, 2006). Um analisador de gases baseado em um laser de cascata quântica pulsado operando na região do infravermelho ( $970\text{ cm}^{-1}$ ) foi desenvolvido para a detecção de níveis traços de amônia no ar. Foi relatada uma sensibilidade de amônia de aproximadamente 50 ppm no ar com este sistema (Manne *et al.*, 2006).

#### **1.5.4 Dióxido de carbono**

O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é um gás à temperatura ambiente e pressão atmosférica. A sua concentração atual na atmosfera terrestre está ao redor de 390 ppm. As principais fontes de  $\text{CO}_2$  são a combustão de carvão e de hidrocarbonetos, a fermentação de líquidos, produção de cimento, respiração dos seres humanos e animais, vulcões e fontes termais (*Inventory of U.S. greenhouse gas emissions and sinks*, 1990-2010).

O  $\text{CO}_2$  é removido da atmosfera para ser incorporado à compostos orgânicos (açúcares, gorduras e aminoácidos), num processo conhecido fixação de carbono. Plantas, algas e muitas espécies de bactérias (cianobactérias) fixam carbono e criam seu próprio alimento através da fotossíntese. A fotossíntese é, portanto, a utilização de  $\text{CO}_2$  (e água) da atmosfera para produção de açúcares e outros compostos orgânicos, liberando  $\text{O}_2$ . Por outro lado, plantas, animais, muitos fungos e algumas bactérias produzem  $\text{CO}_2$ , que é um produto final da quebra de compostos orgânicos como parte do metabolismo desses organismos em um processo conhecido como respiração celular (Taiz e Zeiger, 2010).

Considerado como um gás de efeito estufa (absorve luz infravermelha térmica), as plantas desempenham um importante papel no que diz respeito à amenização dos efeitos provocados pelo  $\text{CO}_2$  quando lançado na atmosfera em largas escalas. Isto é, o  $\text{CO}_2$  pode ser removido da atmosfera por meio do crescimento de plantas selecionadas especialmente para essa finalidade. Quanto mais rápido o crescimento, mais rápida é a sua absorção (Baird, 2002). Existe ainda outro método de sequestrar carbono (que não tem relação com o crescimento de plantas) para amenizar os efeitos que o  $\text{CO}_2$  pode causar ao ambiente: em lugar de ser liberado na atmosfera, o  $\text{CO}_2$  pode ser removido quimicamente dos gases de exaustão das usinas termelétricas, por exemplo, que queimam combustíveis fósseis. O  $\text{CO}_2$  é posteriormente recuperado e armazenado em um local, evitando sua liberação para a atmosfera (Baird, 2002).

Em plantas, organelas específicas, conhecidas como estômatos, iniciam o processo de sequestro de carbono da atmosfera. Os estômatos são pequenos poros nas superfícies de folhas e caules, delimitadas por um par de células-guarda, que efetuam o controle de troca de gases entre o interior da folha e o ambiente. A troca gasosa é regulada através do controle da abertura do poro estomático e do número de estômatos que se formam na epiderme (Hetherington e Woodward, 2003).

A presença de poluentes como metais pesados tóxicos em altas concentrações e de fatores como excesso de luz, alta temperatura e transpiração podem reduzir a assimilação de  $\text{CO}_2$  por interferir na condutância estomática, afetando o metabolismo da planta (Elfadl e Luukkanen, 2006).

Mecanismos de trocas gasosas dizem respeito à assimilação de  $\text{CO}_2$ , a processos de evaporação-transpiração, a condutância estomática e ao déficit ou o excesso de carbono na câmara subestomática, uma vez que a água e o  $\text{CO}_2$  compartilham a mesma rota de difusão (células estomáticas). Desta forma, é necessário manter um equilíbrio entre

assimilação de carbono e transpiração. Sob algum tipo de estresse a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> declina em função da redução na condutância estomática (Prado *et al.*, 2004).

A importância de se detectar óxido nítrico, etileno, amônia e CO<sub>2</sub> é justificada pelos diversos papéis desempenhados por essas moléculas em sistemas biológicos. Com base no conhecimento adquirido na área de detecção fotoacústica, é de interesse científico e tecnológico expandir a experiência na detecção em tempo real dessas e de outras espécies químicas.

Os capítulos descritos a seguir são resultados das aplicações da espectroscopia fotoacústica na detecção dos gases mencionados, bem como do aprimoramento da metodologia envolvida, que se utilizam, por sua vez, dos conceitos e das informações gerais até aqui abordados.

## CAPÍTULO 2

### **Espectroscopia fotoacústica aplicada à detecção de etileno em plantas de amendoim bravo cultivadas em Cr<sup>+6</sup>**

#### **2.1 Justificativa**

A poluição por metais pesados é um dos problemas ambientais mais graves da atual sociedade. Atividades agrícolas, urbanas e industriais, ao longo dos anos, têm contribuído para aumentar os níveis de metais no solo e na água. As maiores fontes de poluição por metais são mineração e fundição, mas quantidades significativas de metais também são liberados para esses ambientes em consequência da combustão de carvão e do descarte de resíduos tóxicos sem tratamento adequado (Spongberg *et al.*, 2008).

Entre as diferentes espécies metálicas existentes, como o cromo (Cr), chumbo (Pb), zinco (Zn), ferro (Fe), cádmio (Cd) e cobre (Cu), algumas atividades industriais em larga escala, como as das indústrias siderúrgicas, favorecem a contaminação em especial pelo Cr no ambiente (Ganesh *et al.*, 2008).

Apesar do Cr ser um elemento essencial para os seres humanos, para o crescimento da planta, ele pode ser tóxico (Hansel *et al.*, 2003; Panda e Choudhury, 2005; Paiva *et al.*, 2009). A fitotoxicidade do Cr nos diferentes ambientes é controlada por uma série de fatores, incluindo sua biodisponibilidade, a competição por sítios de ligação e a espécie iônica existente (Vernay *et al.*, 2007).

A especiação iônica ou o estado de oxidação tem relação direta com a toxicidade do metal pesado, sendo a forma iônica hexavalente para o Cr (Cr<sup>+6</sup>) a mais tóxica (Paiva *et al.*, 2009), mutagênica e cancerígena (Prasad, 2004). O Cr<sup>+6</sup> é capaz de gerar indiretamente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, levando ao chamado estresse oxidativo (Shanker *et al.*, 2005; Ünyayar *et al.*, 2006; Zazo *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Embora algumas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e nitrogênio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*) possam atuar como moléculas sinalizadoras, preparando o organismo contra os efeitos negativos da presença de metal, elas também têm ação negativa sobre os processos fisiológicos e bioquímicos das plantas (Kopyra e Gwozdz, 2004). Sob estresse provocado por Cr<sup>+6</sup>, tem sido observado alterações na estrutura dos cloroplastos e das membranas, nas trocas gasosas, no conteúdo de pigmentos fotossintéticos e na emissão de fluorescência da clorofila *a* (Paiva *et al.*, 2009; Vernay *et al.*, 2007; Arduini, *et al.*, 2006; Panda e Chou-

dhury, 2005; Panda e Khan, 2003; Shanker *et al.*, 2005; Vajpayee *et al.*, 2000). A fluorescência da clorofila *a* é um método não invasivo poderoso para detectar estresse em plantas, permitindo entender os processos fotoquímicos e não-fotoquímicos que ocorrem nas membranas dos cloroplastos (Maxwell e Johnson, 2000). Através das componentes da fluorescência da clorofila *a* é possível determinar o rendimento quântico do fotossistema II (FSII), dado pela razão  $F_v/F_m$  (Fluorescência variável/Fluorescência máxima), a qual expressa a capacidade do sistema em converter energia luminosa em energia química. Há também as componentes que medem a dissipação ou extinção da fluorescência: qP (extinção fotoquímica) e NPQ (extinção não-fotoquímica) (Van Kooten e Snel, 1990). Assim, a avaliação de diferentes estágios da fotossíntese representa um excelente indicativo de estresse por Cr em plantas (Paiva *et al.*, 2009).

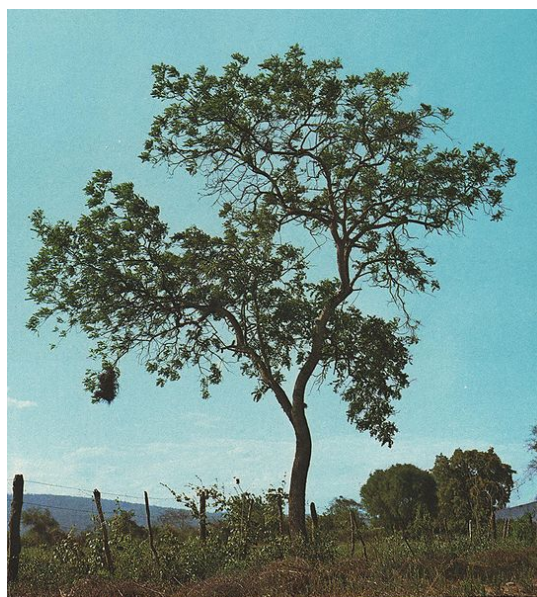
Além das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, do NO e do etileno, existem ainda as poliaminas putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) que atuam como moléculas sinalizadoras à muitas respostas adversas relacionadas ao estresse em plantas, incluindo por metais pesados (Arteca e Arteca, 2007; Balestrasse *et al.*, 2005). A diamina Put, a triamina Spd e a tetramina Spm são as principais poliaminas em plantas e estão envolvidas desde respostas ao estresse (abiótico e biótico), assim como em muitos processos regulatórios em plantas, como crescimento, divisão celular, replicação do DNA, entre outros (Groppa e Benavides, 2008). O excesso de metais pesados produz mudanças no metabolismo das poliaminas (Oliva *et al.*, 2010; Balestrasse *et al.*, 2005; Pirintsos *et al.*, 2005; Groppa *et al.*, 2003). Embora essas mudanças sejam controversas para diferentes espécies, elas estão relacionadas à função protetora das poliaminas nas células das plantas quando em altas concentrações de metais (Ghnaya *et al.*, 2011).

Apesar das alterações que podem ocorrer em plantas em resposta a presença de metais pesados, muitas espécies mostram tolerância a estes metais em função de aclimações anatômicas, morfológicas bioquímicas e fisiológicas. A demanda por espécies arbóreas tolerantes a metais pesados tem aumentado devido à necessidade de reflorestamento perto das áreas inativas de mineração (Pulford e Watson, 2003) e/ou restauração de mata ciliar com alta atividade antrópica e, portanto, com maior possibilidade de presença de metais pesados (Madejón *et al.*, 2004). *Pterogyne nitens* Tul., comumente conhecida como amendoim bravo, é indicada para plantio em mata ciliar com inundações periódicas de rápida duração, redefinição e recuperação de áreas degradadas (Santos *et al.*, 2008). Estas espécies ocorrem naturalmente em áreas de Mata



Atlântica, principalmente em florestas semidecíduas. Apesar do fato de as espécies lenhosas serem comumente usadas para a restauração ecológica em ambientes tropicais, pouco se sabe sobre como elas respondem ao estresse por metal (Fuentes *et al.*, 2007).

De acordo com o exposto, a presença de metais pesados em plantas gera uma gama de respostas que envolvem diversas moléculas e organelas de seus processos fisiológicos. Algumas dessas respostas estão bem estabelecidas, outras porém, como as moléculas de sinalização envolvidas, ainda precisam de maiores investigações. Deste modo, a espectroscopia fotoacústica foi utilizada para detectar etileno e CO<sub>2</sub> de mudas da árvore tropical *P. nitens* (Figura 2.1) cultivadas em Cr<sup>+6</sup>. A aplicação da técnica é inovadora frente aos métodos tradicionais de pesquisa sobre estresse já bem estabelecidos, como por exemplo a emissão de fluorescência da clorofila *a*, o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, o conteúdo relativo de água e a área foliar específica. Além dessas análises, o presente trabalho teve como objetivo realizar medidas de fluorescência de NO e do conteúdo de poliaminas nas plantas citadas para também ter acesso ao nível de estresse em que as plantas se encontravam.



**Figura 2.1** - Árvore tropical *Pterogyne nitens* Tul.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Crescimento das plantas e tratamentos

Plantas de *P. nitens* foram cultivadas em duas condições distintas de acordo com as análises a serem realizadas.

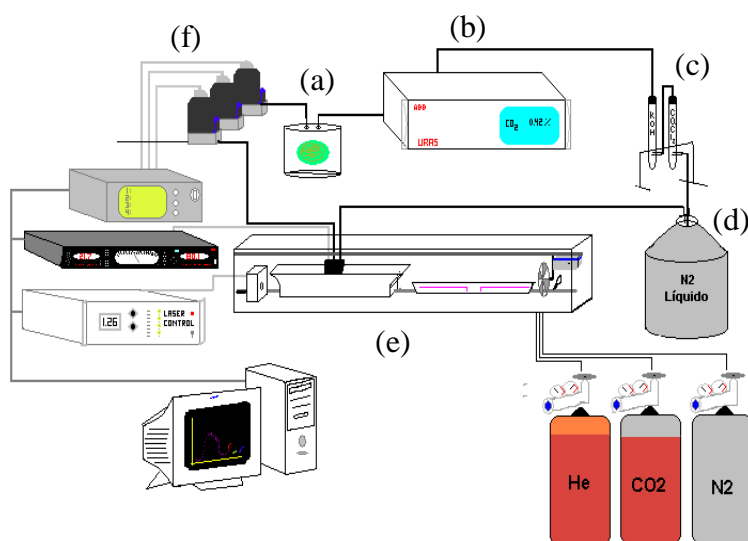
- 1) As sementes foram cultivadas em substrato Plantmax sob densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e à temperatura ambiente (cerca de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) até dois meses de idade (Figura 2.2.1). As plântulas foram submetidas por sete dias a  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$  ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Após esse período, a emissão de  $\text{C}_2\text{H}_4$  e  $\text{CO}_2$ , os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, o conteúdo relativo de água, a área foliar específica, a fluorescência do NO e o conteúdo de poliaminas livres foram avaliados. As análises de NO foram feitas para duas horas e sete dias. Isto pode ser explicado com base no fato que o NO está envolvido em respostas primárias ao estresse (Besson-Bard *et al.*, 2009).
- 2) As sementes foram germinadas em ágar na ausência e na presença de  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$ . Após sete dias, três amostras das raízes e das folhas de cada tratamento foram coletadas para determinar o conteúdo de poliaminas livres.



**Figura 2.2.1** - Plântulas de *Pterogyne nitens* Tul. com dois meses de idade.

### 2.2.2 Detecção de etileno e CO<sub>2</sub>

Cada planta foi colocada dentro de câmaras fechadas para monitorar as taxas de emissão de etileno usando um espectrômetro fotoacústico. Um analisador comercial de gás no infravermelho (URAS14 ABB) conectado em série ao espectrômetro foi utilizado para monitorar a respiração das plantas (emissão de CO<sub>2</sub>) (Figura 2.2.2). Filtros químicos (KOH e NaCl) foram usados para eliminar as contribuições de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, respectivamente, presentes no gás de transporte. Para evitar interferências devido a traços de vapor de água e de hidrocarbonetos, a amostra gasosa foi passada através de uma "armadilha fria" antes de entrar na célula fotoacústica. Para calibrar o detector fotoacústico, uma mistura padrão de 1 ppmv (parte por milhão por volume) de etileno em nitrogênio foi utilizada. Etileno e CO<sub>2</sub> emitidos das plantas foram, então, arrastados, usando uma taxa de fluxo contínuo de 2 L h<sup>-1</sup> de ar como gás de arraste controlado por controladores de fluxo eletrônico (modelo 5850S, Instrumento Brooks), para o interior do detector URAS e do espectrômetro fotoacústico. As concentrações de etileno e de CO<sub>2</sub> foram determinadas considerando os valores do fluxo e as massas das partes aéreas das plantas.



**Figura 2.2.2** - Esquema da montagem experimental utilizada para as medidas fotoacústicas de etileno e CO<sub>2</sub> em plantas de amendoim bravo após sete dias em 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Cr<sup>+6</sup>: a) porta amostra, b) detector de infravermelho de CO<sub>2</sub> (URAS), c) filtros de KOH e CaCl<sub>2</sub>, d) armadilha de N<sub>2</sub> líquido, e) espectrômetro fotoacústico e f) fluxômetros eletrônicos.

### 2.2.3 Emissão de fluorescência da clorofila *a*

Essas medidas foram conduzidas entre 11:00 e 12:00 h usando um fluorímetro modulado portátil (FMS2, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK). Três folhas de cada planta (em um total de três plantas) foram mantidas no escuro por 30 minutos, sendo posteriormente expostas a um feixe de luz modulada de baixa intensidade (cerca de  $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 660 nm), seguido pela exposição por 0,8 s a um feixe de luz branca de alta intensidade ( $10.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), adaptado por Genty *et al.* (1989). O rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ), a fluorescência da clorofila variável ( $F_v/F_0$ ) e os coeficientes de extinção qP (*quenching* fotoquímico) e NPQ (*quenching* não fotoquímico) foram medidos. Os valores foram apresentados como média de três repetições para cada tratamento.

### 2.2.4 Conteúdo dos pigmentos fotossintéticos

Três discos foliares de 1,1 cm de diâmetro foram retirados de cada planta e colocados em tubos plásticos contendo 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os frascos foram envolvidos em papel alumínio (para evitar a degradação do DMSO com a luz) e colocados em banho-maria termostático (CIENITEC-246) a 70°C por duas horas. Esse tempo foi suficiente para descolorir os discos das folhas. Após estes procedimentos, os extratos foram analisados em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-160A) nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm. Os pigmentos fotossintéticos foram quantificados utilizando as equações descritas por Wellburn (1994) para carotenóides, clorofila *a* e clorofila *b*. Os valores encontrados foram expressos em  $\text{nmol cm}^{-2}$ .

### 2.2.5 Conteúdo relativo de água da folha

Três discos de 1,1 cm de diâmetro de cada folha para cada planta foram utilizados para essas medidas. Os discos foliares foram pesados (massa fresca, MF) e, para se obter a massa túrgida (MT), as folhas foram infiltradas com água destilada utilizando um sistema de vácuo. Posteriormente, as superfícies dos discos foliares foram suavemente enxugadas com lenço de papel e secadas a 60°C, por 48 h e a massa seca (MS) foi obtida. O conteúdo relativo de água (CRA) foi calculado a partir da fórmula:  $\text{CRA (\%)} = [(MF - MS) / (MT - MS)] * 100$ .

### 2.2.6 Área foliar específica

As áreas foliares específicas (AFE) foram dadas pelas áreas dos discos das folhas divididas por suas massas secas e expressas em  $\text{cm}^2$  de acordo com a fórmula:  $\text{AFE} = \text{área da folha}/\text{massa seca da folha}$ .

### 2.2.7 Determinação de NO

Os níveis de NO intracelular foram analisados por microscopia de fluorescência utilizando sondas fluorescentes de acordo Tun *et al.* (2006), com modificações. Após duas horas e sete dias de tratamento, porções de raízes de cada tratamento foram retirados (10 pontas de raízes/tratamento, em triplicata) e incubadas em  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão HEPES-TrisHCl (pH 7,5), contendo  $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  DAF-FM-DA (4,5-diacetato diaminofluoresceína, Calbiochem), um corante fluorescente permeável à célula para analisar NO endógeno. As amostras foram incubadas no escuro, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , num agitador rotatório (50 rpm), durante 2 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão HEPES-TrisHCl, sendo preparadas para observação através de um microscópio fluorescente Axioskop 2 (Carl Zeiss, Germany). O filtro foi definido para excitação e emissão da fluoresceína em 515 nm e 525 nm, respectivamente. Fotos digitais foram tiradas. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes, com resultados semelhantes, sendo as fotos apresentadas de um experimento único.

### 2.2.8 Determinação do conteúdo de poliaminas

Essas medidas foram feitas em colaboração com o grupo da professora Eny Iochet Segal Floh do Laboratório de Biologia Celular de Plantas do Departamento de Botânica da USP. Os procedimentos foram realizados de acordo com Silveira *et al.* (2004). As amostras foram moídas em 1,6 mL de 5% (v/v) de ácido perclórico, e após uma hora, centrifugadas por 20 minutos a  $2,0 \times 10^4 \text{ g}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . As poliaminas livres foram determinadas diretamente do sobrenadante usando cloreto de dansil e identificadas por HPLC (Shimadzu Shinpack CLC ODS) usando uma coluna de fase reversa de  $5 \text{ } \mu\text{m}$ . O gradiente foi desenvolvido misturando proporções crescentes de acetonitrila 10% em água (pH 3,5). O gradiente de acetonitrila foi programado para para 65% ao longo dos 10 primeiros minutos, de 65% a 100% entre 10 min e 13 min, e 100% entre 13 min e 21 min, com fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  à  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . A concentração de poliaminas foi determinada usando um detector de fluorescência em 340 nm (excitação) e em 510 nm (emissão). As

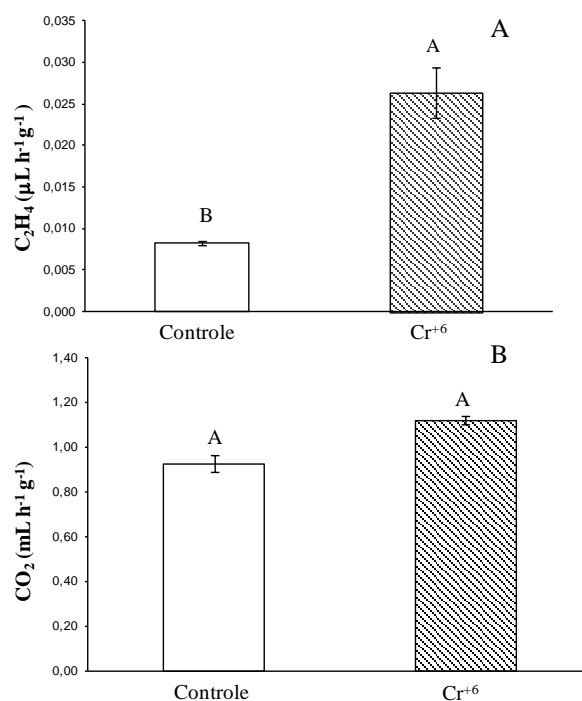
áreas dos picos e os tempos de retenção foram medidos por comparação com padrões de Put, Spd e Spm.

### 2.2.9 Análises estatísticas

Os resultados da emissão de etileno e CO<sub>2</sub>, das análises ecofisiológicas (emissão de fluorescência de clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos, área foliar específica e conteúdo relativo de água) e de poliaminas foram avaliados através das análises de variância (ANOVA). As médias dos valores obtidos foram comparadas usando o teste de Turkey ( $P < 0.05$ ). Os dados foram apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão.

## 2.3 Resultados

Utilizando a espectroscopia fotoacústica, foi possível detectar um aumento significativa na taxa de emissão de etileno para as plantas expostas a Cr<sup>+6</sup>: de 0,008  $\mu\text{L h}^{-1}\text{g}^{-1}$  para aproximadamente 0,026  $\mu\text{L h}^{-1}\text{g}^{-1}$  (Figura 2.3.1 A). Por outro lado, a taxa de respiração das plantas, ou seja, a emissão de CO<sub>2</sub> (Figura 2.3.1 B), não mostrou diferenças estatísticas, partindo de 0,90  $\text{mL h}^{-1}\text{g}^{-1}$  nas plantas do controle para 1,10  $\text{mL h}^{-1}\text{g}^{-1}$  nas plantas cultivadas em Cr<sup>+6</sup> durante sete dias.



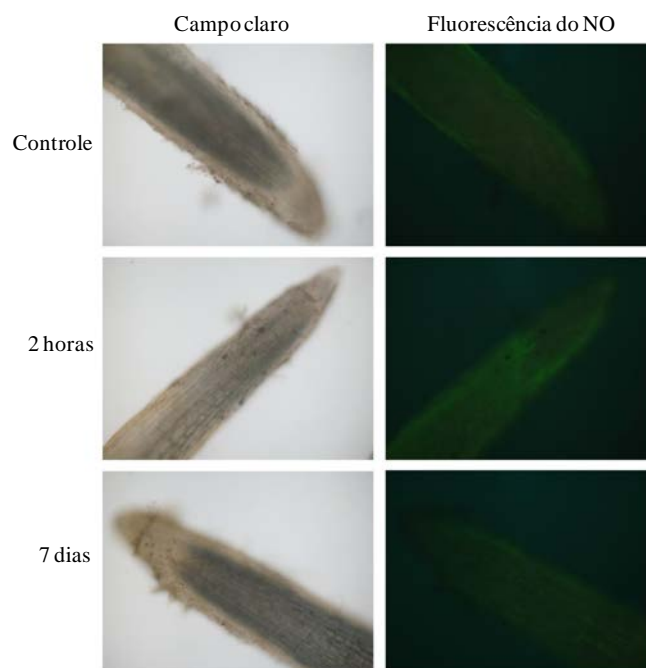
**Figura 2.3.1** - Medidas de espectroscopia fotoacústica de: A) Etileno ( $\mu\text{L h}^{-1}\text{g}^{-1}$ ) e B) CO<sub>2</sub> ( $\text{mL h}^{-1}\text{g}^{-1}$ ) em plantas de amendoim bravo do controle e após exposição em  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  em Cr<sup>+6</sup> durante sete dias. Letras diferentes expressam diferenças estatísticas ( $P < 0.05$ ) entre as plantas do controle e as do tratamento para o mesmo parâmetro ( $n = 3$ ). Letras iguais significam que não houve diferenças estatísticas.

Todos os parâmetros relacionados à fotossíntese (Tabela 2.3.1) não mostraram diferenças estatísticas após sete dias de exposição a  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$ . Os valores de  $F_v/F_m$  e  $F_v/F_0$  para os controles e para as plantas tratadas com  $\text{Cr}^{+6}$  foram 0,814 e 4,57 e 0,845 e 4,89, respectivamente. As proporções Clo *a*: Clo *b* para os controles e as plantas tratadas com  $\text{Cr}^{+6}$  foram 3,27 e 3,74, respectivamente e nenhuma diferença estatística foi observada entre eles e os carotenóides em função da presença de  $\text{Cr}^{+6}$ . Além disso, o CRA e a AFE obtidas para as plântulas de amendoim bravo tratadas com  $\text{Cr}^{+6}$  não mostraram variação em relação as plantas do controle (Tabela 2.3.1).

**Tabela 2.3.1** - Medidas ecofisiológicas de fluorescência da clorofila *a*, conteúdo dos pigmentos fotossintéticos ( $\text{nmol.cm}^{-2}$ ), conteúdo relativo de água (CRA, %) e área foliar específica ( $\text{cm}^2$ ) em plantas de amendoim bravo expostas a  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$  durante 7 dias. Valores seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) para o mesmo parâmetro (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ).

Parâmetros analisados	$\text{Cr}^{+6}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	
	Controle	500
$F_v/F_m$	$0,814 \pm 0,006$ A	$0,845 \pm 0,012$ A
$F_v/F_0$	$4,57 \pm 0,028$ A	$4,89 \pm 0,565$ A
qP	$0,898 \pm 0,021$ A	$0,891 \pm 0,033$ A
NPQ	$0,149 \pm 0,013$ A	$0,150 \pm 0,014$ A
Clo <i>a</i>	$45,486 \pm 0,713$ A	$45,660 \pm 2,366$ A
Clo <i>b</i>	$13,903 \pm 0,042$ A	$13,013 \pm 3,862$ A
Clo <i>a</i> : Clo <i>b</i>	$3,271 \pm 0,041$ A	$3,747 \pm 0,901$ A
Carotenóides ( $\text{nmol.cm}^{-2}$ )	$13,758 \pm 1,426$ A	$13,906 \pm 2,105$ A
CRA (%)	$25,214 \pm 1,4695$ A	$24,952 \pm 0,3787$ A
AFE ( $\text{cm}^2$ )	$447,94 \pm 14,361$ A	$434,31 \pm 13,344$ A

A produção de NO intracelular para as plântulas de amendoim bravo foi medida após 2 horas e 7 dias de tratamento em  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Cr}^{+6}$  (Figura 2.3.2). Em 2 horas de exposição ao  $\text{Cr}^{+6}$ , a emissão de fluorescência de NO no sistema radicular das plântulas pareceu ser ligeiramente mais intensa quando comparada às plantas do controles e às expostas durante 7 dias ao  $\text{Cr}^{+6}$ .

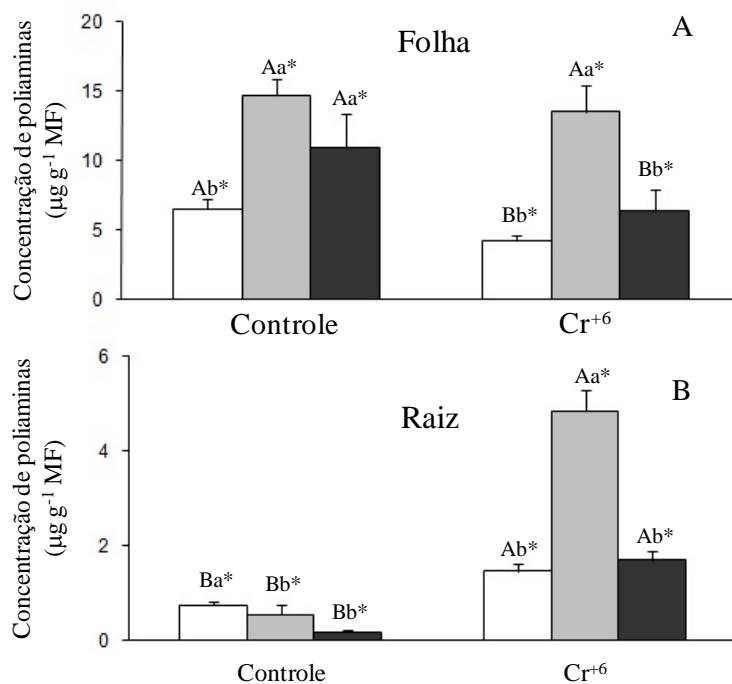


**Figura 2.3.2** - Fluorescência de NO intracelular em raízes das plântulas de amendoim bravo tratada com  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$  durante duas horas e sete dias. As amostras das raízes foram incubadas com corante permeável à célula (DAF-FM-DA) e analisados utilizando microscópio de fluorescência.

A concentração de todas as poliaminas livres analisadas (Put, Spd e Spm) foram maiores nas folhas do que nas raízes (Figura 2.3.3). Nas folhas, Spd foi a poliamina com a maior concentração em ambos os tratamentos, e apesar do padrão das poliaminas ter sido similar entre os controle e as plantas tratadas com  $\text{Cr}^{+6}$ , concentrações significativamente menores foram encontradas nas plantas tratadas com  $\text{Cr}^{+6}$ .

Por outro lado, nas raízes, um aumento significativo nos níveis de poliaminas foi observado na presença de  $\text{Cr}^{+6}$ . Este aumento foi maior para Spd, seguido por Spm e Put. Analisando as diferentes poliaminas, Put apresentou um decréscimo significativo nas folhas das plantas de amendoim bravo cultivadas em  $\text{Cr}^{+6}$ , enquanto nas raízes ela aumentou sob o tratamento. A concentração de Spd nas folhas não mostrou variação, no entanto, para as raízes, foi possível observar um aumento de cerca de 6 vezes na presença de  $\text{Cr}^{+6}$ . Para Spm, um comportamento inverso pôde ser observado, isto é, diminuiu nas folhas e aumentou nas raízes quando comparado com as plantas do controle.





**Figura 2.3.3** - Concentração de poliaminas ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF) em plântulas de amendoim bravo expostas a  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$  durante sete dias. A) Folha e B) Raiz. Letras maiúsculas comparam a concentração de poliaminas entre as concentrações de 0 e  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$ . Letras minúsculas comparam a concentração de poliaminas dentro do controle e dentro dos tratamentos com  $\text{Cr}^{+6}$ . Asterisco (\*) compara a concentração de poliaminas entre as folhas e as raízes (□ Put - putrescina, ■ Spd - espermidina e ■ Spm - espermina).  $P < 0.05$  para o mesmo parâmetro ( $n = 3$ ).

## 2.4 Discussão

$\text{Cr}^{+6}$  é descrito na literatura como a espécie química de Cr mais nociva à planta devido ao seu alto poder de oxidação (Paiva *et al.*, 2009; Shanker *et al.*, 2005). Apesar dessa característica, a toxicidade do  $\text{Cr}^{+6}$  e das demais espécies químicas metálicas depende fortemente das concentrações em que elas estão disponíveis para a absorção, da espécie vegetal exposta a sua presença e da fase de desenvolvimento da planta (Remon *et al.*, 2005).

Um parâmetro muito utilizado para avaliar a extensão do estresse ao qual um organismo está submetido é a produção de etileno (Arteca e Arteca, 2007; Poscherieder *et al.*, 1993; Abeles, 1992; Fuher, 1982). Plantas podem regular internamente a produção de etileno por características genéticas, estágio de desenvolvimento, órgão e/ou por uma variedade de fatores ambientais (temperatura, luz, oxigênio, nutrição e metais pesados) que podem ou não conduzir ao estresse (Arteca e Arteca, 2007; Maksymiec, 2007; Poscherieder *et al.*, 1993; Van Assche *et al.*, 1990; Fuher, 1982). Em relação à detecção desta molécula gasosa no presente trabalho, é importante ressaltar o emprego da espec-

troscopia fotoacústica como uma poderosa ferramenta no estudo de plantas expostas a metais pesados. Até o presente momento, é de nosso conhecimento que o trabalho é inovador nesse sentido. A literatura mostra que a cromatografia gasosa (CG) tem sido a técnica mais comumente utilizada para tal finalidade (Arteca e Arteca, 2007; Abeles, 1992; Pezzarossa *et al.*, 1991; Fuhrer, 1982). As baixas concentrações de etileno aqui detectadas refletem vantagens na utilização da espectroscopia fotoacústica como método de detecção de gases e, em especial, no acompanhamento de pequenas variações das respostas fisiológicas de plantas frente à possibilidade de medidas não- destrutivas e em tempo real. Estas características conferem a espectroscopia fotoacústica uma grande vantagem sobre a cromatografia gasosa, por exemplo, cujas amostras devem ser coletadas em intervalos de tempo para somente depois serem avaliadas. Alterações na concentração de etileno variam a depender do metal utilizado (Arteca e Arteca, 2007). Esses autores observaram que em *Arabidopsis thaliana*,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Cd}^{+2}$  mostraram efeito positivo na produção de etileno, enquanto  $\text{Ni}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  não se mostraram efetivos para causar alteração.  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Cd}^{+2}$  também promoveram um aumento na produção de etileno para folhas de trigo (*Triticum aestivum*), enquanto que para folhas de girassol (*Helianthus annuus* L.) apenas  $\text{Cu}^{2+}$  se mostrou efetivo em aumentar a produção de etileno (Groppa *et al.*, 2003). Apesar da alteração na concentração de etileno ser utilizada como indicativo de estresse, especificamente em estresse por Cr os dados ainda são incipientes. O único trabalho encontrado relacionando etileno e  $\text{Cr}^{+6}$  foi desenvolvido com plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Poschenrieder *et al.*, 1993) e apresenta resultados contraditórios aos nossos. Segundo estes autores foi observado, por CG, inibição da emissão de etileno na presença de  $\text{Cr}^{+6}$ . Esta contradição poderia estar relacionada as diferentes concentrações de  $\text{Cr}^{+6}$  utilizadas por Poschenrieder *et al.* (1993): 2 mmol L<sup>-1</sup> e 10, 20 e 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$  e no presente estudo: 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e/ou pela diferentes espécies vegetais. A carência de trabalhos nesta área reforça a necessidade de maior divulgação dos dados existentes para etileno e Cr. Isto ajudaria a elucidar o envolvimento dos metais nesta importante alteração fisiológica que é a própria emissão de etileno, cujas consequências vão desde a antecipação da senescência do órgão onde ele foi produzido (Taiz e Zeiger, 2010) até o amadurecimento prematuro de frutos (da Silva *et al.*, 2005; Leshem e Pinchasov, 2000).

Dentre os estudos fotossintéticos para analisar os efeitos observados em plantas sob condições de estresse por metal pesado destaca-se a análise de fluorescência da clorofila *a*, que avalia o funcionamento do FSII (Maxwell and Johnson, 2000) através de

uma série de parâmetros, tais como as razões  $F_v/F_m$  e  $F_v/F_0$ . Bolhar-Nordechamp *et al.* (1989) sugerem que valores de  $F_v/F_m$  entre 0,75 e 0,85 indicam que o aparelho fotossintético funciona em condições ambientais propícias ao desenvolvimento sadio da planta. No presente trabalho, os valores para  $F_v/F_m$  mantiveram-se dentro da faixa proposta pelos autores citados acima, sugerindo ausência de estresse na fase fotoquímica. De acordo com Roháček (2002), a razão  $F_v/F_0$  em plantas sadias pode variar de 4 a 6, representando mudanças entre o rendimento quântico fotoquímico e processos não-fotoquímicos que ocorrem no FSII. Embora  $F_v/F_0$  seja mais sensível na detecção de estresse (Oliveira *et al.*, 2009; Paiva *et al.*, 2009), os valores encontrados nesse trabalho corroboram os indicativos de ausência de estresse fotoquímico sugeridos por  $F_v/F_m$  e refletem a integridade do funcionamento do FSII. Para plantas de *Lolium perenne* L. foi observado um decréscimo significativo na razão  $F_v/F_m$  a partir de concentrações de 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$  após 45 dias de experimento. O decréscimo observado foi ainda maior, cerca de 24% em relação ao controle, quando as plantas foram expostas a 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$  (Vernay *et al.*, 2007). Um decréscimo significativo dos parâmetros  $F_v/F_m$ ,  $F_v/F_0$  e  $qP$  em plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*), uma espécie aquática hiperacumuladora de metais, foi observado quando as mesmas foram expostas a  $\text{Cr}^{+6}$ . Mesmo para uma espécie hiperacumuladora, o tratamento com a maior concentração de  $\text{Cr}^{+6}$  (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ) foi letal (Paiva *et al.*, 2009). Os trabalhos supra-citados evidenciam que estas razões são eficientes em avaliar estresse por  $\text{Cr}^{+6}$ . Entretanto, é importante ressaltar a diferença entre a disponibilização de espécies químicas metálicas para plantas aquáticas e terrestres. Uma vez em solução aquosa, o íon metálico possuirá maior mobilidade e disponibilidade para ser absorvido (Antoniadis e Alloway, 2002). Em solos, além dos íons de metais pesados se apresentarem na estrutura mineral, eles podem estar adsorvidos às superfícies sólidas, nas soluções intersticiais, na forma complexada ou associada a coloides, fatores estes que restringem a mobilidade e, conseqüentemente, a disponibilidade para absorção (Qishlaqi e Moore, 2007; Remon *et al.*, 2005).

O conteúdo dos pigmentos fotossintéticos (clo *a*, clo *b* e corotenóides) não foi alterado pela presença de  $\text{Cr}^{+6}$  nas condições experimentais estabelecidas no presente trabalho. Porém, diversos trabalhos têm demonstrado alterações desses parâmetros em plantas expostas a metais (Pandey and Tripathi, 2011; Khan e Khan, 2010; Paiva *et al.*, 2009; Choudhury, 2005; Shanker *et al.*, 2005; Boonyapookana *et al.*, 2002; Vajpayee *et al.*, 2000). Isto poderia ocorrer em função da substituição do íon de  $\text{Mg}^{+2}$  da molécula de clorofila pelos íons de alguns metais pesados (Küpper *et al.*, 1998) ou pela maior

necessidade de produção de carotenóides para auxiliar na dissipação de energia térmica proveniente de comprometimentos fotossintéticos (Demmig-Adams, 1990). A manutenção dos valores de pigmentos, sobretudo dos carotenóides e do NPQ, sugerem que as plantas do presente estudo não necessitaram dissipar energia para prevenir danos fotoxidativos, talvez porque o FSII já estivesse protegido pela ligação com as poliaminas (Hamdani et al., 2011).

O efeito de metais pesados sobre a anatomia e os processos fisiológicos que influenciam a regulação de água na planta tem sido bastante documentado (Santala e Ryser, 2009; Ryser e Emerson, 2007; Ionenko *et al.*, 2006; Poschenrieder e Barcelo, 2004; Vitoria *et al.*, 2001). Em geral, estes estudos sugerem uma redução do conteúdo relativo de água e dos pigmentos fotossintéticos na presença de Cr, como verificado para ervilha (*Pisum sativum*) (Tiwari *et al.*, 2009), samambaia chinesa (*Pteris vittata*) (Su *et al.*, 2005) e couve (*Brassica oleracea*) (Chatterjee e Chatterjee, 2000). Para outros metais, tais como Cu, Co, Ni e Cd, a resposta pareceu ser mais heterogênea, sendo observado aumento (Chatterjee e Chatterjee, 2000), diminuição (Llamas *et al.*, 2008) e não alteração (Lin e Kao, 2007) no CRA. Existe uma hipótese de que algumas plantas possuem um mecanismo de fito-toxicidade para excesso de metal pesado baseado no distúrbio das funções da membrana celular: se o potencial da membrana aumentar em função da absorção de íons de metais pesados, isso irá provocar um decréscimo no conteúdo intracelular de íons  $K^+$ , fazendo, por sua vez, com que haja um decréscimo no conteúdo de água da planta (Llamas *et al.*, 2008). Embora maiores detalhamentos envolvendo membranas não tenham sido conduzidos no presente estudo, a manutenção dos valores do CRA sugere que o tratamento com  $Cr^{+6}$  não foi suficiente para provocar alterações no potencial de membrana que se refletissem em alterações neste atributo foliar.

Assim como o CRA, a AFE e a espessura da folha desempenham um importante papel no funcionamento da planta, pois a quantidade de luz absorvida pela folha e as rotas de difusão do  $CO_2$  através de seus tecidos são diretamente dependentes desses parâmetros (Syvertsen *et al.*, 1995). O tratamento utilizando  $Cr^{+6}$ , descrito nesse trabalho, não provocou alteração na AFE. A interação entre AFE e metais pesados também não mostrou uma relação direta para plantas de carvalho silvestre (*Acer pseudoplatanus* L.) (André *et al.*, 2006). Estes autores observaram que a área foliar específica manteve-se inalterada após 120 dias na presença de Cu (640mg/Kg solo), Zn (3000mg/Kg solo), Cd (10 mg/kg solo) e Pb (90 mg/Kg solo). Esse resultado foi obtido para uma espécie arbórea, tal como no presente trabalho, e sugere uma maior tolerância a maiores concen-

trações de metais para este grupo de plantas quando em comparação com plantas anuais, como a maioria das espécies de interesse agrônômico, que são focos de estudos com metais pesados (Chatterjee e Chatterjee, 2000; Lin e Kao, 2007; Llamas *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2009).

Put, Spd e Spm são as principais poliaminas nas plantas, atuando também em respostas ao estresse abiótico e biótico, na divisão celular, embriogênese somática, na formação de raízes, na iniciação floral e no desenvolvimento de frutos, no metabolismo secundário e na senescência (Santa-Catarina *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2006; Tun *et al.*, 2006; Kuznetsov *et al.*, 2006). Estudos sugerem a interação de poliaminas com proteínas tilacoidais durante o estresse, capacitando a planta à maior tolerância (Hamdani *et al.*, 2011). Segundo estes autores altas concentrações de poliaminas adicionadas ao FSII causaram significativa perda de atividade do mesmo, enquanto menores concentrações, especialmente de Spm, poderiam estabilizar a conformação das proteínas do FSII e melhorar o funcionamento fotossintético sob estresse. Na condição estressante, ocorrem alterações no padrão de ligação de Put e Spm ao LHCII (do inglês, *Light Harvesting Complex* - complexo coletor de luz), ajustando o tamanho do mesmo. Uma diminuição na razão Put/Spm levaria ao aumento do tamanho do LHCII. Isto poderia levar a um aumento na dissipação de energia e uma redução da atividade fotoquímica (Hamdani *et al.*, 2011). No presente estudo foram verificadas reduções nas concentrações de Put e Spm na presença de  $\text{Cr}^{+6}$ , o que pode ter conferido maior estabilidade ao FSII. Porém, a razão Put/Spm no presente estudo não se alterou e talvez por isso não tenhamos verificado aumento na dissipação de energia (dados não mostrados). Outras funções das poliaminas já foram relatadas em condições de estresse, tais como a manutenção do transporte de elétrons, da transferência de energia entre FSI e FSII, principalmente por Spm, e do conteúdo de clorofila (Humdani *et al.*, 2011).

Nas plantas, situações de estresse podem desencadear uma cascata de sinalização, induzindo a produção de moléculas sinalizadoras, como o NO, as quais levam a mudanças na concentração ou modulação dos mensageiros secundários, e conseqüentemente, ativando a resposta de defesa (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007; Xiong *et al.*, 2010). A maior fluorescência de NO após duas horas de tratamento com  $\text{Cr}^{+6}$  pode estar associada à rápida síntese deste composto visando a ativação de respostas de proteção. Isto, aliado a sua rápida difusão e reatividade, conferem a esta molécula características que a classificam como mensageira secundária à respostas iniciais na proteção contra estresse (Wendehenne *et al.*, 2004). Dentre as respostas de

defesa ativadas pelo NO encontram-se a capacidade antioxidante dessa molécula pela sua habilidade em sequestrar ROS e estimular o sistema antioxidante, aliviando o estresse oxidativo gerado por metais pesados (Kopyra *et al.*, 2006). Adicionalmente, em estudos com estresse salino, os tratamentos com doador de NO permitiram um maior crescimento das plantas, com a manutenção da atividade do PSII e o aumento da atividade das enzimas antioxidante, resultando em tolerância ao estresse (Uchida *et al.*, 2002). Embora a atividade antioxidante não tenha sido analisada no presente estudo, pode-se sugerir que o aumento no conteúdo de NO no início do tratamento (2h) possa ter induzido um aumento da atividade antioxidante e proteção do PSII, aliviando o efeito do Cr<sup>+6</sup>. Aumentos na produção de NO sob condição de estresse induzido por metais pesados já foram descritos para várias espécies, em especial para as de ciclo anual de interesse agrônômico (Bartha *et al.*, 2005, Valentovicová *et al.*, 2010). Neste sentido, os resultados obtidos para *P. nitens* são inéditos e revelam o papel do NO sob condições de estresse por metal pesado em espécies de ciclo longo (arbóreas), sugerindo que o mecanismo de defesa envolvendo NO é mantido por uma ampla gama de espécies independente do seu ciclo de vida.

## 2.5 Conclusão

A espectroscopia fotoacústica empregada para a detecção de etileno mostrou-se eficaz na avaliação das alterações fisiológicas das plântulas de amendoim bravo em função da exposição a Cr<sup>+6</sup>. Isto abre um novo leque de possibilidades de análises que podem ser conduzidas conjuntamente com métodos clássicos de avaliação de estresse.

A presença de Cr<sup>+6</sup> em amendoim bravo não promoveu comprometimento do processo fotossintético, assim como de outros parâmetros associados a ele, tais como pigmentos. Isto pode ter sido devido a modulação das concentrações de poliaminas e NO observadas. As poliaminas se ligariam às proteínas do FSII conferindo maior estabilidade a elas. Os resultados sugerem que Spd foi a poliamina que menos tenha contribuído nesta modulação e Put e Spm as que mais efetivamente auxiliaram nesta capacitação. O NO pode ter induzido a atividade das enzimas antioxidante e a manutenção da atividade do FSII, reduzindo os efeitos de estresse no tratamento com Cr<sup>+6</sup>. Os resultados para as poliaminas e NO são inéditos para espécies arbóreas.

Os ajustes fisiológicos verificados para esta espécie em função da exposição a Cr<sup>+6</sup>, assim como a manutenção do seu processo fotossintético, sugerem que ela seja

uma boa opção para utilização em reflorestamento de áreas contaminadas e para a recomposição de matas ciliares em rios antropizados.

## CAPÍTULO 3

### Detecção de óxido nítrico utilizando a espectroscopia fotoacústica e um laser de cascata quântica

#### 3.1 Justificativa

A detecção de NO endógeno não é uma etapa simples devido a amostragem e a instrumentação normalmente utilizada além de outros fatores intrínsecos à molécula, como citado anteriormente. Uma excelente alternativa para a detecção de NO em tempo real, com medidas não destrutivas e com grande sensibilidade pode ser o emprego da espectroscopia fotoacústica utilizando lasers semicondutores como fonte de radiação.

No capítulo 1 do presente trabalho foi citado que uma das grandes vantagens da utilização de lasers semicondutores é a possibilidade de aplicação dos métodos de modulação. Técnicas de modulação têm sido desenvolvidas como um meio para aumentar a relação sinal-ruído de uma medida pela redução da contribuição do ruído (Saarela, 2009; Angelmahr *et al.*, 2008; Dyroff, 2008; Iguchi, 1986; Hager e Anderson, 1970; Arndt, 1965).

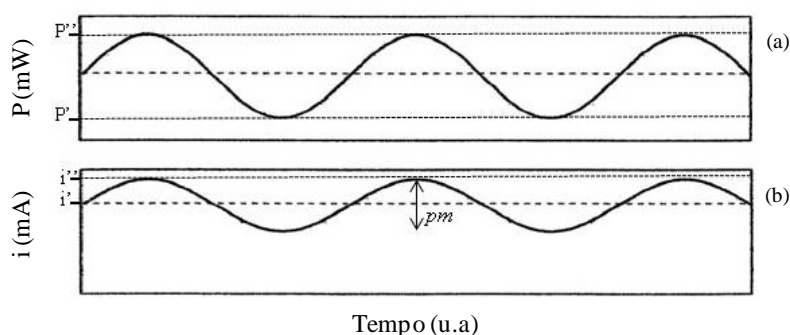
Diferentes esquemas de modulação podem ser usados para a geração do sinal fotoacústico, de forma que duas categorias podem ser definidas. A primeira delas consiste na modulação da radiação do laser diretamente através da corrente de injeção (ou usando um *chopper* mecânico externo). A segunda técnica consiste em modular a própria absorção do gás por meio de um campo elétrico (efeito Stark) (Thöny e Sigrist, 1995; Kavaya *et al.*, 1979) ou por meio de um campo magnético (efeito Zeeman) (Bridges e Burkhardt, 1977). Estes métodos são válidos apenas para moléculas sensíveis a estes efeitos, como por exemplo, a amônia e o NO. Um campo elétrico ou um campo magnético é modulado na frequência de ressonância da célula e produz uma absorção molecular periódica devido à mudança nos níveis de energia da molécula. Esta técnica apresenta a vantagem de ser muito seletiva, pois apenas a molécula ativa contribui para o sinal fotoacústico. Outras moléculas não interferem com a espécie investigada, embora suas presenças sejam importantes (Besson, 2006).

A modulação da radiação laser através da corrente de alimentação é, no entanto, a técnica mais utilizada uma vez que o método é simples, muito eficiente e pode ser aplicado a todas as moléculas. Assim, dois regimes principais são obtidos em função



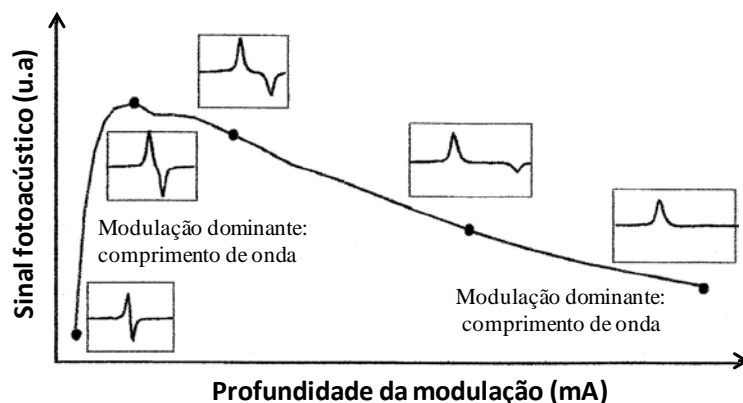
das condições de modulação da corrente: modulação em intensidade (ou amplitude) e modulação em comprimento de onda (Schilt e Thévenaz, 2005).

Em geral, a modulação da corrente produz uma combinação das modulações em comprimento de onda e em intensidade (Schilt *et al.*, 2003), porém duas situações extremas podem ser observadas na qual um tipo de modulação é fortemente dominante. Quando o laser é modulado por uma onda senoidal ou quadrada a partir do limiar de emissão de luz até uma alta corrente, uma modulação *on-off* da potência óptica é produzida e a modulação em intensidade é dominante (figura 3.1.1a) (Schilt e Thévenaz, 2005). Nesse caso, o sinal fotoacústico é proporcional ao perfil da linha de absorção e o espectro é diretamente observado.

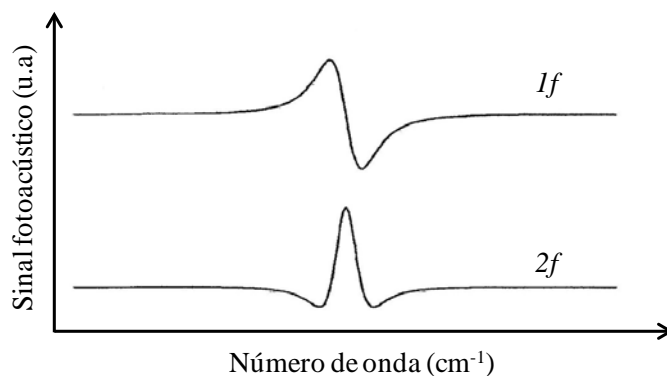


**Figura 3.1.1** - Esquema para representação das modulações em: (a) intensidade ou amplitude.  $P'$  é a potência (em mW) para a qual uma corrente mínima aplicada é suficiente para fazer com o laser comece a emitir luz;  $P''$  é a potência relacionada com uma corrente máxima de operação especificada pelo fabricante do laser e (b) comprimento de onda.  $i'$  é uma corrente próxima a  $i''$  (corrente máxima de operação do laser).  $P_m$  é a profundidade da modulação da onda senoidal adicionada sobre  $i'$ . Em ambas as modulações,  $P_m$  não deve ultrapassar a corrente máxima especificada pelo fabricante do laser. FONTE: Angelmahr *et al.* (2008) (com modificações).

Em um regime dominado pela modulação em comprimento de onda, obtido através de uma pequena modulação da corrente sobre uma corrente contínua elevada (figura 3.1.1b), o sinal fotoacústico depende diretamente da profundidade da modulação, isto é, da amplitude da onda, e um valor ideal para o mesmo pode ser determinado (figura 3.1.2). Neste caso, um resíduo de modulação em intensidade é ainda observado, embora sua influência seja pequena comparada à modulação em comprimento de onda. O sinal fotoacústico, detectado na frequência de modulação  $f$  (detecção do primeiro harmônico), é a primeira derivada do perfil de linha de absorção (figura 3.1.3), na frequência  $2f$  é a segunda derivada da linha e assim sucessivamente (Schilt *et al.*, 2003).



**Figura 3.1.2** - Amplitude do sinal fotoacústico (u.a) em função da profundidade de modulação da corrente (mA). Os regimes dominados pela modulação em intensidade e em comprimento de onda podem ser claramente distinguidos pela forma do sinal fotoacústico. FONTE: Besson, 2006 (com modificações).



**Figura 3.1.3** - Perfil da linha de absorção para um regime dominado pela modulação em comprimento de onda obtida para o primeiro ( $1f$ ) e segundo harmônico ( $2f$ ). FONTE: Martin, 2002 (com modificações).

A espectroscopia fotoacústica com modulação em comprimento de onda é atualmente uma técnica bastante útil na detecção sensível de espécies atômicas e moleculares por oferecer vantagens sobre medidas diretas de absorção. A vantagem mais importante está relacionada ao fato de que a detecção em outros harmônicos é possível, uma vez que o sinal observado é proporcional à curvatura do perfil de absorção.

Nos capítulos 1 e 2 deste trabalho de tese, a importância de se detectar NO já foi bastante discutida em relação às suas diversas funções desempenhadas, sobretudo em plantas. Neste sentido, o presente capítulo teve como objetivo caracterizar e obter maiores informações a partir da aplicação dos métodos de modulação em um laser de cascata quântica para detecção a nível de traço da molécula de NO. Essas informações poderão facilitar a aplicação da metodologia na detecção de NO para sistemas

biológicos, por exemplo, onde as concentrações desse gás são muito baixas (Hilderbrand *et al.*, 2005). Adicionalmente, é de grande interesse científico estabelecer uma metodologia para detecção de NO em sistemas biológicos que forneça medidas não destrutivas e em tempo real.

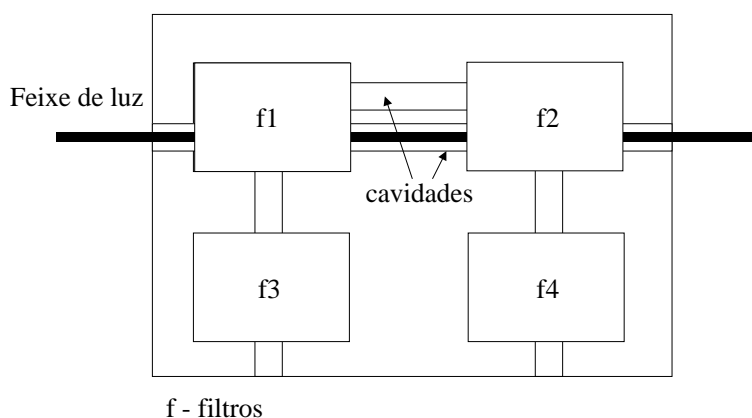
### 3.2 Material e métodos

#### 3.2.1 Material e equipamentos

- Padrões comerciais certificados de NO, (5 ppmv) e N<sub>2</sub> puro (99,98% em pureza);
- Controladores de fluxos de massa eletrônicos (MKS *Instruments*) com vazões máximas de 50 e 200 sccm (do inglês, *standard cubic centimeter per minute* - centímetro cúbico por minuto padrão) e erros de 0.5% e 1%, respectivamente;
- Célula fotoacústica diferencial;
- Laser de cascata quântica (Alpeslaser) para detecção de NO com emissão principal em 5,26  $\mu\text{m}$  (1900,1  $\text{cm}^{-1}$ );
- Amplificador *lock-in* (Stanford 830);
- Fonte de corrente para laser (ILX Lightwave - LDD 3232).

#### 3.2.2 Detector fotoacústico

Como detector foi empregado uma célula fotoacústica diferencial (figura 3.2.1) que trabalha com uma ressonância acústica de aproximadamente 3,9 kHz.



**Figura 3.2.1** - Esboço da célula fotoacústica. F1-4 representam filtros acústicos.

A célula utilizada consiste de duas cavidades ressonantes e de quatro filtros acústicos (Miklós *et al.*, 2001). A radiação excitante passa através de uma das cavidades e as moléculas do gás presente (NO, nesse caso) absorvem e, ao decaírem não radiativamente, geram o sinal fotoacústico que é localmente medido através de um microfone. O mesmo sinal é também medido, em uma intensidade menor, na segunda cavidade com outro microfone (cavidade de referência). Com a diferença dos valores de sinal em cada um dos microfones, ruídos de janela devido a possíveis absorções e ruídos externos são extraídos do sinal.

A parede interna da célula é coberta com uma fina camada de teflon para evitar adsorção da molécula em estudo e/ou para que esta não reaja quimicamente com a superfície (Schmohl *et al.*, 2001).

Quanto à rapidez da detecção, já foi demonstrado que para a espectroscopia fotoacústica o tempo de detecção está apenas limitado ao preenchimento da própria câmara de detecção. A célula fotoacústica utilizada tem um volume de aproximadamente 20 cm<sup>3</sup>. Com um fluxo de 300 sccm, por exemplo, o tempo estimado para que a célula seja preenchida é de 4 s. Ou seja, a técnica é bastante adequada para medida em tempo real, com tempo de resposta de aproximadamente 4 s para mudanças rápidas de concentração.

### **3.2.3 Fonte de luz e caracterização elétrica do laser**

A fonte de radiação eletromagnética empregada neste trabalho foi um laser de cascata quântica, operando em modo contínuo, para detecção de NO, com emissão principal situada em 5,26 µm (1900,1 cm<sup>-1</sup>), segundo o fabricante. A fim de caracterizar o funcionamento do laser, uma curva característica de tensão versus corrente, com o monitoramento da potência, foi gerada fixando a temperatura do laser em - 20° C. Os resultados foram registrados e comparados com os dados fornecidos pelo fabricante do laser.

### **3.2.4 Identificação das linhas de absorção do NO (modulação em amplitude)**

Para a geração do sinal fotoacústico, o laser foi alimentado por uma corrente contínua de 464 mA, sendo sobreposta a esta uma corrente alternada de formato senoidal, proveniente do *lock-in*, com amplitude de 0,232 Vrms (46,4 mA) e frequência de 3,9 kHz (primeiro harmônico da frequência de ressonância da célula fotoacústica diferencial).

O sinal fotoacústico gerado por 5 ppmv de um padrão comercial de NO em N<sub>2</sub>

foi medido utilizando um amplificador *lock-in*. Durante as medidas, o fluxo de NO foi mantido constante no valor de 50 sccm utilizando os fluxômetros eletrônicos.

A temperatura do laser foi variada de - 25 à 0 °C para fazer com que o comprimento de onda de emissão do laser também variasse. Por comparação do espectro da base de dados teóricos HITRAN (2008), a faixa espectral entre 5,25 à 5,26  $\mu\text{m}$  (correspondendo em número de onda à 1899 - 1902  $\text{cm}^{-1}$ ) pôde ser identificada pela variação da temperatura do laser.

### **3.2.5 Determinação do limite inferior de detecção para NO utilizando a modulação em amplitude**

Para determinar o limite mínimo de detecção do sistema para NO foram feitas diluições da mistura padrão de 5 ppmv de NO. Pequenas concentrações de NO foram sintetizadas utilizando dois controladores de massa eletrônicos, um para o  $\text{N}_2$  (200 sccm) e outro para o NO (50 sccm). A temperatura do laser foi fixada no valor correspondente à absorção 1900,1  $\text{cm}^{-1}$  do NO, ou seja, - 15°C. Nesta linha de emissão, a potência do laser correspondeu à 6 mW para uma corrente de alimentação de 464 mA. O sinal fotoacústico foi gerado de acordo com o item 3.2.4.

### **3.2.6 Determinação dos parâmetros da modulação em comprimento de onda**

Nos experimentos realizados usando a modulação em comprimento de onda, o sinal fotoacústico foi gerado modulando o laser eletronicamente por um gerador de função. A forma de onda escolhida foi a senoidal, na qual sua amplitude pico a pico foi variada para os valores de 10, 30, 50, 100 e 150 mV sobre uma corrente contínua fixa de 510 mA. Os diferentes valores de amplitude utilizados corresponderam respectivamente à 2, 6, 10, 20 e 30 mA de corrente alternada na frequência da célula fotoacústica. A detecção foi feita no segundo harmônico da frequência de 1,950 kHz que corresponde a frequência de ressonância da célula fotoacústica (Angelmahr *et al.*, 2008).

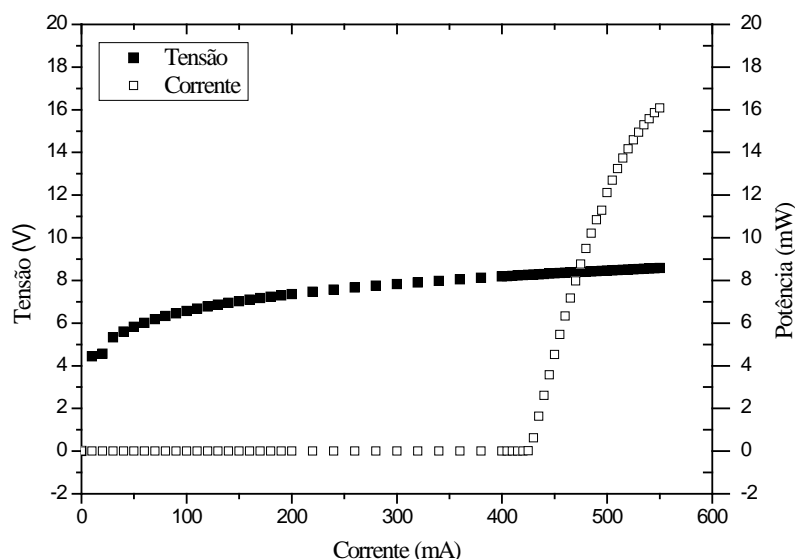
A temperatura do laser foi variada para uma faixa maior, de -36 à -12°C (correspondendo a faixa espectral de 1899 à 1903  $\text{cm}^{-1}$ ). Um amplificador *lock-in* também foi utilizado para o processamento dos dados, sendo estes coletados por um programa desenvolvido em *LabView*.

### 3.2.7 Determinação do limite inferior de detecção para NO utilizando a modulação em comprimento de onda

Os parâmetros de modulação do laser utilizados nestas medidas foram escolhidos de acordo com os resultados obtidos no item 3.2.6, sendo a temperatura do laser equivalente a  $-34^{\circ}\text{C}$  ( $1903,13\text{ cm}^{-1}$ ). Nesta condição, a potência do laser correspondeu à 15 mW para uma corrente de alimentação de 510 mA e modulação senoidal de 10 mA. Diferentes concentrações de NO foram sintetizadas em misturas com  $\text{N}_2$  e, então, o limite inferior de detecção foi determinado.

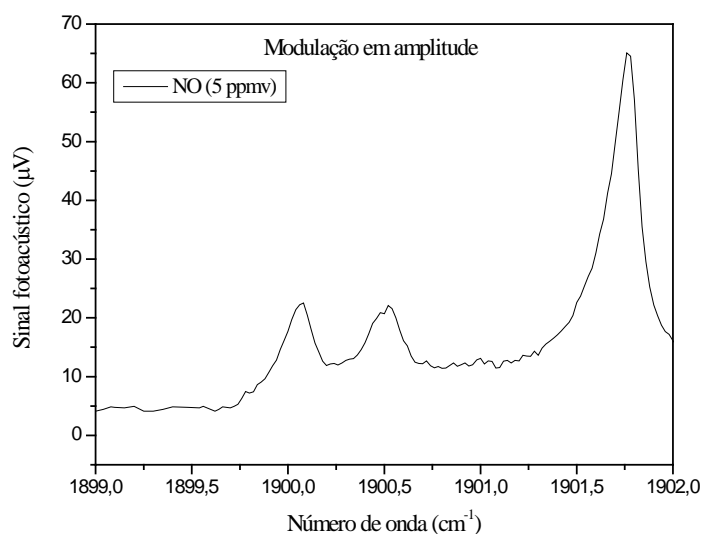
### 3.3 Resultados

A figura 3.3.1 mostra o gráfico da caracterização elétrica experimental do laser de cascata quântica de NO para a temperatura de operação de  $-20^{\circ}\text{C}$ . As curvas relacionam as tensões aplicadas (em volts) com as correntes (em miliampère) e as potências atingidas (em miliWatts). Os maiores valores de potência são obtidos para lasers de cascata quântica que operam em modo contínuo, como o utilizado no presente trabalho, em baixas temperaturas. À  $-20^{\circ}\text{C}$ , variando a corrente de 0 e 550 mA, verificou-se que o laser começava a emitir luz a partir de 430 mA. Ao atingir uma corrente de 550 mA, a potência observada foi de 16 mW.

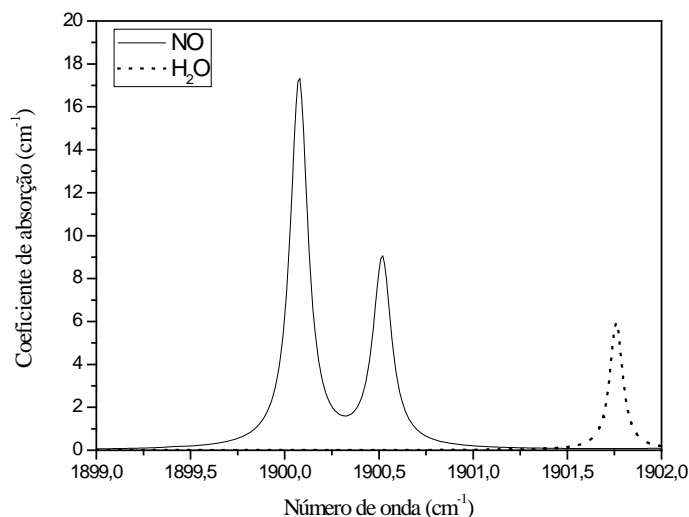


**Figura 3.3.1** - Curva de tensão (V) x corrente (mA) x e potência (mW) obtida para o laser de cascata quântica para NO à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Após a caracterização elétrica do laser, um espectro experimental para identificar as linhas de absorção do NO (5 ppmv) foi obtido com o laser modulado em amplitude (figura 3.3.2). Os dois primeiros picos observados nos menores números de onda (1900,1 e 1900,5  $\text{cm}^{-1}$ ) correspondem às linhas de absorção da molécula de NO. O pico de maior intensidade subsequente a estes, refere-se à linha de absorção da molécula de água. A identificação pôde ser feita considerando os espectros teóricos das duas moléculas em questão (Figura 3.3.3) obtidos da base de dados HITRAN (2008).

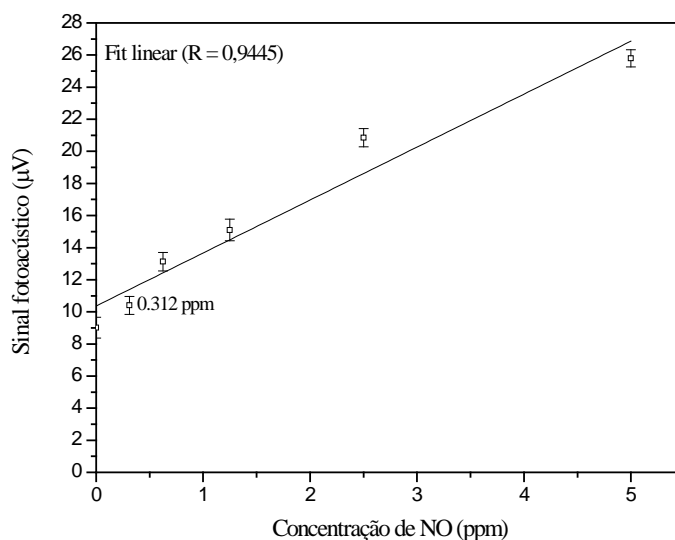


**Figura 3.3.2** - Espectro experimental da molécula de NO obtido com um padrão comercial certificado de 5 ppmv de NO e um laser de cascata quântica para NO.



**Figura 3.3.3** - Espectro para as moléculas de NO e de H<sub>2</sub>O retirados da base de dados HITRAN (2008).

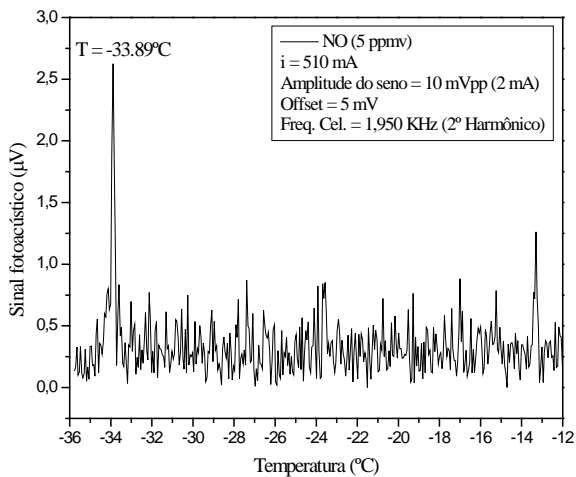
Identificadas as linhas de absorção para o NO, o limite inferior de detecção foi determinado (figura 3.3.4). Nas condições de funcionamento do laser: - 15°C (que corresponde a absorção em 1900,1 cm<sup>-1</sup>), 464 mA e 6 mW de potência, a menor concentração atingida foi de 0.300 ppmv (ou 300 ppbv) de NO em N<sub>2</sub>, com o sinal fotoacústico equivalente à aproximadamente 10 μV.



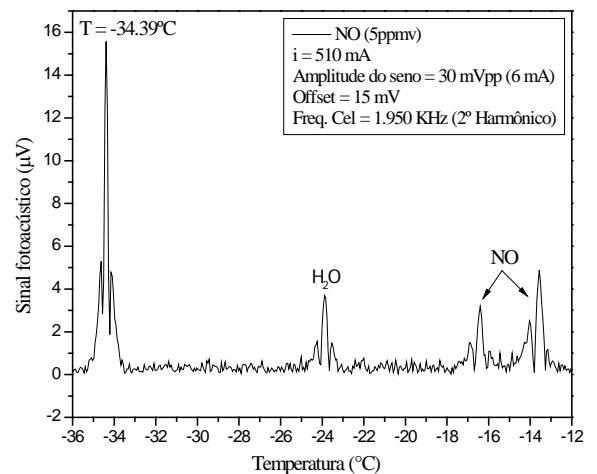
**Figura 3.3.4** - Limite inferior de detecção para o NO em N<sub>2</sub> obtido com modulação em amplitude para o laser fixado na linha 1900,1 cm<sup>-1</sup> (- 15 °C e 6 mW de potência).

Vários testes em relação à amplitude da senoidal foram realizados para a determinação dos parâmetros da modulação em comprimento de onda, visando à obtenção do melhor sinal (intensidade e largura de linha) para a molécula de NO. As 5 figuras que se seguem (3.3.5 a, b, c, d, e) mostram a segunda derivada, isto é, o sinal fotoacústico para o NO detectado considerando o segundo harmônico da frequência do sinal fotoacústico em função da temperatura do laser para diferentes amplitudes da função seno (com os respectivos valores de *offset* correspondendo sempre à metade destas). Para essas medidas, a temperatura do laser foi variada para uma faixa de valores mais negativos (de - 36° à -12°C) em relação à modulação em intensidade (- 25° à 0°C), sendo possível observar a provável existência de mais uma linha de absorção para a molécula de NO em uma temperatura ainda mais baixa (- 33,89 °C) (figura 3.3.5 a, por exemplo).

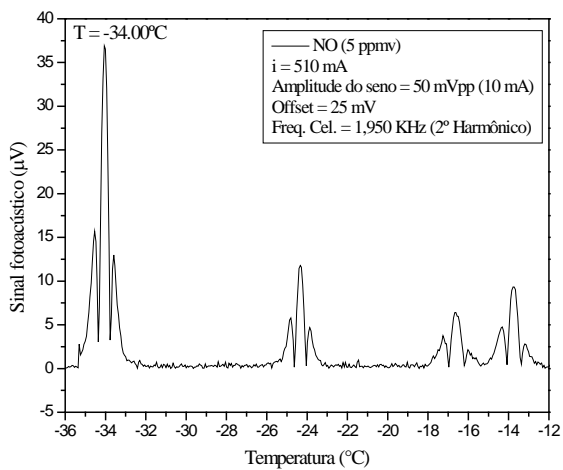




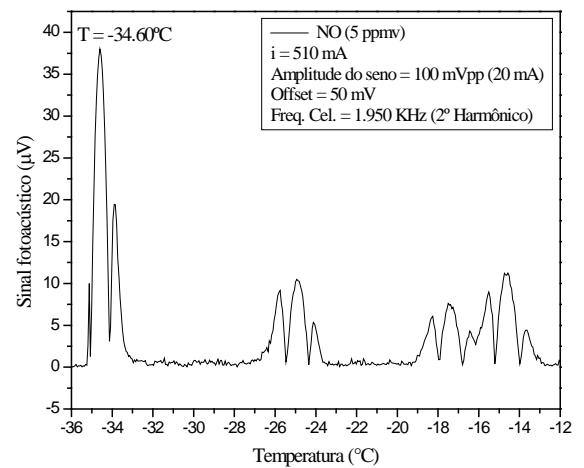
(a) Modulação 1



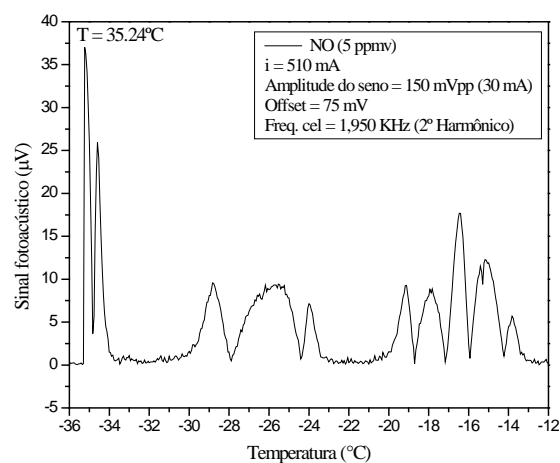
(b) Modulação 2



(c) Modulação 3



(d) Modulação 4



(e) Modulação 5

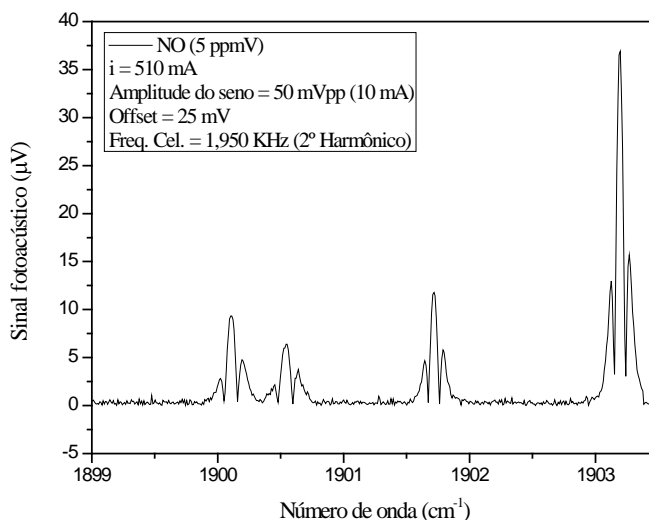
**Figura 3.3.5** - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) em função da temperatura do laser ( $^{\circ}\text{C}$ ) para NO (5 ppmv) Detecção no segundo harmônico da frequência de ressonância da célula fotoacústica (1,950 kHz) para diferentes amplitudes de modulação (a) 10 mVpp (2 mA), (b) 30 mVpp (6 mA), (c) 50 mVpp (10 mA), (d) 100 mVpp (20 mA) e (e) 150 mVpp (30 mA) sobre uma corrente contínua de 510 mA.

É importante ressaltar nessas figuras que o espectro de absorção aparece invertido em relação àquele que é mostrado (em função do número de onda) na figura 3.3.2. A rampa de temperatura do laser (gerada para variar o número de onda) foi iniciada a partir de valores mais negativos para valores mais positivos, objetivando obter a melhor linearidade possível de variação. Para o laser, os maiores números de ondas estão situados nas menores temperaturas. Outra característica a ser ressaltada é a intensidade relativa dos picos, que diminui com o aumento da temperatura devido a redução da potência do laser. Esta, por sua vez, diminui com o aumento da temperatura do laser.

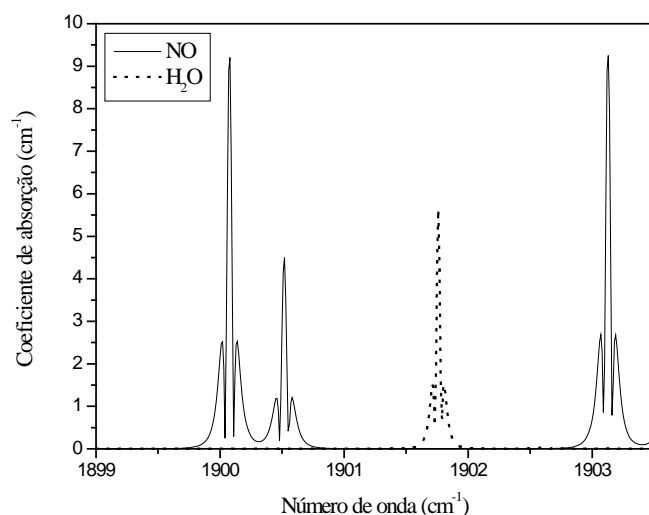
Picos de absorção mais intensos foram obtidos com o aumento da amplitude da senoidal. Por exemplo, a modulação 1 (figura 3.3.5 a), a de menor amplitude, isto é, 10 mVpp (2 mA) apresentou, na faixa espectral utilizada, a absorção mais intensa do NO, correspondendo a um sinal fotoacústico de 2,6  $\mu\text{V}$ . Apesar do baixo valor de largura de linha ( $0,1450\text{ cm}^{-1}$ ), característica importante para a seletividade da técnica, a medida apresentou um ruído elevado, não sendo possível observar as demais absorções. Quando a amplitude da senoidal foi de 30 mVpp (6 mA) (modulação 2, figura 3.3.5 b), um aumento significativo do sinal fotoacústico foi observado para aquela mesma absorção, sendo de aproximadamente 16  $\mu\text{V}$ , seguida por mais três absorções em temperatura maiores (estas correspondendo, como verificado anteriormente, as moléculas de água e de NO). O sinal para aquela primeira absorção foi ainda maior (36,5  $\mu\text{V}$ ) quando 50 mVpp (10 mA) foram aplicados (modulação 3, figura 3.3.5 c), permanecendo, porém, ao redor desse valor para as outras amplitudes maiores (100 e 150 mVpp - modulações 4 e 5, figuras 3.3.5 d e 3.3.5 e, respectivamente). Os demais sinais referentes à absorção da água e do NO também tiveram seus valores aumentados em função do aumento da amplitude da modulação. O aumento da amplitude da modulação também implicou na redução da resolução, porém as larguras de linhas ainda estão razoavelmente estreitas até a modulação 3. A partir desta, um alargamento expressivo nas linhas de absorção pôde ser observado. É importante ressaltar que o aumento da amplitude da modulação provocou uma variação dos valores de temperaturas onde ocorreram os picos de absorção. Embora não muito grande, essa variação foi importante para decidir a faixa de temperatura a ser utilizada nas medidas que se sucederam. Aliando todos os resultados obtidos (intensidade do sinal fotoacústico, larguras das linhas e temperatura do laser), a modulação 3 (figura 3.3.5 c) foi escolhida como a mais adequada para ser utilizada nas medidas de determinação do limite inferior de detecção de NO, a partir da confirmação

de que a linha mais intensa representava de fato mais uma absorção do NO (figura 3.3.6).

A figura 3.3.6 é a modulação 3 em termos de número de onda. Comparando-a com a figura 3.3.7 (segunda derivada do espectro teórico de absorção para o NO e para a água), os dois primeiros grupos de picos se referem a duas absorções de NO, seguida por uma da água, e novamente mais uma do NO.

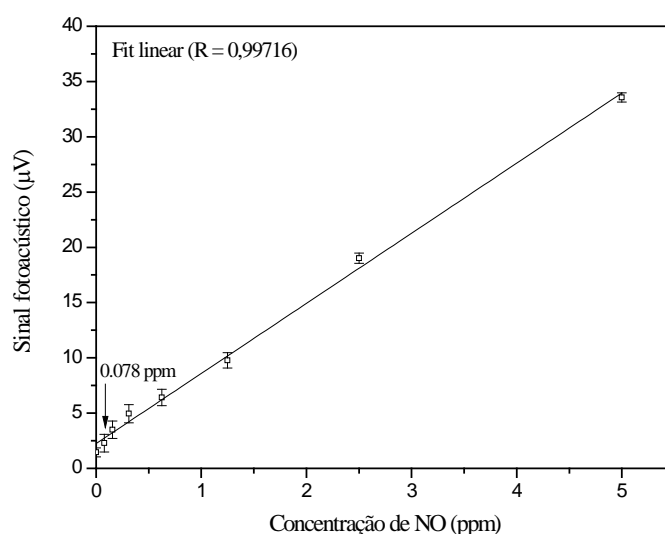


**Figura 3.3.6** - Espectro experimental da molécula de NO obtido com um padrão comercial certificado de 5 ppmv de NO de acordo com os parâmetros utilizados na modulação 3 (figura 3.3.5 c).



**Figura 3.3.7** - Espectros para as moléculas de NO e H<sub>2</sub>O retirados da base de dados HITRAN (2008).

Constatada a presença de mais uma linha de absorção do NO em espectro experimental a partir da comparação com o espectro teórico, o limite inferior de detecção foi determinado utilizando os parâmetros da modulação 3 em comprimento de onda: 510 mA, amplitude do seno equivalente a 50 mVpp (10 mA),  $-34^{\circ}\text{C}$  ( $1903,13\text{ cm}^{-1}$ ), potência de 15 mW, 2º harmônico (1,950 KHz). Nestas condições, 0,078 ppmv (ou 78 ppbv) foi a concentração mínima detectável pelo sistema, com o sinal fotoacústico correspondendo à aproximadamente  $3\text{ }\mu\text{V}$  (figura 3.3.8).



**Figura 3.3.8** - Limite inferior de detecção para o NO em  $\text{N}_2$  obtido com a modulação em comprimento de onda para o laser fixado na linha  $1903,13\text{ cm}^{-1}$  ( $-34^{\circ}\text{C}$  e 15 mW de potência). Os demais parâmetros da modulação do laser foram utilizados de acordo com a modulação 3 (fig. 3.3.5 c).

### 3.4 Discussão

A reprodução da curva característica de tensão *versus* potência *versus* corrente fornecida pelo fabricante é de fundamental importância no conhecimento das características elétricas do laser. Tal procedimento ajuda a evitar que o laser não seja danificado por mau uso, já que ele é muito sensível a corrente aplicada. Os resultados obtidos a partir dessa caracterização estão em concordância com as informações fornecidas pelo fabricante. Por ser um laser que opera em modo contínuo, ele necessita de mais corrente, o que gera maior quantidade de calor e, conseqüentemente, o *peltier* tem que operar em temperaturas mais baixas do que operaria em um laser de modo pulsado. A grande vantagem, entretanto, do primeiro em relação ao segundo são as maiores potências atingidas. Até recentemente, a operação dos lasers de cascata quântica no modo contínuo só era possível em temperaturas criogênicas, e operações à temperaturas ambientes eram

realizadas apenas no modo pulsado para baixos ciclos de operação (Harman, 2006). Porém, os recentes avanços na tecnologia desses dispositivos permitiram sua operação em modo contínuo à temperatura ambiente ou à temperaturas que podem ser obtidas por resfriamento termoelétrico (Tittel *et al.*, 2006), como no caso do presente trabalho.

A partir da caracterização elétrica do laser, as linhas de absorção do NO foram identificadas primeiramente para o laser modulado em amplitude, o que permitiu observar a absorção mais intensa especificada pelo fabricante ( $1900,1 \text{ cm}^{-1}$ ). A diferença relativa entre as intensidades dos picos de absorção experimentais e teóricos se deveu ao fato do espectro experimental não ter sido normalizado com a potência do laser, que diminui com o aumento da temperatura. A modulação em amplitude provoca uma variação significativa na intensidade da radiação, ou seja, praticamente o laser liga e desliga (*on-off*). Entretanto, devido à modulação (especialmente senoidal), a temperatura do laser sofre oscilações que, por sua vez, provoca uma modulação do comprimento de onda da radiação na mesma frequência de ressonância da célula. Assim como resultado, o sinal fotoacústico gerado possui um pouco da contribuição da modulação em comprimento de onda, gerando uma assimetria dos picos de absorção (conforme mostra a figura 3.3.2).

Após a realização de vários testes para definir os parâmetros da modulação em comprimento de onda, uma absorção de maior intensidade (em  $1903,13 \text{ cm}^{-1}$ ) pôde ser verificada à uma temperatura ainda mais baixa variando em torno de  $-34^\circ\text{C}$ . O fato de existirem diferentes valores de temperatura do laser onde ocorreram os máximos de absorção para a molécula do NO, se deve ao sensor de temperatura. Este está localizado na parte interna de uma caixa metálica (*housing*) que acomoda o laser, não representando, portanto, a temperatura real da região ativa do laser, que para gerar um dado comprimento de onda deve ser sempre a mesma. Essa diferença aumenta quando maior quantidade de calor é gerada no sistema devido ao aumento da corrente.

Uma das grandes vantagens na utilização de lasers de cascata quântica de onda contínua é a possibilidade de aliá-los às técnicas de modulação. Diferentes amplitudes de modulação foram testadas para a modulação em comprimento de onda uma vez que, em um regime dominado pela modulação em comprimento de onda, o sinal fotoacústico depende diretamente da amplitude da modulação (Dyroff, 2008) e um valor ideal para o mesmo pôde ser, então, determinado.

Como citado anteriormente, técnicas de modulação têm sido desenvolvidas como um meio para aumentar a relação sinal-ruído de uma medida pela redução da contribui-

ção do ruído (Saarela, 2009; Angelmahr *et al.*, 2008; Dyroff, 2008; Iguchi, 1986; Hager e Anderson, 1970; Arndt, 1965). Dessa forma, o limite inferior de detecção para o NO em comprimento de onda foi menor do que o atingido através da modulação em amplitude no presente trabalho (78 e 312 ppbv, respectivamente). Além de a diluição ter sido feita para uma absorção de maior intensidade o menor limite de detecção se deveu também a diminuição do sinal de fundo obtido para a modulação em comprimento de onda no segundo harmônico da ressonância da célula fotoacústica.

Ao aplicar uma variação senoidal na corrente de alimentação do laser, a temperatura do laser varia e, conseqüentemente, o comprimento de onda. Uma vez que o sinal fotoacústico é proporcional ao coeficiente de absorção que, por sua vez, depende do comprimento de onda da radiação, ele terá a mesma frequência de oscilação da corrente alternada aplicada. Porém, o perfil dessa oscilação será diferente ao de uma função senoidal, já que o mesmo é influenciado pela dependência não linear do coeficiente de absorção com o comprimento de onda. O uso de uma corrente contínua somado a uma corrente alternada de baixa amplitude, faz com que o sinal fotoacústico tenha uma contribuição maior da modulação em comprimento de onda do que da modulação em amplitude. O primeiro harmônico ainda carrega, porém, uma contribuição da modulação em amplitude, de modo que o segundo harmônico foi utilizado para obtenção do sinal fotoacústico no presente trabalho. Adicionalmente, a detecção no segundo harmônico carrega a parte principal do sinal analítico e elimina, ou reduz significativamente, a contribuição da linha de base. Existe um interesse particular pela detecção do sinal em harmônicos pares (2, 4, 6...), porque eles atingem seu ponto máximo no centro da linha de absorção (Kluczynski *et al.*, 2001). A modulação em comprimento de onda, portanto, é geralmente preferida quando o objetivo é atingir baixas concentrações, já que a relação sinal-ruído tende a aumentar, e quando as linhas de absorções de uma molécula são muito estreitas.

É importante ressaltar a presença da água nas medidas de NO feitas com um padrão comercial. A água, sendo uma molécula bastante polar, provavelmente se adsorveu nas paredes da célula fotoacústica. Embora ela tenha sido exaustivamente limpa com N<sub>2</sub>, a célula em questão é muito utilizada para análises de diferentes amostras há bastante tempo.

### 3.5 Conclusão

Os métodos de modulação em amplitude e em comprimento de onda aplicados ao laser de cascata quântica para NO puderam ser explorados visando atingir um sinal fotoacústico de maior qualidade. A modulação em comprimento de onda utilizando o segundo harmônico possibilitou a obtenção de um melhor ajuste linear aos resultados para a determinação do limite inferior de detecção do NO. O sinal de fundo para as medidas obtidas com a modulação em comprimento de onda foi menor, comparado àquele obtido pela modulação em amplitude.

A aplicação de sensores ópticos para detecção de NO é de grande interesse para um número de aplicações em diferentes áreas do conhecimento, principalmente na fisiologia de plantas. Desta forma, através da utilização da espectroscopia fotoacústica e de um sensor fotoacústico, as informações adquiridas pelo presente trabalho poderão contribuir para a aplicação da metodologia na detecção de NO de diferentes amostras biológicas.

## CAPÍTULO 4

### Espectroscopia fotoacústica aplicada à detecção simultânea de moléculas em misturas gasosas

#### 4.1 Justificativa

A detecção de um tipo de molécula gasosa pela espectroscopia fotoacústica, com o uso de fontes de radiação apropriadas para essa finalidade, é relativamente simples quando apenas uma molécula está presente na amostra, como no caso de amostras padrões certificadas. Entretanto, quando a espectroscopia fotoacústica é estendida para a detecção de moléculas gasosas provenientes de uma amostra onde outras moléculas podem estar presentes, como no caso das plantas, gases de combustão, entre outras, mesmo que estas possuam absorções distintas, é importante identificá-las. A presença de outras moléculas pode interferir na intensidade do sinal fotoacústico gerado para molécula que se quer analisar. O tempo de relaxação de cada molécula gasosa pode variar em função da presença de outras e até mesmo em função de diferentes gases de diluição. Este processo é um passo fundamental para a geração do sinal fotoacústico, influenciando fortemente na sensibilidade da técnica (Kosterev *et al.*, 2006).

A identificação, portanto, de outras moléculas numa mistura pode ser feita simultaneamente com a utilização de duas fontes de radiação e uma única célula. Nesta etapa do presente trabalho, o que se pretendeu foi desenvolver uma metodologia para a detecção simultânea de  $\text{NH}_3/\text{C}_2\text{H}_4$  e  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{CO}_2$ .

A importância de se detectar  $\text{NH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4$  e  $\text{CO}_2$  já foi discutida no capítulo 1 deste trabalho com relação a ampla gama de reações bioquimicamente relevantes da qual essas moléculas fazem parte para a maioria dos organismos vivos, sobretudo plantas. Adicionalmente, todas estas moléculas desempenham papéis fundamentais nos processos que governam a química da atmosfera.

#### 4.2 Material e métodos

##### 4.2.1 Material e equipamentos

- Padrões comerciais certificados de  $\text{NH}_3$  (10 ppmv),  $\text{C}_2\text{H}_4$  (100 ppm),  $\text{CO}_2$  (99,99 % de pureza) e  $\text{N}_2$  puro (99,98% de pureza);
- Controladores de fluxos de massa eletrônicos (Brooks Instruments) com vazões

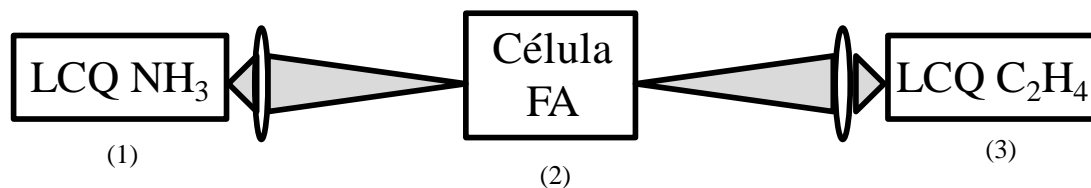


- máximas de  $5 \text{ L h}^{-1}$  (1% de erro);
- Célula fotoacústica diferencial (Capítulo 3, item 3.2.2);
- Laseres de cascata quântica (Alpeslaser) para detecção de  $\text{NH}_3$  (emissão principal em  $9,56 \mu\text{m}$ ) e para a detecção de  $\text{C}_2\text{H}_4$  (emissão principal em  $10,53 \mu\text{m}$ );
- Amplificador *lock-in* (Stanford 850 e 830).

## 4.2.2 - Detecção simultânea utilizando três frequências

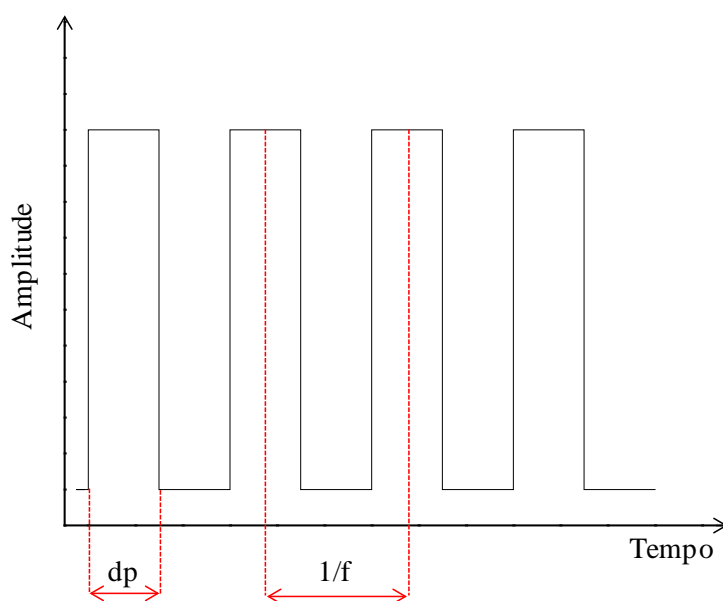
### 4.2.2.1 - Arranjo experimental

Os laseres utilizados nesta etapa do trabalho foram laseres de cascata quântica pulsados (LCQ) para  $\text{NH}_3$  e  $\text{C}_2\text{H}_4$ . Uma vez que a célula fotoacústica utilizada possui duas janelas ópticas, os laseres foram fixados em posições opostas, permitindo que seus feixes passassem simultaneamente através do tubo ressonador que se encontra no interior da célula (Figura 4.2.2.1).



**Figura 4.2.2.1** - Esquema experimental da configuração dos laseres e da célula fotoacústica para as medidas simultâneas de  $\text{C}_2\text{H}_4+\text{NH}_3$  ou  $\text{C}_2\text{H}_4+\text{CO}_2$  utilizando três frequências. (1) laser de cascata quântica para  $\text{C}_2\text{H}_4$ , (2) célula fotoacústica diferencial e (3) laser de cascata quântica para  $\text{NH}_3$ .

A corrente de alimentação dos LCQ é determinada pela duração dos pulsos e por taxas de repetição controladas (Figura 4.2.2.2). Multiplicando um parâmetro pelo outro, obtém-se o ciclo de trabalho (*duty cycle*) do laser (expresso em porcentagem). Por exemplo, para o LCQ para etileno, a duração do pulso e a taxa de repetição utilizadas foram  $50 \text{ ns}$  e  $400 \text{ kHz}$ , respectivamente, o que correspondeu a um ciclo de trabalho de  $2\%$  [ $(50 \cdot 10^{-9} \text{ s} * 400 \cdot 10^3 \text{ Hz}) * 100$ ].

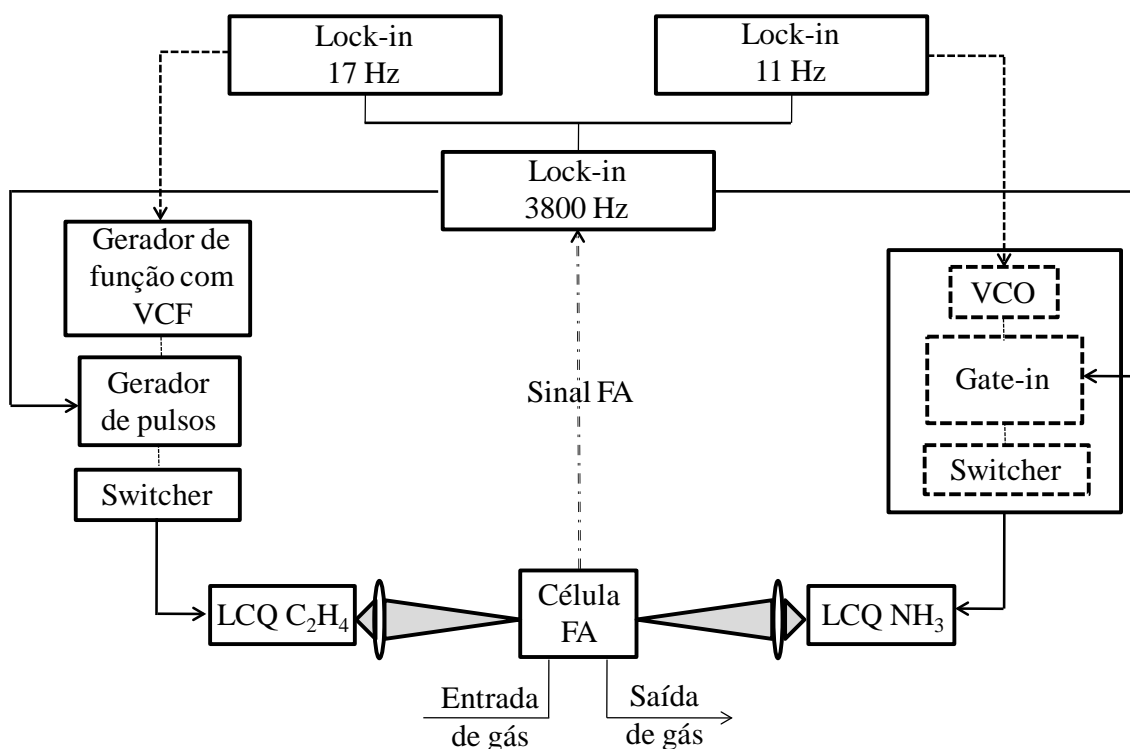


**Figura 4.2.2.2** - Esquema para determinação do ciclo de trabalho de um LCQ pulsado. O ciclo de trabalho é determinado pela multiplicação da  $dp$  (duração do pulso) pelo inverso da frequência, que é a taxa de repetição.

Para gerar o sinal fotoacústico para a molécula de etileno, primeiramente, a corrente pulsada do LCQ (para etileno) foi modulada na frequência de ressonância da célula fotoacústica (3800 Hz). Essa modulação (em amplitude pura) foi produzida utilizando o sinal TTL (*transistor-transistor-logic*) proveniente do primeiro *lock-in*, sendo este enviado para o gerador de pulso da eletrônica do laser pela porta de entrada denominada *gate-in*. Para geração do sinal fotoacústico para a molécula de amônia, a corrente pulsada do LCQ (para amônia) também foi modulada na frequência de ressonância da célula fotoacústica (3800 Hz), sendo esta modulação, da mesma forma, produzida pelo primeiro *lock-in*. O sinal TTL deste *lock-in* foi enviado para a entrada *gate-in* de um sistema eletrônico desenvolvido no laboratório. Esse sistema eletrônico era constituído principalmente por, além do *gate-in*, um VCO (do inglês *Voltage-controlled oscillator* - oscilador controlado por voltagem) que alimentava um chaveador de potência (*switcher*), que, por sua vez, excitava o LCQ. A presença do VCO entre o gerador de pulsos e o *switcher* permite inserir uma modulação adicional a este sistema. Para realização das medidas simultâneas de  $C_2H_4+NH_3$  ou  $C_2H_4+CO_2$ , além da modulação em amplitude pura na frequência de 3800 Hz, o ciclo de trabalho de cada laser foi simultaneamente modulado em frequências baixas e diferentes entre si. Este tipo de modulação foi produzido pelo segundo *lock-in*, que enviava um sinal senoidal para o VCF (do inglês

*Voltage-controlled frequency* - oscilador controlado por frequência) de um gerador de função, no caso do LCQ para etileno. A saída TTL (*sync out*) do gerador de função foi configurada na frequência de 400 KHz (que corresponde à taxa de repetição utilizada para o laser). Este sinal, por sua vez, foi enviado para a entrada (*trig-in*) do gerador de pulso do laser. O terceiro *lock-in* foi utilizado para modular em baixa frequência o LCQ para amônia. Nesse caso, o sinal senoidal produzido foi enviado para o VCO do sistema eletrônico. Desta forma, a utilização do VCO no processo de excitação de ambos os LCQ permitiu introduzir uma modulação adicional, em baixa frequência, alterando as taxas de repetição dos lasers e, conseqüentemente, seus ciclos de operação. Por exemplo, o laser utilizado na detecção de amônia (e CO<sub>2</sub>), além dele ter sido modulado em amplitude pura na frequência de ressonância da célula fotoacústica (3800 Hz), o seu ciclo de trabalho (através da taxa de repetição) foi modulado na frequência baixa equivalente a 11 Hz. Do mesmo modo, o laser utilizado na detecção de etileno, além dos 3800 Hz da modulação em amplitude pura, seu ciclo de trabalho foi modulado na frequência baixa de 17 Hz (Figura 4.2.2.3). Cuidados foram tomados para que as variações produzidas pelas baixas frequências sobre as taxas de repetição não ultrapassassem demasiadamente o valor de 400 KHz. Isso permitiu que os ciclos de trabalhos dos lasers fossem mantidos próximos a 2% (valor recomendado pelo fabricante), evitando, assim, uma alimentação danosa sobre os lasers.

O sinal fotoacústico gerado pela mistura dos gases foi detectado pelo primeiro *lock-in*. Existiu um cuidado especial em utilizar constantes de tempos baixas o suficiente (1 ou 3 ms) para permitir a passagem da informação de baixa frequência no sinal detectado. Em seguida, esse sinal foi enviado para o segundo e terceiro *lock-ins*. O *lock-in* que provocava a variação do ciclo de trabalho do laser em 11 Hz (segundo *lock-in*), separava o sinal gerado pela amônia nessa mesma frequência baixa. O terceiro *lock-in* (com frequência de referência fixada em 17 Hz) separava o sinal fotoacústico devido à absorção por parte da molécula de etileno. Os dados obtidos foram armazenados por meio de um programa desenvolvido em plataforma Labview.



**Figura 4.2.2.3** - Esquema da montagem experimental para as medidas simultâneas de  $C_2H_4+NH_3$  ou  $C_2H_4+CO_2$  utilizando três frequências. FA – Fotoacústico; LQC – Laser de Cascata Quântica; VCF – *Voltage-controlled frequency*, VCO – *Voltage-controlled oscillator*.

#### 4.2.2.2 - Configurações dos equipamentos para a detecção simultânea

As configurações dos amplificadores *lock-ins* e dos lasers utilizadas para as medidas simultâneas foram:

- **Primeiro *lock-in* (frequência de ressonância da célula fotoacústica):**

- Frequência de referência interna: 3800 Hz;
- Constante de tempo: 1 ou 3 ms;
- Sensibilidade: 1 mV.

- **Segundo *lock-in* (frequência baixa):**

- Frequência de referência interna: 17 Hz;
- Amplitude da função seno: 96 mV (e testada para outros valores);
- Constante de tempo: 1 ou 3 s;
- Sensibilidade do *lock-in*: 1V.

- **Terceiro *lock-in* (frequência baixa):**

- Frequência de referência interna: 11 Hz;
- Amplitude do seno: 96 mV;
- Constante de tempo: 1 ou 3 s;
- Sensibilidade do lock-in: 1V.

- **Parâmetros do laser de cascata quântica para detecção de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>:**

- Duração do pulso: 50 ns;
- Taxa de repetição: 400 KHz (variando entre 389,2 e 425,5 KHz que resultou em ciclos de operação de 1,95% e 2,13%).

- **Parâmetros do laser de cascata quântica para detecção de NH<sub>3</sub> (ou CO<sub>2</sub>):**

- Duração do pulso: 50 ns;
- Taxa de repetição: 400 KHz (variando entre 389.2 e 425.5 KHz, o que resultou em ciclos de operação de 1,95% e 2,13%).

#### **4.2.3 - Curvas de frequências de ressonância**

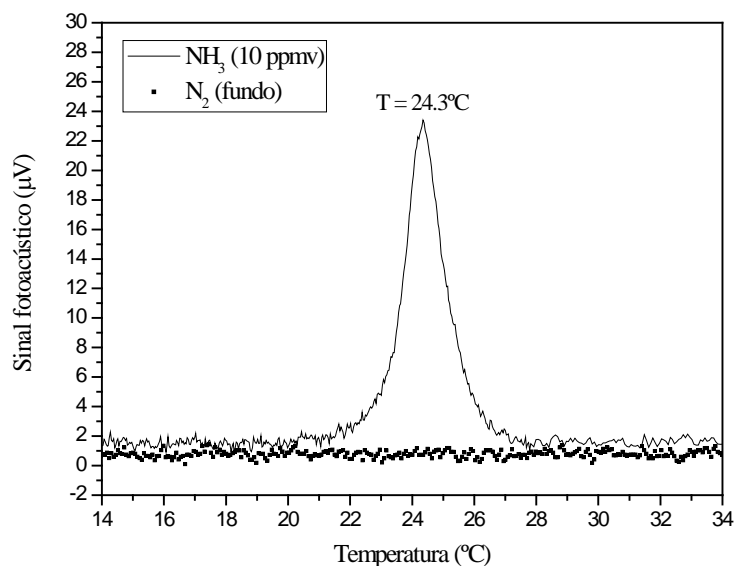
As faixas espectrais utilizadas para os lasers possuem algumas linhas de absorção de CO<sub>2</sub> detectáveis quando a concentração desse gás é alta (em porcentagem), como no caso do presente trabalho. Uma vez que isso altera o valor da frequência de ressonância da célula fotoacústica, testes foram realizados para obter a relação da ressonância da célula fotoacústica com a concentração do gás. Para esse fim, concentrações do CO<sub>2</sub> (50%, 25% e 12,5%) em N<sub>2</sub> foram produzidas para obtenção das curvas de frequência de ressonância da célula fotoacústica. As frequências foram variadas de 2000 Hz à 5000 Hz.

#### **4.2.4 - Resposta do microfone da célula fotoacústica para baixas frequências**

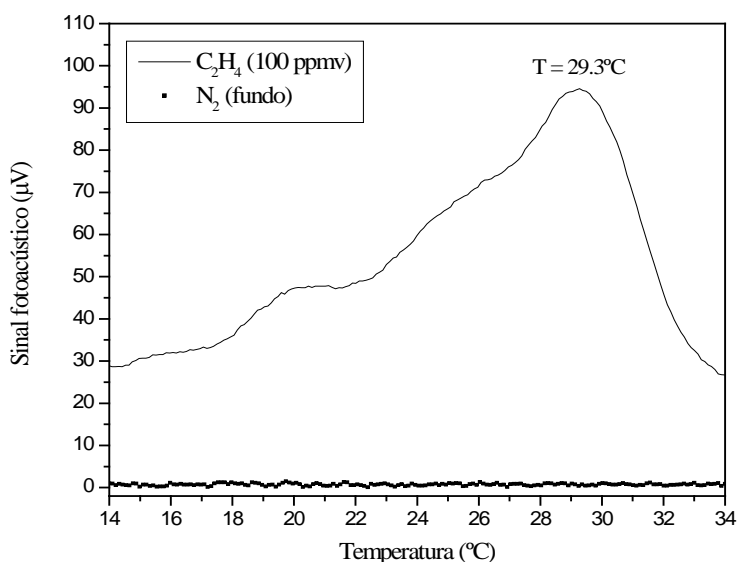
Com a finalidade de escolher as baixas frequências a serem utilizadas nas medidas simultâneas, a resposta do microfone da célula fotoacústica foi avaliada. Um sinal senoidal de 100 mV<sub>rms</sub> foi enviado para o microfone da célula fotoacústica, aqui utilizado como um alto-falante, sendo a frequência variada entre 5 Hz e 35 Hz.

### 4.3 Resultados

As figuras 4.3.1 e 4.3.2 mostram, respectivamente, os sinais fotoacústicos obtidos para  $\text{NH}_3$  (10 ppmv) e para  $\text{C}_2\text{H}_4$  (100 ppmv) em função da variação da temperatura (14 à 34°C) dos respectivos lasers. O sinal foi obtido aplicando-se puramente a modulação em amplitude.

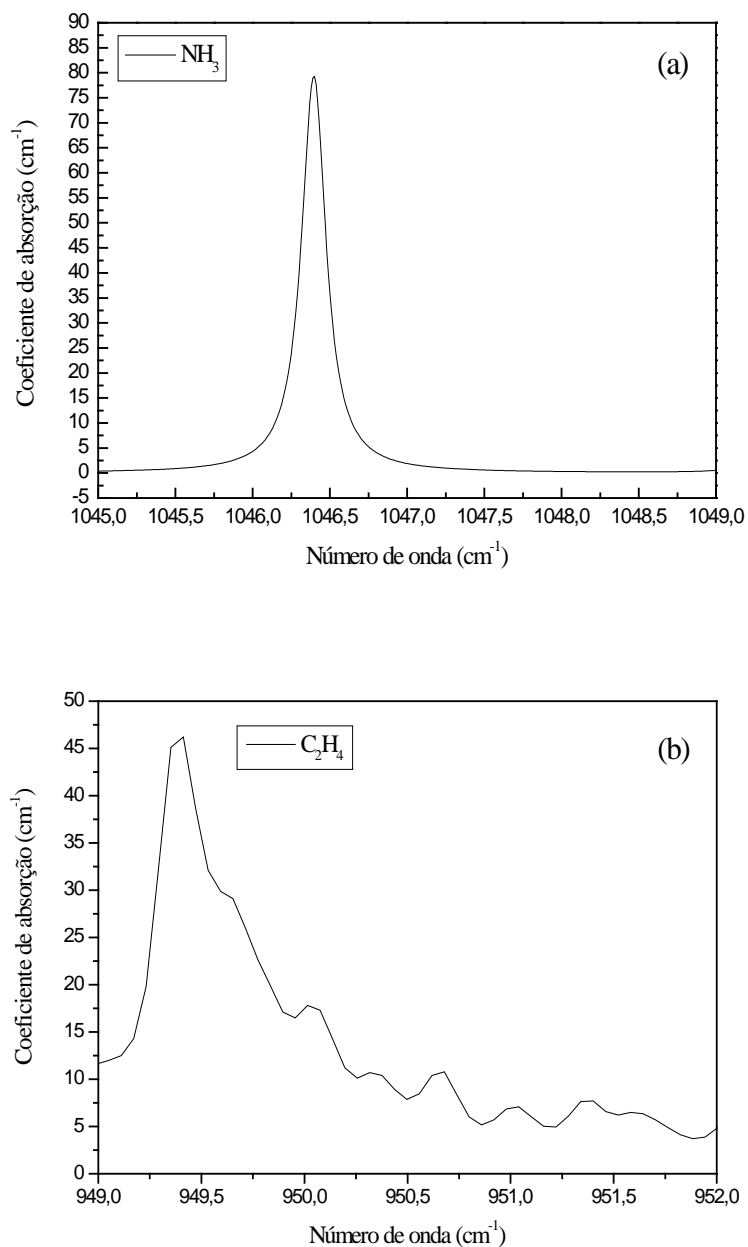


**Figura 4.3.1** - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) em função da temperatura do laser ( $^\circ\text{C}$ ) para amônia (10 ppmv) e para o  $\text{N}_2$  (sinal de fundo) obtido com a modulação em amplitude (constante de tempo: 300 ms e frequência de ressonância da célula: 3800 Hz).



**Figura 4.3.2** - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) em função da temperatura do laser ( $^\circ\text{C}$ ) para etileno (100 ppmv) e para o  $\text{N}_2$  (sinal de fundo) obtido com a modulação em amplitude (constante de tempo: 300 ms e frequência de ressonância da célula: 3800 Hz).

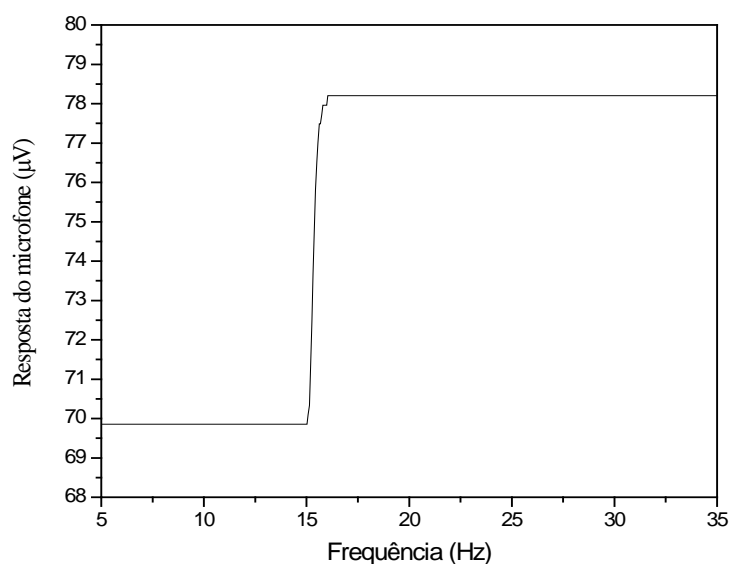
Nas condições de operação dos lasers, as temperaturas dos picos de absorção para a  $\text{NH}_3$  e para o  $\text{C}_2\text{H}_4$  foram respectivamente  $24,3^\circ\text{C}$  e  $29,3^\circ\text{C}$ , correspondendo às absorções em  $1046,4\text{ cm}^{-1}$  e  $949,4\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, de acordo com os espectros teóricos retirados da base de dados HITRAN (2008) (figuras 4.3.3 a e b).



**Figura 4.3.3** - Espectros teóricos (HITRAN 2008) para as moléculas de: (a)  $\text{NH}_3$  (amônia) e (b)  $\text{C}_2\text{H}_4$  (etileno).

Além dos picos de absorção de ambas as moléculas ocorrerem em números de ondas distintos entre eles, não existe interferência da água.

Após obter individualmente o sinal fotoacústico para as moléculas de  $\text{NH}_3$  e  $\text{C}_2\text{H}_4$ , a resposta do microfone da célula fotoacústica foi caracterizada em relação a baixas frequências aplicadas (figura 4.3.4) para posterior realização das medidas simultâneas. Este procedimento foi necessário, uma vez que o modelo de microfone utilizado não apresentava uma curva de resposta do fabricante para esta faixa de frequência.

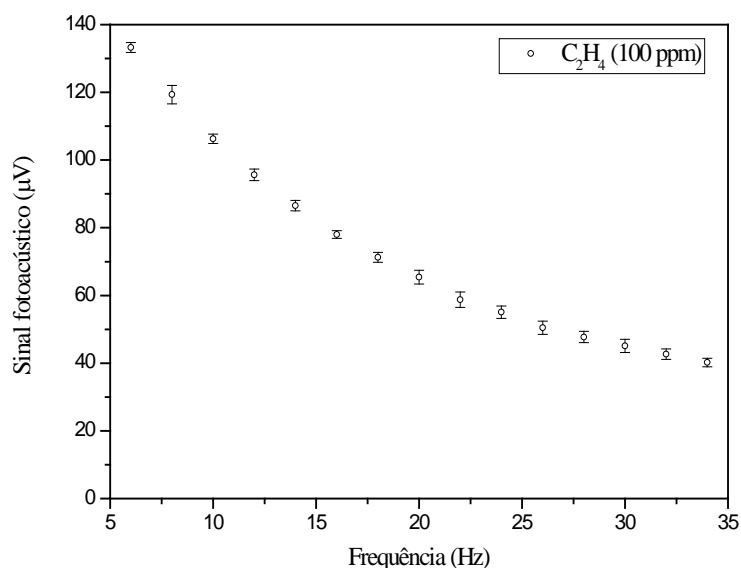


**Figura 4.3.4** - Resposta do microfone ( $\mu\text{V}$ ) da célula fotoacústica diferencial em função de baixas frequências (Hz) para um sinal senoidal de 100 mVrms.

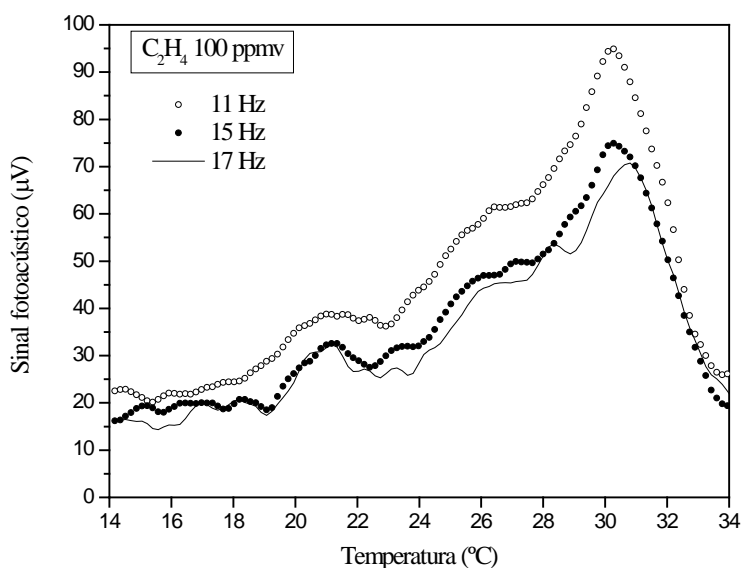
O microfone da célula fotoacústica apresentou uma resposta constante até aproximadamente 15 Hz. Para uma pequena variação da frequência (entre 15 e 16 Hz), um aumento de aproximadamente 8  $\mu\text{V}$  de sinal foi observado. A partir de 16 Hz, a resposta do microfone foi de aproximadamente 78  $\mu\text{V}$ , permanecendo constante até os 35 Hz.

O sinal fotoacústico para o etileno (100 ppmv) foi observado em função de diferentes frequências baixas (Figura 4.3.5). Estas foram escolhidas para o mesmo intervalo de frequências utilizado na obtenção da resposta do microfone (Figura 4.3.4). Embora a resposta do microfone tenha aumentado no intervalo de frequência de 15 à 16 Hz, o sinal fotoacústico para o  $\text{C}_2\text{H}_4$  diminuiu com o aumento das frequências. Isso pôde ser melhor observado varrendo o espectro do laser entre os números de ondas de  $949\text{ cm}^{-1}$  à  $952\text{ cm}^{-1}$  (que corresponde à variação de temperatura de 14 à  $34^\circ\text{C}$ ) para três valores de frequências (Figura 4.3.6). Entre as frequências utilizadas (11, 15 e 17 Hz), o maior sinal foi obtido para a menor frequência: 11 Hz.





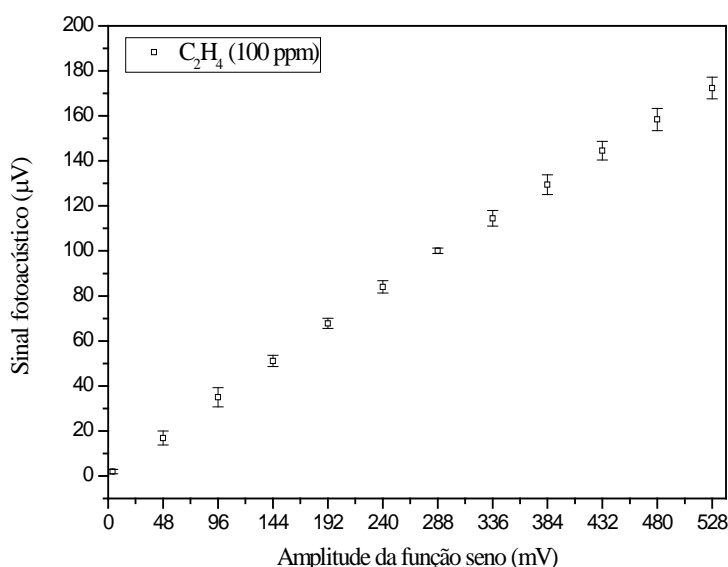
**Figura 4.3.5** - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) para etileno (100 ppmv) em função de baixas frequências (Hz) na temperatura de pico ( $T = 29,3^\circ\text{C}$ ). Configuração do primeiro *lock-in*: frequência de ressonância de 3800 Hz e constante de tempo de 1ms; Configuração do segundo *lock-in*: constante de tempo de 1s e amplitude da função seno de 96 mV.



**Figura 4.3.6** - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) para etileno (100 ppmv) em função da temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) do laser para  $\text{C}_2\text{H}_4$ . As curvas comparam os sinais para diferentes frequências baixas: 11, 15 e 17 Hz. Configuração do primeiro *lock-in*: frequência de ressonância de 3800 Hz e constante de tempo de 1ms; Configuração do segundo *lock-in*: constante de tempo de 1s e amplitude da função seno de 96 mV.

As medidas descritas anteriormente foram feitas apenas para o etileno, entendendo-se que não seria necessário refazê-las para a amônia, uma vez que a metodologia aplicada independe, até aqui, da molécula avaliada. Como a concentração do etileno (100 ppmv) era maior que a concentração de amônia (10 ppmv) disponível, a maior frequência (17 Hz) (i.e., menor sinal fotoacústico) foi escolhida para as medidas com etileno e a menor frequência (11 Hz) (maior sinal fotoacústico), para as medidas com a amônia (e CO<sub>2</sub>).

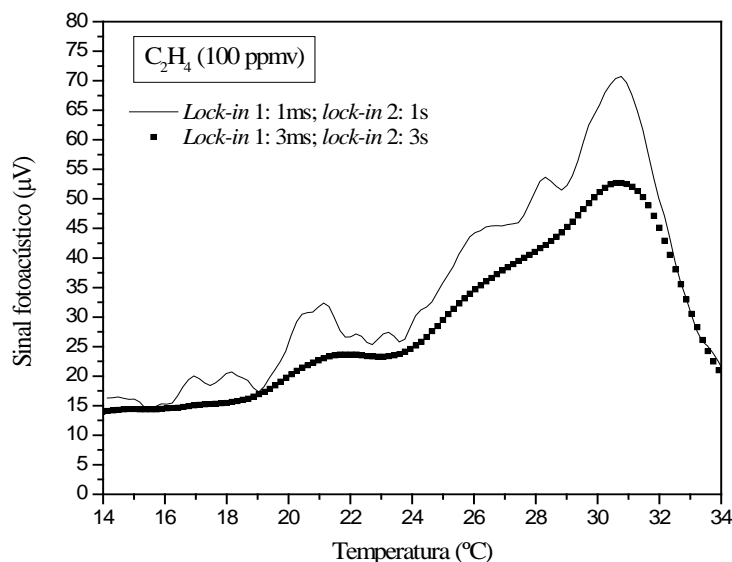
Após estabelecer as baixas frequências a serem utilizadas nas medidas simultâneas, o sinal fotoacústico para o C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> foi observado para diferentes amplitudes (V<sub>rms</sub>) da função seno (figura 4.3.7).



**Figura 4.3.7** - Sinal fotoacústico (µV) para etileno (100 ppmv) em função das amplitudes da função seno (mV) na temperatura do pico ( $T = 29,3^{\circ}\text{C}$ ). Configuração do primeiro *lock-in*: frequência de ressonância de 3800 Hz e constante de tempo de 1ms; Configuração do segundo *lock-in*: constante de tempo de 1s e frequência interna de 17 Hz.

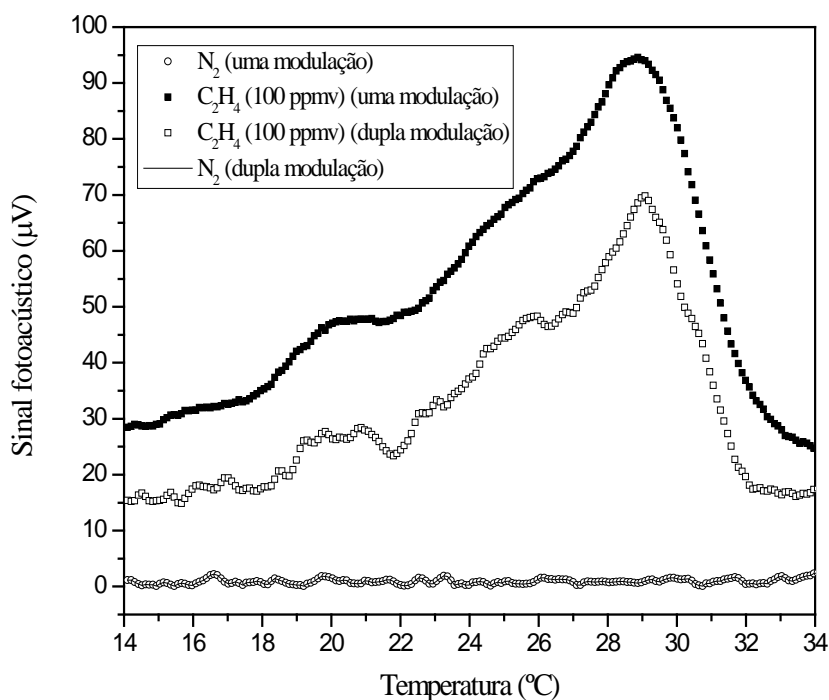
Os resultados mostram que o sinal fotoacústico cresceu linearmente com o aumento da amplitude da função seno. A oscilação da taxa de repetição do laser e, consequentemente do ciclo de trabalho, provocada pelo aumento da amplitude da função seno, pode comprometer o funcionamento do laser, de forma que 96 mV foi a amplitude escolhida para ser utilizada nas medidas simultâneas. Essa amplitude foi suficiente para provocar uma variação de 389,2 e 425,5 KHz na taxa de repetição, o que resultou em ciclos de trabalho variando entre de 1,95% e 2,13%, respeitando, desta forma, as especificações do fabricante e evitando causar danos ao laser.

As constantes de tempo foram escolhidas com base nos resultados da figura 4.3.8. Entre os pares de constantes de tempos utilizados (1ms e 1s ou 3ms e 3s), o maior sinal fotoacústico foi obtido para o par com as menores constantes (1ms e 1s), sendo este aplicado nas medidas simultâneas.



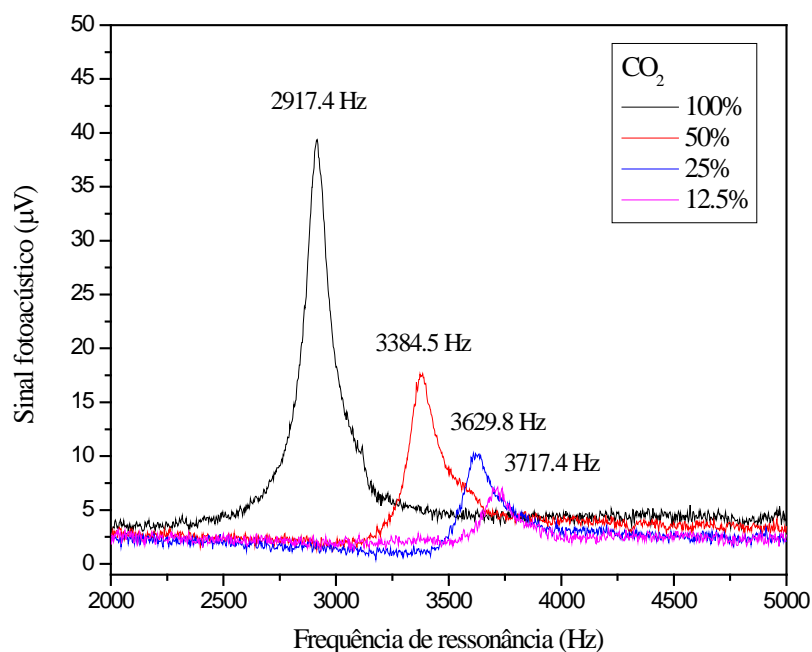
**Figura 4.3.8** - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) para etileno (100 ppmv) em função da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) do laser para etileno. As curvas comparam os sinais obtidos para dois pares de constantes de tempo: 1ms e 1s ou 3ms e 3s. Configuração do primeiro *lock-in*: frequência de ressonância de 3800 Hz e constante de tempo de 1ms ou 3ms; Configuração do segundo *lock-in*: constante de tempo de 1s ou 3s; frequência interna de 17Hz e amplitude da função seno de 96 mV.

Utilizando todos os parâmetros (frequência, amplitude e constante de tempo) até aqui definidos para as medidas simultâneas, uma comparação foi feita entre uma medida simulando a medida simultânea (dupla modulação) e outra com modulação em amplitude pura (uma modulação) para o  $\text{C}_2\text{H}_4$  (100 ppmv) (figura 4.3.9). O sinal fotoacústico para o  $\text{C}_2\text{H}_4$  foi mais intenso quando apenas uma modulação foi utilizada, sendo aproximadamente  $25 \mu\text{V}$  maior no pico de absorção. Por outro lado, os sinais de fundo ( $\text{N}_2$ ) não foram afetados pelas modulações.



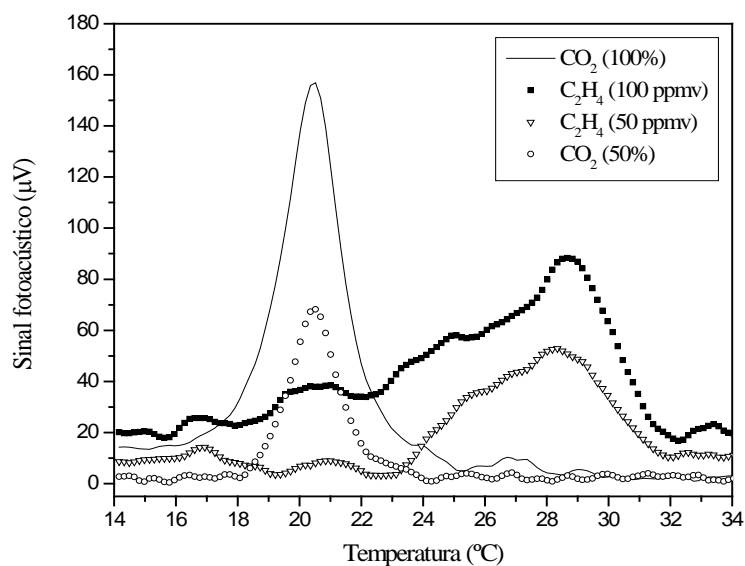
**Figura 4.3.9** - Comparação entre os sinais fotoacústicos obtidos para etileno (100 ppmv) e  $N_2$  (sinal de fundo) com dupla modulação e uma modulação (em amplitude). Para dupla modulação as configurações do primeiro *lock-in* foram: frequência de ressonância de 3800 Hz e constante de tempo de 1ms; Configuração do segundo *lock-in*: constante de tempo de 1s; frequência interna de 17 Hz e amplitude da função seno de 96 mV. Na modulação em amplitude pura, a constante de tempo foi de 300 ms.

Antes da realização das medidas simultâneas para  $C_2H_4+NH_3$  ou  $C_2H_4+CO_2$ , em virtude da concentração de  $CO_2$  disponível (aproximadamente 100%), curvas de frequência de ressonância para este gás foram obtidas diluindo-o em  $N_2$ . Esta etapa foi necessária uma vez que a frequência de ressonância da célula fotoacústica muda na presença de amostras puras, como mostra a figura 4.3.10. Para melhor visualização dos resultados, as curvas foram mostradas apenas para quatro concentrações (100, 50 e 25, e 12.5%). O deslocamento da frequência de ressonância da célula foi em direção a maiores valores quando o gás se tornou mais diluído em  $N_2$ . Na concentração de 12.5 % de  $CO_2$ , a frequência de ressonância observada (3717,4 Hz) foi a mais próxima da frequência de ressonância normalmente utilizada para os gases em concentrações a nível de ppm (3800 Hz).

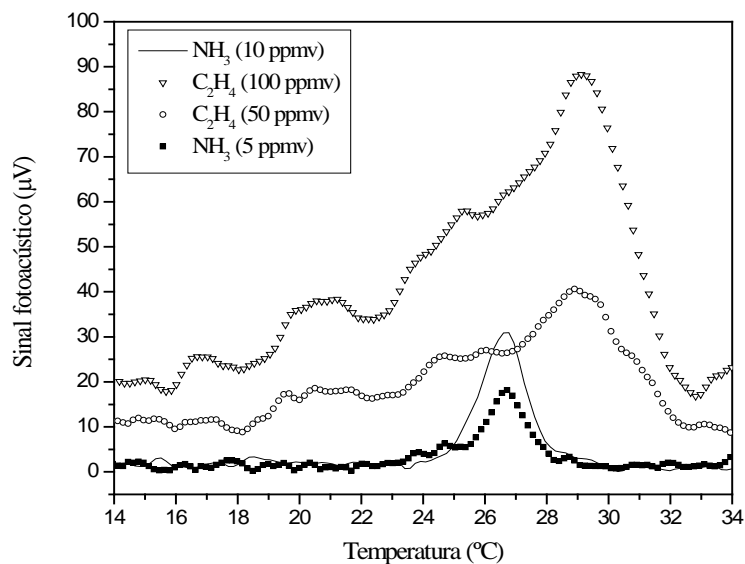


**Figura 4.3.10** - Sinal fotoacústico ( $\mu\text{V}$ ) para diferentes concentrações de  $\text{CO}_2$  (100, 50 e 25 e 12.5 %) em função da frequência de ressonância de célula fotoacústica (Hz).

Nas figuras 4.3.11 e 4.3.12 podem ser observadas as linhas de absorção características para as misturas de  $\text{C}_2\text{H}_4 + \text{CO}_2$  e  $\text{C}_2\text{H}_4 + \text{NH}_3$ , respectivamente, utilizando o método da dupla modulação. As figuras representam os sinais fotoacústicos obtidos individualmente e nas misturas para as concentrações de: 100 ppmv/2 de  $\text{C}_2\text{H}_4$  e 100%/2 de  $\text{CO}_2$  (figura 4.3.11) e 100 ppmv/2 de  $\text{C}_2\text{H}_4$  10 ppmv/2 de  $\text{NH}_3$  (figura 4.3.12). O fator dois da divisão é devido à mistura dos dois gases na mesma vazão durante a medida.

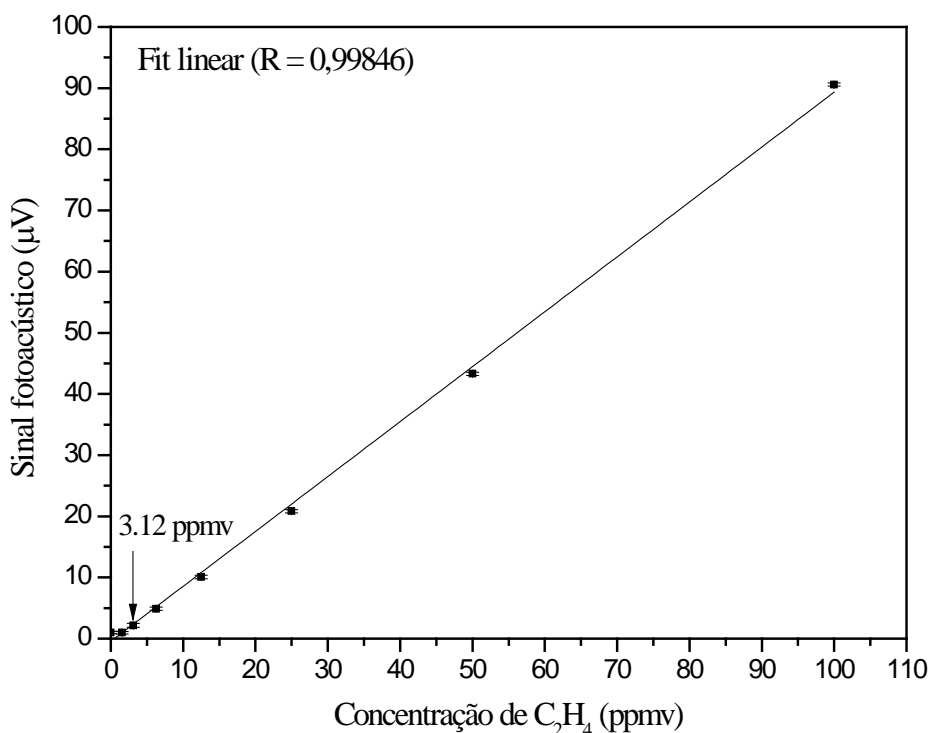


**Figura 4.3.11** - Sinal fotoacústico medido simultaneamente para etileno (50 ppmv) e CO<sub>2</sub> (50%) e individualmente para etileno (100 ppmv) e CO<sub>2</sub> (100%) com dupla modulação. Frequência de ressonância para o CO<sub>2</sub> 100%: 2917 Hz; Frequência de ressonância para o CO<sub>2</sub> 50%: 3384,5 Hz.



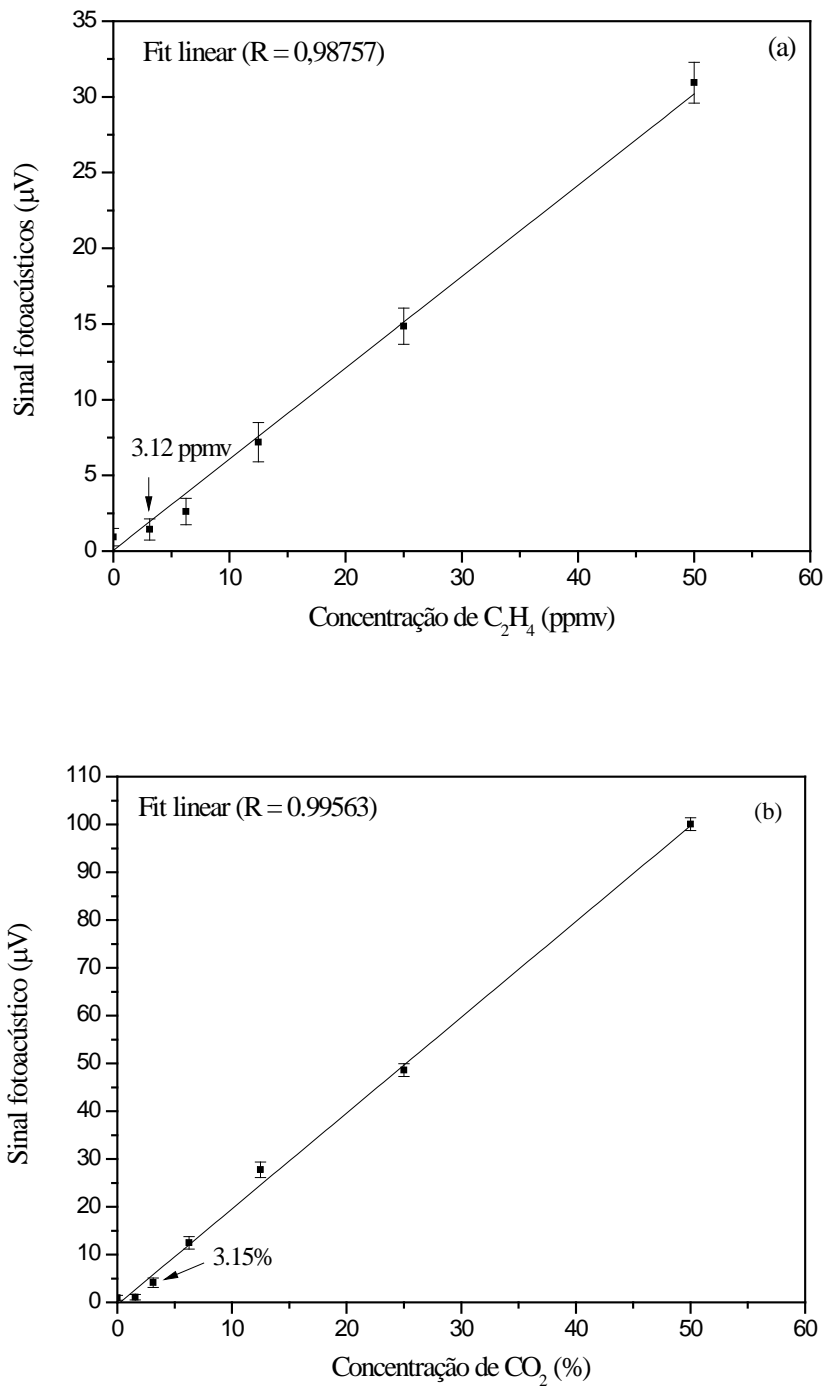
**Figura 4.3.12** - Sinal fotoacústico medido simultaneamente para etileno (50 ppmv) e amônia (5 ppmv) e individualmente para etileno (100 ppmv) e amônia (10 ppmv) com dupla modulação.

Após a realização das medidas simultâneas, os limites inferiores de detecção foram obtidos para  $C_2H_4$  (100 ppmv) em  $N_2$ , utilizando a modulação em amplitude pura (figura 4.3.13) e simultaneamente para a mistura  $C_2H_4 + CO_2$  com dupla modulação (figuras 4.3.14 a e b).



**Figura 4.3.13** - Limite inferior de detecção para etileno (100 ppmv) em  $N_2$  obtido com modulação em amplitude pura para a temperatura do laser de 29,3°C.

Diluindo 100 ppmv de  $C_2H_4$  em  $N_2$ , a concentração mínima atingida foi de aproximadamente 3,12 ppmv quando a modulação em amplitude (uma única modulação) foi utilizada (figura 4.3.13). A mesma concentração foi obtida também para a diluição simultânea da mistura  $C_2H_4 + CO_2$  (figuras 4.3.14 a), embora os desvios padrões dessa medida tenham sido maiores do que da diluição com uma única modulação e o valor obtido do ajuste linear da reta, menor ( $R = 0,98757$ ). A concentração mínima detectável simultaneamente para  $CO_2$  em  $C_2H_4$  foi de 3,15% (figura 4.3.14 b). Para a realização dessas medidas, a frequência de ressonância da célula fotoacústica foi sempre ajustada de acordo com cada concentração produzida a fim de encontrar o sinal fotoacústico máximo.



**Figura 4.3.14** - Limites inferiores de detecção simultânea para (a) etileno (100 ppmv) em  $\text{CO}_2$  (100%) e (b)  $\text{CO}_2$  (100%) em etileno (100 ppmv). Temperatura do laser de etileno: 29,3°C; temperatura do laser de amônia para detecção do  $\text{CO}_2$ : 18,5°C.



#### 4.4 Discussão

Diferentes moléculas gasosas podem estar presentes em uma mistura de uma amostra biológica, por exemplo. Com o intuito de identificar e quantificar  $C_2H_4 + NH_3$  e  $C_2H_4 + CO_2$  a partir de uma única medida, uma metodologia de detecção simultânea foi proposta nesta etapa do presente trabalho. A separação dos sinais fotoacústicos de cada molécula na mistura utilizando o método da dupla modulação é comparada aos processos de transmissão de informações, sejam essas sonoras ou imagens por televisão. A frequência de menor valor (17 Hz, por exemplo), denominada de envoltória, modula a onda de alta frequência (3800 Hz), que é a portadora do sinal fotoacústico. Os amplificadores *lock-ins*, que operam em baixas frequências atuam como receptores de alta seletividade, demodulando e separando com eficácia a contribuição de cada molécula gasosa na geração do sinal fotoacústico total, produzido na frequência de ressonância da célula (3800 Hz).

Vários procedimentos antes da realização das medidas simultâneas, porém, foram realizados para que a configuração mais apropriada, no que diz respeito ao melhor sinal fotoacústico obtido fosse, desta forma, aplicada. Nesse aspecto, as frequências baixas, as amplitudes das ondas senoidais e as constantes de tempo foram os principais parâmetros estabelecidos.

As frequências baixas foram escolhidas em função da resposta do microfone da célula fotoacústica diferencial e para as quais não havia interferência da frequência da rede de energia elétrica (60 Hz). A modulação em baixa frequência é provocada pela oscilação da taxa de repetição do ciclo de trabalho do laser. Uma vez que a intensidade do sinal fotoacústico diminuiu com o aumento da frequência de modulação (Fig. 4.3.5), uma hipótese sugerida para explicação desse comportamento se baseia na resposta do laser: a resposta do laser ao tipo de modulação aplicada pode ser lenta, porque a baixa frequência influencia na velocidade em que os pulsos da corrente de alimentação do laser ora permanecem, ora saem do pulso de maior duração responsável pela geração do sinal fotoacústico, i.e, dos pulsos que estão dentro da frequência de modulação.

O sinal fotoacústico (testado para o etileno) em função da amplitude da onda senoidal se mostrou linear com o aumento desta. Embora a escolha de maiores amplitudes seja ideal, um certo limite foi respeitado, uma vez que, no tipo de configuração utilizada, ela influenciava diretamente na taxa de repetição e, por sua vez, no ciclo de operação do laser (devendo-se a esse fato os crescentes sinais fotoacústicos observados com o aumento da amplitude). Para as medidas simultâneas, a amplitude determinada (96 mV)

foi suficiente para causar uma variação do ciclo de operação do laser que não ultrapassasse o recomendado pelos fabricantes (2%).

O sinal fotoacústico para o etileno foi obtido comparando-se duas combinações de constantes de tempo, sendo o maior sinal observado para a combinação com as menores constantes (1ms e 1s). A constante de tempo funciona como um filtro passa baixa, isto é, após o processamento do sinal realizado pelo *lock-in*, ela elimina (filtra) as oscilações de baixa frequência fora da frequência de corte do filtro. Uma consequência disso é a relação da constante de tempo está com o tempo em que um instrumento leva para alcançar a maior estabilização possível correspondente ao estímulo, refletindo o quão rápida ou lentamente o sinal responde e, assim, o seu grau de suavização. Ao aumentar a constante de tempo, o sinal se torna mais estável e mais fácil de ser medido de forma segura. Por outro lado, altas constantes de tempo podem não refletir o sinal real ou até mesmo mascarar alguma variação importante ou transiente que tenha acontecido durante a medida.

Na faixa espectral de emissão do laser utilizado para detectar amônia foi possível observar uma absorção significativa para o CO<sub>2</sub>. Partindo do princípio de que a frequência de ressonância é diretamente proporcional a velocidade do som, e que esta é proporcional ao inverso da raiz quadrada da massa molar do gás (Besson, 2006), isso justifica o fato da frequência de ressonância variar em função das concentrações de CO<sub>2</sub> que alteram a massa resultante da mistura gasosa.

Estabelecidos todos os parâmetros em questão, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> + NH<sub>3</sub> ou C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> + CO<sub>2</sub> foram simultaneamente detectados na mistura sem interferência das absorções referentes a cada gás. Adicionalmente, os limites inferiores de detecção para cada par de gases puderam ser atingidos. Primeiramente, a calibração do sistema foi feita apenas para o etileno em N<sub>2</sub> utilizando uma única modulação. O limite atingido, embora não significativamente baixo, mostrou, por outro lado, a estabilidade da medida, confirmada pelos pequenos desvios padrões e pelo bom ajuste linear da reta (R = 0,99846) para as concentrações produzidas. O limite inferior de detecção também foi aferido para a mistura C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> + CO<sub>2</sub>. A menor concentração de etileno atingida na mistura foi a mesma obtida para o etileno em N<sub>2</sub>. Entretanto, a presença da dupla modulação nas medidas simultâneas produziu um sinal mais instável com desvios padrões maiores, bem como um valor mais baixo para o ajuste linear (R = 0,98757). Contudo, é importante ressaltar que além da detecção simultânea, a calibração do sistema também pôde ser simultaneamente realizada.

Efeitos que influenciam na geração do sinal fotoacústico, e conseqüentemente na sensibilidade da técnica, estão presentes na detecção de moléculas gasosas em misturas e até mesmo em diferentes gases de diluição (Besson, 2006; Kosterev *et al.*, 2006; Schilt *et al.*, 2005, Veres *et al.*, 2003), como em amostras de gases biológicos e ambientais, por exemplo. Embora, na maioria dos casos esses efeitos sejam desprezados, a metodologia aqui abordada forneceu uma alternativa para estudos mais detalhados de gases em baixas concentrações, permitindo também uma caracterização mais cuidadosa do sistema utilizado.

#### **4.5 Conclusão**

No experimento descrito na presente etapa do trabalho, foi demonstrado que dois gases de uma mesma mistura puderam ser detectados simultaneamente utilizando um único sensor, sendo o trabalho inédito nesse sentido. A dupla modulação aplicada foi transferida para cada laser sem interferência para as concentrações estudadas, produzindo uma maior oscilação do sinal fotoacústico, mas que não foi suficiente para interferir no limite inferior de detecção dos gases na mistura. Nessa metodologia, outros gases podem ser detectados simultaneamente apenas pela substituição do laser de acordo com a molécula a ser estudada.

## CAPÍTULO 5

### Considerações finais e perspectivas

A espectroscopia no infravermelho utilizando fontes de radiação como os lasers, seja a gás ou de materiais semicondutores, é um método eficiente para detectar diferentes espécies químicas gasosas. Em todas as etapas descritas no presente trabalho, a espectroscopia fotoacústica (no infravermelho) foi a principal técnica utilizada para detecção de etileno, óxido nítrico, amônia e dióxido de carbono. A detecção de tais moléculas aqui se justifica pelas suas multifuncionalidades desempenhadas principalmente em sistemas biológicos, como apresentado no capítulo 1.

No capítulo 2, etileno e dióxido de carbono foram detectados, utilizando para o etileno a espectroscopia fotoacústica com um laser a gás ( $\text{CO}_2$ ) e para  $\text{CO}_2$ , um analisador de gás com emissão no infravermelho próximo e um detector baseado no efeito termo acústico. Essas medidas foram realizadas para plantas de amendoim bravo cultivadas em metal pesado ( $\text{Cr}^{+6}$ ) num período de sete dias. Técnicas mais usuais, como por exemplo, a emissão de fluorescência da clorofila *a*, fluorescência do NO e o conteúdo de poliaminas, para entender o estresse também foram utilizadas. Os dados obtidos para a emissão de etileno revelaram a capacidade da espectroscopia fotoacústica em detectar o nível de estresse em que as plantas se encontravam (e que a fluorescência da clorofila *a* não pôde revelar). A detecção de etileno pela espectroscopia fotoacústica preenche requisitos técnicos importantes, como por exemplo, análises não destrutivas e em tempo real, que outras técnicas, como a cromatografia gasosa, comumente utilizada para a detecção de gás, não o fazem. Isto abre um novo leque de possibilidades de análises que podem ser conduzidas conjuntamente com métodos clássicos de avaliação de estresse.

No capítulo 3, as metodologias de modulação em amplitude e em comprimento de onda possibilitaram conhecer mais profundamente um sistema baseado em um laser de cascata quântica utilizado para a detecção de NO. Aplicando a modulação em comprimento de onda para uma faixa maior de número de onda, uma absorção mais intensa para a molécula de NO pôde ser observada, permitindo que um limite de detecção na faixa de ppbv pudesse ser atingido. A utilização e o aprimoramento de uma metodologia baseada num sistema tão específico como em lasers para a detecção de moléculas gasosas importantes é de grande interesse para diferentes aplicações, sobretudo no que diz respeito a detecção dessa molécula a partir de sistemas biológicos. Assim, os resultados

obtidos no referido capítulo deste trabalho de tese forneceu informações importantes quanto à capacidade do sistema em detectar óxido nítrico, contribuindo para um maneira mais eficaz de aplicá-los em futuras análises de amostras biológicas.

No capítulo 4, uma metodologia utilizando dois lasers de cascata quântica e um único sensor fotoacústico para detecção simultânea de etileno e amônia (e/ou dióxido de carbono) foi estabelecida. É importante ressaltar que os limites de detecção não foram afetados nessa configuração. A exploração de uma metodologia que permite medir simultaneamente duas moléculas pode ser estendida para quaisquer outras modificando as fontes de radiação. Além disso, a ideia da metodologia em questão foi um passo inicial para que outras possam ser desenvolvidas restringindo a quantidade de equipamentos (os *lock-ins*, por exemplo) utilizados, ou com a substituição desses por programas feitos com auxílio de placas de aquisição de dados.

De modo geral, os resultados obtidos pelo presente trabalho visaram contribuir para a difusão da espectroscopia fotoacústica, abrindo possibilidades para suas diferentes aplicações, sobretudo no monitoramento de moléculas gasosas que desempenham importantes papéis biológicos.

## Referências Bibliográficas

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Salveit, Jr. M.E. (1992) Ethylene in plant biology. 2nd ed. New York: Academic Press. 414p.
- Albor-Aguilera, M. L., Gonzalez-Trujillo, M. A., Cruz-Orea, A., Tufino-Velazquez, M. (2009) Thermal and optical properties of polycrystalline CdS thin films deposited by the gradient recrystallization and growth (GREG) technique using photoacoustic methods. *Thin Solid Films*, 517, 2335-2339.
- Alloway, B.J. (1995) Heavy metals in soil. New York, USA. Blackie Academic & Professional. 386p.
- Altuzar, V., Tomas, S. A., Zelaya-Angel, O., Sánchez-Sinencio, F., C. Mendoza-Barrera (2006) CO<sub>2</sub> laser photoacoustic spectroscopy applied to environmental analysis in the metropolitan area of Mexico City. *Instrumentation Science and Technology*, 34, 9–21.
- Alves, G. V, L., Santos, W.C. Waldman, W.R., Oliveira, J.G., Vargas, H., da Silva, M.G. (2010) A photoacoustic technique applied to detection of ethylene emissions in edible coated passion fruit. *Journal of Physics. Conference Series* 214, p. 12-02.
- André, O., Vollenweider, P., Günthardt-Goerg, M. S. (2006) Foliage response to heavy metal contamination in Sycamore Maple (*Acer pseudoplatanus* L.). *For. Snow Landsc. Res.* 80, 3: 275–288.
- Angelmahr, M., Miklós, A., Hess, P. (2008) Wavelength- and amplitude-modulated photoacoustics: comparison of simulated and measured spectra of higher harmonics. *Applied Optics*, 47 (15), 2806-2812.
- Antoniadis, V. and Alloway, B. J. (2002) The role of dissolved organic carbon in the mobility of Cd, Ni and Zn in sewage sludge-amended soils. *Environ. Poll.* 117, 515-521.
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Gwóźdź, E.A. (2011) The message of nitric oxide in cadmium challenged plants, *Plant Science*, 181(5), 612-620.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172, 876–887.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Jelonek, T. (2009) Nitric oxide, induced by wounding, mediates redox regulation in pelargonium leaves, *Plant Biology*. 11, 650–663.

- Arduini, I., Masoni, A., Ercoli, L., (2006) Effects of high chromium applications on miscanthus during the period of maximum growth, *Environmental and Experimental Botany*, 58, 234–243.
- Arndt, R. (1965) Analytical line shapes for lorentzian signal broadened by modulation. *J. Appl. Phys.* 36, 2522 – 2524.
- Arteca, R. N. and Arteca J. M. (2007) Heavy-metal-induced ethylene production in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*. 164, 1480 – 1488.
- Baird, C. (2002) *Química Ambiental*. 2. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 622p.
- Bakhirkin, Y.A.; Kosterev, A.A.; Curl, R.F.; Tittel, F.K.; Yarekha, D.A.; Hvozdar, L.; Giovaninini, M.; Faist, J. (2006) Sub-ppbv nitric oxid concentration measurements using cw theroelectrically cooled quantum cascade laser-based integretd cavity output spectroscopy. *Appl. Phys*, B 82, 149-154.
- Balestrasse, K. B., Gallego, S. M., Benavides, M. P., Tomaro, M.L. (2005) Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil*. 270, 343–353.
- Balestrazzi, A., Agoni, V., Tava, A., Avato, P., Biazzi, E., Raimondi, E., Macovei, A., Carbonera D., (2011) Cell death induction and nitric oxide biosynthesis in white poplar (*Populus alba*) suspension cultures exposed to alfalfa saponins. *Physiologia Plantarum*. 141(3), 227-38.
- Baptista-Filho, M.; Riter, H. G., da Silva, M.G., Luna, F. J., Werneck, C. G., Rech, I., Polidoro, J. C., Monte, M. B. M., Souza-Barros, F., Miklos, A., Vargas, H. (2011) Ammonia traces detection based on Photoacoustic Spectroscopy for evaluating ammonia volatization from natural zeolites at typical crop field temperature. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 158, 241 – 245.
- Baptista-Filho, M., da Silva, M. G., Polidoro, J. C., Luna, F. J., Monte, M. B. M., Miklos, A., Souza-Barros, F.; Vargas, H. (2008) Detection of ammonia released from zeolite by the quantum cascade laser based photoacoustic set-up. *European Physical Journal-Special Topics*, 153, 547-550.
- Baptista-Filho, M.; da Silva, M.G.; Sthel, M.S.; Schramm, D.U.; Vargas, H.; Miklos, A.; Hess, P. (2006) Ammonia detection using quantum-cascade laser photoacoustic spectroscopy. *Applied Optics*, 45: 4966-4971.
- Bartha, B., Kolbert, Z., Erdei, L. (2005) Nitric oxide production induced by heavy metals in *Brassica juncea* L. Czern. and *Pisum sativum* L. *Acta Biologica Szegediensis*. 49(1-2), 9-12.

- Bernardi, A. C. C.; Oliveira, P. P. A.; Campana, M. (2008) Volatilização de amônia em pastagem de capim-tanzânia fertilizada com mistura de ureia e zeólita. Circular Técnica 56 - EMBRAPA.
- Berrou, A., Raybaut, M., Godard, A., Lefebvre, M. (2010) High-resolution photoacoustic and direct absorption spectroscopy of main greenhouse gases by use of a pulsed entangled cavity doubly resonant OPO. Applied Physics B- Lasers and Optics, 98, 217-230.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D. (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. Annual Review of Plant Biology. 59,21–39.
- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., Taconnat, L., Renou, J-P., Pugin, A., Wendehenne D. (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake<sup>[W]</sup>. Plant Physiology, 149, 1302–1315.
- Besson, J-P. (2006) Photoacoustic spectroscopy for multi-gas sensing using near infrared lasers. Tese 189p.
- Besson, J. P., Schilt, S., Sauser, F., Rochat, E., Hamel, P., Sandoz, F., Niklues, M., Thevenaz, L. (2006a) Multi-hydrogenated compounds monitoring in optical fibre manufacturing process by photoacoustic spectroscopy," Appl. Phys. B 85, 343 - 348.
- Bolhar-Nordenkampf, H.R., Long, S.P., Baker, N.R. (1989) Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. Functional Ecology. 3, 497-514.
- Boonyapookana, B., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Sing-hakaew, S. (2002) Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duckweed *Wolffia globosa*, International Journal of Phytoremediation. 4, 87–100.
- Bouchard J.N., Yamasaki, H. (2008) Heat Stress Stimulates Nitric Oxide Production in *Symbiodinium microadriaticum*: A Possible Linkage between Nitric Oxide and the Coral Bleaching Phenomenon. Plant Cell Physiol. 49(4), 641–652.
- Bridges, T. J. e Burkhardt, E. G. (1977) Zeeman spectroscopy of NO with magneto-spectrophone," Opt. Commun. 22(2), 248 – 250.
- Byrnes, C.A., Bush, A., Shinebourne, E.A. (1996) Measuring expiratory nitric oxide in humans, Nitric Oxide, Pt B. 269, 459–473.



- Camejo, D., Martí Mdel, C., Nicolás, E., Alarcón, J.J., Jiménez, A., Sevilla, F. (2007) Response of superoxide dismutase isoenzymes in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) during thermo-acclimation of the photosynthetic apparatus. *Physiol Plant*. 131(3), 367-77.
- Chatterjee, J., Chatterjee, C. (2000) Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution*. 109, 69-74.
- Choudhary, A., Singh, R.P. (2000) Cadmium-induced changes in diamine oxidase activity and polyamine levels in *Vigna radiata* Wilczek seedlings. *J Plant Physiol* 156, 704–710.
- Chrobak, L., Malinski, M., Zakrzewski, J., Strzalkowski, K. (2010) The photoacoustic spectroscopic investigations of the surface preparation of ZnSe crystals with the use of the optimization methods. *Applied Surface Science*, 256, 2458-2461.
- Corrêa, S. F. Mota, L., Paiva, L.B., do Couto, F. M., da Silva, M. G., de Oliveira, J.G., Sthel, M. S., Vargas, H., Miklós, A. (2011) Effects of ozone exposure on ‘Golden’ papaya fruit by photoacoustic phase-resolved method: Physiological changes associated with carbon dioxide and ethylene emission rates during ripening. *J. Appl. Phys.* 109, 114701-7.
- Corrêa, S. F., Souza, M. S., Pereira, T., Alves, G. V. de L., Oliveira, J. G., da Silva, M. G., Vargas, H. (2008) Determination of thermal diffusivity in papaya pulp as a function of maturation stage. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 30, 611-615.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218: 900-905.
- Cristescu, S.M., Persijn, S.T., Hekkert, S.T.L., Harren, F.J.M. (2008) Laser-based systems for trace gas detection in life sciences, *Appl. Phys. B: Lasers Opt.* 92, 343–349.
- Csele, M. (2004) *Fundamentals of light sources and lasers*. A Wiley-Interscience publication. 283-290.
- Curl, R. F., Capasso F., Gmachl, C., Kosterev, A. A. McManus, B., Lewicki, R., Pusharsky, M., Wysocki, Gerard., Tittel, F.K. (2010) Quantum cascade lasers in chemical physics. *Chemical Physics Letters*, 1 -18.
- da Silva, M. G., Miklos, A., Falkenroth, A., Hess, P. (2006) Photoacoustic measurement of N<sub>2</sub>O concentrations in ambient air with a pulsed optical parametric oscillator," *Appl. Phys. B* 82(2), 329 - 336.

- da Silva, M.G., Oliveira, J.G., Vitoria, A.P., Corrêa, S.F., Pereira, M.G., Campostrini, E., Santos, E.O., Cavalli, A., Vargas H. (2005) Correlation between ethylene emission and skin colour changes during papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening. *Journal de Physique IV*, 125, 877 – 879.
- da Silva, M. G., Santos, E. O.; Sthel, M. S.; Cardoso, S. L.; Cavalli, A., Monteiro, A. R.; de Oliveira, J. G.; Pereira, M. G.; Vargas, H. (2003) Effect of heat treatment on ethylene and CO<sub>2</sub> emissions rates during papaya (*Carica papaya* L.) fruit ripening. *Rev. Sci. Instrum.* 74, 703.
- Davies, I.R., Zhang, X.J. (2008) Nitric oxide selective electrodes Globins and Other Nitric Oxide-Reactive Proteins. , Pt A, 436, 63–95.
- De Araújo, A. S. F. e Carvalho, E. M. de S. (2006) Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. Universidade Federal do Piauí. *Comunicado Técnico*, n. 11, p. 1-4.
- De Gouw, J. A., Hekkert, S. T. L., Mellqvist, J., Warneke, C., Atlas, E. L., Fehsenfeld, F. C., Fried, A., Frost, G. J., Harren, F. J. M., Holloway, J. S., Lefer, B.; Lueb, R., Meagher, J. F., Parrish, D. D., Patel, M., Pope, L., Richter, D., Rivera, C., Ryerson, T. B., Samuelsson, J., Walega, J.; Washenfelder, R. A., Weibring, P., Zhu, X. (2009) Airborne Measurements of Ethene from Industrial Sources Using Laser Photo-Acoustic Spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 43, 2437-2442.
- Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta BBA Bioenergetics*. 1020, 1-24.
- Du, C., Zhou, J., (2011) Application of Infrared Photoacoustic Spectroscopy in Soil Analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 46(5), 405-422.
- Du, C. W., Zhou, J. M., Wang, H. Y., Chen, X. Q., Zhu, A. N., Zhang, J.B. (2009) Determination of soil properties using Fourier transform mid-infrared photoacoustic Spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 49, 32-37.
- Dumitras, D. C., Banita, S., Bratu, A. M., Cernat, R., Dutu, D. C. A., Matei, C., Patachia, M., Petrus, M., Popa, C. (2010) Ultrasensitive CO<sub>2</sub> laser photoacoustic system. *Infrared Physics and Technology*, 53, 308-314.
- Dumitras, D. C., Dutu, D. C., Matei, C., Magureanu, A. M., Petrus, M., Popa, C., Patachia, V. (2008) Measurements of ethylene concentration by laser photoacoustic techniques with applications at breath analysis. *Romanian Reports in Physics*, 60, 593-602.

- Dyroff, C. (2008) Tunable diode laser absorption spectroscopy for trace gas measurements with high sensitivity and low drift. Dissertação de Mestrado, Karlsruhe - Alemanha, 162p.
- Ecker, J.R. (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268, 667–675.
- El-Brolossy, T. A., Ibrahim, S. S. (2010) Photoacoustic measurement of thermal properties of polystyrene metal oxide composites. *Thermochimica Acta*, 509, 46-49.
- Elfadl, M. A., Luukkanen, O. (2006) Field studies on the ecological strategies of *Prosopis juliflora* in a dryland ecosystem. 1. A leaf gas exchange approach. *Journal of arid Environments*, 66: 1-15.
- Faist, J., Capasso, F., Sivco, D. L., Sirtori, C., Hutchinson, A. L., Cho, A.Y. (1994) Quantum Cascade Laser. *Science*, 264 (5158): 553–556.
- Felix, E.P., Cardoso, A. A., (2004) Amônia (NH<sub>3</sub>) Atmosférica: fontes, transformação, sorvedouros e métodos de análise. *Quim. Nova*, 27(1) 123-130.
- Ferus, M., Cihelka, J., Civis, S. (2008) Formaldehyde in the environment - Determination of formaldehyde by laser and photoacoustic detection. *Chemicke Listy*, 102,417-426.
- Filho, F. R.; Zilberstein, B. (2000) Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade, metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica do Brasil*, v. 46, p. 265-271.
- Fontaniella, B., Mateos, J.L., Vicente, C., Legaz, M-E. (2001) Improvement of the analysis of dansylated derivatives of polyamines and their conjugates by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 919, 283-288.
- Fuentes, D., Disante, K.B., Valdecantos, A., Cortina, J., Vallejo, V.R. (2007) Sensitivity of Mediterranean woody seedlings to copper, nickel and zinc. *Chemosphere*. 66, 412–420.
- Fuhrer, J. (1982) Ethylene Biosynthesis and Cadmium Toxicity in Leaf Tissue of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol*. 70, 162-167.
- Furchgott, R.F. (1999) Endothelium-Derived Relaxing Factor: Discovery, Early Studies, and Identification as Nitric Oxide (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*. 38(13-14), 1870 - 1880.
- Ganesh, K. S., Baskaran, L., Rajasekaran, S., Sumathi, K., Chidambaram, A.L.A., Sundaramoorthy P. (2008) Chromium stress induced alterations in biochemical

- and enzyme metabolism in aquatic and terrestrial plants. *Coll. And Surf. B: Biointerf.* 63, 159-163.
- García-Mata, C., Lamattina L. (2002) Nitric Oxide and Abscisic Acid Cross Talk in Guard Cells *Plant Physiol* 128:790-792.
- Garcia-Mata, C., Lamattina, L. (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.* 126 1196–1204.
- Gazzarrini, S., McCourt, P. (2003) Cross-talk in plant hormone signalling: what *Arabidopsis* mutants are telling us. *Ann Bot*, 91, 605–612.
- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R., (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87–92.
- Ghnaya, A. B., Hourmant, A., Couderchet, M., Branchard, M., Charles, G., (2011) Polyamine levels and pigment contents in rapeseed regenerated in vitro in the presence of zinc, *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*,. 3(8), 206-213.
- Ghosh, B., Chakraborty, P., Kumar, P., Kanjilal, D., Vijayan, C. (2008) Photoacoustic spectroscopy of Ni<sup>+</sup>-implanted quartz”; *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions With Materials and Atoms*, 266, 1229-1234.
- Gmachl, C., Capasso, F., Sivco, D.L., Cho, A.Y. (2001) Recent progress in quantum cascade lasers and applications . *Reports on Progress Physics.* 64 - 1533.
- Groppa, M. D., Benavides, M. P. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances Review Article. *Amino Acids* 34, 35–45.
- Groppa, M.D., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. (2003) Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Sci* 164, 293–299.
- Grossel, A., Zeninari, V., Joly, L., Parvitte, B., Durry, G., Courtois, D. (2007) Photoacoustic detection of nitric oxide with a Helmholtz resonant quantum cascade laser sensor. *Infrared Physics and Technology*, 51, 95-101.
- Grossel, A., Zeninari, V., Joly, L., Parvitte, B., Courtois, D., Durry, G. (2006) New improvements in methane detection using a Helmholtz resonant photoacoustic laser sensor: A comparison between near-IR diode lasers and mid-IR quantum cascade lasers. *Spectrochimica Acta Part A* 63: 1021–1028.

- Hansel, C. M., Wielinga, B.W., Fendorf, S. (2003) Investigating chromium contamination and remediation. SSRL, Stanford Synchrotron Radiation Laboratory. Disponível em: [http://www-ssrl.slac.stanford.edu/research/chromium\\_summary.html](http://www-ssrl.slac.stanford.edu/research/chromium_summary.html).
- Hager, Jr. R.N., Anderson, R.C. (1970) Theory of the derivative spectrometer. *Journal. Opt. Soc. Am.* 60, 1444 – 1449.
- Hamdani, S., Yaakoubi, H., Carpentier, R. (2011) Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 104, 314–319.
- Hampl, V., Walters, C.L., Archer, S.L. (1996) Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: Feelisch M, Stamler JS, (Eds). *Methods in nitric oxide research.* Chichester: John Wiley & Sons; 310-318.
- Harman, T. (2006) Development of Quantum-Cascade Laser based biosensor technology. *ISSO Annual Report*, 85 – 87.
- Harvey, T. J., Henderson, A., Gazi, E., Clarke, N. W., Brown, M., Faria, E. C., Snook, R. D., Gardner, P. (2007) Discrimination of Prostate Cancer Cells by Reflection Mode FTIR Photoacoustic Spectroscopy. *Analyst*, 132, 292-295.
- Herzberg, G. (2003) *The spectra and structures of the simple free radicals: an introduction to molecular spectroscopy.* Dover Phoenix Edition, NY, 231p.
- Hetrick, E.M., Schoenfish, M.H. (2009) Analytical chemistry of nitric oxide, *Annual Review of Analytical Chemistry.* 2, 409–433.
- Hilderbrand, S.A., Lim, M.H., Lippard, S.J. (2005) Fluorescence-based nitric oxide detection. *Topics in Fluorescence Spectroscopy.* Geddes, C.D., Lakowicz, J.R., Eds: Springer, Vol. 9, 163 – 188.
- HITRAN (2008) Database <http://cfa-www.harvard.edu/HITRAN>. Acessado em fevereiro de 2012.
- Hetherington, A. M.; Woodward F. I. (2003) The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature.* 424, 901 – 908.
- Howieson, I. (2006) The application of quantum cascade laser (QCL) sensor to industrial gas monitoring. *Gases and Technology Features.* p. 8-11.
- Iguchi, T. (1986) Modulation waveforms for second-harmonic detection with tunable diode laser. *J. Opt. Soc. Am.* 3, 419 – 423.

- Inventory of U.S. greenhouse gas emissions and sinks: **1990-2010**. <http://www.epa.gov/climatechange/emissions/usinventoryreport.html> (acessado em abril de 2012).
- Jia, H., Zhao, W., Cai, T., Chen, W., Zhang, W., Gao, X. (2009) Absorption spectroscopy of ammonia between 6526 and 6538  $\text{cm}^{-1}$ . *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 110: 347–357.
- Johnson, P.R., and Ecker, J.R. (1998) The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 32, 227–254.
- Kanellis, A.K.; Chang, C.; Klee, H.; Bleecker, A.B.; Pech, J.C.; Grierson, D. (1999) *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II*. Hardcover, 480 p.
- Kavaya, M. J., Margolis, J. S., Shumate, M. S. (1979). Optoacoustic detection using Stark modulation. *Appl. Opt.* 18(15), 2602 - 2606.
- Khan, N.A. (2006) *Ethylene action in plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 206p.
- Khan, M.R., Khan, M. M. (2010) Effect of Varying Concentration of Nickel and Cobalt on the Plant Growth and Yield of Chickpea, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 4(6), 1036-1046.
- Kleschyov, A.L., Wenzel, P., Munzel, T. (2007) Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide. *Journal of Chromatography B*. 851, 12–20.
- Kluczynski, P., Gustafsson, J., Lindberg, A. M., Axner, O. (2001) Wavelength modulation absorption spectrometry - an extensive scrutiny of the generation of signals. *Spectrochimica Acta Part B* 56, 1277 – 1354.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T. (1998a) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*. 70, 2446–2453.
- Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T. (1998b) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 46, 373–375.
- Kopyra, M., Stachon-Wilk, M. E. Gwózdź, A. (2006) Effects of exogenous nitric oxide on the antioxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. *Acta Physiologiae Plantarum*. 28,525-536.
- Kopyra, M., Gwózdź, E. A. (2004) The role of nitric oxide in plant growth regulation and responses to abiotic stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*. 26, 459-472.

- Kosterev, A.A., Bakhirkin, Y.A., Tittel, F.K., Blaser, S., Bonetti, Y., Hvozdar, I. (2004) Photoacoustic phase shift as a chemically selective spectroscopic parameter. *Appl. Phys. B* 78, 673–676.
- Kuthanová, A., Gemperlová, L., Zelenková, S., Eder, J., Machácková, I., Opatrný, Z., Cvikrová, M. (2004) Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol Biochem* 42, 149–156.
- Kuznetsov, V., Radyukina, N.L., Shevyakova, N.I. (2006) Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. *Rus J Plant Physiol* 53(5), 583–604.
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., Pagnussat, G. (2003) Nitric Oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule. *Annual Review of Plant Biology*. 54,109-136.
- Lamattina, L., Beligni, M.V., Garcia-Mata, C., Laxalt, A.M. (2001) Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds. US Patent. US 6242384 B1.
- Leshem, Y.Y. (1996) Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regulation*. 18 155- 159.
- Leshem, Y.Y., Pinchasov, Y. (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria anannasa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *Journal of Experimental Botany*. 51, 1471-1473.
- Levitt, J. (1980) Responses of plants to environmental stresses. Academic, New York.
- Liang, M. e Knox, F. G. (2000) Production and functional roles of nitric oxide in the proximal tubule. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 278:1117-1124.
- Lin, Y.C., Kao, C.H. (2007) Proline accumulation induced by excess nickel in detached rice leaves. *Biologia Plantarum*. 51 (2), 351-354.
- Llamas, A., Ullrich, C. I., Sanz, A. (2008) Ni<sup>2+</sup> toxicity in rice: Effect on membrane functionality and plant water content. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46, 905-910.
- Loscalzo, J. e Vita, J. A. (2000) Contemporary cardiology Nitric oxide and cardiovascular system. 4, 3 - 5.

- Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J. M., Robinson, B., (2004) White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests, *Environmental Pollution*, 132, 145 -155.
- Maksymiec, W. (2007) Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29(3), 177-187.
- Manne, J.; Sukhorukov, O., Jäger, W.; Tulip, John (2006) Pulsed quantum cascade laser-based cavity ring-down spectroscopy for ammonia detection in breath. *Appl. Opt.* 45, 9230-9237.
- Marinov, D. e Sigrist, M. (2003) Monitoring of road-traffic emissions with a mobil photoacoustic system," *Photochem. Photobiol. Sci.* 2(7), 774 – 778.
- Martin, P. A. (2002) Near-infrared diode laser spectroscopy in chemical process and environmental air monitoring. *Chem. Soc. Rev.*, 31, 201–210.
- Martinez, D., Navarrete, M., Mejia-Uriarte, E. V., Villagran-Muniz, M., Vazquez, V. (2009) Methodology to analyze pesticides in water by pulsed photoacoustics. *Revista Mexicana De Física*, 55, 85-89.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51, 659-658.
- Mccurdy, M.R.; Bakhirkin, Y.A.; Tittel, F.K. (2006) Quantum cascade laser-based integratedcavity output spectroscopy of exhaled nitric oxide. *Appl. Phys. B Lasers and Optics*.
- Mcmanus, J.B.; Nelson, D.D.; Herndon, S.C.; Shorter, J.H.; Zahniser, M.S.; Blaser, S.; Hvozdar, L.; Muller, A.; Giovannini, M.; Faist, J. (2006) Comparison of cw and pulsed operation with a TE-cooled quantum cascade infrared laser for detection of nitric oxide at 1900 cm<sup>-1</sup>. *Appl. Phys. B* 85, 235–24.
- Menzel, L.; Kosterev, A.A.; Curl, R.F.; Tittel, F.K.; Gmachl, C.; Capasso, F.; Silveo, D.L.; Baillargeon, J.N.; Hutchinson, A.L.; Cho, A.Y.; Urban, W. (2001) Spectroscopic detection of biological NO with a quantum cascade laser. *Appl. Phys. B* 72, 859-863.
- Miklós, A., Hess, P., Bozóki, Z. (2001) Application of acoustic resonators in photoacoustic trace gas analysis and metrology. *Review of Scientific Instruments*. 72(4), 1938-1955.
- Mur, L.A.J., Mandon, J., Cristescu, S.M., Harren, F.J.M., Prats, E. (2011) Methods of nitric oxide detection in plants: A commentary. *Plant Science* 181, 509– 519.



- Mur, L.A.J., Santosa, I.E., Laarhoven, L.J.J., Holton, N.J., Harren, F.J.M., Smith, A.R. (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars, *Plant Physiology*. 138, 1247–1258.
- Murphy, M.E., Noack, E. (1994) Nitric oxide assay using hemoglobin method, *Methods. Enzymology*. 233, 240–250.
- Narasimhan, L. R., Goodman, W., and Patel, C. K. N. (2001) Correlation of breath ammonia with blood urea nitrogen and creatinine during hemodialysis," *PNAS* 98(8), 4617 – 4621.
- Normand, E., Howieson, I., McCulloch, M.T. (2007) Quantum-cascade lasers enable gas-sensing technology. *Laser Focus World* 43 (4): 90–92.
- Numai, T. (2004) *Fundamental of Semiconductor lasers*. Springer-Verlag New York (Springer series in Optical Science) 93, 259p.
- Oliva, S. R., Mingorance, M. D., Valdés, B., Leidi, E. O., (2008) Uptake, localisation and physiological changes in response to copper excess in *Erica andevalensis*, *Plant Soil*, 328, 411–420.
- Oliveira, J.G., Bressan-Smith, R. E., Campostrini, E., Cunha, M., Costa, E. S., Torres, N., A., Coutinho, K. S., da Silva, M.G.,Vitória, A. P. (2010). Papaya pulp gelling: is it premature ripening or problems of water accumulation in the apoplast. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 32, 961-969.
- Oliveira, J. G., Alves, P. L. da C. A., Vitória, A. P. (2009) Alterations in chlorophyll *a* fluorescence, pigment concentrations and lipid peroxidation to chilling temperature in coffee seedlings. *Environmental and Experimental Botany*. 67 (1), 71–76.
- Paiva, L.B., de Oliveira, J.G., Azevedo, R.A., Ribeiro, D.R., da Silva, M.G., Vitória, A.P. (2009) Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr<sup>3+</sup> and Cr<sup>6+</sup>. *Environ. Exp. Bot.* 65, 403–409.
- Pallini, M., Curulli, A., Amine, A., Palleschi G. (1998) Amperometric Nitric Oxide Sensors: a Comparative Study. *Electroanalysis*. 10(15), 1010–1016.
- Panda, S.K., Choudhury, S. (2005) Chromium stress in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 95–102.
- Panda, S.K., Khan, M.H., (2003) Antioxidant efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) leaves under heavy metal toxicity, *Journal of Plant Biology*, 30, 23–29.

- Pandey, P., Tripathi, A.K. (2011) Effect of Heavy metals on Morphological and Biochemical characteristics of *Albizia procera* (Roxb.) Benth. Seedlings. *International Journal of Environmental Sciences*. 1(5), 1009 – 1017.
- Pereira, T., de Almeida, P. S. G., de Azevedo, I. G., da Cunha, M., de Oliveira, J.G., da Silva, M. G., Vargas, H. (2009) Gas diffusion in `Golden papaya fruit at different maturity stages. *Postharvest Biology and Technology*. 54, 123-130.
- Pezzarossa, B., Lubrano, L., Petruzzelli, G., Tonutti, P. (1991) The effect on Cd contents and ethylene biosynthesis in tomato plants of adding cadmium sulphate to soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 57-58: 589-596.
- Pirintsos, S. A., Kotzabasis, K., Loppi, S. (2004) Polyamine production in *Lichens* under metal pollution stress. *Journal of Atmospheric Chemistry* **49**, 303–315.
- Planchet, E., Kaiser W. M., (2006) Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3043–3055.
- Prado, C. H. B. A., Wenhui, Z., Rojas, M. H. C., Souza, G. M. (2004) Seasonal leaf gas exchange and water potential in a woody cerrado species community. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16(1): 7-16.
- Prasad, M.N.V. (2004) Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. 2nd Edition, Springer. 462p.
- Poschenrieder, C., Barcelo, J. (2004) Water relations in heavymetal stressed plants. In: Prasad, M. (Ed.), *Heavy Metal Stress in Plants from Biomolecules to Ecosystems*, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, pp. 249–263.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J. (1993) Chromium-induced inhibition of ethylene evolution in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves. *Physiologia plantarum*. 89, 404 – 408.
- Pulford, I.D., Watson, C., (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review, *Environmental International*. 29, 529-540.
- Puppato, L. ; Cassini, S. T. A. Santana, R. Borges, A.C., Vieira, C. (1987) Biological Nitrogen Fixation In Plants Of "Phaseolus Vulgaris" As Affected By Photossynthate Supply". *Revista Ceres*, 34, 99-109.
- Qishlaqi, A., Moore, F. (2007) Statistical Analysis of Accumulation and Sources of Heavy Metals Occurrence in Agricultural Soils of Khoshk River Banks, Shiraz, Iran. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*. 2(5): 565-573.

- Robinson, J. K., Bollinger, M. J., Birks, J. W. (1999) Luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chemiluminescence detector for the analysis of nitric oxide in exhaled breath. *Anal. Chem.* 71, 5131-5136.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E. Vecino-Bueno, I., Feldman, S. R. (2011) Accumulation and tolerance characteristics of chromium in a cordgrass Cr-hyperaccumulator, *Spartina argentinensis*. *J. Hazardous Materials.* 185, 862 – 869.
- Remon, E., Bouchardon, J.-L., Cornier, B., Guy, B., Leclerc, J.-C., Faure, O. (2005) Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: Implications in risk assessment and site restoration. *Environmental Pollution*, 137, 316-323.
- Rocha, M.V., Sthel, M.S., da Silva, M.G., Paiva, L.B., Pinheiro, F.W., Miklòs, A., Vargas, H. (2011) Quantum-cascade laser photoacoustic detection of methane emitted from natural gas powered engines. *Appl Phys B*, 1 - 6.
- Roháček, K. (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning and mutual relationships. *Photosynthetica* 40 (1), 13-29.
- Ryser, P., Emerson, P. (2007) Growth, root and leaf structure, and biomass allocation in *Leucanthemum vulgare* Lam. (Asteraceae) as influenced by heavy-metal containing slag. *Plant Soil* 59, 2461–2467.
- Saarela, J.; Toivonen, A.M.; Sorvajärvi, T.; Hernberg, R. (2009) Wavelength modulation waveforms in laser photoacoustic spectroscopy. *Applied Optics* 48, 743 - 747.
- Sands, D. (2005) Diode Lasers. IOP Publishing Ltd. Department of Physics - The University of Hull, UK. 457p.
- Santa-Catarina, C., Silveira, V., Scherer, G. F. E., Floh, E. I. S. (2007) Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture.* v.90, p. 93-101.
- Santala, K.R. and Ryser, P. (2009) Influence of heavy-metal contamination on plant response to water availability in white birch, *Betula papyrifera*. *Environmental and Experimental Botany*, 66 334–340.
- Santos, M. J. C., Nascimento, A. V. S., Mauro, R. A. (2008) Germinação do amendoim bravo (*Pterogyne nitens* Tul) para utilização na recuperação de áreas degradadas. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias.* 3(1), 31- 34.

- Schilt, S., Thevenaz, L., Robert, P. (2003) Wavelength modulation spectroscopy: combined frequency and intensity laser modulation, *Appl. Opt.* 42(33), 6728-6738.
- Schilt, S., Thévenaz, L. (2005) Wavelength modulation photoacoustic spectroscopy: Theoretical description and experimental results. *Infrared Physics and Technology* 48, 154 - 162.
- Schilt, S., Thévenaz, L., Niklues, M., Emmenegger, L., Häuglin, C. (2004) Ammonia monitoring at trace level using photoacoustic spectroscopy in industrial and environmental applications. *Spectrochim. Acta, Part A* 60(14), 3259-3268.
- Schilt, S., Besson, J. P., Thévenaz, L. (2005) Methane monitoring by near infrared photoacoustic spectroscopy: The importance of relaxation phenomena. *J. Phys. IV* 125, 7-10.
- Schmidt, H.H.H.W., Kelm, M. (1996) Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. In: Feilisch, M., Stamler, J.S. (Eds.), *Methods in Nitric Oxide Research*. Wiley, pp. 491–497.
- Schmohl, A., Miklós, A., Hess, P. (2001) Effects of adsorption–desorption processes on the response time and accuracy of photoacoustic detection of ammonia, *Applied Optics*. 40, 2571-2578.
- Schrier-Uijl, A. P., Kroon, P. S., Leffelaar, P. A., van Huissteden, J. C. Berendse, F., Veenendaal, E. M. (2010) Methane emissions in two drained peat agroecosystems with high and low agricultural intensity. *Plant and Soil*, 329, 509-520.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Tavera, H.L., Avudainayagam, S. (2005) Chromium toxicity in plants. *Environ. Intern.* 31, 739–753.
- Shibuki, K. (1990) An electrochemical microprobe for detecting nitric-oxide release in brain-tissue. *Neuroscience Research*. 9, 69–76.
- Sigrist, M.W. (2003) Trace gas monitoring by laser photoacoustic spectroscopy and related techniques (plenary). *Rev. Sci. Instrum.* 74, 486 – 490.
- Silveira, V., Santa-Catarina C., Tun, N.N., Scherer, G. F.E., Handro W., Guerra, M. P., Floh E. I.S. (2006) Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. *Plant Sci* 171:91–98
- Spongberg, A. L., Hartley, L., Neher, D.A., Witter, J. (2008) Fate of Heavy Metal Contaminants in a Former Sewage Treatment Lagoon, Hancock County, Ohio. *Soil & Sediment Contamination*. 17, 619–629.

- Syvertsen, J.P., Lloyd, J. McConchie, C., Kriedemann P.E., Farquhar, G.D. (1995) On the relationship between leaf anatomy and CO<sub>2</sub> diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell and Environment*. 18, 149 – 157.
- Su, Y., Han, F. X., Sridhar, B.B. M., Monts, D. L. (2005) Phytotoxicity and phytoaccumulation of trivalent and hexavalent chromium in brake fern. *Environ. Toxicol. and Chem.* 24, 2019-2026.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010) *Plant physiology - A Textbook*, 5th Edition, Sinauer Association Inc. 649-671.
- Thöny, A. Sigrist, M. W. (1995) Novel photoacoustic Stark cell. *Rev. Sci. Instrum.* 66(1), 227 – 231.
- Tittel, F. K., Bakhirkin, Y., Curl, R. F., Kosterev, A. A., Lewicki, R., McCurdy, M., So, S., Wysocki, G., Maulini, R., Faist, J., Diehl, L., Troccoli, M., Cappasso, F. (2006) High Resolution Spectroscopy and Trace-Gas Detection with State of-the Art Thermoelectrically-Cooled cw Mid-Infrared Quantum Cascade Lasers. The 2nd International Workshop on Quantum Cascade Lasers, Brindisi, Italy, Sept. 6–9.
- Tittel, F.K.; Richter, D.; Fried, A. (2003) Solid-state mid infrared laser sources, in *Mid-Infrared Laser Applications in Spectroscopy*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Tiwari, K.K., Dwivedi, S., Singh, N.K., Rai, U.N., Tripathi, R.D. (2009) Chromium (VI) induced phytotoxicity and oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.): biochemical changes and translocation of essential nutrients. *Journal of Environmental Biology*. 30, 389-394.
- Tsikas, D., Mitschke, A., Gutzki, F.-M., Engeli, S., Jordan J. (2010) Evidence by gas chromatography–mass spectrometry of ex vivo nitrite and nitrate formation from air nitrogen oxides in human plasma, serum, and urine samples. *Analytical Biochemistry*. 397, 126 - 128.
- Tsikas, D. (2004) Measurement of nitric oxide synthase activity in vivo and in vitro by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 279, 81-103.
- Tsuji, H., Gupta, A. K., Hasegawa T., Katsuki, M., Kishimoto, K., Morita, M., (2003) High temperature air combustion: from energy conservation to pollution reduction. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- Tun, N.N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Scherer, G. F. E., Floh, E. I. S., (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol*. 47, 346–354.

- Uchida, A., Jagendorf, A. T., Hibino, T., Takabe, T., Takabe, T. (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*. 163, 515 – 523.
- Ünyayar, S., Çelik, A., Çekiç, F.O., Gözel, A. (2006) Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*. 1 – 5.
- Valentovicová, K., Halušková, L., Huttová, J., Mistrík, I., Tamás, L. (2010) Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips. *Plant Physiol*. 167, 10–14.
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B., Singh, S.N. (2000) Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* 41, 1075–1082.
- Van Assche, F., Clijsters, H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment*, 13, 195-206.
- Van Kooten, O., Snel, J. F. H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*. 25, 147-150.
- Vassilev, A., Berova, M., Zlatev, Z. (1998) Influence of Cd<sup>2+</sup> on growth, chlorophyll content and water relations in young barley plants. *Biologia Plantarum*, 41, 601-606.
- Veres, A., Bozóki, Z., Mohácsi, A., Szakáll, M., Szabó, G. (2003) External cavity diode laser based photoacoustic detection of CO<sub>2</sub> at 1.43 mm: the effect of molecular relaxation. *Applied Spectroscopy*, 57(8): 900-905.
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A. (2007) Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere* 68, 1563–1575.
- Vitecek, J., Reinohl, V., Jones, R.L. (2008) Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells. *Molecular Plant*. 1, 270–284.
- Vitória, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A. (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57, 701–710.
- Xiong, J., Fu, G., Tao, L., Zhu, C. (2010) Review: Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 497, 13–20.
- Walford G. e Loscalzo J. (2003) Nitric oxide in vascular biolog. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1(10): 2112-2118.

- Wang, C.X., Mo, Z., Wang, H., Wang, Z.J., Cao, Z.H. (2003) The transportation, time-dependent distribution of heavy metals in paddy crops. *Chemosphere* 50, 717–723.
- Weaver, J., Porasuphatana, S., Tsai, P., Budzichowski, T., Rosen, G.M. (2005) Spin trapping nitric oxide from neuronal nitric oxide synthase: a look at several iron–dithiocarbamate complexes. *Free Radical Research*. 39, 1027–1033.
- Webber, M. E., MacDonald, T., Pushkarsky, M. B., Patel, C. K. N., Zhao, Y., Marcillac, N., Mitloehner, F. M. (2005) Agricultural ammonia sensor using diode lasers and photoacoustic spectroscopy," *Meas. Sci. Technol.* 16, 1547-1553.
- Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313.
- Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D.F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signaling and defense responses. *Current Opinion in Plant Biology.* 7, 449-455.
- Wysocki, G., Kosterev, A. A., Tittel, F. K. (2005) Spectroscopic trace-gas sensor with rapidly scanned wavelengths of a pulsed quantum cascade laser for in situ NO monitoring of industrial exhaust systems. *Appl. Phys. B* 80, 617-625.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 35, 155–189.
- Zazo, J.A., Paull, J.S., Jaffe, P.R. (2007) Influence of plants on the reduction of hexavalent chromium in wetland sediments. *Environ. Poll.* 157, 29-35.
- Zhang, F-Q., Wang, Y-S., Lou, Z-P., Dong, J-D. (2007) Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere.* 67, 44 – 50.
- Zilio, S. C. (2009) *Óptica Moderna - Fundamentos e aplicações*. São Carlos: Compacta, 300p.