

Instrumentação Básica para Análise das Trocas Gasosas (CO₂ e H₂O) entre as Plantas e o Meio Ambiente

CLÁUDIO JOSÉ REIS DE CARVALHO

Pesquisador, DSc. em Ecofisiologia Vegetal

Laboratório de Ecofisiologia Vegetal

Embrapa Amazônia Oriental

Belém, Pará, Brasil

E-mail: carvalho@libnet.com.br

Introdução

O relacionamento das partes aéreas das plantas com a atmosfera, leva a uma troca constante de gases, muito importante para o equilíbrio energético, através da dissipação de calor pela transpiração e para a aquisição de carbono através da fotossíntese.

A via mais importante para a difusão desses gases (vapor d'água e CO_2) do interior da folha para a atmosfera e vice-versa, passa através dos estômatos que atuam como válvulas reguladoras desses fluxos através basicamente, da modificação do grau de abertura do poro estomático. A regulação desta abertura, é afetada por fatores do meio físico (umidade, temperatura, radiação, ventos, poluentes atmosféricos) em interação com fatores internos (hormônios, nutrição mineral etc.), sendo portanto um ponto chave em diversas investigações em fisiologia vegetal.

Nos estudos envolvendo estes fenômenos – basicamente transpiração e fotossíntese – é necessário quantificar as trocas de gás carbônico e vapor d'água entre o interior das folhas e a atmosfera, bem como inferir o grau de regulação exercida pelos estômatos sobre o fluxo destes gases. Neste caso, têm sido buscadas metodologias e desenvolvidos equipamentos, para medir o mais exatamente que possível estes fluxos, causando porém um mínimo de distúrbio na superfície das folhas, ou seja: aproximando-se o mais possível das condições naturais. A evolução destes equipamentos foi relativamente rápida, aproveitando descobertas e tecnologias geradas em outros campos tais como polímeros, circuitos, ligas metálicas e outros, na concepção de equipamentos complexos os quais logo em seguida tornaram-se portáteis para o uso no campo.

Embora continue a evoluir, a busca por métodos mais modernos e não invasivos, não invalida o uso dos equipamentos atuais, cuja concepção e embasamento teórico fazem com que eles sejam e permaneçam válidos ainda por um bom tempo. Neste segmento do curso, procuraremos dar uma visão geral sobre o funcionamento, embasamento teórico e detalhes de uso dos equipamentos mais comuns, existentes ainda hoje na maioria dos laboratórios de fisiologia vegetal no Brasil.

Condutância estomática

A partir do reconhecimento do fato, de que a regulação da abertura dos estômatos era o ponto crucial nos processos de difusão do vapor d'água e CO₂, os pesquisadores passaram a procurar um meio de quantificar o grau de abertura dos estômatos para poder associá-lo com outras observações.

Um dos primeiros métodos utilizados foi aquele que procurava associar a infiltração de uma série de líquidos de diferentes tensões superficiais com a maior ou menor abertura dos estômatos (HABERLANDT, 1905; MOLISCH, 1912). Foram usadas várias misturas tais como Xilol e Nujol, Nujol e Querosene, Xilol e parafina líquida ou mesmo água em diversas proporções de mistura com um álcool como por exemplo o Álcool Isopropílico (ALVIM & HAVIS, 1954; WORMER & OCHS, 1959).

Apesar de ser prático e extremamente barato, este método tem a desvantagem de não permitir uma abordagem biofísica para a quantificação do fluxo de gases, sendo portanto uma forma qualitativa e semi-artesanal de avaliar a abertura dos estômatos. Porém, para investigações por longo tempo em áreas remotas ou mesmo quando se deseja somente o controle da necessidade de irrigação em plantações, este passa a

ser um meio adequado, visto que se necessita apenas de alguns frascos, substancias baratas e treinamento de pessoal.

A escolha dos líquidos, deve levar em consideração várias características das folhas da(s) espécie(s) tais como pilosidade da superfície das folhas, distribuição, número, tamanho e forma dos estômatos. Logicamente, o melhor método de seleção ainda é o de tentativa e erro, procurando-se misturas que dêem uma nítida resposta de penetração, revelada pelo aparecimento de minúsculos pontos de coloração verde mais forte, resultado da difusão do líquido nas células do parênquima vizinho da câmara sub-estomática. Após algum tempo, esses pequenos pontos podem unir-se, formando manchas necróticas no limbo foliar, pois geralmente esses líquidos são tóxicos e também destroem a membrana plasmática matando as células com as quais entrem em contato.

Um exemplo de série de líquidos infiltrantes pode ser dado com aquela usada largamente no dendezeiro (Tabela 1).

Neste processo, são depositadas gotas dos diversos frascos (geralmente partindo do nº6 na face abaxial de um folíolo do dendezeiro. Dependendo da velocidade de penetração, pode-se testar concentrações com menos ou mais água. Logicamente, quanto mais abertos estiverem os estômatos, as misturas com mais água continuarão a penetrar, até atingir um limite no qual isto não se dará mais. O número da solução imediatamente abaixo daquela que não penetrou, será considerado como representativo do grau de abertura dos estômatos naquele momento.

TABELA 1 - Concentração dos componentes da série de líquidos infiltrantes usada para avaliar o grau de abertura estomática em dendezeiros (Adaptado de WORMER & OCHS, 1959).

Número do frasco	Água (%)	Isopropanol (%)
1	0	100
2	10	90
3	20	80
4	30	70
5	40	60
6	50	50
7	60	40
8	70	30
9	80	20
10	90	10
11	100	0

Apesar de simples, quando bem executado, o método permite diferenciar respostas à seca de híbridos de diversas origens. Em plantações industriais desta espécie e de coqueiro, este método foi usado com sucesso para orientar a irrigação na África Ocidental. Os gotejadores eram ativados quando eram obtidos infiltrações abaixo do nível 6 as 15 horas. Também nestas espécies, foi encontrada uma boa correlação entre os resultados do método de infiltração e a resistência difusiva medida nas mesmas folhas com um porômetro. A visualização da infiltração pode ser melhorada, adicionando-se um corante como o Sudam III aos líquidos e as séries podem ser

ampliadas, fazendo-se misturas com proporções intermediárias, para aumentar o detalhamento.

Porômetros primitivos foram construídos, baseados no fenômeno da difusão forçada de uma massa ar através dos tecidos de uma folha anfiestomática, onde a resistência ao fluxo através da folha dependia em princípio da resistência dos estômatos e dos espaços intercelulares. Nas folhas hipoestomáticas, a resistência ao fluxo da massa de ar seria resultante da maior ou menor abertura dos estômatos mais a resistência oferecida pelos espaços intercelulares dos tecidos do mesófilo.

Basicamente foram concebidos três tipos de porômetros de fluxo de massa. Em um tipo, o fluxo de ar que passava através da folha era medido com fluxímetros em $\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ou seja $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Em outro, a resistência a passagem do ar através da folha era comparada a resistências padronizadas feitas com combinações de capilares de vidro. Finalmente em um terceiro tipo, era determinado o tempo necessário para provocar uma queda de pressão de um certo volume de ar forçado através da folha (Figura 1 A; B e C).

Apesar da aparente simplicidade, as medidas eram complicadas e traziam a desvantagem de provocarem situações muito diferentes das naturais, visto que normalmente não se tem fluxos de ar através dos tecidos do mesófilo e que isto provocava desidratação e deformação mecânica das células guarda e do mesófilo, resultando em modificação da abertura dos estômatos.

Com o advento dos sensores capacitivos, foi possível desenhar equipamentos que criassem situações menos artificiais. Estes sensores são dispositivos que modificam suas características elétricas por influencia da umidade do ar, através da

difusão de moléculas de água em sais (cloreto de lítio) ou polímeros higroscópicos. Inicialmente, estes dispositivos eram volumosos, porem alcançaram tamanhos minúsculos (alguns milímetros quadrados), possibilitando a sua acomodação em câmaras também de tamanho reduzido (Vaissala Humicap).

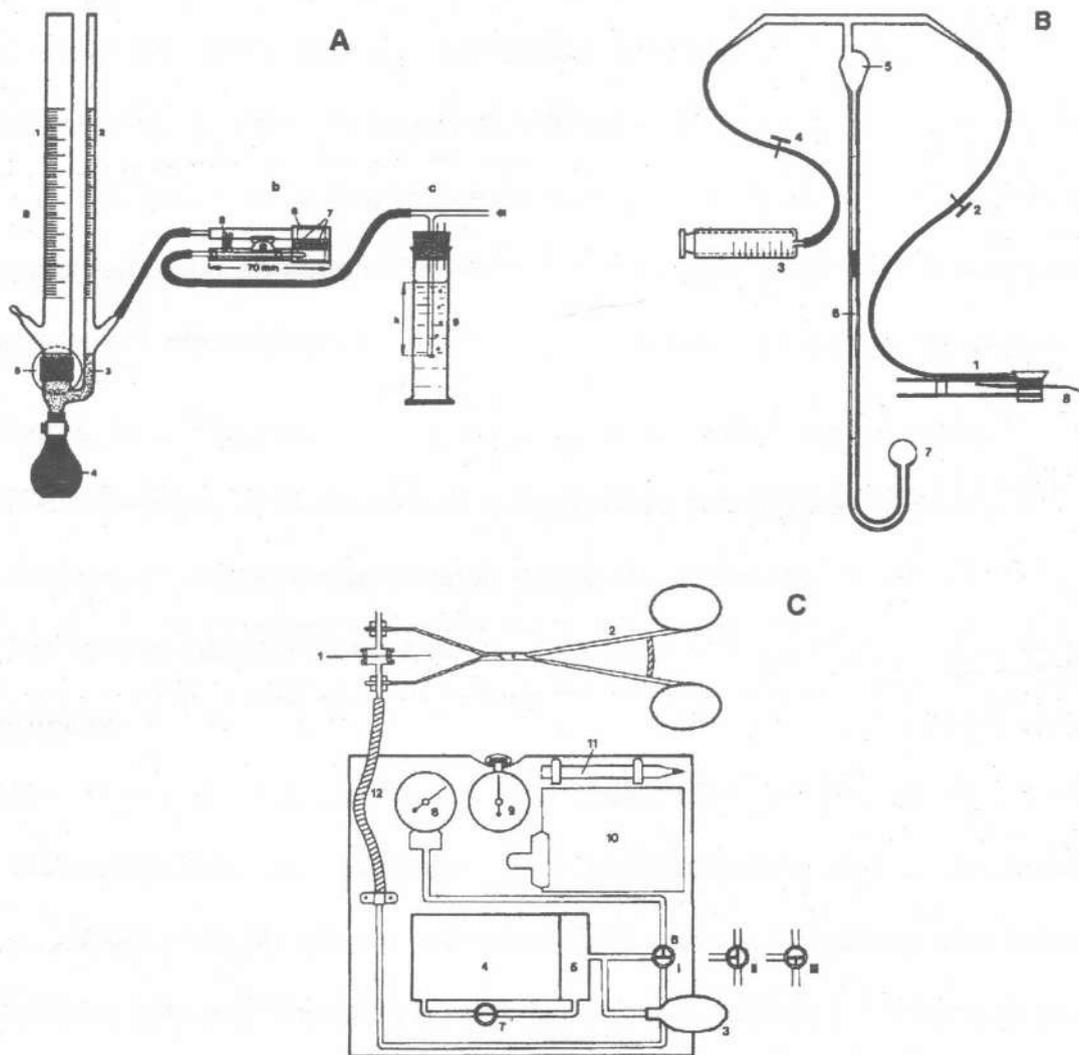


FIGURA 1 - Modelos A; B e C: de porômetros antigos. (SLAVIK, 1974).

O princípio de operação destes equipamentos, conhecidos como porômetros de difusão, assume que a taxa de transpiração é controlada principalmente por

modificações da abertura dos estômatos. Assim, o tempo necessário para a modificação da umidade no interior de uma câmara contendo uma certa área de folha, possibilita a derivação da resistência à difusão de vapor d'água.

De modo geral, estes porômetros são constituídos de uma câmara pequena - onde é encerrada uma seção da folha de área determinada - de um sensor de umidade, de dois termopares ou termistores para medir as temperaturas da folha e do interior da cubeta, de um dispositivo para injetar ar seco na câmara e de um "timer" de precisão.

O princípio de medida consiste em colocar uma lamina de plástico fechando a câmara (no lugar da folha) e o ar seco é injetado para baixar a umidade do seu interior. Em seguida, a lamina de plástico é substituída pela folha e mede-se o tempo Δt (s) necessário que o vapor d'água liberado pela folha aumente em 1 a 5% a umidade do interior da câmara. A resistência difusiva ($s.cm^{-1}$) pode ser calculada por:

$$r_{total} = \frac{(C - C_m)\Delta t A}{(C_2 - C_1)V}$$

Onde C_2 e C_1 são as concentrações de vapor ($g.cm^{-3}$) do início e do final do tempo, C é a concentração de vapor d'água observada, C_m é a umidade média dentro da câmara durante Δt , V é o volume da câmara (cm^{-3}) e A é a área de folha sobre a abertura da câmara (cm^{-2}). Com uma réplica de papel, era possível estimar a resistência da camada limite (r_a). O problema apresentado por esses porômetros era o de que a difusão dava-se em uma câmara com ar praticamente parado e as condições de umidade e temperatura variavam muito durante as medidas. Por esses motivos

foram criadas outras versões com ventiladores internos que misturavam bem o ar no interior da câmara e reduziam bastante a camada limite.

Um grande avanço na calibração e uso desse tipo de porômetro foi dado por KANEMASU et al. (1969), que usou uma placa de acrílico com resistências artificialmente obtidas por diferentes conjuntos de orifícios de diversos tamanhos (diâmetro e altura) e número. A placa recebia em uma das faces uma camada de papel filtro umedecido, isolada por uma fita adesiva plástica, simulando os espaços intercelulares que teoricamente são saturados de água.

A resistência teórica ($s.cm^{-1}$) destes conjuntos de furos pode ser calculada pela equação abaixo:

$$r = \frac{l_{eff}}{D} = \frac{4A(l_0 + \frac{\pi d}{8})}{Dn\pi d^2}$$

Onde l_{eff} é a via efetiva de difusão do orifício, D é a difusibilidade do vapor d'água no ar parado, A é a área de folha exposta na cubeta do porômetro, l_0 é o comprimento de cada furo, d o diâmetro dos furos, n o numero de furos e $\pi d/8$ um fator de correção geométrico.

A adoção deste tipo de calibração tornou mais pratica a calibração destes equipamentos, que antes era feita por interposição de pequenos tubos de diferentes comprimentos entre a folha e o sensor.

Este tipo de porômetro tornou-se muito difundido pela sua facilidade de operação e calibração no campo, principalmente após a incorporação de sistemas automatizados de seleção de níveis de umidade e contadores de tempo de alta resolução (1/100s), que aliados ao tamanho reduzido dos sensores de umidade

permitiram o desenvolvimento de câmaras menores, construídas com materiais como o polipropileno que adsorvem e liberam pouquíssimo vapor d'água.

Atualmente, a maioria das medidas de resistência estomática (ou condutância), é feita com basicamente três tipos de porômetros:

- 1- Porômetros transientes (Transient porometers);
- 2- Porômetros de umidade constante (Steady-state or null-balance porometers);
- 3- Porômetros de fluxo constante (Constant-flow porometers).

1- Porômetros transientes.



O seu princípio de funcionamento é basicamente o mesmo dos porômetros de difusão, no qual uma pequena câmara contendo no seu interior um sensor de umidade, é pinçada contra a superfície de uma folha e, ou o tempo requerido para que se processe a mudança (dentro de intervalos pré-selecionados) da umidade, ou a mudança de umidade por um determinado intervalo de tempo são registrados e comparados com a resistência difusiva obtida com valores empíricos de uma placa de calibração. Apesar da simplicidade, a câmara não é ventilada, fazendo com que a difusão do vapor d'água da folha até a superfície do sensor sofra influência da geometria da câmara, do sensor e da folha. Eles não podem ser usados com coníferas ou com folhas que não cubram completamente a fenda da câmara.

Dois modelos muito usados deste tipo de porômetro são o LI-700 (LICOR, USA) e o porômetro dinâmico AP4 (Delta-T Devices, UK).

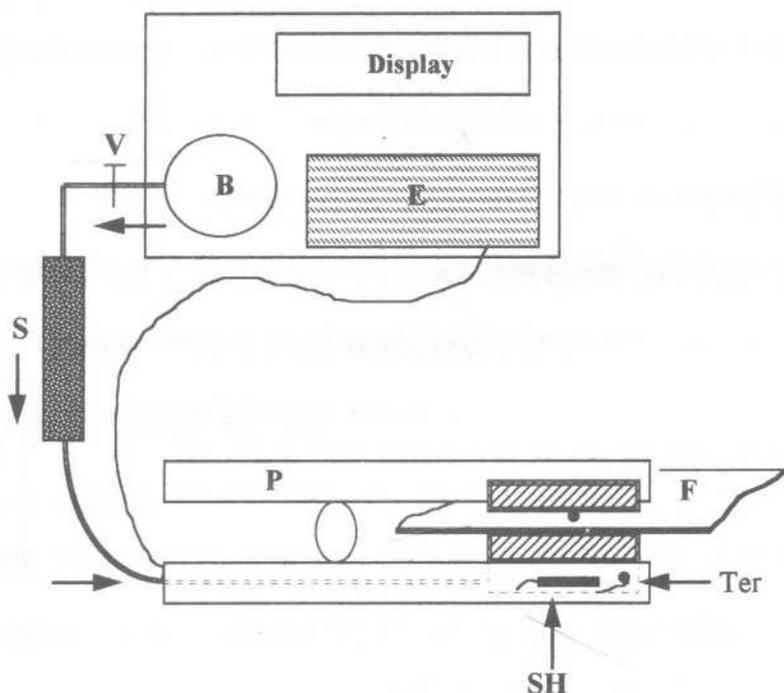


FIGURA 2 - Desenho esquemático de um porômetro transiente mostrando as principais partes. A pinça (P) está magnificada e é mostrada em corte transversal, prendendo uma seção de folha (F), cuja parte abaxial está voltada para o sensor de umidade (SH). As duas pequenas bolas, são termistores (Ter), respectivamente para medir a temperatura da folha e do interior da câmara. Na unidade central, existe uma bomba de ar (B), que impulsiona um fluxo de ar através de uma válvula (V), passando por uma coluna de sílica gel (S). O ar seco (setas), serve para baixar a umidade intermitentemente na câmara. Estes ciclos e os sinais dos sensores são comandados e processados por uma parte eletrônica (E) e mostrados em um display.

O modelo LI-700, tem faixas pré-selecionáveis de umidade (Tabela 2) e contador de tempo de precisão, o qual conta o tempo necessário (Δt) para que a umidade do interior da câmara varie entre dois valores (máximo e mínimo) previamente selecionados (Figura 3).

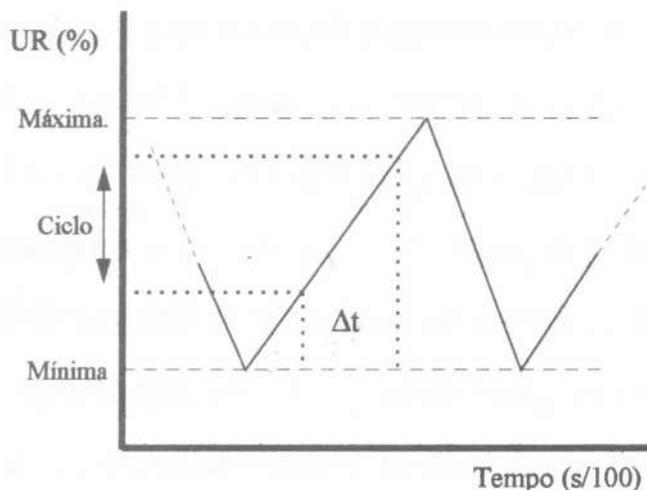


FIGURA 3 - Desenho esquemático mostrando a variação da umidade no interior da câmara durante um ciclo do porômetro.

Quando a umidade atinge o valor máximo para a faixa selecionada, a bomba de ar é ativada e ar seco é injetado dentro da câmara até que ela baixe ao valor de mínima (Tabela 2).

Sua operação é quase que completamente manual, devendo ser selecionada uma faixa de umidade para o interior da câmara, a mais próxima possível da verificada no ambiente, com um psicrômetro aspirado, para evitar os efeitos negativos de uma mudança brusca de umidade sobre a abertura dos estômatos.

A calibração deste equipamento é feita com uma placa que tem um conjunto de furos de resistências estabelecidas teoricamente. A Tabela 3, mostra uma série destes valores calculados para várias temperaturas.

Para operar o equipamento, é preferível fazer uma calibração *in situ*, permitindo que tanto a placa de calibração como o aparelho, equilibrem suas temperaturas com aquelas do local das medidas. Isto é muito importante, principalmente quando o aparelho sofre mudanças bruscas de ambiente como ao serem transportados de salas

com ar refrigerado para casas de vegetação ou campo. O porômetro deve ser ligado e deixado fazer vários ciclos com a finalidade de equilibrar a umidade dentro da câmara e nas suas tubulações. A placa de calibração deve estar com o papel umedecido mas não molhado e as medidas devem ser iniciadas com o conjunto de orifícios de maior resistência, passando sucessivamente para os de menor resistência, com intuito de evitar o fenômeno de adsorção e dessorção da umidade pelas paredes da cubeta. Nos intervalos das calibrações a placa deve permanecer em um pequeno saco plástico para evitar que seque. Antes de usar, secar superficialmente a mesma com papel Kleenex ou equivalente que não desfie e manipular sempre a placa pelos cantos, evitando tocar a sua superfície, pois a oleosidade da pele e os sais do suor, podem alterar seus valores.

TABELA 2 - Faixas de umidade do interior da câmara e valores que iniciam e finalizam a contagem do timer do porômetro LI-700 (LICOR, Inc)

UMIDADE (%)	FAIXA DE OPERAÇÃO	TIMER (INICIO)	TIMER (FINAL)
BAIXA	15 a 40	25	35
MÉDIA	30 a 55	40	50
ALTA	45 a 70	55	64

Uma vez a placa posicionada no sensor, deve-se ajustar o fluxo de ar da bomba, de maneira que a injeção de ar seco na câmara seja suficiente para baixar a umidade em até no máximo 2 divisões de UR abaixo dos pontos de mínima. O tempo decorrido (counts) para o aumento da umidade dentro da câmara deve ser observado e, uma vez

estável (após mais ou menos cinco ciclos), deve ser registrado, passando para uma nova série de orifícios.

TABELA 3 - Valores de resistência difusiva ($s.cm^{-1}$) calculados para uma placa de calibração do porômetro LI-700, usando a abertura standard (3,18 x 20,32 mm, 0,624 cm^2) e pressão atmosférica de 1000mb*, (Fonte: LICOR, 1981).

TEMPERATURA	ORIFÍCIOS					
	ABERTO	8 GRANDES	8 PEQUENOS	5	4	3
°C						
0	0.9	2.9	6.4	10.6	16.2	26.3
5	0.8	2.9	6.2	10.3	15.7	25.4
10	0.8	2.8	6.0	9.9	15.2	24.6
15	0.8	2.7	5.8	9.6	14.7	23.8
20	0.8	2.6	5.7	9.3	14.2	23.1
25	0.7	2.5	5.5	9.1	13.8	22.4
30	0.7	2.4	5.3	8.8	13.4	21.8
35	0.7	2.4	5.2	8.5	13.0	21.1
40	0.7	2.3	5.0	8.3	12.6	20.5
45	0.7	2.2	4.9	8.0	12.3	19.9
50	0.6	2.2	4.7	7.8	11.9	19.4

*Para altitudes e pressões diferentes, estes valores tem de ser recalculados (BOYNTON & BRATTAIN, 1929; LIST, 1966).

As temperaturas da placa e da câmara são críticas e, sobretudo na calibração, a diferença entre elas não deve exceder $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Também, durante as medidas, uma nova calibração deve ser feita cada vez que houver uma variação de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ na temperatura ambiente.

Um exemplo de curvas de calibração pode ser visto na Figura 4 que ilustra as mudanças ocorridas nas mesmas quando são selecionadas condições diferentes de umidade e com diferenças de temperaturas. Na verdade, o ajuste por regressão linear (como mostrado na Figura 4), facilita a conversão dos dados obtidos (contagens em 1/100seg) em resistência (s/cm). Porém, entre o valor mais baixo (menor que 1 s/cm) e o subsequente, há sempre um erro, devido ao fato da distribuição destes pontos nos valores mais baixos aproximar-se mais de um modelo curvilíneo. Mas, em termos práticos a perda de precisão é pequena, mesmo porque, neste tipo de porômetro, a maior fonte de erro é a diferença de temperatura, seguida pela seleção de umidades de trabalho altas (próximas a 80%), devido ao fenômeno de histerese apresentado por este tipo de sensor nestas condições.

Durante as medições, deve-se tentar obter uma leitura estável o mais rápido possível, para evitar efeitos do ambiente da câmara sobre os estômatos. Em algumas espécies, os estômatos respondem rapidamente ao ar seco de dentro da cubeta fechando rapidamente e abrindo para os níveis normais após alguns ciclos. Nestes casos, um certo número de ciclos deve ser estabelecido como norma de conduta durante toda a coleta de dados. Ao final da medida, verificar sempre as temperatura da folha e da câmara e anotar.

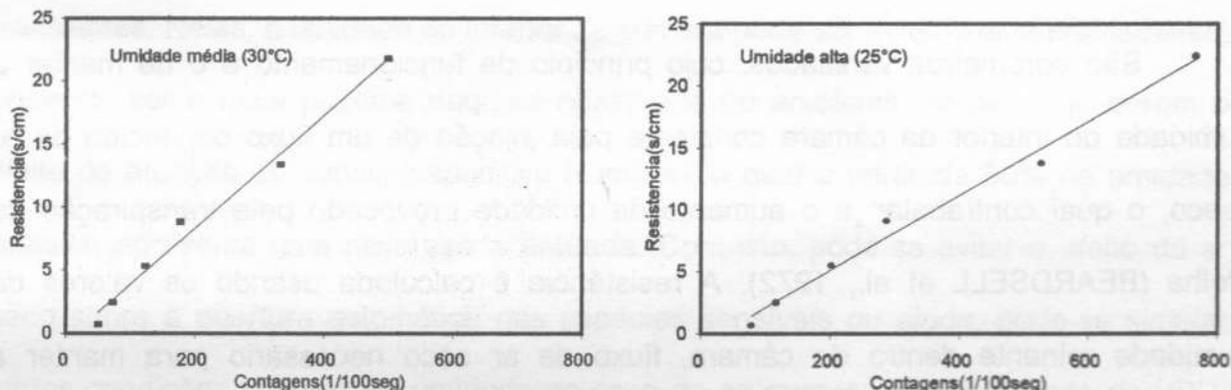


FIGURA 4 - Exemplos de curva de calibração obtidas em umidades alta e média a diferentes temperaturas com o porômetro LI-700.

Nos intervalos das leituras, o sensor deve ser mantido à sombra para evitar um sobre aquecimento e deve-se verificar sempre o bom estado do cartucho com Sílica Gel, a qual deve ser trocada quando menos de 1/3 do cartucho estiver mudando de cor (Azul para Rosa).

Durante as medidas, devem ser evitadas folhas molhadas com orvalho ou chuva, assim como as regiões da folha com nervuras muito salientes que impeçam ao bom contato e selagem da câmara.

O porômetro dinâmico AP4 (Delta-T Devices, UK), funciona basicamente segundo o mesmo sistema descrito anteriormente. Porém ele é todo automatizado, e comandado segundo rotinas mantidas em um EPROM, que guarda os dados de calibração, ajusta as curvas e as instala, usando esses valores para calcular os dados, os quais podem ser expressos em resistência ou condutância e estocados em memória, para serem transferidos posteriormente para um PC.

2 - Porômetros de umidade constante

São porômetros ventilados, cujo princípio de funcionamento é o de manter a umidade do interior da câmara constante pela injeção de um fluxo conhecido de ar seco, o qual contrabalança o aumento da umidade provocado pela transpiração da folha (BEARDSELL et al., 1972). A resistência é calculada usando os valores da umidade reinante dentro da câmara, fluxo de ar seco necessário para manter a umidade do interior da câmara constante, área da folha exposta e as temperaturas do interior da câmara e da superfície da folha. Na Figura 4, é mostrado o esquema simplificado de um porômetro deste tipo.

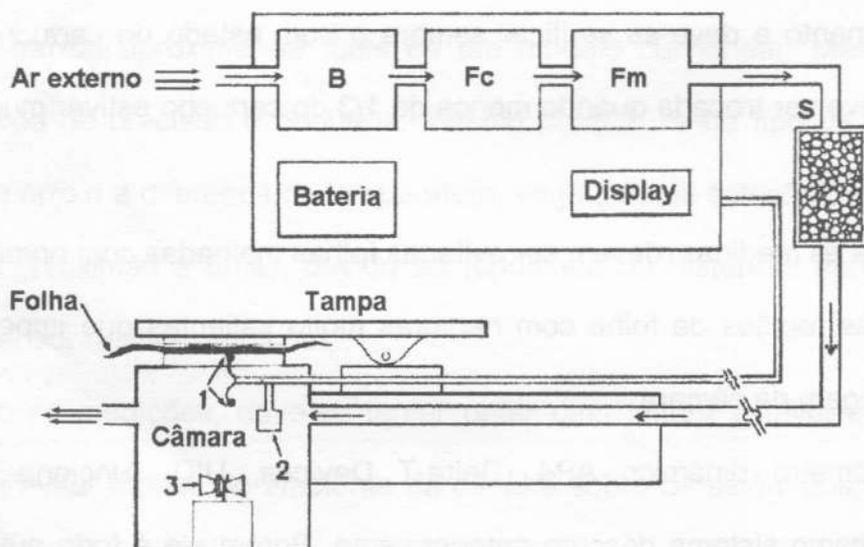


FIGURA 4 - Esquema simplificado, mostrando os componentes básicos de um porômetro de umidade constante. B- bomba de ar; Fc- válvula controladora de fluxo; Fm- medidor de fluxo (mass flow meter); S- tubo com Sílica Gel. Na câmara do porômetro, são mostrados: 1- Termistores para a temperatura da folha e da câmara; 2- Sensor de umidade; 3- Microventilador. (Adapatado de PEARCY et al. 1991).

Este tipo de equipamento apresenta vantagens em relação aos porômetros transientes. Neles, a umidade do interior da câmara pode ser selecionada previamente, podendo ser a mais próxima daquela observada no ambiente, respeitando porém o limite de atuação do sensor capacitivo Humicap, o qual a partir de 80% de umidade relativa, apresenta uma histerese acentuada. Com isto, pode-se evitar o efeito do ar seco sobre a abertura estomática nas espécies sensíveis ou ainda, pode-se simular várias condições internas de umidade no caso de se querer estudar o efeito do VPD, sobre a abertura dos estômatos. Também, evita-se os efeitos de dessorção de umidade no interior da câmara.

Outra vantagem é a calibração feita em bases mais reais, pois nesse porômetro, calibra-se o próprio sensor de umidade, passando-se correntes de ar com a umidade conhecida e pré-condicionada ou ainda, pode ser usado o princípio do equilíbrio da pressão de vapor d'água sobre a superfície de soluções saturadas com diferentes sais (Tabela 4).

TABELA 4 - Umidade relativa* sobre a superfície de soluções saturadas com diferentes sais (YOUNG, 1967).

SAL	UR (%) 25°C	Coefficiente de Temperatura (UR/°C)	Temp. Mínima de Operação (°C)
Cloreto de Lítio 1H ₂ O	11,3	0,01	20
Cloreto de Magnésio 6H ₂ O	32,7	0,06	15
Dicromato de Sódio 2H ₂ O	53,7	0,27	15
Cloreto de Sódio	75,1	0,01	25
Cromato de Potássio	86,5	0,06	20

* Outros valores podem ser encontrados em SLAVÍK, 1974, p.243.

As soluções de Cloreto de Sódio (UR=75,1%) e Cloreto de Magnésio (UR=32,7%) devem ser preferidas por representarem situações mais realistas de umidade encontrada na natureza e principalmente por estarem dentro da faixa operacional ótima do sensor de umidade (UR 15 a 80%). Durante a calibração usando soluções saturadas, é imprescindível que o equipamento esteja em um ambiente de temperatura estável, e que o sensor fique o mais próximo possível da superfície do líquido (deve-se ter todo o cuidado para não respingar solução no sensor, pois isto pode danificá-lo para sempre), e permitir um tempo longo (horas) de equilíbrio para que se possa ajustar os controles eletrônicos (potenciômetros) para os valores de umidade máxima e mínima.

Um componente importante no cálculo da resistência (r_s) ou condutância estomática (g_s) e da transpiração (E), é fluxo de ar seco que entra na câmara. Este fluxo normalmente é medido por um fluxímetro de massa, cujo esquema é exemplificado na Figura 5.

A calibração deste tipo de fluxímetro é complicada e normalmente eles vêm calibrados de fábrica. Porém, é aconselhável pelo menos conferir seu funcionamento pelo menos anualmente.

O modelo mais difundido deste tipo de porômetro é o LI-1600, cujo desenho esquemático da câmara é mostrado na Figura 6.

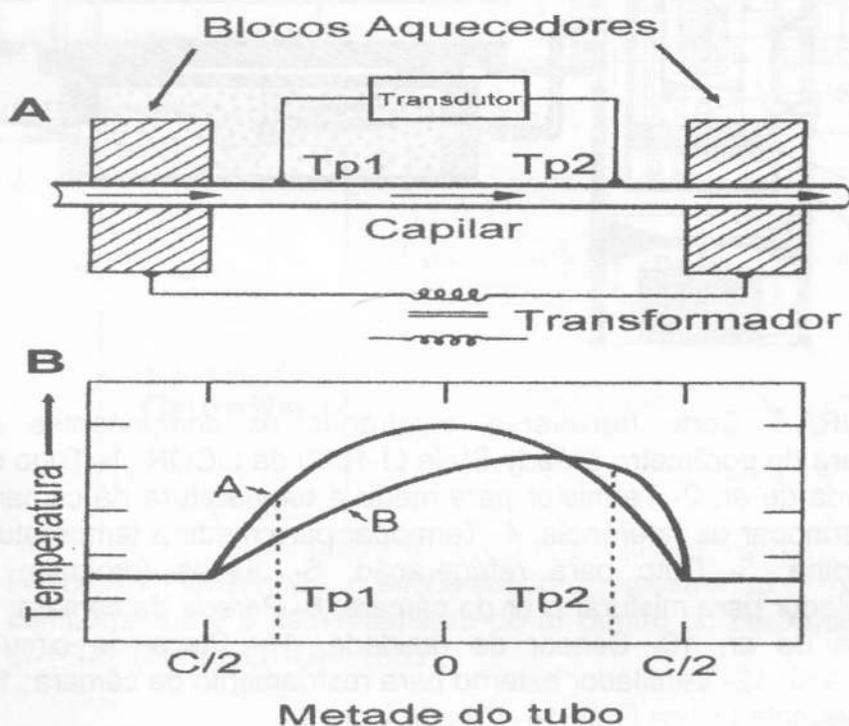


FIGURA 5 - (A) Estrutura básica de um fluxímetro de massa baseado no efeito de dissipação de calor. O ar passa por um capilar, aquecido simetricamente em relação ao seu ponto central por blocos e um transformador. As temperaturas dos dois lados é medida por termopares ou por termômetros de resistência de platina, ligados a um transdutor de sinal. Na figura (B), nota-se que ao passar o ar resfria um lado do tubo, modificando a distribuição de calor no seu corpo (situações A e B). Esta transferência de calor, provocada pelo fluxo, faz com que a temperatura em Tp2 seja mais alta do que em Tp1.

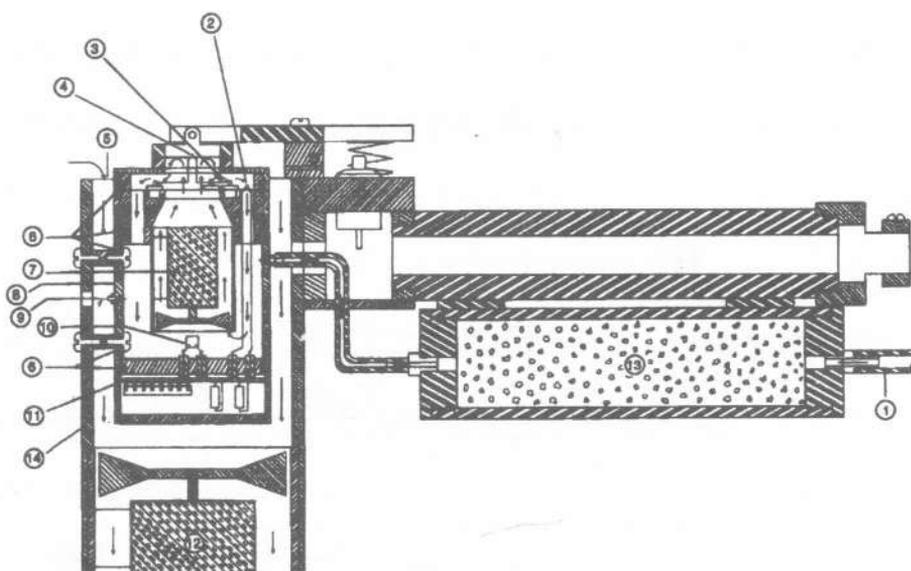


FIGURA 6 - Corte transversal mostrando os componentes da câmara do porômetro Steady-State LI-1600 da LICOR. 1- Tubo de entrada de ar; 2- Termistor para medir a temperatura da câmara; 3- Termopar de referência; 4- Termopar para medir a temperatura da folha; 5- Duto para refrigeração; 6- Juntas toroidais; 7- Ventilador para misturar o ar da câmara; 8- Parede da câmara; 9- Saída de ar; 10- Sensor de umidade; 11- Placa de circuito impresso; 12- Ventilador externo para resfriamento da câmara; 13- Dessecante (Sílica Gel); 14- Parede isolante.

Seu funcionamento é quase que totalmente microprocessado e o usuário seleciona a umidade de trabalho que será mantida durante as medidas e depois ajusta o fluxo de ar seco suficiente para contrabalançar a emissão de vapor d'água pela folha que faz aumentar a umidade dentro da câmara. Um desenho esquemático deste equipamento pode ser visto na Figura 7.

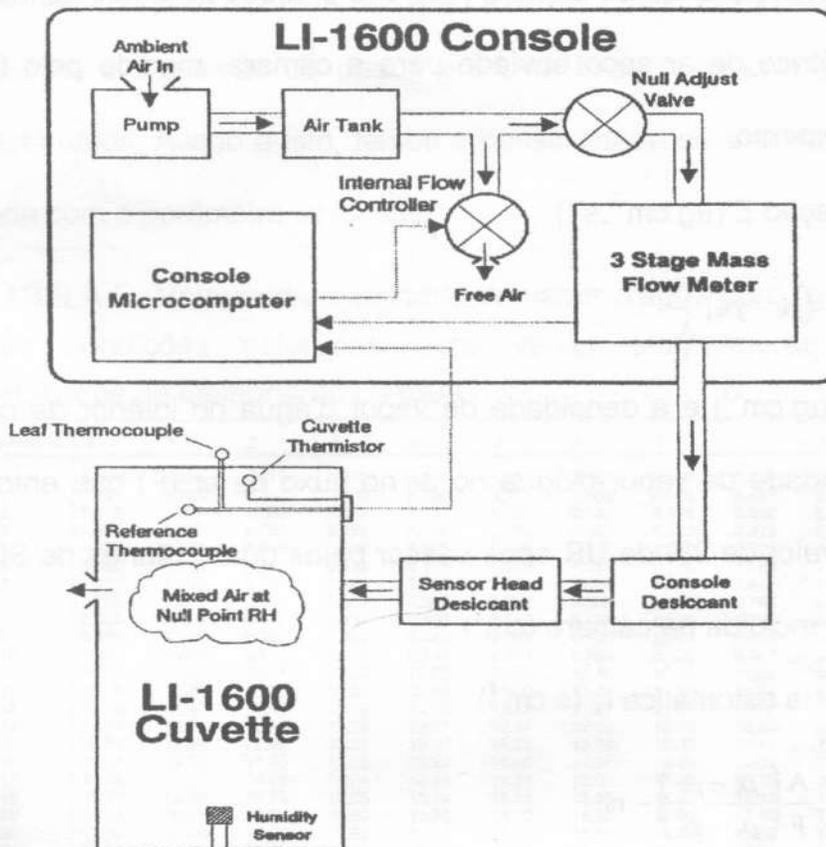


FIGURA 7 - Desenho esquemático mostrando os componentes e o caminhamento do ar dentro do porômetro LI-1600. (Fonte: LICOR, 1989).

No display do equipamento, podem ser lidas a resistência difusiva ou a condutância (dependendo do modelo, 1600; 1600C ou 1600M) havendo possibilidade de estocar todos os dados em uma central de aquisição de dados para serem posteriormente descarregadas em um PC ou impressora. Porém, seus principais parâmetros, são calculados pelas seguintes equações (LICOR, 1989):

- Fluxo volumétrico de ar seco F ($\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)

$$F = \left[\frac{T_c}{273,15} + 1 \right] \left[\frac{101,3}{P} \right] M$$

Onde T_c é temperatura da câmara ($^{\circ}\text{C}$), P é pressão barométrica local (kPa) e M é o fluxo volumétrico de ar seco enviado para a câmara, medido pelo fluxímetro de massa do equipamento.

- Transpiração E ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

$$E = (\rho_c - \rho_a) \frac{F}{A}$$

Onde ρ_c ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) é a densidade de vapor d'água no interior da câmara, ρ_a ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) é a densidade de vapor d'água no ar no fluxo de ar (F) que entra na câmara (assume-se um valor de 2% de UR após passar pelas duas colunas de Sílica Gel) e A é a área da folha incluída na câmara (cm^2).

- Resistência estomática r_s ($\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)

$$r_s = \frac{A}{F} \left(\frac{\rho_l - \rho_c}{\rho_c - \rho_a} \right) - r_b$$

Assume-se que a atmosfera do interior da folha está saturado de umidade. Assim, a densidade de vapor da folha (ρ_l) a densidade de saturação de vapor d'água na temperatura da folha. A densidade de vapor da câmara (ρ_c) é a densidade de saturação de vapor d'água na temperatura da câmara vezes a umidade relativa dividida por 100%. Também é assumido um valor de $0,15\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ para a resistência da camada limite (r_b).

Os valores da densidade de vapor d'água puro nas condições saturadas para várias temperaturas (ρ) são mostrados na tabela V. Estes são os valores estocados na memória do LI-1600 e são dados em $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. Para converter para $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, devem ser multiplicados por 10^{-6} .

Embora sejam mais caros e de manipulação mais trabalhosa, este tipo de porômetro permite a aquisição de dados em uma base mais próxima do ambiente natural dos estômatos. Aliado a isto, temos a possibilidade de estimar a transpiração, que não é dada com o porômetro transiente.

TABELA 5 - Valores da densidade de vapor d'água puro (g.m^{-3}) nas condições saturadas para várias temperaturas (ρ) estocados na memória do LI-1600.

Temp °C	.0	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9
0	4.847	4.881	4.915	4.948	4.983	5.107	5.052	5.087	5.122	5.157
1	5.192	5.228	5.264	5.300	5.338	5.373	5.409	5.446	5.483	5.521
2	5.559	5.597	5.635	5.673	5.711	5.750	5.789	5.828	5.868	5.907
3	5.947	5.987	6.028	6.068	6.109	6.150	6.192	6.233	6.275	6.317
4	6.360	6.402	6.445	6.488	6.531	6.575	6.619	6.663	6.707	6.752
5	6.792	6.842	6.887	6.933	6.979	7.025	7.071	7.118	7.165	7.212
6	7.260	7.307	7.355	7.404	7.452	7.501	7.550	7.600	7.649	7.699
7	7.750	7.801	7.851	7.902	7.954	8.006	8.058	8.110	8.163	8.218
8	8.270	8.324	8.377	8.431	8.485	8.540	8.595	8.650	8.708	8.762
9	8.819	8.875	8.932	8.989	9.048	9.104	9.163	9.221	9.280	9.339
10	9.399	9.459	9.519	9.579	9.641	9.702	9.763	9.825	9.887	9.949
11	10.01	10.08	10.14	10.20	10.27	10.33	10.40	10.46	10.53	10.58
12	10.66	10.73	10.79	10.86	10.93	11.00	11.07	11.14	11.21	11.27
13	11.35	11.42	11.49	11.56	11.63	11.70	11.77	11.85	11.92	11.99
14	12.07	12.14	12.22	12.29	12.37	12.44	12.52	12.60	12.67	12.75
15	12.83	12.91	12.99	13.07	13.14	13.23	13.31	13.39	13.47	13.55
16	13.63	13.72	13.80	13.88	13.97	14.05	14.14	14.22	14.31	14.39
17	14.48	14.57	14.65	14.74	14.83	14.92	15.01	15.10	15.19	15.28
18	15.37	15.46	15.55	15.65	15.74	15.83	15.93	16.02	16.12	16.21
19	16.31	16.41	16.50	16.60	16.70	16.80	16.90	17.00	17.10	17.20
20	17.30	17.40	17.50	17.60	17.71	17.81	17.91	18.02	18.12	18.23
21	18.34	18.44	18.55	18.66	18.77	18.88	18.99	19.10	19.21	19.32
22	19.43	19.54	19.65	19.77	19.88	20.00	20.11	20.23	20.34	20.46
23	20.58	20.70	20.81	20.93	21.05	21.17	21.29	21.42	21.54	21.66
24	21.78	21.91	22.03	22.16	22.28	22.41	22.54	22.66	22.79	22.92
25	23.05	23.18	23.31	23.44	23.58	23.71	23.84	23.97	24.11	24.24
26	24.38	24.52	24.66	24.79	24.93	25.07	25.21	25.35	25.49	25.63
27	25.78	25.92	26.06	26.21	26.35	26.50	26.65	26.79	26.94	27.09
28	27.24	27.39	27.54	27.69	27.85	28.00	28.15	28.31	28.46	28.62
29	28.78	28.93	29.09	29.25	29.41	29.57	29.73	29.89	30.05	30.22
30	30.38	30.55	30.71	30.88	31.05	31.22	31.38	31.55	31.72	31.89
31	32.07	32.24	32.41	32.59	32.76	32.94	33.11	33.29	33.47	33.65
32	33.83	34.01	34.19	34.38	34.56	34.74	34.93	35.11	35.30	35.49
33	35.68	35.87	36.06	36.25	36.44	36.63	36.83	37.02	37.22	37.41
34	37.61	37.81	38.01	38.21	38.41	38.61	38.81	39.01	39.22	39.42
35	39.63	39.84	40.05	40.26	40.47	40.68	40.89	41.10	41.31	41.53
36	41.75	41.96	42.18	42.40	42.62	42.84	43.06	43.28	43.50	43.73
37	43.96	44.18	44.41	44.64	44.87	45.09	45.33	45.56	45.79	46.02
38	46.26	46.50	46.74	46.97	47.21	47.45	47.69	47.94	48.18	48.42
39	48.67	48.92	49.17	49.42	49.66	49.92	50.17	50.42	50.67	50.93
40	51.19	51.45	51.70	51.96	52.22	52.49	52.75	53.01	53.28	53.54
41	53.82	54.09	54.36	54.63	54.90	55.17	55.44	55.72	56.00	56.27
42	56.56	56.84	57.12	57.40	57.68	57.97	58.25	58.54	58.83	59.12
43	59.41	59.70	60.00	60.29	60.59	60.88	61.18	61.48	61.78	62.08
44	62.39	62.70	63.00	63.31	63.62	63.92	64.23	64.55	64.86	65.17
45	65.50	65.81	66.13	66.45	66.77	67.10	67.42	67.74	68.07	68.40
46	68.73	69.06	69.39	69.73	70.06	70.40	70.73	71.07	71.41	71.75
47	72.10	72.45	72.79	73.13	73.48	73.84	74.18	74.53	74.89	75.25
48	75.61	75.98	76.33	76.69	77.05	77.41	77.77	78.14	78.51	78.88
49	79.26	79.63	80.01	80.38	80.76	81.14	81.52	81.90	82.28	82.67
50	83.06	83.45	83.84	84.23	84.62	85.01	85.41	85.81	86.20	86.60

3 - Porômetros de fluxo constante

Neste tipo de equipamento, existe uma unidade de suprimento de ar, a qual envia para a câmara um fluxo constante de ar seco ou com a umidade baixa. Uma vez no interior da câmara, este ar é misturado (microventilador) com o vapor d'água proveniente da transpiração da folha, atingindo um posterior equilíbrio, quando então este valor é registrado. A grande desvantagem é que os estômatos são expostos a condições de umidade muito diferentes das ambientais e, dependendo do fluxo enviado, podem ocorrer grandes diferenças de pressão de vapor, por dessorção de vapor a partir das paredes da câmara. Estes aparelhos são geralmente equipados com um analisador de infravermelho (IRGA) multicanal, que pode quantificar a variação de CO_2 e H_2O no fluxo de ar, permitindo o cálculo da fotossíntese, transpiração e condutância estomática simultaneamente. Por estas características, estes porômetros já interfaceiam com os analisadores portáteis de fotossíntese que serão vistos mais adiante.

Existem vários modelos disponíveis comercialmente, que podem usar o sensor capacitivo Humicap, para medir a umidade dentro da câmara ou dispor de IRGA'S, adequados para medir simultaneamente CO_2 e H_2O . Um diagrama básico deste tipo de equipamento pode ser visto na Figura 8.

Embora sejam teoricamente menos complexos que os porômetros de umidade constante, e possibilitar a quantificação do vapor de H_2O e CO_2 , estes equipamentos tem pouca portabilidade (são transportáveis) e necessitam de um IRGA diferencial com canais para quantificar estes dois gases, o que os tornam muito caros.

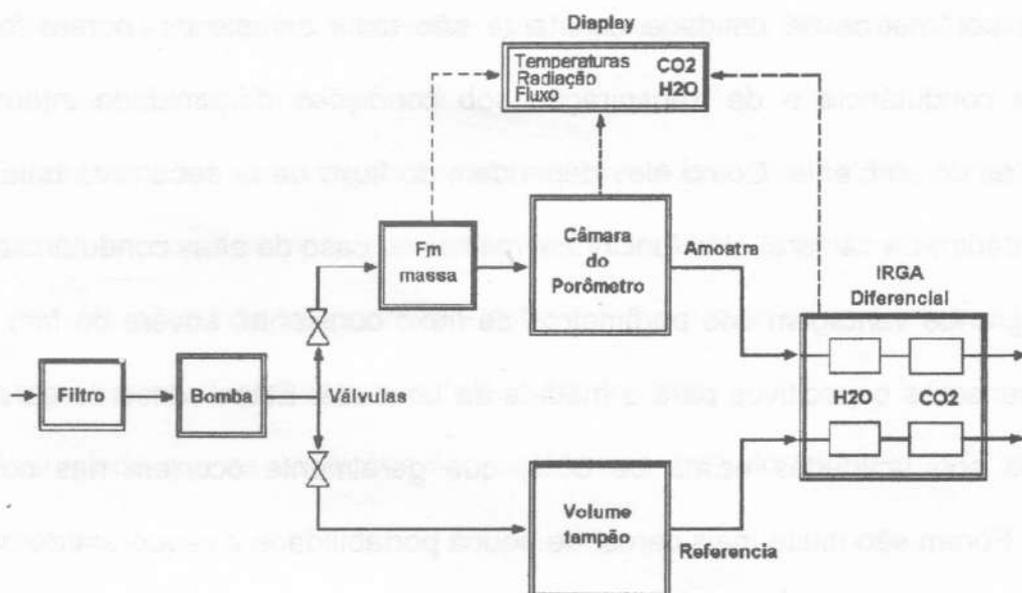


FIGURA 8 - Desenho esquemático mostrando os componentes e o caminhamento do ar dentro de um porômetro de fluxo constante (Adaptado de PEARCY, 1991).

As equações para a determinação dos diversos parâmetros (fotossíntese, transpiração e condutância) serão mostradas na seção que vai explorar os analisadores de fotossíntese.

Comparativamente, os porômetros transientes são os mais baratos do que os outros, sofrendo porém com os fenômenos de adsorção e dessorção de vapor dentro da sua câmara, além de não permitir o cálculo da taxa de transpiração. Também o tempo de resposta do sensor de umidade, erros no timer e o não estabelecimento de gradientes uniformes de umidade principalmente em condições não isotérmicas, fazem com que eles sejam menos precisos em condições de condutâncias altas. A observação constante e cuidadosa das diferenças de temperatura durante a operação e a recalibração constante desses aparelhos no campo, aumenta a precisão dos dados obtidos.

Os porômetros de umidade constante são mais complexos, porém fornecem dados de condutância e de transpiração sob condições de umidade interna mais próximas as do ambiente. Como eles dependem do fluxo de ar seco para balancear a umidade dentro da câmara, eles funcionam melhor no caso de altas condutâncias.

A grande vantagem dos porômetros de fluxo constante, advém do fato de não usarem sensores capacitivos para a medida da umidade. Estes sensores apresentam problemas sob umidades acima de 80%, que geralmente ocorrem nas condições tropicais. Porém são muito mais caros, de pouca portabilidade e requerem do operador um conhecimento teórico mais aprofundado.

4 - Conversão de unidades de condutância (gs)

O embasamento teórico que permitiu o desenvolvimento dos porômetros e a derivação da resistência difusiva (r), levou a utilização da unidade de velocidade como s.cm^{-1} para expressar a resistência exercida pelos estômatos e pela cutícula à difusão de vapor d'água. Porém, apesar de fisicamente correta, esta unidade tinha pouco poder ilustrativo. Por isso, dentre outros motivos, houve uma tendência de substituir a expressão resistência por condutância (g), que é simplesmente o inverso da resistência, e que portanto tem a dimensão de cm.s^{-1} .

$$g = \frac{1}{r}$$

Grande parte da bibliografia científica mais antiga ainda usou muito esta unidade, a qual foi substituída posteriormente por unidades baseadas em fluxos molares ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), que têm um significado fisiológico mais claro e baseiam-se em

quantidades mais compatíveis aquelas que expressam as taxas de fotossíntese ($\mu \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e transpiração ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Estas unidades podem ser intercorrelacionadas através de transformações simplificadas, tendo-se sempre em mente que isso pode levar a erros, basicamente ditados por diferenças de temperatura - entre a folha e o ar do interior da câmara - e pressão atmosférica, a qual depende da altitude do local.

Assumindo que as condições são isotérmicas, os valores em cm.s^{-1} , podem ser convertidos por:

$$g(\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}) = g(\text{cm.s}^{-1}) 0,446 \left[\frac{273}{(T+273)} \right] \left[\frac{P}{101,3} \right]$$

Onde T é a temperatura em $^{\circ}\text{C}$ e P é pressão atmosférica em kPa.

Desde que se conheça a altitude, a pressão atmosférica em kPa pode ser estimada pela seguinte relação:

$$P = 101,325 \left[1 - (2,2569 \cdot 10^{-5} Z) \right]^{5,2553}$$

Onde Z é a altitude em metros.

Alternativamente, esta conversão pode ser feita usando-se fatores já previamente calculados, para diferentes temperaturas e pressões. Uma série destes valores é mostrada na Tabela 6.

No caso de condições não isotérmicas (temp. da folha \neq da temp. da câmara), deve-se entrar com a temperatura da folha e a pressão (kPa) adequadas, para encontrar um fator o qual multiplicado pela condutância em mm.s^{-1} para se obter valores em $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A rigor, estes fatores de conversão são corretos somente sob condições isotérmicas. Porém, se a diferença entre a temperatura da folha e a temperatura do ar do interior da câmara for mantida dentro do limite de $\pm 5^{\circ}\text{C}$, o erro decorrente de sua utilização é estimado em 1-2%. O mais importante é sempre procurar utilizar a temperatura da folha para estas conversões (McDERMITT, 1991).

TABELA 6 - Fatores de conversão para transformar valores de condutância ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$) em valores de $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (adaptado de PEARCY et al., 1991).

P kPa	T °C								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
102	0.0435	0.0427	0.0420	0.0413	0.0406	0.0399	0.0393	0.0386	0.0380
101	0.0439	0.0432	0.0424	0.0417	0.0410	0.0403	0.0397	0.0390	0.0384
100	0.0444	0.0436	0.0428	0.0421	0.0414	0.0407	0.0400	0.0394	0.0388
99	0.0448	0.0440	0.0433	0.0425	0.0418	0.0411	0.0405	0.0398	0.0392
98	0.0453	0.0445	0.0437	0.0430	0.0422	0.0415	0.0409	0.0402	0.0396
97	0.0457	0.0449	0.0442	0.0434	0.0427	0.0420	0.0413	0.0406	0.0400
96	0.0462	0.0454	0.0446	0.0439	0.0431	0.0424	0.0417	0.0411	0.0404
95	0.0467	0.0459	0.0451	0.0443	0.0436	0.0429	0.0422	0.0415	0.0408
94	0.0472	0.0464	0.0456	0.0448	0.0440	0.0433	0.0426	0.0419	0.0413
93	0.0477	0.0469	0.0461	0.0453	0.0445	0.0438	0.0431	0.0424	0.0417
92	0.0482	0.0474	0.0466	0.0458	0.0450	0.0442	0.0435	0.0428	0.0422
91	0.0488	0.0479	0.0471	0.0463	0.0455	0.0447	0.0440	0.0433	0.0426
90	0.0493	0.0484	0.0476	0.0468	0.0460	0.0452	0.0445	0.0438	0.0431
89	0.0499	0.0490	0.0481	0.0473	0.0465	0.0457	0.0450	0.0443	0.0436
88	0.0504	0.0495	0.0487	0.0478	0.0470	0.0463	0.0455	0.0448	0.0441
87	0.0510	0.0501	0.0492	0.0484	0.0476	0.0468	0.0460	0.0453	0.0446
86	0.0516	0.0507	0.0498	0.0490	0.0481	0.0473	0.0466	0.0458	0.0451
85	0.0522	0.0513	0.0504	0.0495	0.0487	0.0479	0.0471	0.0464	0.0456
84	0.0528	0.0519	0.0510	0.0501	0.0493	0.0485	0.0477	0.0469	0.0462
83	0.0535	0.0525	0.0516	0.0507	0.0499	0.0490	0.0483	0.0475	0.0467
82	0.0541	0.0532	0.0522	0.0513	0.0505	0.0496	0.0488	0.0481	0.0473
81	0.0548	0.0538	0.0529	0.0520	0.0511	0.0503	0.0494	0.0487	0.0479
80	0.0555	0.0545	0.0535	0.0526	0.0517	0.0509	0.0501	0.0493	0.0485

4 - Fotossíntese e transpiração

A importância da mensuração das taxas fotossintéticas em vários campos do estudo das reações das plantas superiores atualmente é óbvia. Nos últimos 50 anos, têm-se visto uma enorme evolução no campo da instrumentação voltada para ciências biológicas, aproveitando avanços da física, físico-química, polímeros e outros materiais, que se fez sentir também na fisiologia vegetal.

Atualmente, é possível determinar a atividade fotossintética de comunidades vegetais, folhas individuais, discos foliares e mesmo de cloroplastos isolados, dependendo do nível de organização em que se trabalha, baseado nas variações de CO_2 ou de O_2 . Em alguns destes níveis (comunidades, folhas individuais), é possível - e desejável - acoplar medidas também da transpiração (conseqüentemente gs), o que aumenta a potencialidade de interpretação dos dados de fotossíntese, através de adaptações do sistema usado.

Não existe um sensor individual para medir a fotossíntese. Deste modo, normalmente são usados sistemas desenvolvidos com base em vários modos de detecção do CO_2 ou O_2 , que variam em precisão e complexidade. A evolução histórica mostra que vários modos de detecção das trocas gasosas já foram usados, podendo ser citados como exemplo a captação do CO_2 por meios alcalinos líquidos ou sólidos, variação do pH de sistemas tampão, medidas manométricas da evolução do CO_2 e O_2 , mensuração da incorporação radioisótopos (C^{14}), variação da quantidade de O_2 por eletrodos de Clark e outros métodos que podem ser vistos em SESTÁK et al. (1971).

Atualmente, predominam três modos de detecção, dependendo do nível de organização no qual a fotossíntese é estudada. Nos casos de comunidades vegetais,

plantas isoladas e folhas individuais, é usada principalmente a medida das trocas de CO_2 , com sistemas baseados em analisadores de infravermelho (infrared gás analysers), conhecidos mais comumente como IRGA'S. No caso de discos de folhas e cloroplastos isolados, os sistemas baseiam-se nas trocas de O_2 , detectadas por eletrodos de Clark (DELIEU & WALKER, 1972) e finalmente ao nível molecular, são usados radioisótopos ou reduções do sistema de NAD, medidas em espectrofotômetros no ultravioleta.

O sistemas baseados na análise das trocas de CO_2 por meio de um IRGA, são hoje muito difundidos, devido a sua precisão e flexibilidade, que permitem sua aplicação nos mais variados arranjos, para o estudo do efeito de fatores ambientais sobre a fotossíntese e devido à evolução da portabilidade destes sistemas, o que permitiu sua ampla utilização no campo.

Basicamente, um sistema para quantificação da fotossíntese, é constituído de um IRGA, uma câmara de assimilação, um conjunto de bombeamento e condicionamento de ar, controladores de fluxo, tubos e conexões.

O funcionamento dos IRGA'S baseia-se no fato de que as moléculas de gases heteroatômicos, absorvem radiação infravermelha (de comprimentos de onda longos), e que cada gás tem um espectro de absorção específico nesta região. Este mesmo princípio, permite a quantificação de uma série de gases de moléculas heteroatômicas tais como CO_2 , H_2O , NH_3 , CO , N_2O , NO e hidrocarbonetos gasosos. Felizmente os gases formados por dois átomos idênticos (O_2 e N_2) também presentes na atmosfera, não absorvem radiação nesta região e assim não interferem com os outros. A principal

banda de absorção do CO_2 , situa-se no comprimento de onda de $\lambda = 4,25 \mu\text{m}$, com picos secundários em 2,66; 2,77 e 14,99 μm .

O único gás que apresenta interferência com CO_2 , é o vapor d'água, o qual apresenta uma banda de absorção em 2,7 μm , constituindo assim um problema na quantificação do CO_2 . Para eliminar esta interferência, geralmente a corrente de ar enviada para análise no IRGA é previamente secada ou colocam-se filtros no equipamento, para a eliminação da radiação onde a absorção dos dois gases coincide.

A absorção da radiação infravermelha pelo CO_2 segue a lei de Berr-Lambert, dependendo portanto do percurso da radiação no meio gasoso e da concentração molar daquele gás na mistura. Assim, é possível calibrar estes equipamentos com uma mistura padrão conhecida constituída de CO_2 e um gás inerte como o N_2 .

Basicamente um IRGA é constituído de três parte: 1- Fonte de radiação infravermelha; 2- Célula ou células para os gases; 3- Detetor de radiação (Figura 9).

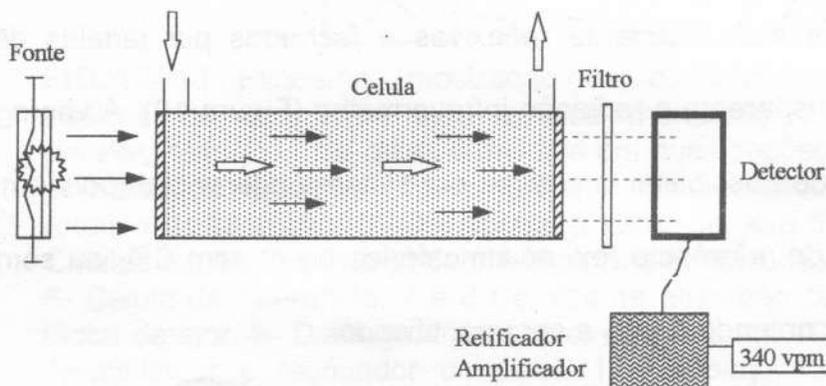


FIGURA 9 - Esquema simplificado, mostrando os componentes básicos de um IRGA. A fonte de radiação é constituída de um filamento de tungstênio aquecido a 600 - 800°C. A radiação emitida passa através da célula de análise por onde circula ar com CO_2 (setas largas), passa por um filtro que seleciona a radiação de $\lambda = 4,25 \mu\text{m}$ e entra em um detetor, o qual gera um sinal, que após retificado e amplificado, gera um número no display.

Existem basicamente dois tipos de IRGA, os dispersivos (DIR) e os não dispersivos (NDIR). No primeiro tipo, a radiação passa por um monocromador, que seleciona uma banda específica (como em um espectrofotômetro) e permite assim, traçar o espectro de absorção de um determinado gás heteroatômico, e por isso são mais caros. Quando se necessita quantificar somente um ou dois tipos de gases (CO_2 e H_2O), prefere-se os dispersivos, que usam toda a faixa de radiação. De todo modo, para o uso em estudos de fotossíntese, um IRGA deve possuir capacidade de resolução na faixa de 0,1 a 1,0 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de ar, (0,1 - 1,0 vpm) em amostras de ar que normalmente contêm 340 vpm de CO_2 (ar atmosférico).

O modelo mostrado na figura anterior é bastante simples. Na verdade estes equipamentos possuem uma célula selada preenchida com um gás neutro (N_2) e outra por onde pode ser passada uma corrente de gás a ser analisado (IRGAS absolutos). Porém, a maioria dos IRGAS atualmente possui duas células montadas em paralelo, com paredes internas altamente reflexivas e fechadas por janelas de um material inteiramente transparente a radiação infravermelha (Figura 10). A vantagem deste tipo de arranjo é o de possibilitar a análise em sistema diferencial, pois em uma célula é passado o gás de referência (ex. ar atmosférico ou ar sem CO_2 ou somente N_2) e na outra flui o gás contendo o CO_2 a ser quantificado.

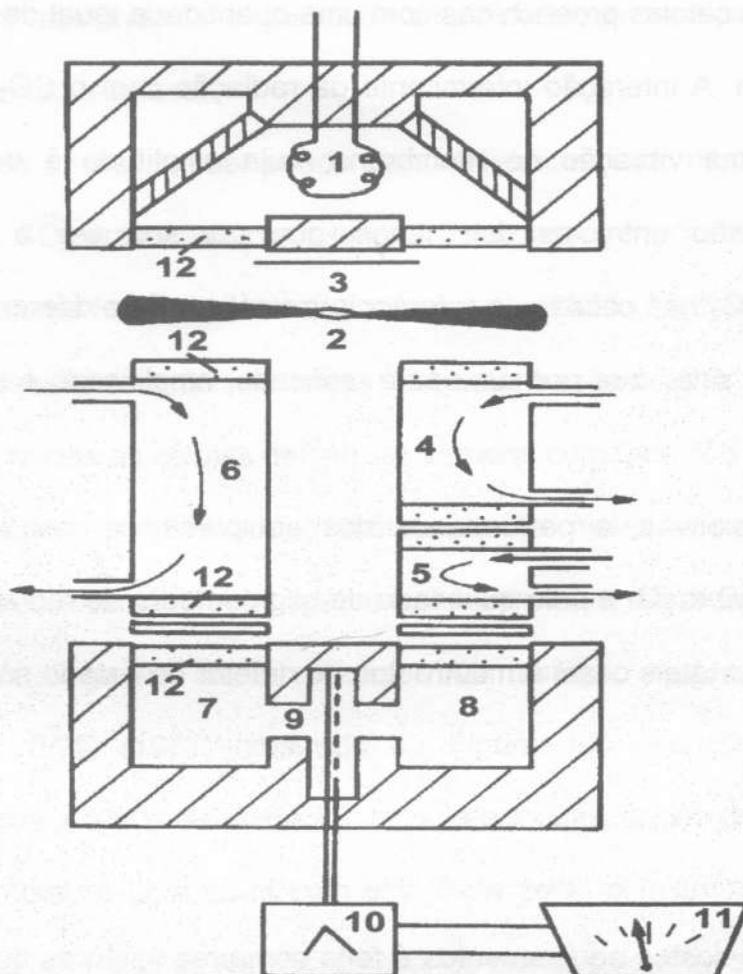


FIGURA 10 - Esquema, mostrando os componentes básicos de um IRGA com células montadas em paralelo, em que uma delas é dividida em duas seções. 1- Fonte de radiação infravermelha. 2- Segmentador rotativo da radiação. 3- Ocluser para zeragem. 4 e 5- Células de análise que podem ser ou não conectadas. 6- Célula de referencia. 7 e 8 Células de absorção do bloco detetor. 9- Diafragma transdutor (efeito Luft). 10- Amplificador e retificador do sinal. 11- Display. 12- Janelas transmissoras de infravermelho. O fluxo de gases segue as setas.

A radiação infravermelha passa pelas células e é mais ou menos atenuado dependendo da quantidade de CO_2 presente. A radiação é cortada intermitentemente provocando pulsos, os quais incidem posteriormente no detetor. Este detetor é

constituído de duas células preenchidas com uma quantidade igual de CO_2 , separadas por uma membrana. A interação intermitente da radiação com o CO_2 contido nessas células provoca uma vibração na membrana, cuja amplitude é determinada pela diferença de pressão entre os dois lados, que por sua vez é dependente da concentração de CO_2 nas células de referência e análise. Esta diferença de amplitude é transformada em sinal, que por sua vez é retificado, amplificado e enviado para um display.

Por esses motivos, a performance dos equipamentos deste tipo são muito influenciados pela vibração e pela qualidade do segmentador de radiação. Atualmente, os equipamentos portáteis usam um outro tipo de detetor de estado sólido, que diminui esta dependência.

Calibração

A calibração destes equipamentos é feita com uma misturas de gases (CO_2 em N_2) de concentrações conhecidas, preferentemente acondicionada em garrafas de alumínio, pois as garrafas de ferro podem com o tempo adsorver CO_2 nas suas paredes, e ar desprovido de CO_2 , que pode ser obtido passando o ar por uma coluna de cal sodada (Soda Lime), a qual retira e retém todo o CO_2 , ou mesmo nitrogênio. Existem duas formas de calibração possível, dependendo da aplicação.

Se interessa a quantidade exata de CO_2 em uma mistura de gases, deve ser usada a calibração no modo absoluto, onde as duas células (análise e referência) são varridas com ar sem CO_2 , para ajuste do Zero do sinal com o auxílio do ocluser. Posteriormente, são passadas misturas de CO_2 de concentrações decrescentes pela

célula de análise. ajustando-se o ganho do amplificador. A cada passo, é necessário checar o zero usando o ocluser.

No caso do analisador ser usado para determinar uma mudança dinâmica na concentração de CO_2 provocada por exemplo pela passagem do fluxo de ar por uma câmara contendo uma folha, o analisador deve ser calibrado no modo diferencial, pois neste modo, é possível detectar mudanças da concentração de CO_2 da ordem de $100\mu\text{g.m}^{-3}$. Para isso, ambas as células devem ser varridas com uma corrente da mistura de gás com a concentração conhecida, e posteriormente, passa-se na célula de análise uma mistura com uma concentração ligeiramente menor (ex. 400 e 350 ppm de CO_2 em N_2), ajustando-se o ganho do amplificador. Um artifício que foi introduzido por PARKINSON e LEGG (1971) mostrado na Figura 10, é encontrado em alguns equipamentos onde a célula de análise é dividida em duas, sendo uma longa com 95% do comprimento total, e uma curta com 5%. Para zerar o instrumento, uma mistura padrão é passada por todas as células, colocando um tubo ligando as seções da célula de análise. Posteriormente, passa-se ar sem CO_2 pela célula menor, que equivale a 5% de decréscimo na concentração, que permite ajustar o sinal como no modo diferencial.

As misturas de gases costumam em geral muito caro, assim como as bombas misturadoras especiais para diluir gases puros em proporções definidas. Uma saída econômica, consiste em comprar uma garrafa de ar comprimido seco normal (sem retirada do CO_2), vendido em cilindros maiores (9m^3), e quantificar em um IRGA, no modo absoluto a quantidade de CO_2 presente. Este gás, pode ser usado como padrão secundário, bastando checar a concentração de tempos em tempos. Isto permite uma grande economia de gás de calibração puro.

Medidas do fluxo

A mensuração do fluxo é fundamental na quantificação das trocas gasosas entre as folhas e a atmosfera da câmara. A taxa de fluxo é medida por equipamentos conhecidos como fluxímetros os quais dependendo do princípio físico usado na sua concepção podem fornecer uma estimativa do fluxo volumétrico (f_v em $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) ou fluxo de massa (f_w em $\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$).

O princípio de um fluxímetro de massa do tipo térmico já foi mostrado na seção de porometria. Outros tipos de fluxímetro usam a quantificação do movimento de rotação de um pequeno motor em contato com o fluxo de gás ou diferenças de pressão. Estes tipos de fluxímetros suplantaram os clássicos fluxímetros de área variável, os quais são porém até hoje muito úteis.

Os fluxímetros de área variável consistem de tubos de vidro, feitos e graduados com precisão, nos quais diâmetro do orifício interno diminui suavemente do topo para a base. Dentro deste tubo, é colocado um objeto sólido (flutuador), que pode ter o formato esférico ou cônico, feitos de alumínio ou outro material, tendo porém um diâmetro menor do que o diâmetro interno da base do tubo. Quando um determinado fluxo de ar é passado por dentro deste tubo, o flutuador é empurrado para o alto até atingir uma posição de equilíbrio onde seu peso é contrabalançado pelo fluxo. Estes instrumentos, já vem calibrados de fábrica sob condições específicas de temperatura e pressão, e podem sofrer erros nos casos de serem usados em condições diferentes e de deposição de poeira no seu interior. As fabricas fornecem gráficos de correção de temperatura, mas o ideal é proceder a recalibração in situ, a qual para as baixas taxas

de fluxo usadas nos sistemas de fotossíntese pode ser feita com fluxímetros de bolha de sabão.

Um fluxímetro de bolha de sabão pode ser construído com uma bureta de boa qualidade, em cuja extremidade é adaptada uma junção em T (Figura 11). Nas duas outras extremidades do T são conectados o tubo de ar e um bulbo de borracha preenchido com água e sabão, a qual quando apertada forma uma bolha, cujo movimento é registrado em um cronômetro. De posse do volume, e do tempo decorrido, pode-se calcular o fluxo. Com a combinação de buretas de volumes diferentes, pode-se ter uma medida bastante acurada de várias taxas de fluxo. Outra solução é usar uma proveta cheia, invertida dentro de um vasilhame estreito com água, e fazer o ar borbulhar dentro dela, calculando o fluxo pela taxa de deslocamento de água, mas o fluxímetro de bolha de sabão deve ser preferencialmente usado, sobretudo para fluxos baixos ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

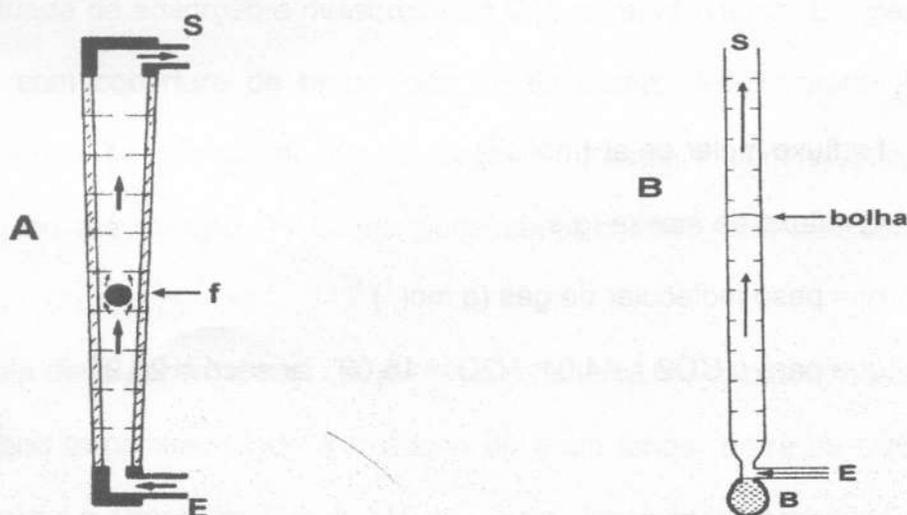


FIGURA 11 - Fluxímetro de área variável (A) e esquema de um fluxímetro de bolha de sabão (B). E- entrada de ar; S- saída de ar; B- bulbo de borracha, f- flutuador.

Nos cálculos das taxas de fotossíntese ou de transpiração, necessitamos do fluxo molar (f em $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) que pode ser derivado quer do fluxo volumétrico (f_v em $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$) quer do fluxo de massa (f_w em $\text{kg}\cdot\text{s}^{-1}$), pelas equações:

$$f = \frac{f_v}{1000} \cdot \frac{1}{22,4} \cdot \frac{273,15}{(273,15 + T)} \cdot \frac{p}{101,3} \cdot \frac{1}{60}$$

Onde:

f = fluxo molar de ar ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)

f_v = fluxo volumétrico de ar ($\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$)

22,4 = volume em dm^3 de um mol de ar nas CNTP.

T = temperatura do ar durante a mensuração ($^{\circ}\text{C}$)

p = pressão atmosférica durante a mensuração (kPa)

$$f = \frac{f_w}{m}$$

Onde:

f = fluxo molar de ar ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)

f_w = fluxo de massa ($\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$)

m = peso molecular do gás ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

que para o $\text{CO}_2 = 44,01$; $\text{H}_2\text{O} = 18,02$; ar seco = 28,97

Câmaras de assimilação

Com o advento dos sistemas modernos, que já são projetados e construídos incorporando todos os componentes necessários (câmara, analisador, tubos etc.) visando a portabilidade, os sistemas clássicos (construídos pelo próprio pesquisador) estão perdendo lugar, embora ainda possam ser usados para aplicações específicas como as medidas a longo prazo em estudos de enriquecimento de CO_2 , efeitos de poluentes, comparação da capacidade fotossintética de diferentes materiais genéticos ou mesmo quando já se dispõe de um IRGA estacionário no laboratório.

Na construção de uma câmara de assimilação, deve-se procurar um desenho que não contenha cantos mortos (formas arredondadas), para evitar a formação de bolsões de ar parado, e que tenha o menor volume vazio possível, para permitir um rápido equilíbrio das trocas gasosas entre a folha e o ambiente da câmara (Figura 12).

O material usado no corpo da câmara, deve ser escolhido com base na sua baixa capacidade de adsorção e dessorção de CO_2 e vapor d'água. Em geral, as ligas de alumínio com cobertura de níquel são ideais porém, este material é difícil de trabalhar e oxida facilmente. A melhor opção é trabalhar com plásticos como o polipropileno ou até mesmo PVC, que pode ser recoberto com polipropileno auto-adesivo.

A janela deve ser feita com um material relativamente não permeável ao CO_2 e H_2O e com boa transmissividade a radiação de onda longa. Entre os materiais mais acessíveis estão o Propafilm C e o policarbonato. No campo, pode ser usada uma lâmina de perspex transparente sobre a câmara para eliminar parcialmente a incidência de radiação longa.

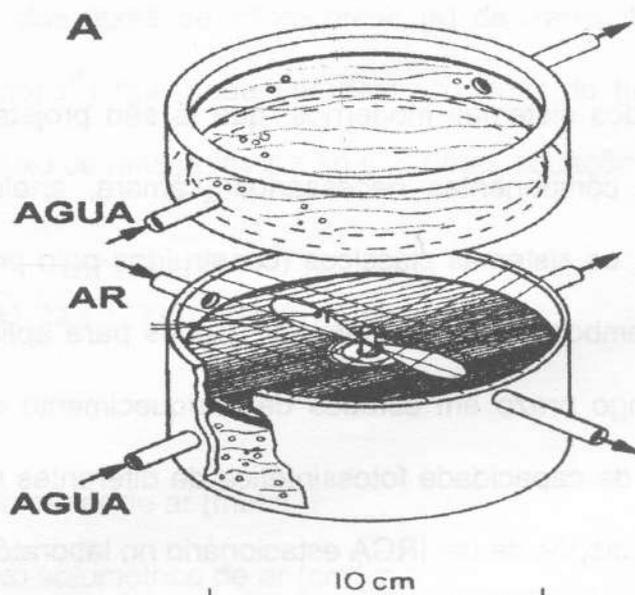


FIGURA 12 - Desenho de uma câmara simples que pode ser construída com alumínio e acrílico. A refrigeração é feita com simples circulação de água. A folha é mantida na posição por um trançado de fios de nylon, onde é colocado um termistor para medir a sua temperatura.

Algumas câmaras possuem sensores capacitivos HUMICAP incorporados para permitir o cálculo da condutância e transpiração, juntamente com microtermistores para a temperatura da folha e do ar do seu interior, o qual deve ser muito bem homogeneizado com o uso de microventiladores sem escovas (os ventiladores usados em microcomputadores são adequados(Figura 13).

A ventilação, auxilia bastante no controle da temperatura interna porém, dependendo do sistema, são usados trocadores de calor (radiadores), com base em blocos Peltier ou mesmo com circuladores de água (termostatos-criostatos), que são caros e difíceis de transportar (Figura 14).

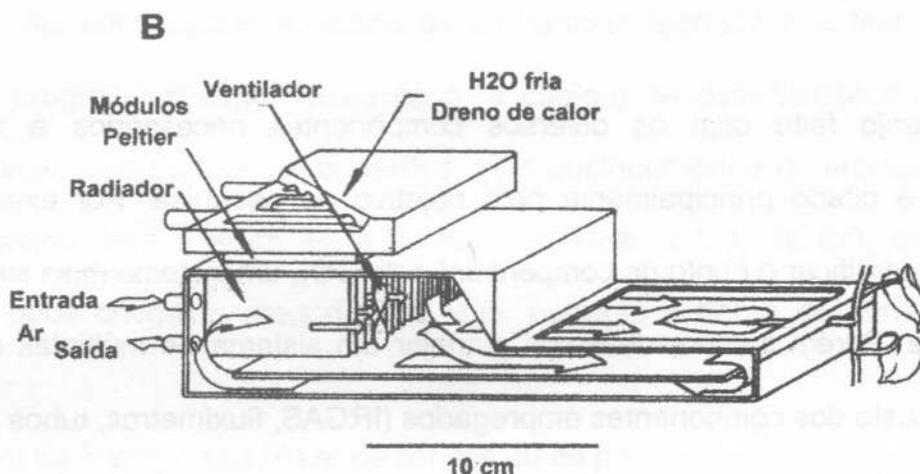


FIGURA 13 - Desenho de uma câmara mais complexa, onde a refrigeração é feita com blocos de efeito Peltier. A circulação de água troca calor com os módulos.

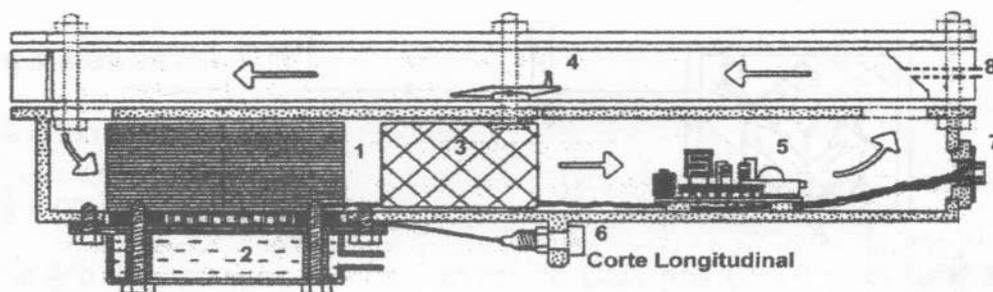


FIGURA 14- Corte longitudinal de uma câmara mais complexa. 1- Radiadores; 2- Banho para troca de calor com os módulos Peltier (acima); 3- Microventilador tubular; 4- Sistema basculante com microtermistor para temperatura da folha; 5- Módulo de controle do sensor HUMICAP e termistor para temperatura do ar; 6- Conexão para controle dos módulos Peltier; 7- Conexão para sinais de temperatura e umidade; 8- Entrada e saída de ar.

Sistemas

O arranjo feito com os diversos componentes necessários à medida da fotossíntese é ditado principalmente pelo objetivo da pesquisa. Por exemplo, se o interesse é quantificar o ponto de compensação de CO_2 , um sistema mais simples pode ser suficiente. Porém sempre devemos planejar um sistema de múltiplas aplicações, haja vista o custo dos componentes empregados (IRGAS, fluxímetros, tubos etc...).

Existem basicamente três tipos de arranjo - ou sistemas - passíveis de serem montados, que são os sistemas fechado, semi-aberto (ou semi-fechado) e aberto.

O sistema fechado é o mais simples, podendo ser usado um IRGA absoluto (fluxo de ar somente pela célula de análise). O seu esquema pode ser visto na Figura

15.

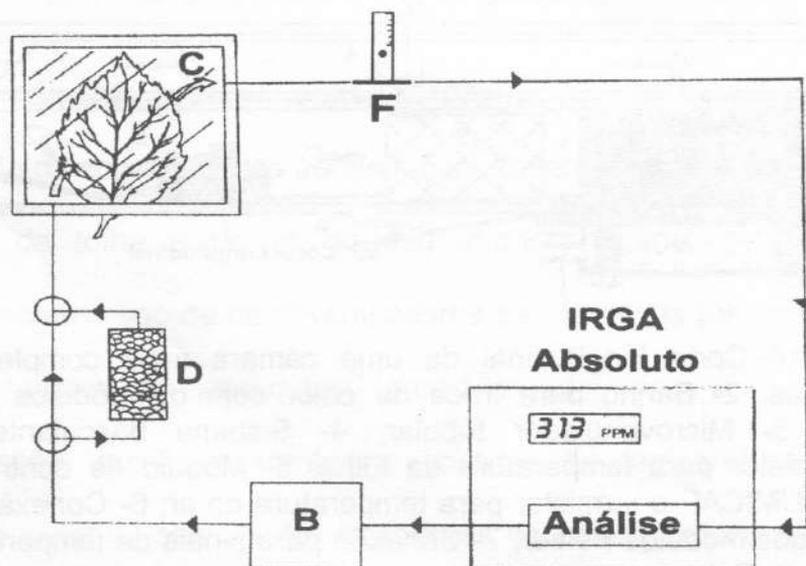


FIGURA 15 - Sistema fechado, mostrando C- câmara de assimilação; F- Fluxímetro; B- bomba de ar; D- tubo de Perclorato de Magnésio ou Cloreto de Zinco, usada para controlar a umidade do ar dentro do circuito.

O ar flui continuamente dentro de um circuito fechado e o teor de CO_2 vai diminuindo progressivamente. Neste caso, a câmara de assimilação deve ser bem vedada, assim como os tubos e conexões, pois qualquer saída ou entrada de ar com CO_2 no sistema, leva a erros. Para se ter uma idéia, o teor de CO_2 dentro de um laboratório pode chegar a mais de 700 vpm, portanto o dobro do atmosférico (340 vpm).

A taxa de fotossíntese (A) pode ser calculada por:

$$A = \frac{c_1 - c_2}{(t_1 - t_2) \cdot 10^3} \cdot \frac{v}{22,4} \cdot \frac{p}{101,325} \cdot \frac{273,13}{T \cdot S}$$

Onde:

c_1 e c_2 , são as frações molares do CO_2 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), nos tempos t_1 e t_2

v é o volume total do sistema (mL)

S é a área da folha (m^2)

T é a temperatura do ar

p é a pressão

22,4 é o volume ocupado por 1mmol de CO_2 nas CNTP (273,13°K e 101,325 kPa).

No sistema semi-fechado, o arranjo é uma derivação do sistema fechado, onde se procura estabelecer um equilíbrio do CO_2 dentro do circuito, através da injeção de CO_2 puro (Figura 16) para contrabalançar aquele absorvido pela folha. Neste caso, pode-se usar um IRGA absoluto, cujo sinal comanda um sistema de solenóides e fluxímetro de massa. Neste caso pode-se pré-selecionar um diferencial de concentrações (ex. 400 a 380 vpm).

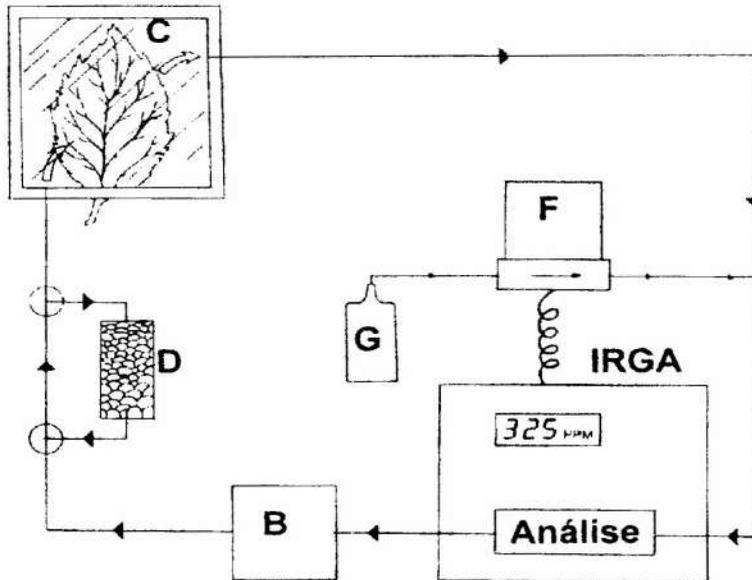


FIGURA 16 - Sistema semi-fechado, mostrando C- câmara de assimilação; F- Fluxímetro de massa térmico; B- bomba de ar; D- tubo de Perclorato de Magnésio ou Cloreto de Zinco, usada para controlar a umidade do ar dentro do circuito; G- Cilindro de CO₂ puro.

Neste caso, A, é determinada por:

$$A = \frac{f_c}{S}$$

Onde:

f_c é o fluxo molar de CO₂ para o sistema ($\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)

S é a superfície da folha (m^2)

Neste sistema, a pressão de vapor d'água dentro do circuito deve ser mantida constante ou monitorada para permitir a correção da concentração do CO₂ em ar seco.

Neste caso também é exigida uma boa vedação em todo o circuito.

Os sistemas abertos (Figura 17) são os mais flexíveis, exigindo porem um IRGA diferencial o qual é usado para medir a diferença de concentração de CO₂ entre o ar

atmosférico (que passa pela célula de referência) e o ar que passa por dentro da câmara de assimilação. Estes sistemas são em geral mais caros, porem permitem as mais diversas aplicações e simulam condições bem próximas das naturais.

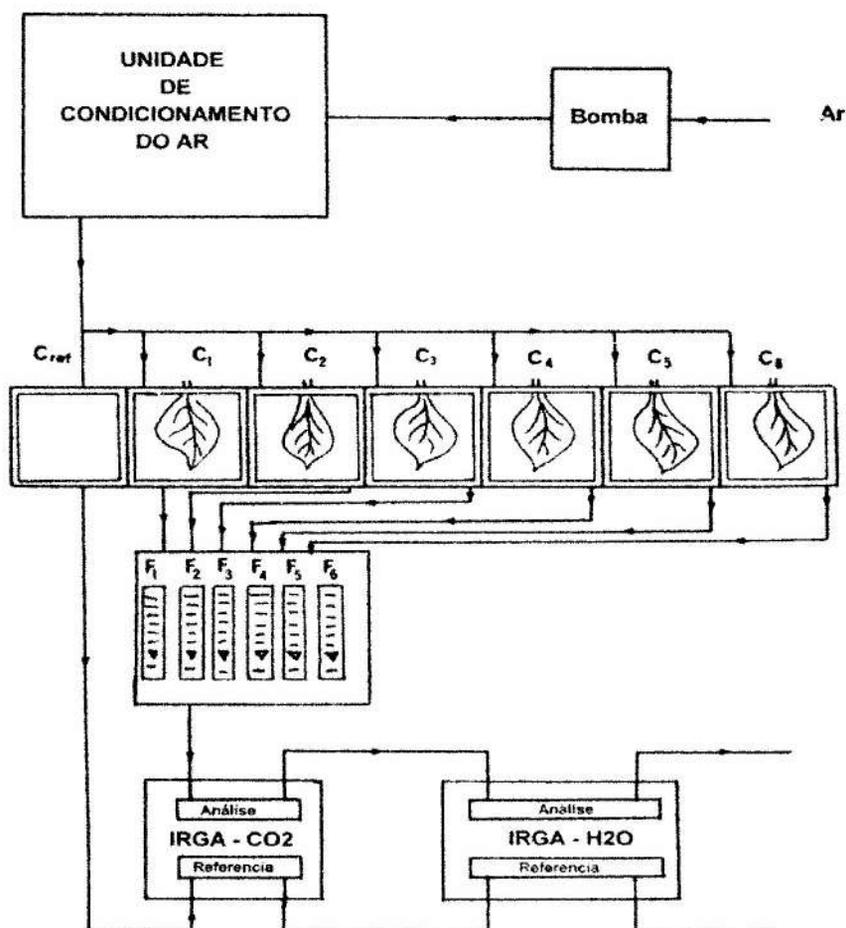


FIGURA 17 - Sistema aberto, mostrando C_n- câmaras de assimilação; F_n- Fluxímetros de área variável; B- bomba de ar; e uma unidade de condicionamento que permite a regulação da umidade do ar enviado para as câmara.

Neste caso, se o fluxo de ar for secado antes de entrar na célula de análise do IRGA, a taxa de assimilação (A) pode ser dada por:

$$A = \frac{f(c_e - c_o)}{S}$$

Onde:

f é o fluxo molar de ar

$(c_e - c_o)$ é a diferença entre a concentração molar de CO_2 (diferencial)

S é a área da folha em m^2

No caso de se usar dois IRGAS (um para CO_2 e outro para H_2O) o primeiro tem de ser equipado com filtros para excluir a banda de absorção da água ou ainda pode ser colocado primeiro no sistema e antes de entrar no IRGA CO_2 , o ar pode ser secado em colunas de perclorato de magnésio.

O efeito de “diluição” causado pelo vapor d’água sobre a concentração de CO_2 , pode ser descontado pelo uso da equação:

$$A = \frac{f \cdot (c_e - c_o)}{S} \cdot \frac{(1 - x_o)}{(1 - x_e)}$$

Onde:

x é a fração molar do vapor d’água no ar

Normalmente as misturas de calibração são fornecidas em vpm. Para se transformar em unidades molares, pode-se usar a seguinte relação:

$$M = \left(\frac{c}{22,4} \right) \cdot \left(\frac{273,13}{T} \right) \cdot \left(\frac{p}{101,325} \right) \cdot 10^{-3}$$

Onde:

M é a concentração molar de CO_2 ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$)

c é a fração molar ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), que equivale a fração volumétrica ($\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ ou vpm)

p é a pressão (kPa)

T é a temperatura absoluta (K)



5 - Considerações finais

Atualmente, estão disponíveis no mercado, sistemas portáteis para a mensuração conjunta da fotossíntese, transpiração e derivação da condutância estomática (LI-COR, PP-Systems, ADC etc.). A maioria destes sistemas funciona com base na injeção de CO₂ puro em um sistema fechado (null point), para compensar a absorção pela folha. Outros podem ainda ser usados como sistemas abertos em diferencial porém, os princípios básicos continuam os mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALVIM, P. de T. & HAVIS, J. R. A improved infiltration series for studying stomatal opening as illustrated with coffee. *Plant Physiol.* 29: 97-98, 1954.
- ALVIM, P. de T. A new type of porometer for measuring stomatal opening and its use in irrigation studies. In: F. E. ECKARDT (ed.). *Methodology of Plant Eco-Physiology.* (Arid Zone Res. 25). Pp. 325-329. UNESCO, Paris 1965.
- BEARDSSELL, M.F.; JARVIS, P.G. & DAVIDSON, B. A null-balance diffusion porometer suitable for use with leaves of many shapes. *J. Appl. Ecol.*, 9, 677-690, 1972.
- BOYNTON, W. P. & BRATTAIN, W.H. Interdiffusion of gases and vapors. *International Critical Tables.* Vol.5, p.62-63, McGraw-Hill, New York, 1929.
- DELIEU, T. & WALKER. An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol.* 71, 201-225, 1972.
- HABERLANDT, G. *Die Lichtsinnesorgane der Laubblätter.* Leipzig, 1905.
- KANEMASU, E. T.; THURTELL, G. W. & TANNER, C. B. Design, calibration and field use of a stomatal diffusion porometer. *Plant Physiol.* 44: 881-885, 1969.
- LI-COR, INC. LI-1600, Steady State Porometer, Instruction Manual. Publication 8210-0030, Lincoln, Nebraska, USA, 1989.

- LI-COR, INC. LI-700, Transient Porometer, Instruction Manual. Publication 8106-23, Lincoln, Nebraska, USA, 1981.
- LIST, R.J. Smithsonian Meteorological Tables. Viscosity and Thermal Conductivity of Air and Diffusivity of Water Vapor in Air. Vol.14, Smithsonian Miscellaneous Collection, 1966.
- McDERMITT, D.K. Sources of error in the estimation of stomatal conductance and transpiration from porometer data. Hortscience, 25(12): 1538-1548, 1990.
- MOLISCH, H. Das Offen- und Geschlossensein der Spaltöffnungen veranschaulicht durch eine neue Methode (Infiltrationsmethode). Z. Bot. 4:106-112, 1912.
- PARKINSON, K. J. & LEGG, B.J. A new method for calibrating infra-red gas analysers. J. Phys. E. Sci. Instrum. 4, 598-600, 1971.
- PEARCY, R.W.; -DETLEF SCHULZE, E. & ZIMMERMANN, R. Measurement of transpiration and leaf conductance. In: R.W.Pearcy; J. Ehleringer; H.A. Mooney & P.W. Rundel (eds). Plant Physiological Ecology: Field methods and instrumentation. Chapman and Hall London, p.137-160, 1991.
- SESTÁK, Z.; CATSKÝ, J. & JARVIS, P.G. Plant Photosynthetic Production: Manual of Methods, Junk, the Hague, pp.800, 1971.
- SLAVÍK, B. Methods of studying plant water relations. Springer-Verlag Berlin, pp.450, 1974.