

3 Aspectos Teóricos

3.1. Espalhamentos Inelásticos

Os sinais de interesse detectados em um espectro de um LIF-LIDAR são, basicamente, decorridos de espalhamentos inelásticos, isto é, interações onde há transferência de energia da radiação para a matéria ou, mais raramente (e, conseqüentemente, com menor intensidade), da matéria para a radiação. Neste capítulo estão descritos os dois espalhamentos inelásticos que serão determinantes na construção da instrumentação realizada: a fluorescência e a linha Stokes do espalhamento Raman da molécula de água.

3.1.1. Fluorescência

A absorção de um fóton por uma molécula, levando à excitação de um elétron a um estado eletrônico mais elevado é, em geral, acompanhada de uma transição de estado vibracional.

Como a massa dos núcleos é muito maior que a dos elétrons, aqueles podem ser considerados estáticos na escala do tempo da transição eletrônica (princípio de Frank-Condon). Com o elétron em um nível eletrônico mais energético, os núcleos irão reagir a esta nova configuração situando-se em um estado vibracional diferente (Figura 1). Formalmente temos

$$\bar{m}_{if} = \langle \Psi_{el}^i \Phi_v^i | \mathbf{m} | \Psi_{el}^f \Phi_v^f \rangle \approx m_{if} \langle \Phi_v^i | \Phi_v^f \rangle = m_{if} S_{vv'} ; \quad \text{Equação 1}$$

Onde $|S_{vv'}|^2 = |\langle \Phi_v^i | \Phi_v^f \rangle|^2$ são chamados de fatores de Frank-Condon, Φ representa a função de onda dos estados vibracionais, Ψ representa a função de onda dos estados eletrônicos e μ é momento de dipolo associado.

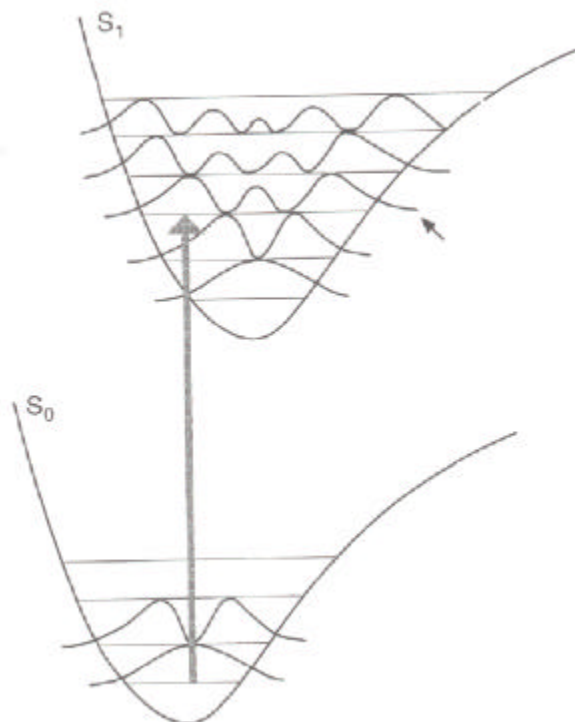


Figura 1 - A função de onda vibracional no estado eletrônico excitado com maior coincidência com a função de onda vibracional anterior, no estado fundamental, terá maior probabilidade de ocorrer.

Após a excitação a um estado vibracional mais excitado, a molécula tende a relaxar por meio da interação com o meio circundante.

A relaxação de um nível vibracional mais alto para o nível vibracional de mais baixa energia de um certo estado eletrônico pode ocorrer em 10^{-12} s (ou menos) em meios condensados. Processos de conversão interna, isto é, a passagem da molécula de um estado eletrônico de mais alta energia com nível vibracional de mais baixa energia para um estado eletrônico de mais baixa energia, mas com nível vibracional excitado, ocorrem também na escala de tempo de 10^{-12} s.

Decaimentos não-radiativos podem continuar a ocorrer até o estado fundamental (também por conversão interna). Esses decaimentos ocorrem em tempos que variam de 10^{-12} s a 10^{-6} s.

A taxa de decaimento radiativo situa-se em torno de 10^7 s⁻¹ a 10^8 s⁻¹ para uma transição óptica forte (alta taxa de decaimento radiativo). Como essas emissões ocorrem muito mais provavelmente do nível vibracional menos energético (10^{12} s⁻¹ para transições vibracionais contra 10^8 s⁻¹ para transições fluorescentes), portanto,

após haver ocorrido decaimentos não-radiativos, na maioria dos casos, a energia do fóton emitido é menor que a do fóton absorvido. A fluorescência de uma molécula é o decaimento de um estado excitado $|\Psi_{el}^{exc} \Phi_{v_0}\rangle$ para o estado fundamental por meio de emissão espontânea de um fóton.

A ocorrência de fluorescência em uma molécula (quando excitada por luz com um determinado comprimento de onda) está vinculada à comparação dos coeficientes de decaimento pelo(s) caminho(s) não-radiativo(s). A fluorescência acontece quando a taxa de decaimento radiativo é pelo menos comparável à taxa de decaimento não-radiativo.

Uma das características mais atrativas da espectroscopia de fluorescência é sua sensibilidade, se comparada com a espectroscopia de absorção. O limite de detecção das técnicas fluorimétricas é, em geral, de uma a três ordens de magnitude menor do que as de espectrofotometria de absorção. Seu limite de detecção está, tipicamente, na escala de partes por bilhão. Esta alta sensibilidade se deve à existência de detectores capazes de detectar um fóton (detectores *photon counting*). Já os detectores de espectroscopia por absorção se baseiam na detecção de uma redução da intensidade da radiação incidente, o que faz necessário medir radiações de grande intensidade que estão fora da faixa de operação dos dispositivos *photon counting*.

Outra vantagem acessória é a grande faixa de concentração do fluoróforo em que as medidas de intensidade guardam uma relação linear, simplificando assim o procedimento laboratorial de rotina. Igualmente importante, é o fato de os métodos de espectroscopia por fluorescência serem muito mais seletivos. Em contrapartida, esta técnica se limita a um número relativamente pequeno de estruturas moleculares que apresentam emissão fluorescente após a absorção de fótons.

A fluorescência ocorre tanto em sistemas químicos simples como complexos, sejam gases, líquidos ou sólidos. O tipo de fluorescência em que a radiação absorvida é reemitida sem alteração de frequência é chamada de fluorescência ressonante. As bandas de fluorescência molecular, contudo, encontram-se, muito mais freqüentemente, centradas em comprimentos de onda maiores (energias menores) que o da linha de ressonância.

A Figura 2 mostra esquematicamente as diferentes formas de decaimento para elétrons excitados. Duas dessas transições, a fluorescência e a fosforescência, são radiativas, pois envolvem a liberação de fótons. Porém, outras formas de transição não radiativas podem ocorrer.

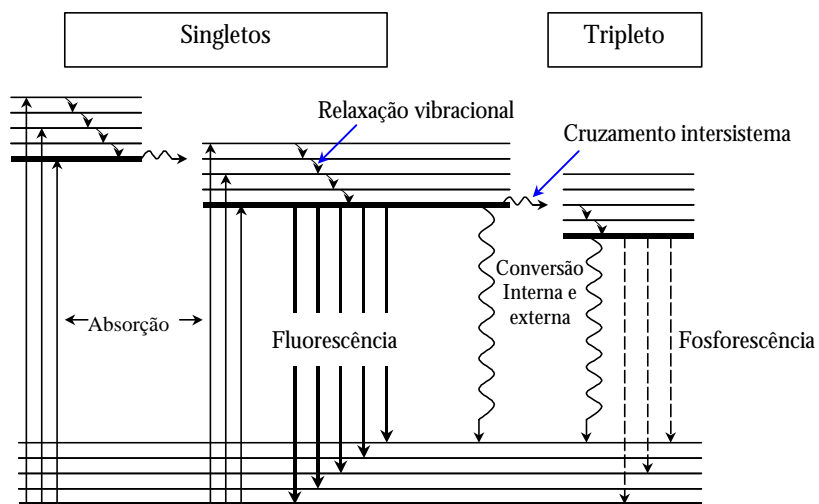


Figura 2 - Esquema de excitação e decaimento dos elétrons. Os níveis excitados à esquerda exemplificam estados singletos. O nível eletrônico excitado da direita representa um tripleto.

A Figura 3 mostra a outra alternativa de decaimento que ocorre quando a molécula em estado excitado troca seu spin total realizando um cruzamento intersistema do estado onde $S = 0$ (singlete) para um estado com $S = 1$ (triplete). Neste estado, o decaimento ao estado fundamental por emissão radiativa de um fóton de maior comprimento de onda é denominado fosforescência. Como a taxa de cruzamento intersistemas é baixa (até $10^1 s^{-1}$), fosforescência é um processo “lento”.

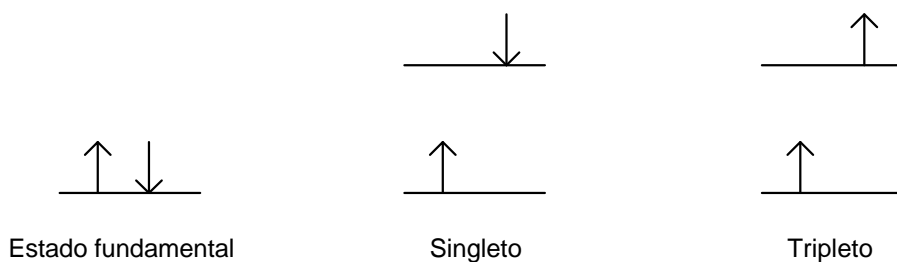


Figura 3 - Possibilidades de composição de spins para um par de elétrons

Os processos não radiativos para a desexcitação da molécula são a relaxação vibracional, a conversão interna, a conversão externa e o cruzamento intersistemas. Como descrito a seguir, esses processos podem competir com as transições radiativas ou mesmo complementá-las.

Relaxação vibracional: Uma molécula pode ser excitada a qualquer um dos níveis vibracionais dos níveis eletrônicos mais energéticos durante um processo de excitação eletrônica. Em um solvente, entretanto, este "excesso" de energia vibracional é muito rapidamente perdido para o meio, resultando em um pequeno acréscimo na temperatura deste e levando o elétron ao mais baixo nível vibracional do estado excitado. O processo de relaxação vibracional é tão eficiente que o tempo de vida dos níveis vibracionais é da ordem de 10^{-12} s ou menos. Desta forma, a banda de fluorescência associada a esta transição eletrônica, quando existente, ocorre a energias menores que da excitação inicial.

Conversão interna: Este fenômeno ocorre quando os níveis vibracionais de um estado eletrônico de mais baixa energia se superpõem, em energia, aos níveis vibracionais de outro estado eletrônico de maior energia para o qual o elétron foi excitado. Assim, o elétron pode decair para o estado eletrônico de menor energia de forma não radiativa. Esta conversão interna, além de impedir a emissão fluorescente, pode ser responsável pela pré-dissociação destas moléculas, uma vez que a transferência do elétron para um estado vibracional alto de um estado eletrônico menos energético pode provocar a ruptura da ligação molecular.

Conversão externa: A desativação de estados eletrônicos excitados podem envolver interações e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente ou outros solutos da solução. Esta conversão externa é experimentada quando se verifica o efeito na intensidade da fluorescência devido à mudança do solvente. Baixa temperatura e alta viscosidade, que diminuem a colisão entre partículas, geralmente levam a um aumento da fluorescência.

Cruzamento intersistemas: Este é o processo no qual o spin do elétron excitado é invertido e, por exemplo, permite a migração deste para um estado tripleto. Este processo é mais comum em moléculas contendo átomos pesados. As interações spin/órbita ficam mais fortes na presença de tais átomos e, desta forma, a mudança do spin é favorecida. A presença, na solução, de espécies paramagnéticas, tais como o oxigênio molecular, também promove o cruzamento intersistemas, diminuindo a fluorescência.

Estes mecanismos limitam a fotoluminescência a um número relativamente pequeno de sistemas. A rota mais favorável para o decaimento é aquela que minimiza o tempo de vida dos estados excitados. Desta forma, o decaimento por fluorescência será observado se o sistema apresentar características estruturais e ambientais que façam este decaimento rápido o suficiente em relação aos processos não radiativos.

A fluorescência raramente ocorre para excitações com radiação ultravioleta de comprimento de onda menor que 250nm (~5eV), pois tal radiação é constituída por fótons com energia suficiente para causar a desativação da molécula por dissociação ou pré-dissociação².

É observado empiricamente que a fluorescência é mais encontrada em compostos nos quais a transição de mais baixa energia é do tipo $\pi^* \rightarrow \pi$. Este fato pode ser compreendido pelo maior coeficiente de absorção deste tipo de transição que para transições do tipo $\pi^* \rightarrow n$ (da ordem de 100 a 1000 vezes maior).

Sabe-se empiricamente que moléculas que possuem estrutura rígida fluorescem mais. A falta de rigidez provavelmente causa um aumento na taxa de conversão interna diminuindo a fluorescência. Igualmente conhecido é o fato de que há um aumento da fluorescência quando corantes fluorescentes são adsorvidos em superfícies sólidas. Aqui também a rigidez estrutural, adicionada pela superfície, pode ser responsável pelo efeito observado. Outro fator de alteração da intensidade da fluorescência é a presença de oxigênio dissolvido. Neste caso, há, freqüentemente, a diminuição da fluorescência. Duas razões concorrem para este efeito: a ocorrência de indução fotoquímica da oxidação das espécies fluorescentes ou, o que é mais comum, o cruzamento intersistema,

² A pré-dissociação deve ser diferenciada da dissociação. Na dissociação, a radiação absorvida leva o elétron diretamente para um nível vibracional suficientemente energético para causar a ruptura da ligação. No caso da pré-dissociação, a radiação leva inicialmente o elétron a um nível eletrônico de mais alta energia. Posteriormente, por cruzamento intersistema, o elétron passa a um nível eletrônico baixo mas em um nível vibracional mais energético. A pré-dissociação ocorre quando este nível vibracional tem energia suficiente para causar a ruptura da ligação.

levando a molécula a um estado excitado tripleto, em virtude das propriedades paramagnéticas do oxigênio molecular.

Para o cálculo da concentração de um fluoróforo a partir de sua fluorescência, levamos em conta que a potência da radiação fluorescente é proporcional à radiação do feixe incidente que é absorvido pelo sistema. Isto é,

$$F = K'(P_0 - P); \quad \text{Equação 2}$$

onde P_0 é a potência do feixe incidente e P sua potência após atravessar um comprimento b do meio.

Para relacionar a potência da radiação fluorescente F com a concentração c do fluoróforo, escreve-se a lei de Beer na forma

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-ebc}; \quad \text{Equação 3}$$

onde e é o coeficiente de absorção e o produto ebc a absorbância A . Substituindo a Equação 3 na Equação 2 temos

$$F = K'P_0(1 - 10^{-ebc}); \quad \text{Equação 4}$$

expandindo o termo entre parênteses em série de Taylor obtemos

$$F = K'P_0 \left[2.303ebc - \frac{(2.303ebc)^2}{2!} + \frac{(2.303ebc)^3}{3!} \dots \right]; \quad \text{Equação 5}$$

Para valores de $ebc < 0.02$, todos os termos subseqüentes no colchete são pequenos quando comparados com o primeiro. Desta forma, utilizando-se apenas o primeiro termo, o erro da Equação 5 em relação à Equação 4 será de no máximo 2,5%. Quando a concentração de fluoróforos é pequena o suficiente para satisfazer esta condição, pode-se, então, escrever

$$F = 2,303K'P_0ebc = Kc; \quad \text{Equação 6}$$

Para a situação objeto desta tese, que envolve a determinação de clorofila a no mar, pode-se calcular até que concentração de clorofila a na água do mar, analisada em uma cubeta simples, com 1cm de largura, se enquadra a Equação 6 com um erro máximo de 2,5%. Utilizando um coeficiente de absorção típico [Campbell & Esaias, 1983] em torno de 0,05 l/(μ g.m), as concentrações até 45 μ g/l apresentam um erro máximo de 2,4%, o que satisfaz a condição para utilização da equação 2.5.

Na análise deste cálculo, vale acrescentar que outros dois fenômenos são capazes de produzir desvios nesta relação linear: a auto-absorção e a auto-extinção. A auto-absorção ocorre quando o comprimento de onda de emissão se sobrepõe ao pico de absorção do fluoróforo. Desta forma, a radiação emitida sofre um decréscimo na medida que atravessa a solução, pois uma parte é reabsorvida pelo fluoróforo. A auto-extinção ocorre por colisão entre os fluoróforos, provavelmente de uma maneira análoga à conversão externa. Os efeitos de ambos os fenômenos crescem com o aumento da concentração.

Para medidas realizadas diretamente sobre o mar é necessário levar em conta os múltiplos espalhamentos sofridos pela radiação, que irão afetar o total de luz disponível a cada profundidade. Modelos de transferência radiativas foram utilizados para desenvolver a relação da concentração de um fluoróforo em uma coluna de água do mar, quando medido por um LIDAR (neste caso, conforme descrito na Equação 12, é linear a relação entre a potência detectada da fluorescência e a concentração do fluoróforo). Segundo simulações modeladas por computador [Poole & Esaias, 1982], concentrações maiores que $1\mu\text{g/l}$ devem ser integradas em, no máximo, 3m. Deve-se também levar em conta que, segundo Falkowski [Falkowski & Kolber, 1995], o valor médio da concentração da clorofila a nos oceanos do mundo é de $0,2\mu\text{g/l}$.

3.1.2. Espalhamento Raman

A Figura 4 apresenta um espectro típico da radiação retroespalhada da água do mar. Em que pese a ocorrência de importantes bandas de fluorescência ao longo do espectro, o pico mais intenso deste espectro (excitado em 532nm) tem outra natureza.: é decorrente da emissão Raman da água.

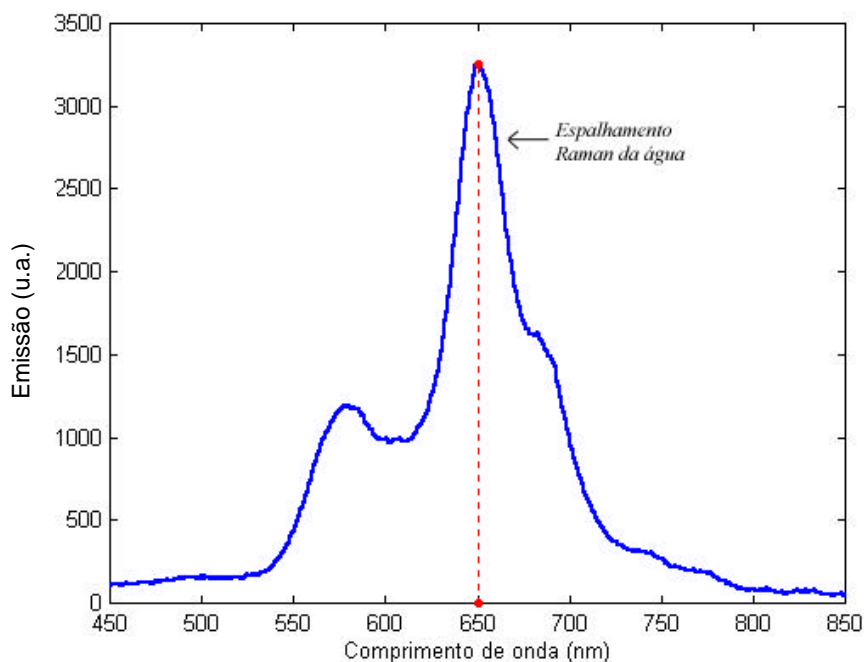


Figura 4 - Espectro de fluorescência de água costeira medido pelo LIDAR-PUC. O pico da emissão Raman está em 651nm (excitação em 532nm).

O espalhamento Raman é um espalhamento inelástico da radiação por um material, isto é, um quantum de energia (um fônon) é transferido entre o quantum de radiação e o material, de tal forma que a luz espalhada contém fótons com energia menor (linha Stokes) ou maior (linha anti-Stokes) que o da excitação.

Para descrever completamente o espalhamento Raman é necessário utilizar tanto a teoria de grupos como a teoria de perturbações de ordens superiores. Entretanto, é possível obter uma compreensão clássica do fenômeno considerando-o decorrente da ação do campo elétrico da onda eletromagnética sobre as cargas do material [Andrew & Demidov, 1995]. Ao contrário do processo de simples absorção, que requer a existência na molécula de um momento de dipolo elétrico, o efeito Raman está associado à polarizabilidade da molécula, mesmo que esta não possua momento de dipolo.

Considerando, por simplicidade, a interação da luz com uma única molécula, expressa-se o momento de dipolo desta molécula como:

$$P_i = \sum_{i,j,k,l,\dots} (p_i + \mathbf{a}_{ij} E_j + \mathbf{b}_{ijk} E_j E_k + \mathbf{g}_{ijkl} E_j E_k E_l + \dots); \quad \text{Equação 7}$$

onde i,j,k,l representam as coordenadas espaciais x, y e z e ΣE_i é o campo elétrico da radiação incidente. O termo p_i expressa a possibilidade de um momento de dipolo permanente. Dos componentes restantes, induzidos pela

presença do campo elétrico, vamos fixar nossa atenção sobre o termo linear em E. Os termos de ordens mais altas em E_i expressam processos (não-lineares), como o espalhamento hiper-Raman, e que não serão de interesse aqui.

Tanto o momento de dipolo p_i como a polarizabilidade α_{ij} podem variar no tempo, se a molécula vibra. Expandindo p_i e α_{ij} como séries de Taylor em termos das coordenadas generalizadas q_n , que descrevem os n modos vibracionais (q_n são os deslocamentos atômicos de cada modo) temos:

$$p_i = p_{0i} + \sum_n \left(\left(\frac{\partial p_i}{\partial q_n} \right)_{q=0} q_n \right); \quad \text{Equações 8}$$

$$\mathbf{a}_{ij} = \mathbf{a}_{0ij} + \sum_n \left(\left(\frac{\partial \mathbf{a}_{ij}}{\partial q_n} \right)_{q=0} q_n \right)$$

Considerando os deslocamentos q_n pequenos, pode-se aproximar a dependência temporal de q_n e escrever:

$$\begin{aligned} q_n(t) &= q_{0n} \cos(\mathbf{w}_n t); \\ E_i(t) &= E_{0i} \cos(\mathbf{w}_L t) \end{aligned} \quad \text{Equações 9}$$

Substituindo as Equações 8 e Equações 9 na Equação 7 (desprezando os termos de mais alta ordem) têm-se

$$P_i = \sum_{i,j,k,l,\dots} \left(\begin{aligned} & p_{0i} + \sum_n \left(\left(\frac{\partial p_i}{\partial q_n} \right)_{q=0} q_{0n} \cos(\mathbf{w}_n t) \right) + \mathbf{a}_{0ij} E_{0j} \cos(\mathbf{w}_L t) + \\ & + E_{0j} \sum_n \left(q_{0n} \left(\frac{\partial \mathbf{a}_{ij}}{\partial q_n} \right)_{q=0} \{ \cos[(\mathbf{w}_n + \mathbf{w}_L)t] + \cos[(\mathbf{w}_n - \mathbf{w}_L)t] \} \right) + \dots \end{aligned} \right);$$

Equação 10

O termo $\sum_n \left(\left(\frac{\partial p_i}{\partial q_n} \right)_{q=0} q_{0n} \cos(\mathbf{w}_n t) \right)$ está associado à absorção no infravermelho. O termo $\mathbf{a}_{0ij} E_{0j} \cos(\mathbf{w}_L t)$ representa a absorção associada ao espalhamento Rayleigh, na mesma frequência da radiação incidente. Finalmente, o termo $E_{0j} \sum_n \left(q_{0n} \left(\frac{\partial \mathbf{a}_{ij}}{\partial q_n} \right)_{q=0} \{ \cos[(\mathbf{w}_n + \mathbf{w}_L)t] + \cos[(\mathbf{w}_n - \mathbf{w}_L)t] \} \right)$ representa a parte

do momento de dipolo que é induzido pela luz e também é proporcional à frequência de oscilação de $\alpha_{i,j}$. Se $\left(\frac{\partial \mathbf{a}_{ij}}{\partial q_n}\right)_{q=0} \neq 0$ para determinado valor do par i,j , dois termos aparecem; correspondem à reemissão de fótons. Estes são os espalhamentos Raman Stokes e anti-stokes, respectivamente, com energia com valor para maior ou menor de um quantum de energia associado à diferença de energia dos modos vibracionais da molécula.

Esta descrição, entretanto, não explica a diferença das intensidades das linhas Stokes e anti-Stokes. Para isto é necessário analisar o fenômeno quanticamente. Neste caso, considera-se uma interação de dois fótons com um fônon da molécula. A variação de energia do fóton espalhado (reemitido) é vista como associado a um processo de emissão ou absorção de fônons quando do relaxamento da molécula.

Naturalmente, o decaimento para níveis vibracionais de maior energia que o estado fundamental é sempre possível, gerando um fóton de menor energia que o inicial. Já para aniquilar um fonon, gerando um fóton com maior energia que o inicial, um elétron deve estar em um nível vibracional de maior energia, e esta probabilidade depende da temperatura. Desta forma, a razão entre as linhas Stokes e anti-stokes refletem o fator de Boltzmann ($e^{(-h\nu/kT)}$). Apesar de este não ser o único fator determinante das intensidades das linhas Stokes e anti-Stokes, é possível compreender, ainda que qualitativamente, esta diferença entre suas intensidades.

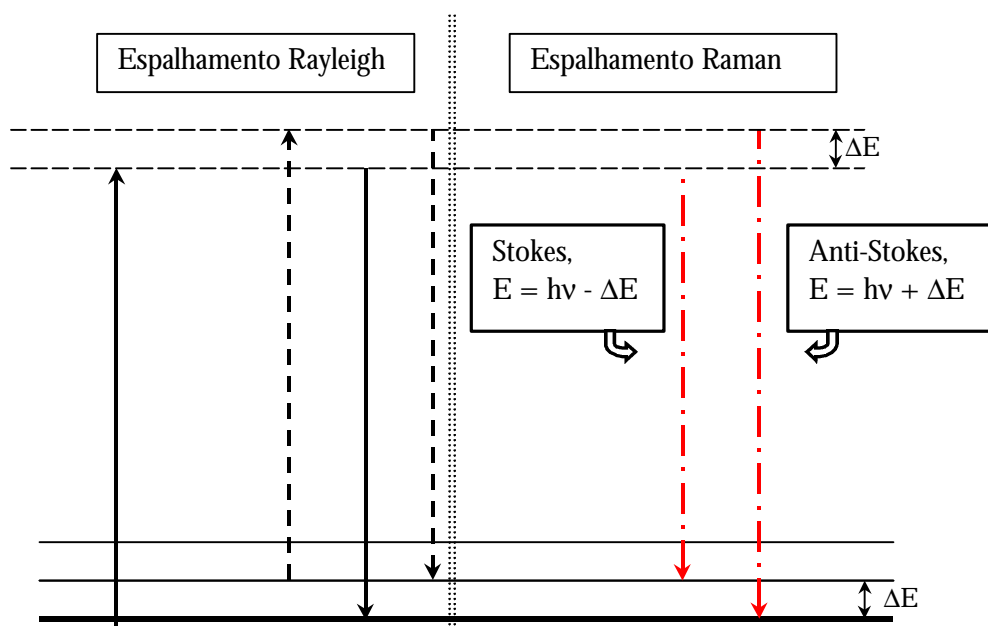


Figura 5 - Esquema dos espalhamentos Rayleigh (elástico) e Raman (inelástico).

A intensidade de um pico Raman depende de maneira complexa da possibilidade de polarização da molécula, da intensidade da fonte e da concentração da molécula ativa, entre outros fatores. A potência da emissão Raman cresce com a quarta potência da frequência da fonte de excitação (similar

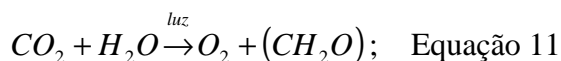
ao espalhamento Rayleigh: $I = \frac{16p^4 c}{3\epsilon^4} a^2 E_0^2$, onde λ é o comprimento de onda e

E_0 a amplitude do vetor de campo elétrico). A intensidade do Raman é em geral diretamente proporcional à concentração da molécula ativa. Se o estado virtual corresponde a um estado real, esta transmissão é denominada Raman-ressonante.

3.2. Fotossíntese

A captura da energia solar por organismos fotossintetizadores e sua conversão em energia química por meio da reação de síntese de compostos orgânicos é, em última instância, a fonte de praticamente toda a energia biológica [Lehninger et *alli*, 1993].

A equação geral da fotossíntese descreve a reação de oxi-redução (mediadas por uma série de substâncias presentes no cloroplasto) na qual H_2O doa elétrons (e prótons) para a redução de CO_2 e sua transformação em carboidrato (CH_2O):



A fotossíntese engloba dois processos: as reações “claras”, que ocorrem apenas quando as plantas estão iluminadas, e as reações de fixação de carbono, ou reações escuras, que ocorrem tanto sob luz quanto na escuridão.

Nas células fotossintéticas eucariotas, tanto as reações claras quanto as de fixação de carbono se dão no cloroplasto (Figura 6). O cloroplasto é envolvido por uma membrana externa que é permeável a íons e pequenas moléculas. Uma membrana interna envolve o compartimento interno. Neste compartimento interno há várias vesículas (ou sacos) achatadas, envolvidas por uma outra membrana, chamadas tilacóides, que são normalmente dispostas em pilhas chamadas grana. As membranas tilacóides são separadas da membrana interna do cloroplasto. Os pigmentos fotossintéticos e todas as enzimas necessárias para as reações a luz estão embutidas na membrana tilacóide. O fluido ao redor dos tilacóides, o estroma, contém a maior parte das enzimas necessárias para as reações de fixação de carbono, quando moléculas de ATP e NADPH, produtos da fase clara, são utilizados para reduzir o CO₂ para formar glicose e outros produtos orgânicos. Neste trabalho, serão relatadas apenas as reações que envolvem luz.

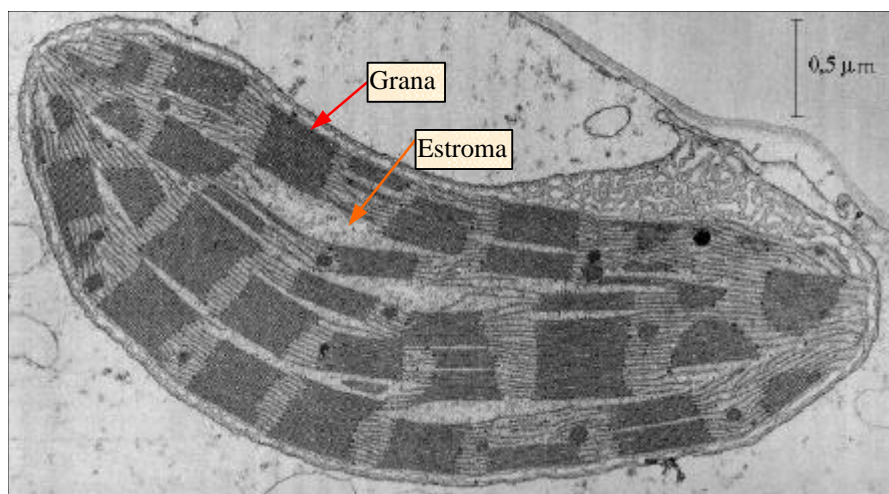


Figura 6 - Cloroplasto. Os tilacóides são os filamentos observados, em geral agrupados nos grana.³

A absorção de luz se dá através de certos tipos de moléculas instaladas nas membranas tilacóides chamadas pigmentos-antena. Destes, os mais importantes são as clorofilas, pigmentos verdes, com um anel de porfirina (com Mg no centro)

³ Figura obtida em [Raven *et alli*, 1978]

ligado a uma longa cadeia de carbono. A estrutura do anel de porfirina apresenta uma forte absorção na região visível do espectro. Por esta razão as clorofilas apresentam coeficientes de absorção de luz especialmente altos e são, portanto, particularmente adequados para absorver a luz visível durante a fotossíntese.

Os cloroplastos das plantas superiores sempre contêm dois tipos de clorofila. Um deles é, invariavelmente, a clorofila *a* e o segundo tipo, em muitas espécies, é a clorofila-b. Apesar de os dois pigmentos serem verdes, seus espectros de absorção são ligeiramente diferentes (Figura 7), permitindo que se complementem na absorção de luz na região do visível. A maioria das plantas superiores contém duas vezes mais clorofila *a* que clorofila-b. As clorofilas das bactérias diferem muito pouco dos pigmentos das plantas.

Além das clorofilas, as membranas tilacóides contêm pigmentos secundários (conhecidos como pigmentos acessórios). Os carotenóides e as ficobilinas absorvem luz em comprimentos de onda diferentes dos absorvidos pelas clorofilas, conforme pode ser verificado na Figura 7 e são, portanto, receptores suplementares de luz.

As proporções relativas das clorofilas e dos pigmentos acessórios são características para cada espécie de planta. A variação dessas proporções é responsável pela diversidade de cor dos organismos fotossintetizantes (tanto na vegetação superior como no fitoplâncton).

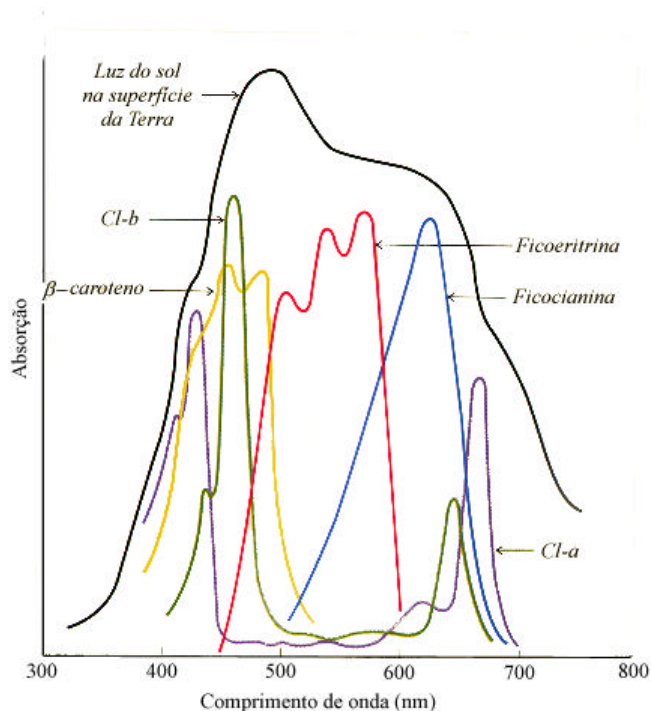


Figura 7 - Espectros de absorção de diferentes pigmentos presentes nas membranas tilacóides, comparados com o espectro da luz do sol que atinge a superfície da Terra⁴

Os pigmentos das membranas tilacóides que absorvem luz estão reunidos em grupos funcionais denominados fotossistemas. Cada fotossistema é composto por até algumas centenas de pigmentos. Todos os pigmentos de um fotossistema podem absorver luz, mas apenas alguns poucos podem transformar a energia da luz em energia química. Os pigmentos transdutores consistem em várias moléculas de clorofila combinadas com um complexo de proteínas. Este conjunto é conhecido como centro de reação. Os outros pigmentos do fotossistema são chamados de pigmentos-antena. Esta estrutura para absorção dos fótons está esquematizada na Figura 8.

⁴ Gráfico desenvolvido a partir de ilustração de [25]

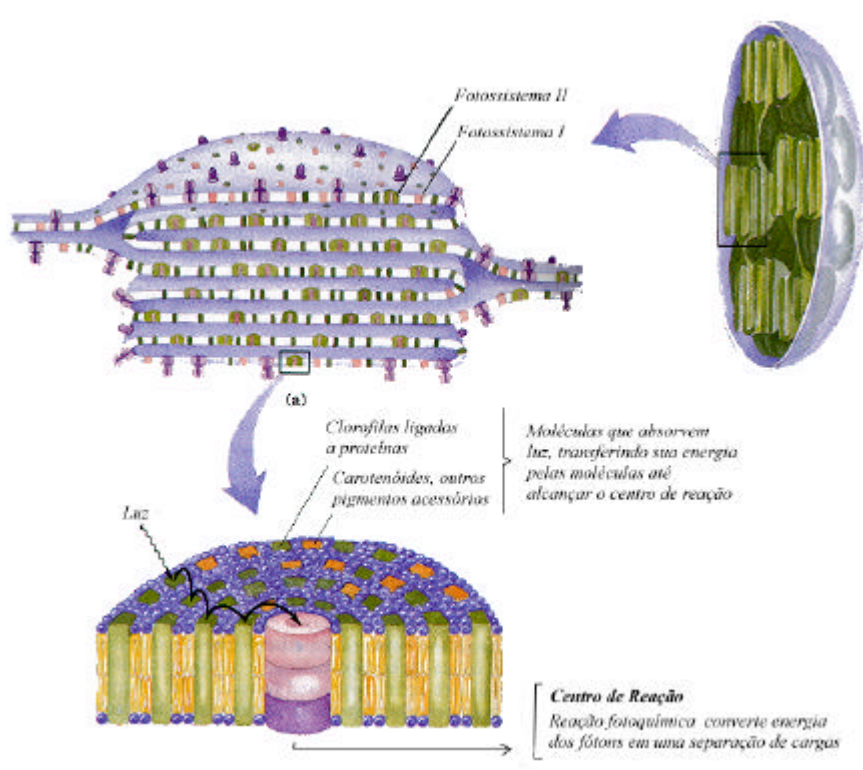


Figura 8 - Esquema da disposição das estruturas moleculares nas membranas tilacóides⁵.

As moléculas de clorofila nas membranas tilacóides ficam ligadas a proteínas das membranas que orientam as clorofilas em relação ao plano das membranas e conferem aos pigmentos propriedades de interação com a radiação ligeiramente diferentes daquelas da clorofila livre. Quando as moléculas de clorofila (livres) são excitadas por luz, a energia absorvida é rapidamente liberada por fluorescência e calor. No entanto, quando folhas intactas são iluminadas no espectro do visível, pouca fluorescência é observada. Há uma transferência ressonante de energia da molécula excitada para um pigmento-antena vizinho, sendo este excitado, e permitindo o retorno da primeira molécula a seu estado fundamental. Esta transferência ressonante de energia é repetida para os vizinhos subsequentes até que a clorofila do centro de reação é excitada [Whitmarsh & Govindjee, 1999].

A tarefa básica do centro de reação é funcionar como um capacitor minúsculo, armazenando energia ao separar e estabilizar cargas positivas e

⁵ Figura desenvolvida a partir de ilustração de [Lehninger *et alli*, 1993]

negativas em cada lado da membrana tilacóide [Govindjee & Coleman, 1990]. No centro de reação (do fotossistema II), a clorofila a doa um elétron para uma molécula de feofitina, que o doa a uma molécula plastoquinona A que, por sua vez, o doa a uma molécula quinona B. Esta, após receber 2 elétrons (e posteriormente 2 prótons, liberados da molécula de água) pode circular livremente pelo cloroplasto. Uma molécula Z reduz a clorofila a. Esta molécula Z, em conjunto com catalisadores, é que oxida a água e produz O₂. A excitação e passagem de elétrons da clorofila a para a feofitina é um processo extremamente rápido, da ordem de alguns picossegundos.

Parte da energia absorvida pelos pigmentos antena, e que não é aproveitada no processo de fotossíntese, é que pode se transformar em radiação fluorescente. Assim, a eficiência quântica da fluorescência da clorofila a depende de uma série de fatores ambientais, tais como a disponibilidade de luz e nutrientes, temperatura etc.. . Uma alteração no aparato fotossintético tanto pode aumentar como diminuir a intensidade da fluorescência. Por exemplo, se o conjunto de pigmentos antena for afetado, impedindo a chegada da radiação ao centro de reação, concluímos que a fluorescência diminuirá. Entretanto, Falkowski [Falkowski & Kolber, 1995] relata que se uma parte dos centros de reação deixa de funcionar a fluorescência em 685nm aumenta, pois os pigmentos antena conseguem redirecionar a energia absorvida para outros centros de reação que, desta maneira, irão se saturar e, portanto, favorecerá a fluorescência.

Para monitorar a fluorescência dos pigmentos-antena devemos levar em conta que cada molécula apresenta um espectro de fluorescência característico. A clorofila a fluoresce em uma banda centrada em torno de 685 nm de 10,6 nm (FWHM⁶) de largura [Schmitz-peiffer et alli, 1990b]. Já a clorofila b fluoresce em banda em torno de 730nm. Os carotenóides em geral não fluorescem. A ficoeritrina, uma ficobilina presente nas cianobactérias e algumas algas, fluoresce em banda com pico entre 560 e 580nm, quando excitada, *in vivo*, em 532nm [Hoge et alli, 1998]. A fluorescência em bandas bem definidas (como é o caso da clorofila a, por exemplo) é uma característica importante para a identificação, no

⁶ FWHM: Full Width at Half Maximum, isto é, a largura do pico calculada entre os pontos com valor de metade do máximo.

espectro de fluorescência do meio natural, da contribuição de um tipo específico de fluoróforo.

3.3. Normalização de sinal de fluorescência pelo espalhamento Raman da água

A concentração de um fluoróforo medida por um LIDAR é descrita pela equação conhecida como “equação do LIDAR” [Bristow et *alli*, 1981]:

$$n_f = \left(\frac{P_F H^2}{P_L} \right) \left(\frac{4p}{Th_{rec}} \right) \left[\frac{m_w^2 e^{H(b_L + b_F)}}{(1 - R_w)^2} \right] \left(\frac{k_L + k_F}{s_f} \right); \quad \text{Equação 12}$$

onde n_f é a concentração do fluoróforo na coluna d'água (em mg/m^3) e

P_F = potência detectada da fluorescência em $\lambda_{\text{emis.}} = F$ (W)	P_L = potência detectada do laser em $\lambda = L$ (W)
μ_w = índice de refração da água no visível	H = distância do sensor ao alvo (m)
β_x = coeficiente atmosférico de atenuação do feixe em $\lambda = x$ (1/m)	T = área de cobertura efetiva do telescópio (m^2)
R_w = Refletância especular da interface ar-água para incidência normal no visível	η_{rec} = eficiência do telescópio receptor
κ_x = coeficiente efetivo de atenuação pela água do feixe em $\lambda = x$ (1/m)	σ_F = seção de choque efetiva da clorofila <i>a</i> para a banda de fluorescência centrada em F quando excitada em $\lambda = L$ (m^2/mg)

Neste caso estamos assumindo que:

- P_F é a contribuição produzida pela incidência do feixe do laser. Todas os demais sinais de fundo, tais como a reflexão e espalhamento da radiação passiva e a fluorescência induzida por este foi subtraída (por iluminação passiva entende-se aquela gerada pela luz natural do sol e suas reflexões e reemissões);
- a superfície da água sujeita à excitação situa-se toda sobre o campo de visão do telescópio;
- o sinal de fluorescência é integrado até uma profundidade “infinita”. Esta aproximação requer que a profundidade da água seja pelo menos

quatro vezes superior ao maior comprimento de atenuação característico (κ_F^{-1} ou κ_L^{-1});

- em cada amostra n_f , κ_L , κ_F e σ_F são independentes da profundidade. É razoável assim considerar para a camada superior da água onde as ondas e as correntes mantêm uma mistura homogênea. Medidas do coeficiente de atenuação de feixe (α) indicam que este se mantém essencialmente constante em pelo menos 2 vezes o comprimento de atenuação ($2\alpha^{-1}$);
- o tempo de vida da fluorescência é significativamente menor que a duração do pulso do laser. O tempo de fluorescência *in vivo* da clorofila *a* é menor que 1ns, e
- o termo de atenuação atmosférica mantém-se constante e próximo à unidade (isto é verdade para até algumas centenas de metros).

Mesmo que κ_L , κ_F e σ_F permaneçam constantes vertical e horizontalmente, a determinação de seus valores não é uma tarefa fácil. Para se obter σ_F é necessário a realização de demoradas medidas *in situ*. Os coeficientes de atenuação efetiva podem ser inferidos pela reflexão e pela fluorescência do pulso do laser na coluna d'água desde que, experimentalmente, se possa resolver no tempo este sinal de retorno. Se estes coeficientes puderem ser considerados constantes, a quantidade de clorofila *a* poderia ser calculada por

$$n_f = C_1 P_F; \quad \text{Equação 13}$$

onde C_1 seria uma constante que poderia ser obtida para cada vôo, através de medidas *in situ*.

Entretanto, uma relação linear entre n_f e P_F não se realiza nas medições, quando comparamos com os resultados das amostras coletadas *in situ*. Além da variação horizontal, tanto em pequena escala quando em larga escala, dos coeficientes de atenuação efetiva e da seção de choque efetiva da clorofila *a*, um problema básico para a comparação de diferentes medições de fluorescência da clorofila *a* feitas por um sistema LIF-LIDAR está no fato da estrutura da superfície da água ser diferente em cada medida, variando, assim, o total de luz refletida e refratada.

Para contornar estas dificuldades experimentais, propôs-se como solução (Fadeev *et alli* em 1978 e Bristow *et alli* em 1981) a normalização do sinal da

fluorescência pela emissão do espalhamento Raman devido aos modos vibracionais da ligação O-H das moléculas de água. Este espalhamento se dá (para água pura) com um deslocamento de 3418cm^{-1} do comprimento de onda de excitação. Assim, para a excitação a 532nm , a emissão Stokes do espalhamento Raman estará em 650nm .

A equação da concentração de moléculas de água na coluna d'água estimulada pelo laser pode ser escrita de forma análoga à equação 2.11 para quantidade de fluoróforos:

$$n_w = \left(\frac{P_R H^2}{P_L} \right) \left(\frac{4p}{Th_{rec}} \right) \left\{ \frac{m_w^2 e^{[H(b_L + b_R)]}}{(1 - R_w)^2} \right\} \left(\frac{\mathbf{k}_L + \mathbf{k}_R}{\mathbf{s}_w} \right); \quad \text{Equação 14}$$

onde

n_w é concentração de moléculas d'água afetadas pela radiação na coluna d'água e

P_R = potência detectada da emissão Raman em $\lambda = R$	σ_w = seção de choque da emissão Raman para o modo vibracional O-H da água (líquida)
--	---

dividindo a equação 2-11 pela equação 2-13 teremos:

$$\frac{n_f}{n_w} = \left(\frac{P_F}{P_R} \right) \left\{ \frac{e^{[H(b_L + b_F)]}}{e^{[H(b_L + b_R)]}} \right\} \left(\frac{\mathbf{k}_L + \mathbf{k}_F}{\mathbf{k}_L + \mathbf{k}_R} \right) \left(\frac{\mathbf{s}_w}{\mathbf{s}_F} \right); \quad \text{Equação 15}$$

A atenuação das radiações devido à atmosfera pode ser considerada desprezível para atmosferas limpas para valores de H até 150m . A seção de choque σ_R varia fracamente com a temperatura e a salinidade, mas para temperaturas entre 5 e 25°C pode ser considerada constante. A concentração de moléculas na coluna d'água é constante, exceto para águas altamente poluídas. Desta forma, a equação 4-4 pode ser reescrita como

$$c_f = C_2 \left(\frac{P_F}{P_R} \right) \left(\frac{\mathbf{k}_L + \mathbf{k}_F}{\mathbf{k}_L + \mathbf{k}_R} \right) \left(\frac{1}{\mathbf{s}_F} \right); \quad \text{Equação 16}$$

Onde c_f é a concentração relativa de fluoróforos na coluna d'água considerada. Para águas onde o material particulado mude apenas em sua concentração mas não em sua composição, a razão entre os coeficientes efetivos de atenuação é uma constante. Se a composição deste material não muda de forma abrupta, esta razão ainda pode ser considerada uma constante se os comprimentos de onda R e F forem próximos (no limite em que $F = R$ a razão será sempre igual a 1). Desta forma, simplifica-se a equação 4-5 para

$$c_f = \frac{C_3}{S_F} \frac{P_F}{P_R}; \quad \text{Equação 17}$$

Assim, para sistemas onde σ_F pode ser considerado constante, a concentração de clorofila a é diretamente proporcional à razão da intensidade da fluorescência da clorofila a pela intensidade do espalhamento Raman. Isto é, podemos expressar a concentração relativa de clorofila a em unidades Raman.

A seção de choque σ_F pode sofrer grande variação tanto no espaço como no tempo, pois depende da espécie do fitoplâncton e de sua situação nutricional, bem como da irradiação descendente do ambiente. É importante observar, contudo, que o sinal da fluorescência da clorofila a , normalizada pelo da emissão Raman, tem a capacidade de fornecer *in situ* informações justamente sobre a concentração e a eficiência quântica natural da fluorescência da clorofila a , que são, desta forma, informações sobre a capacidade fotossintética do fitoplâncton, em determinada localização e em determinado instante. Para tanto, é necessário o emprego de técnicas complementares de medida da clorofila a . Uma das técnicas disponíveis é a utilização de algoritmos que empregam o espectro de radiação passiva natural.