

## 2 Fundamentos Teóricos

Durante o processo de excitação de uma molécula através da absorção de radiação luminosa, um elétron passa de um nível de energia mais baixo para um nível de energia mais elevado. Esse estado mais energético do elétron, porém, é muito instável e através de uma série de diferentes processos de decaimento, radioativos ou não-radioativos, a energia pode ser perdida trazendo o elétron de volta a um estado menos excitado ou ao seu estado fundamental. O processo de “perda” de energia caracterizado pela emissão de radiação luminosa é chamado de luminescência. Neste trabalho iremos investigar uma forma específica de luminescência que ocorre em curtíssimos períodos – da ordem de  $10^{-9}$  s a  $10^{-5}$  s – chamada fluorescência.

### 2.1. Processos de Decaimento Não-Radioativos

Durante a excitação de um elétron na passagem para um nível eletrônico mais elevado seu estado vibracional torna-se mais excitado. Porém, este estado vibracional tem uma duração muito pequena, pois, devido ao processo, não-radioativo, chamado relaxação vibracional, o elétron perde energia para o meio circundante através de colisões com as moléculas do solvente. Essas colisões aumentam ou diminuem em virtude da viscosidade do solvente.

Além do processo de relaxação vibracional a energia do elétron excitado pode ser perdida, ainda, através de outros processos não-radioativos, como a conversão interna – quando dois níveis eletrônicos se sobrepõem – e a conversão externa – quando o elétron passa de um nível mais excitado para um nível menos excitado sobreposto ao primeiro – ou cruzamento intersistema – quando ocorre uma transição de spin do estado.

No processo de relaxação vibracional, durante a excitação da molécula por um fóton, o elétron excitado pode receber energia maior que a energia necessária para realizar uma transição para o primeiro nível eletrônico excitado, porém menor que a energia necessária para o nível seguinte. Nesse caso, o elétron assumirá níveis vibracionais mais excitados no primeiro nível eletrônico excitado, mas essa energia vibracional é rapidamente perdida (da ordem de  $10^{-12}$  s) para o meio na presença de um solvente. Essa energia é perdida para o meio circundante devido às interações entre as moléculas do soluto e do solvente, o que resulta em um sutil acréscimo de temperatura do meio. A curta duração desses níveis vibracionais caracteriza uma menor emissão fluorescente nessa faixa de energia.

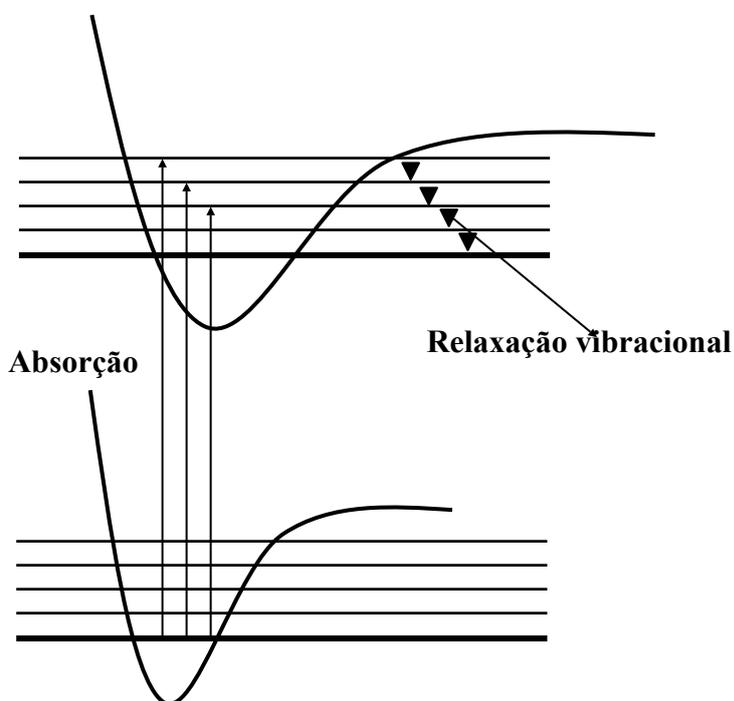


Figura 1 - Esquema de decaimento dos elétrons através do processo de relaxação vibracional.

## 2.2. Fluorescência

Como dito anteriormente o processo de luminescência está associado ao processo de absorção, uma vez que, a energia emitida pela molécula será a mesma, ou parte, da energia antes absorvida. Caracterizamos como fluorescência o processo de luminescência que ocorre entre  $10^{-9}$ s e  $10^{-5}$ s, se esta emissão ocorrer em intervalo superior a  $10^{-5}$ s caracterizamos o processo como fosforescência.

A capacidade fluorescente de algumas moléculas nos permite obter informações sobre certas características dessa molécula. A análise de moléculas através de técnicas de fluorescência é bastante atraente por não ser destrutiva ao mensurando e por sua alta sensibilidade. Técnicas de fluorescência são capazes de detectar um fóton, com limites de detecção de até três ordens de grandeza menores que os limites verificados nas técnicas de espectroscopia de absorção, que se baseia em uma redução da intensidade luminosa.

Como será visto com mais detalhe em 2.2.1, outra vantagem da técnica de fluorescência, reside na linearidade entre a concentração do fluoróforo – grupo de moléculas que emite radiação fluorescente – e a intensidade da emissão de fluorescência dentro de uma determinada faixa de concentração. Contudo, nem todas as moléculas que absorvem radiação são capazes de reemitir-la. A fluorescência é favorecida em moléculas com estruturas rígidas, pois estas diminuem a ocorrência de processos não-radioativos, como, por exemplo, o processo de conversão interna. Em contrapartida, a radiação absorvida pela molécula também influencia sua atividade fluorescente, pois quando esta absorve uma radiação muito energética (ex.: radiação ultravioleta com comprimentos de onda inferiores a 250 nm), não observamos, em geral, atividade fluorescente, pois o fóton associado a esta radiação pode causar a dissociação da molécula.

Segundo Sierra (1995) alguns fatores externos como a temperatura, que aumenta a probabilidade de colisões no estado excitado aumentando as conversões internas, e o solvente, podem influenciar a emissão fluorescente.

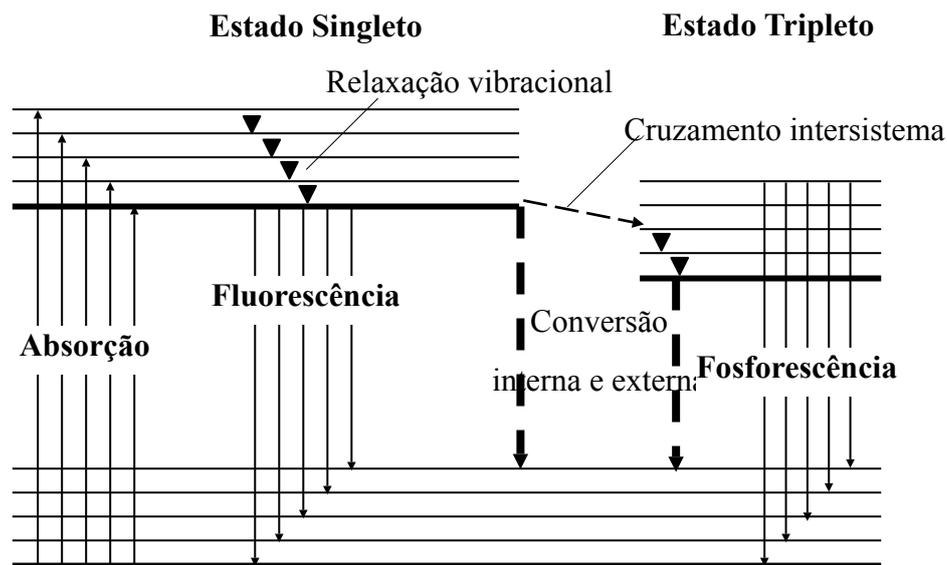


Figura 2 - Esquema da emissão radioativa por fluorescência de uma molécula após a absorção de radiação e diferentes processos de decaimento não-radioativo.

Após o processo de absorção os elétrons excitados na molécula já começam a declinar devido ao decaimento não-radioativo. A eficiência da fluorescência de uma molécula será a relação entre a taxa de decaimento radioativo e a taxa de decaimento não-radioativo dessa molécula.

A emissão fluorescente costuma ser menos energética que a radiação absorvida, isto deve-se ao fato de que logo após a absorção temos o decaimento não-radioativo através do processo de relaxação vibracional, ou seja, a emissão fluorescente costuma apresentar comprimentos de onda maiores que os da radiação absorvida. Contudo, apesar de apresentar menor incidência, a emissão fluorescente pode ocorrer com o mesmo comprimento de onda da radiação absorvida, sendo esta emissão conhecida como fluorescência ressonante.

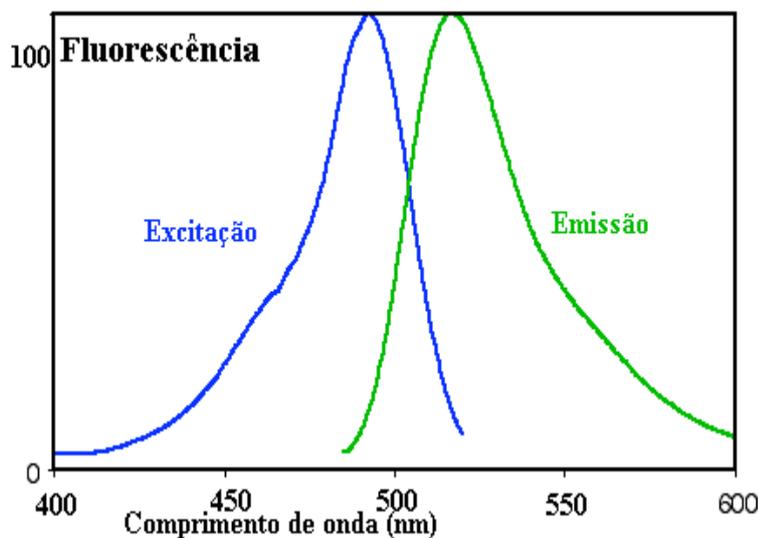


Figura 3 - Espectro de excitação e o espectro de emissão fluorescente correspondente a essa faixa de absorção.

A técnica de espectroscopia por fluorescência apresenta relação linear, dentro de determinada faixa de concentração, entre a concentração do fluoróforo e a intensidade de emissão fluorescente, conforme veremos a seguir.

### 2.2.1. Concentração do Fluoróforo

Uma importante característica da técnica de espectroscopia por fluorescência é a possibilidade de se estimar a concentração do fluoróforo medido através de sua emissão fluorescente. Para tal consideraremos que a emissão fluorescente de uma molécula depende da radiação absorvida ( $P_0 - P$ ). Isso nos possibilita escrever a seguinte relação:

$$F = K'(P_0 - P) \quad (1)$$

onde  $P_0$  é a potência do feixe incidente e  $P$  é a potência do feixe após atravessar um comprimento  $b$  do meio. A constante  $K'$  depende da “eficiência quântica” (Skoog & Leary, 1992) no processo de fluorescência.

Para obtermos uma relação entre a emissão de fluorescência  $F$  e a concentração do fluoróforo  $c$ , devemos escrever a lei de Beer na forma:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\epsilon bc} \quad (2)$$

onde  $\epsilon bc$  é a absorvância, sendo  $\epsilon$  o coeficiente de absorção e  $c$  a concentração das moléculas do mensurando.

A partir de (1) e (2), obtemos:

$$F = K'P_0(1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (3)$$

Cujo termo entre parênteses pode ser expandido em série de Taylor. Assim,

$$F = K'P_0 \left[ 2,303\epsilon bc - \frac{(2,303\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303\epsilon bc)^3}{3!} \dots \right] \quad (4)$$

Para valores de  $\epsilon bc < 0,02$ , termos de ordem maior podem ser desprezados.

Assim, (4) torna-se:

$$F = 2,303K'P_0\epsilon bc \quad (5)$$

Se utilizarmos uma potência incidente constante durante a medição poderemos, então, escrever (5) como:

$$F = Kc \quad (6)$$

cuja linearidade entre a emissão de fluorescência e a concentração é patente. Essa linearidade está associada a dois processos que aumentam sua incidência com o aumento da concentração: a auto-extinção<sup>1</sup> e a auto-absorção<sup>2</sup>.

Para as concentrações de clorofila a consideradas neste trabalho poderemos utilizar a relação estabelecida em (6), pois as medidas abordadas nos estudos aqui apresentados são referentes às medições no oceano, e, que segundo Falkowski & Kolber (1995) apresentam uma concentração média de clorofila a em torno de 0,2 µg/L.

### 2.3. Espalhamento Raman da Água

Nos espectros característicos das medições realizadas neste trabalho, temos o espalhamento Raman da água como a principal banda no espectro, tanto para as medições no laboratório quanto para as medições em campo.

O espalhamento resultante de um fóton incidente é dito elástico se não houver variação no seu comprimento de onda. Ele é conhecido como espalhamento de Rayleigh<sup>3</sup>. Mas se ao interagir com a molécula proporcionando variações no seu espectro (comprimento de onda) consideramo-lo inelástico. Portanto no espalhamento Raman<sup>4</sup> há a interação radiação-matéria, de modo que, a radiação retroespalhada contém fótons de maior energia (linha anti-Stokes) ou menor energia (linha Stokes) que os da excitação.

---

<sup>1</sup> A auto-extinção ocorre, como no processo de conversão externa, devido a colisões entre as moléculas do fluoróforo. Esse fenômeno proporciona efeitos mais significativos com o aumento da concentração de fluoróforo, isso devido ao aumento da probabilidade da ocorrência de colisões.

<sup>2</sup> A auto-absorção ocorre quando o pico de emissão se sobrepõe ao pico de absorção. Nesse caso, a emissão fluorescente é reabsorvida por outras moléculas ao atravessar a amostra, diminuindo a intensidade de fluorescência medida.

<sup>3</sup> *John William Strutt*, terceiro Barão de Rayleigh, nasceu em Langford Grove, Maldon, Essex, na Inglaterra, em 12 de novembro de 1842, publicou em 1871 sua teoria sobre o espalhamento da luz.

<sup>4</sup> Físico indiano que estabeleceu, em 1923, o fenômeno de espalhamento inelástico da luz através da matéria.

Segundo Barbosa (2003), podemos descrever o espalhamento Raman como a ação do campo elétrico da onda eletromagnética sobre as cargas elétricas do material.

O espalhamento Raman está associado à polarizabilidade da molécula, mesmo que esta não possua momento de dipolo. Através do desenvolvimento das equações que descrevem esta interação entre o campo elétrico e as cargas do material e concluído que o momento dipolo possui um termo associado à absorção no infravermelho, um termo que representa a absorção do espalhamento de

Rayleigh, é o termo  $E_{0j} \sum_n \left( q_{0n} \left( \frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_n} \right)_{q=0} \left\{ \cos[(\omega_n + \omega_L)t] + \cos[(\omega_n - \omega_L)t] \right\} \right)$  do

momento dipolo que é induzido pela luz e é proporcional à frequência de oscilação  $\alpha_{ij}$ , onde  $E$  é a intensidade do campo elétrico da radiação incidente,  $q_n$  são os deslocamentos atômicos de cada modo e as  $\alpha_{ij}$  a polarizabilidade. Se

$\left( \frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_n} \right)_{q=0} \neq 0$ , para determinado valor do par  $ij$ , aparecem dois termos correspondentes à reemissão de fótons. Estes são os espalhamentos Raman Stokes e anti-Stokes com energias associadas à diferença de energia dos modos vibracionais da molécula. Para explicar a diferença qualitativa entre as linhas Stokes e anti-Stokes recorreremos ao fato de a probabilidade de se gerar um fóton de maior energia que o fóton inicial depende da temperatura, pois requer que um elétron esteja em nível vibracional de maior energia. Sendo assim, a razão entre as linhas Stokes e anti-Stokes é dada pelo fator de Boltzmann ( $e^{(-h\nu/kT)}$ ).

O espalhamento Raman é um fenômeno de segunda ordem sendo, portanto, menos intenso. O sinal Raman é mais facilmente detectável para grandes quantidades de moléculas e/ou grandes intensidades da radiação incidente.

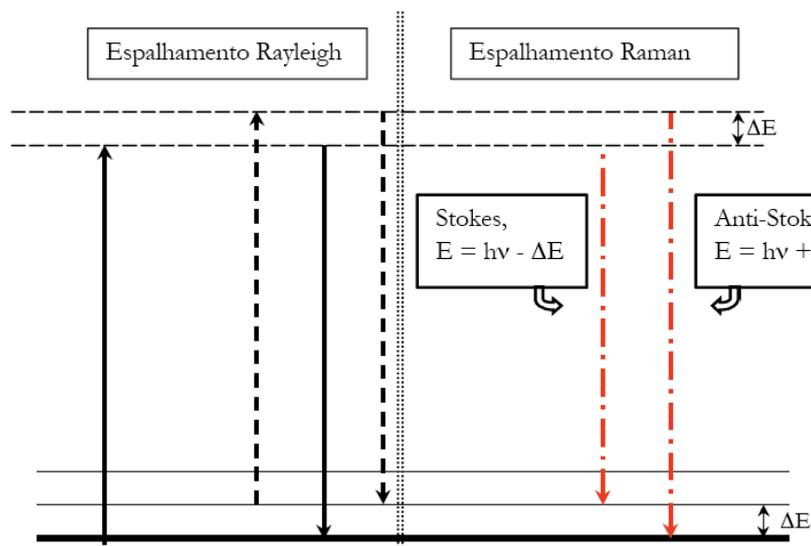


Figura 4 - Esquema dos espalhamentos Rayleigh e Raman.<sup>5</sup>

### 2.3.1.

#### Varição da posição do máximo do espalhamento Raman com a temperatura

A banda referente ao espalhamento Raman da água trata-se da resultante de duas outras bandas associadas ao espalhamento dos monômeros – moléculas de água isoladas – e o espalhamento dos polímeros – moléculas de água ligadas pelas forças de Van der Waals. A energia de vibração destes compostos é levemente diferente e, por esse motivo, ocasionam uma pequena diferença no deslocamento de Stokes do espalhamento Raman de cada composto.

Segundo Barbosa (2003), as posições dos máximos do espalhamento dos monômeros e dos polímeros dependem da temperatura da água. Quanto maior for a temperatura da água, maior será a energia do sistema, diminuindo, desta forma, a formação de pontes de hidrogênio.

A salinidade é outro fator que influencia no equilíbrio destes compostos. O aumento da concentração de sal na água contribui, também, para a diminuição do número de pontes de hidrogênio.

<sup>5</sup> Figura obtida em (Barbosa, 2003)

Variando a temperatura de uma amostra de água, a uma salinidade constante, de 0 °C a 60 °C, gradativamente, foi medido, com o LIDAR, o espalhamento Raman da água, obtendo-se o gráfico de correlação entre a posição do máximo do Raman e a temperatura da amostra, como pode ser observado na figura 5.

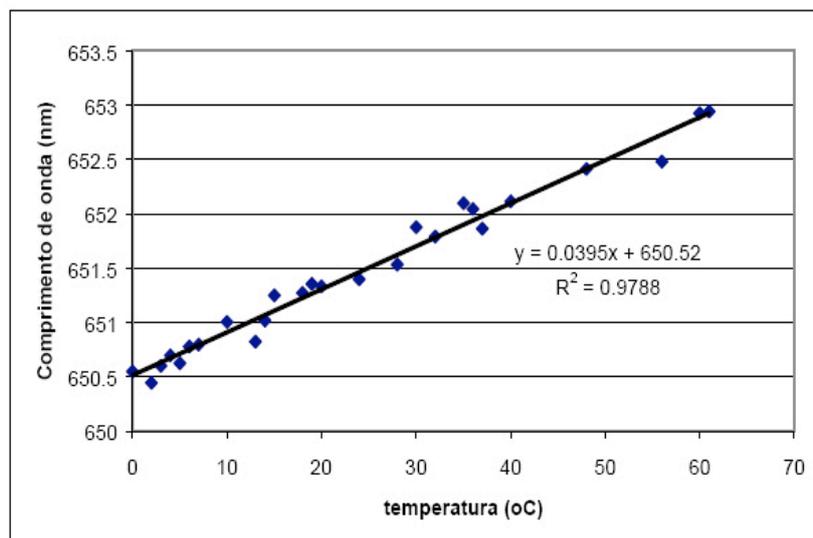


Figura 5 - Relação entre a posição do máximo da gaussiana ajustada à banda do espalhamento Raman e a temperatura da água.<sup>6</sup>

## 2.4.

### Fotossíntese

O termo fotossíntese significa literalmente construção ou síntese pela luz. Na acepção comum, fotossíntese é o processo através do qual as plantas sintetizam compostos orgânicos a partir de matéria-prima inorgânica na presença da luz solar. Assim dizemos que as plantas, de maneira geral, são autotróficas, ou seja se auto-alimentam, enquanto que os animais são heterotróficos.

As algas, as plantas superiores e certas bactérias captam essa energia diretamente da radiação solar e a utilizam para síntese de alimentos essenciais. Na fotossíntese, o processo químico principal consiste na conversão de dióxido de

<sup>6</sup> Curva obtida em (Barbosa, 2003).

carbono e água em carboidratos e oxigênio. A reação pode ser representada pela figura 6.

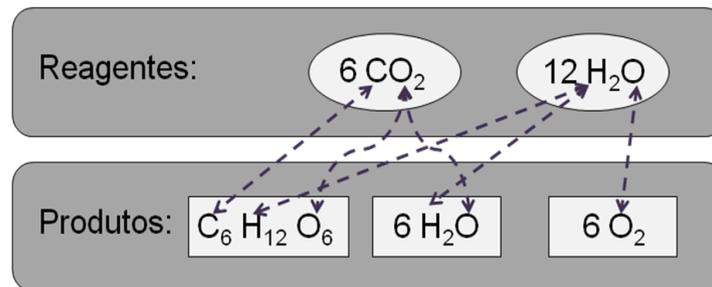


Figura 6: Reagentes e produtos da fotossíntese.

Os carboidratos formados possuem mais energia do que as matérias-primas  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Graças à energia solar, os compostos pobres em energia são convertidos em compostos ricos em energia. Portanto a fotossíntese pode ser considerada como um processo de conversão da energia radiante do Sol em energia química dos tecidos vegetais.

A Fotossíntese está muito ligada a Respiração e, de maneira geral, há um balanço entre estes dois processos na biosfera. Tanto a fotossíntese quanto a respiração geram energia química utilizável, na forma de ATP, cuja molécula pode ser observada na figura 7.

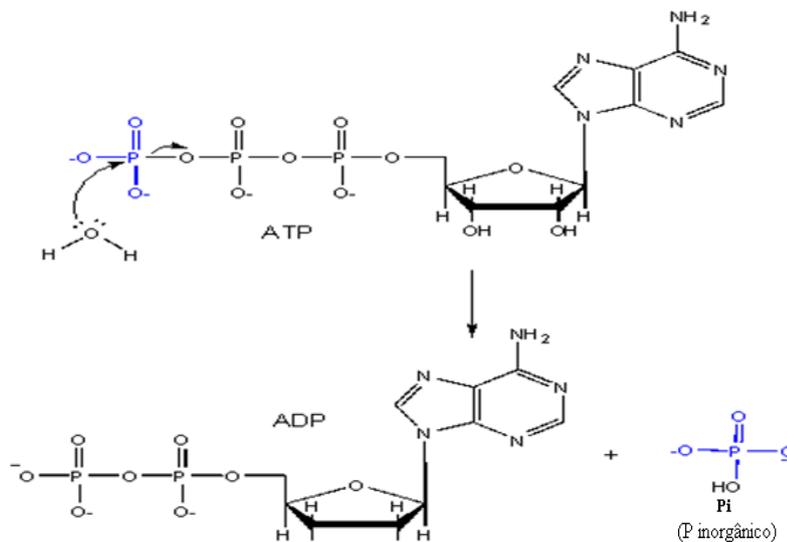


Figura 7: Estrutura da molécula de ATP.

A respiração aeróbica envolve a oxidação de moléculas orgânicas em  $\text{CO}_2$  com redução do  $\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e dissipação de energia em forma de calor. A fotossíntese envolve dois processos ligados: a oxidação de  $\text{H}_2\text{O}$  em  $\text{O}_2$  mediada pela luz e produção de ATP – fase luminosa – e a redução do  $\text{CO}_2$  em moléculas orgânicas, onde o ATP é utilizado – fase escura.

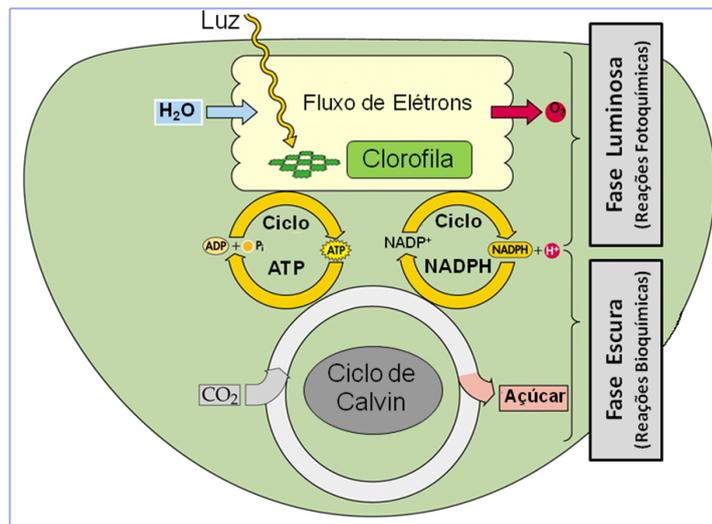


Figura 8: Visão geral da fotossíntese.

#### 2.4.1.

#### Fatores Limitantes da Fotossíntese

O rendimento da fotossíntese em dada planta depende de certo número de fatores internos e externos. Os principais fatores internos são a estrutura da folha e seu teor de clorofila, o acúmulo de produtos da fotossíntese dentro dos cloroplastos – que são tipos de plastídios que contêm pigmentos, a influência de enzimas protoplasmáticas e a presença de diminutas quantidades de constituintes minerais. Os fatores externos são a qualidade e quantidade de luz incidente nas folhas, a temperatura do ambiente e as concentrações de dióxido de carbono e oxigênio na atmosfera que envolve a planta.

Estes fatores interferem na eficiência e, portanto, na intensidade emissão fluorescente, que é objeto de análise do sistema LIDAR.

Tabela 1: Quadro com os principais fatores limitantes da fotossíntese e do metabolismo das plantas.

<b>Processo Celular</b>	<b>Fatores Limitantes</b>
Fotossíntese	Luz Carbono – CO <sub>2</sub> ou bicarbonato
Metabolismo	Nitrogênio Fosfato Silicato Metais: ferro e magnésio Vitaminas
	<b>Fatores Controladores</b> Temperatura pH

#### 2.4.2. O Aparelho Fotossintético

O aparelho fotossintético é aquela parte da célula da folha que contém os ingredientes necessários para a absorção de luz e canalização da energia da moléculas de pigmentos excitadas para uma série de reações químicas e enzimáticas. Todos os organismos fotossintéticos contêm um ou mais pigmentos orgânicos capazes de absorver radiação visível que iniciará as reações fotoquímicas da fotossíntese. As três principais classes de pigmentos encontrados em plantas e algas são as clorofilas, os caratenóides e as ficobilinas. Os caratenóides e as ficobilinas são chamados de pigmentos fotossintéticos acessórios, uma vez que os quanta absorvidos por esses pigmentos podem ser transferidos para as clorofilas, que são as principais responsáveis pela captação de luz. Embora os pigmentos caratenóides possam auxiliar na coleta da luz de diferentes comprimentos de onda, sua principal função é a de antioxidante, prevenindo danos fotooxidativos às moléculas de clorofila. Sem os caratenóides, não haveria a fotossíntese na presença de oxigênio. Esses pigmentos acessórios

absorvem a luz em regiões diferentes da clorofila possibilitando uma absorção da luz em toda região do visível, conforme podemos observar na figura 9.

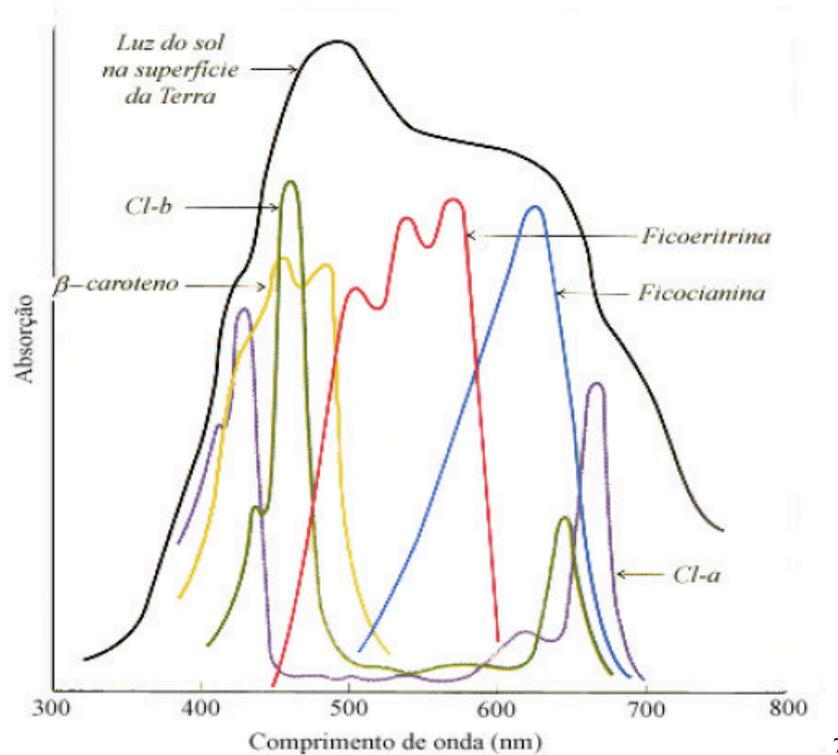


Figura 9: Espectros de absorção das clorofilas e outros pigmentos acessórios comparados ao espectro da luz solar, na região do visível, que atinge a superfície da Terra.

O conhecimento a respeito da estrutura celular na qual se localiza a fotossíntese foi conseguido através de estudos com microscópios ópticos e eletrônico e com o emprego de técnicas de fracionamento celular. Nas algas verdes e plantas superiores a clorofila está contida num plastídio celular chamado cloroplasto.

São organelas com 3-10  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,5-2  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Uma célula pode conter até 200 cloroplastos. Internamente o cloroplasto é composto de um sistema de lamelas, os tilacóides que em certas regiões verdes densa se dispõem em pilhas chamadas grana ou *granum*. Cada lamela de cloroplasto pode conter duas membranas duplas. Os granas são envolvidos por uma matriz incolor

<sup>7</sup> Figura obtida por (Barbosa, 2003)

chamada estroma, e todo o cloroplasto é circundado por uma membrana delimitante dupla, o envoltório ou envelope do cloroplasto. No interior do cloroplasto os granas são interligados por um sistema frouxo de membranas, as lamelas do estroma.

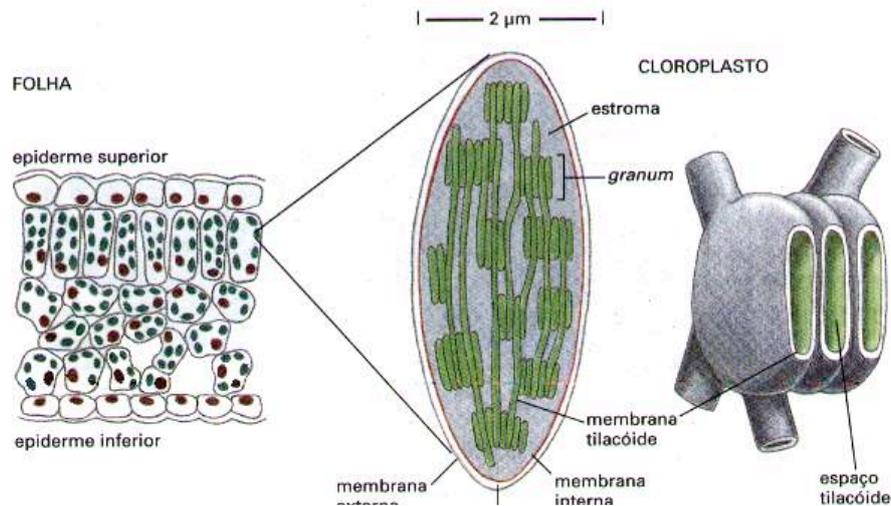


Figura 10: Estruturas internas dos cloroplastos.

A estrutura lamelar é encontrada tanto em cloroplastos de plantas superiores como de algas. Nas algas a forma dos cloroplastos é muito variada. As algas azuis, consideradas mais primitivas, não contêm cloroplastos como nas algas verdes, vermelhas e pardas. O material fotossintético presente nesses organismos consiste de camadas paralelas de membranas lamelares dispostas através do citoplasma.

As membranas lamelares nas quais a clorofila se encontra têm na sua composição química, aproximadamente, metade de lipídios e metade de proteínas. As proteínas catalisam as reações enzimáticas e dão resistência mecânica às membranas, enquanto a presença de lipídios facilita o armazenamento energético e oferece permeabilidade seletiva a açúcares, sais, substratos, etc. A conversão de energia luminosa e as reações associadas do transporte de elétrons da fotossíntese ocorrem nas lamelas. O estroma contém muitas proteínas solúveis, incluindo as enzimas do ciclo de Calvin - Benson, responsáveis pela etapa escura da redução

do  $\text{CO}_2$  a carboidratos. Resumidamente dois estágios sequenciais ocorrem nos cloroplastos: a) Primeiro, a luz com certos comprimentos de onda são capturadas e convertidas em energia química por uma série de passos chamados de reações de luz ou reações luminosas ou ainda fase clara. Essas reações são processadas nas membranas internas do cloroplasto (tilacóides). b) Segundo, o  $\text{CO}_2$  é fixado e reduzido à compostos orgânicos, particularmente açúcares, por uma série de passos chamados de reações no escuro ou fixação de  $\text{CO}_2$  ou ainda fase escura. Esse processo ocorre na matriz fluída do cloroplasto (estroma).

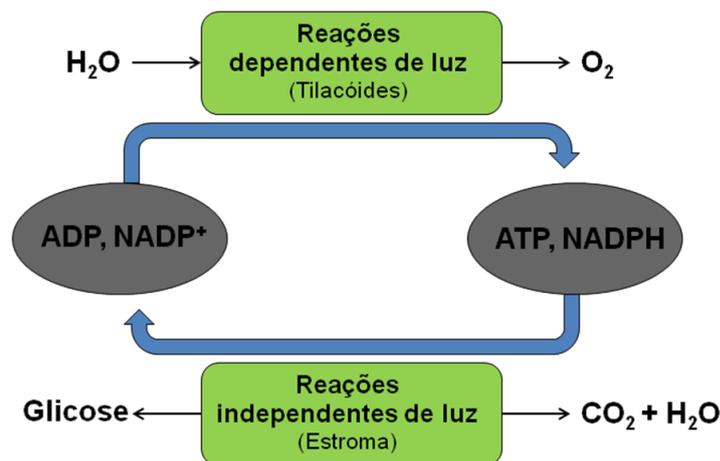


Figura 11: Reações da Fotossíntese – reação dependente de luz, onde a energia luminosa é convertida em energia química de moléculas como ATP e NADPH; reação independente de luz, onde a energia molecular é utilizada na produção de moléculas de açúcar.

### 2.4.3.

#### Fotofosforilação

A fotofosforilação, que corresponde à fase luminosa, ocorre na membrana tilacóide. Os componentes diversos do sistema de fotofosforilação organizam-se em estruturas bem definidas, provendo a síntese de ATP e NADPH, indispensáveis à fixação de dióxido de carbono.



Figura 12: Reações que originam as moléculas de ATP e NADPH.

Evidências indicam que, nesta etapa, estão envolvidos dois fotossistemas, formados por pigmentos e denominados fotossistema I (FS1) e fotossistema 2 (FS2). O FS1 contém: clorofila  $a$ , clorofila  $b$ , carotenóides e um pigmento chamado P-700. A clorofila  $a$  no FS1 absorve energia luminosa em comprimentos de ondas elevados. O FS2 contém um centro de reação que é um complexo constituído de proteínas de membranas, várias moléculas de clorofila  $a$ , entre as quais se inclui o P680, duas moléculas de feofitina, duas ou três moléculas de plastoquinona e um átomo de ferro não hêmico. No FS2, a clorofila  $a$  absorve luz em comprimentos de onda menos elevados. Ambos sistemas possuem elétrons capazes de serem excitados por energia de comprimentos de onda maiores que 680 e 600 nm para o FS1 e o FS2, respectivamente. Estes sistemas operam em série, em conexão um com o outro por meio de uma cadeia de transporte de elétrons e em associação com a fotólise da água. Este processo denomina-se fotofosforilação não cíclica.

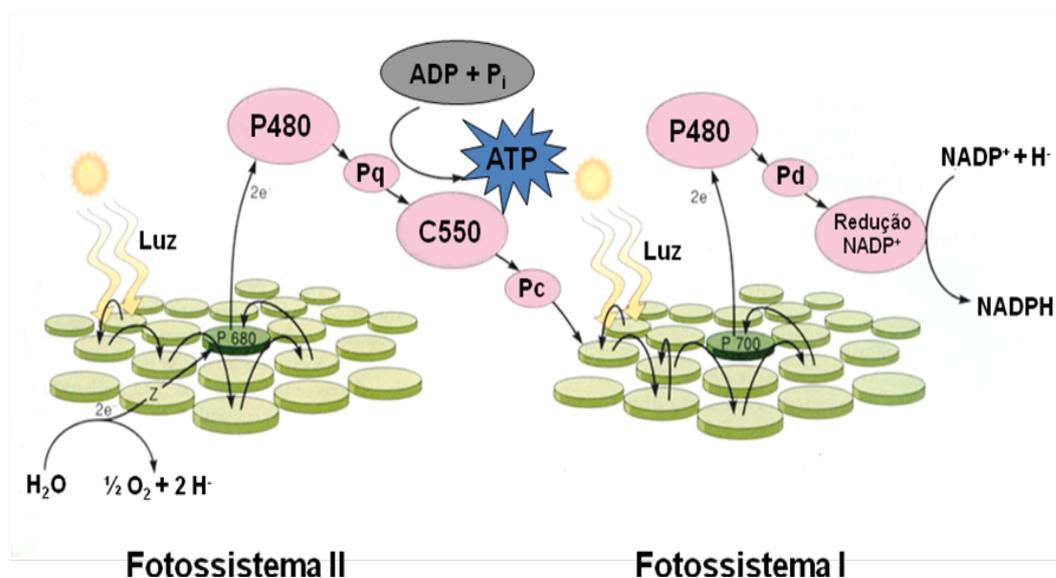


Figura 13: Diagrama simplificado do transporte de elétrons acíclico (não cíclico) no cloroplasto. Há dois centros de reação: PSI e PSII. Os elétrons são extraídos da água pelo PSII, transferidos para o PSI através de uma cadeia de transferência de elétrons e finalmente para o NADP+.

Pela ação da luz, elétrons do FS1 são excitados, o que leva o potencial do sistema a um valor tal que capacita a reduzir o pigmento P430, que é o receptor primário de elétrons. Os elétrons passam do pigmento P430 a uma cadeia de transportadores até o NADP<sup>+</sup> que é reduzido para NADPH. O FS1 torna-se deficiente de elétrons. Esta deficiência é suprida por elétrons originários do FS2.

Elétrons deste último sistema ( $E_0 = +1,0$  Volt) são excitados pela energia luminosa, o que faz o sistema adquirir um potencial adequado para reduzir o citocromo C550. Este último éceptor primário de elétrons do FS2. Os elétrons captados por este citocromo fluem para o FS1, passando por uma cadeia fotossintética de transporte de elétrons, constituída, em seqüência, por: citocromo b3, plastoquinona, citocromo e plastocianina. Em consequência, o P680 do FS2 torna-se deficiente em elétrons. A reposição de elétrons no P680 provenientes da degradação da água que ocorre em um complexo liberador de oxigênio presente também no FS2 e envolve, provavelmente, íons manganês e cloreto. Os elétrons, ao percorrerem a cadeia de transportadores, com potenciais de redução crescentes de C550 ao FS1, ocasionam a liberação de energia livre. Essa energia livre é utilizada no processo de fosforilação do ADP e consequente síntese de ATP.

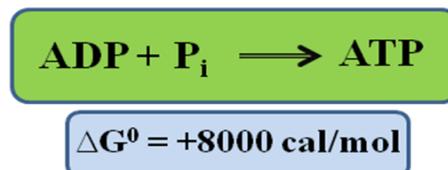


Figura 14: Reação de síntese de ATP.

Como se observa, a síntese de ATP está associada a um processo não cíclico, daí o nome de fotofosforilação ou fosforilação fotossintética não cíclica.

Outro tipo de fotofosforilação, onde atua somente o FS1, elétrons do FS1, excitados pela ação da luz, reduzem o pigmento P430. Os elétrons passam, então, por uma série de intermediários, retornando ao FS1. Nesta cadeia de transporte de elétrons, há liberação de energia capaz de promover a síntese de ATP, a partir de ADP e Pi. A síntese de ATP ocorre em um circuito fechado. Este processo chama-se fotofosforilação cíclica.

Portanto, no fluxo não cíclico de elétrons, há síntese de ATP e de NADPH e formação de oxigênio. Este processo ocorre em vegetais, envolvendo os fotossistemas 1 e 2. No fluxo cíclico, em que opera somente o fotossistema 1, há apenas produção de ATP.

#### 2.4.4. Ciclo de Calvin

O ATP e NADPH formados durante as fotofosforilações são utilizados na redução  $\text{CO}_2$  para produção de glicose e outros produtos de redução na fase escura da fotossíntese. A partir da glicose, são formados os polissacarídios como celulose e o amido. Calvin e colaboradores, após inúmeras experiências incubando suspensões de algas *Scenedesmus* e *Chlorella*, em presença de  $^{14}\text{CO}_2$ , propuseram, para explicar a redução do  $\text{CO}_2$ , uma sequência de reações que recebeu o nome de ciclo de calvin. Conhecida também como ciclo de redução do carbono, esta sequência apresenta como substância chave a 1,5-difosforribulose. Esta fixa  $\text{CO}_2$ , originando em cetoácido que se hidrolisa com produção de 3-fosfoglicerato. A enzima que catalisa estas reações é a carboxidismutase. O fosfoglicerato é então fosforilado, numa reação que consome ATP formando-se 1,3-difosfoglicerato.

O  $\text{CO}_2$  fixado, agora sob a forma de carboxila, sofre redução pelo NADPH, numa reação catalisada pela 3-fosfogliceraldeído-desidrogenase. Segue-se uma série de reações que leva à regeneração do 1,5-difosforribulose completando-se assim o ciclo. A formação de glicose dá-se a partir de 6-fosfofrutose, conforme indicado na sequência seguinte:



Quando se consideram todos os átomos de carbono da glicose como provenientes do  $\text{CO}_2$  devem-se admitir seis voltas pelo conjunto de reações que constituem o Ciclo de Calvin. Neste caso pode-se escrever como balanço final da sequência, a equação:

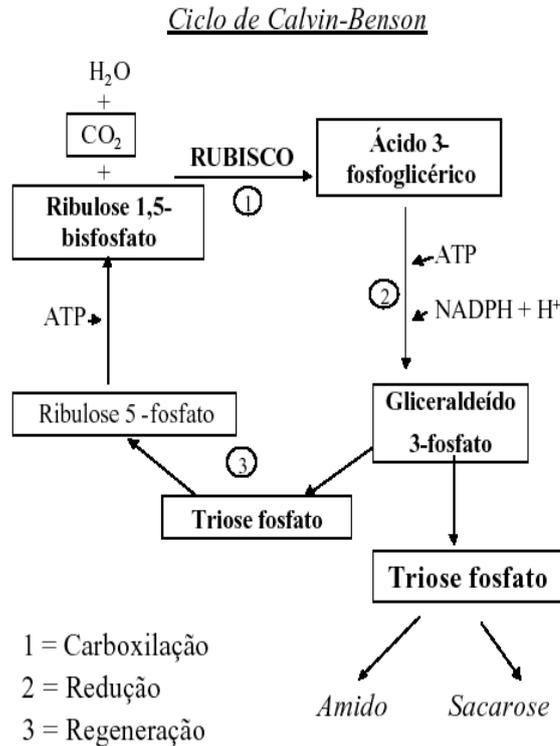
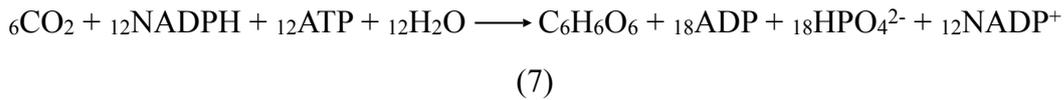


Figura 15: Ciclo de Calvin - Benson

## 2.5.

### Normalização do sinal de fluorescência pelo espalhamento Raman da água

Para que possamos estabelecer uma inter-relação entre a intensidade de fluorescência medida em diferentes espectros no LIDAR devemos estabelecer um parâmetro, dentro do próprio espectro, de referência. Esse parâmetro deve levar em consideração os diversos fatores ambientais aos quais o fluoróforo é submetido.

Para medições em água o espalhamento Raman da água funciona muito bem como fator de normalização das diferentes bandas associadas aos fluoróforos medidos. Segundo Barbosa (2003) a partir das equações de concentração das moléculas do fluoróforo e da concentração das moléculas de água podemos

estabelecer uma simples relação que nos permite associar às concentrações do fluoróforo em unidades Raman.

$$c_f = \frac{C \times P_F}{\sigma_F \times P_R} \quad (8)$$

onde  $c_f$  é a concentração relativa de fluoróforos na coluna d'água considerada. Sendo considerado águas cujo material particulado mude apenas sua concentração e não sua composição. Em sistemas onde  $\sigma_F$  (correspondente a seção de choque efetiva da clorofila **a** para a banda de fluorescência centrada em  $F$  quando excitada em  $\lambda = L$  ( $m^2/mg$ )) pode ser considerado constante, a concentração de clorofila **a** é diretamente proporcional à razão da intensidade da fluorescência da clorofila pela intensidade do espalhamento Raman.

Como o espalhamento Raman é um efeito de segunda ordem sua intensidade é muito baixa necessitando, portanto, de altas concentrações da molécula analisada. No caso de uma solução de água do mar a maior quantidade de moléculas é de  $H_2O$ . Sendo, portanto, a vibração molecular  $O - H$  a responsável pelo principal sinal de espalhamento Raman. Sendo assim, para uma excitação em 532 nm a banda Raman corresponderá a um  $\lambda_{Raman} = 655$  nm.

A proximidade espectral da banda Raman da emissão fluorescente da clorofila **a** torna bastante adequada a utilização da banda Raman como um fator de normalização de emissão fluorescente, pois a banda Raman está associada ao volume de  $H_2O$  excitado pelo laser que é o mesmo volume que contém a clorofila. Assim devido a essa proximidade os demais fatores (absorção, espalhamento, etc.) serão similares para as duas emissões permitindo, desta forma, uma maior confiabilidade na determinação da concentração relativa.